

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA LECTINA
ANTIMICROBIANA DA RAIZ DE *PORTULACA ELATIOR***

JOSÉ DAYVID FERREIRA DA SILVA

Recife, PE

2016

JOSÉ DAYVID FERREIRA DA SILVA

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA LECTINA
ANTIMICROBIANA DA RAIZ DE *PORTULACA ELATIOR***

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a Patrícia Maria Guedes Paiva

Coorientadora: Prof^a. Dr^a Maria do Socorro de Mendonça Cavalcanti

Recife, PE

2016

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

Silva, José Dayvid Ferreira da

Purificação e caracterização de uma lectina antimicrobiana da raiz de *Portulaca elatior* / José Dayvid Ferreira da Silva. – Recife: O Autor, 2016.

64 f.: il.

Orientadores: Patrícia Maria Guedes Paiva, Maria do Socorro de Mendonça Cavalcanti

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia, 2016.

Inclui referências

1. Lectinas 2. Bactérias 3. Fungos I. Paiva, Patrícia Maria Guedes (orient.)
II. Cavalcanti, Maria do Socorro de Mendonça III. Título.

572.6

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017-129

JOSÉ DAYVID FERREIRA DA SILVA

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA LECTINA
ANTIMICROBIANA DA RAIZ DE *PORTULACA ELATIOR***

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

Aprovado por:

Prof^a. Dr^a Patrícia Maria Guedes Paiva (UFPE)

Prof^a. Dr^a Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho (UFPE)

Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão (UFPE)

Prof. Dr. Roberto Araújo Sá (UFPE)

Data: **26/02/2016**

Dedico

Aos meus pais, **José Carlos e Silvania**, pela minha formação moral, por sempre me apoiarem nas decisões tomadas, por serem fonte de inspiração e motivação para lutar pelos meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo. Por toda a coragem, luz, determinação e força na escolha da direção correta a tomar e por dar-me a oportunidade de conhecer e conviver com tantas pessoas especiais. Agradeço a Ele todas as vitórias e conquistas alcançadas durante a minha vida.

À minha mãe, Silvania Ferreira dos Santos Silva, e ao meu pai, José Carlos da Silva Junior, por todo o amor, carinho e empenho na minha educação. Seus exemplos de luta e determinação, em buscar sempre o melhor para os filhos, marcarão toda a minha vida.

Às minhas irmãs Dayziany e Dayvisiany Silva por todo amor, carinho e incentivo.

À professora Dra. Patrícia Paiva, por ter me recebido de braços abertos e por sido muito mais do que uma orientadora durante o período do mestrado. Obrigado pela confiança, apoio, incentivo e paciência, eles foram fundamentais para a minha formação.

À professora Dra. Maria do Socorro de Mendonça Cavalcanti, por ter feito parte dessa caminhada e por me dar todo apoio e suporte para que esse trabalho fosse concluído da melhor forma.

Ao professor Thiago Henrique Napoleão que sempre esteve presente me ajudando nos momentos mais difíceis. Seus ensinamentos e colaboração foram de suma importância para a conclusão deste trabalho.

À todos que fazem ou fizeram parte do laboratório BIOPROT, pela colaboração e em especial a Livia, Pollyana, Carlos e Leonardo pela amizade, pela ajuda quando eu desconhecia de alguma técnica.

À Felipe Borba que tem feito parte dessa minha caminhada desde a graduação, a ele devo grande parte do meu conhecimento e aprendizado na área.

Ao professor Irapuan Oliveira Pinheiro e a Amanda Mota pela ajuda na identificação do inibidor endógeno e disponibilidade para utilização do HPLC.

À turma Eternamente Fronteiras, vocês sempre serão lembrados por mim com muito carinho.

À Carolina Albuquerque Rodrigues, que mesmo nossos caminhos tendo tomado rumos diferentes, fez parte de toda essa caminhada. Meu eterno carinho.

À Ariele Mendes, amiga e irmã que a vida me presenteou.

Às Suellén e Isabela, minhas alunas de Iniciação Científica, obrigado por me ouvirem e por toda amizade construída nesse período.

Aos meus colegas e amigos da UPE que sempre estiveram presentes em minha vida (Mayra, Lorena, Vinicius, Tassia, Surama).

À eterna turma do Anexo V (Andréa, Estevão, Jamylle, João Paulo, Lucas, Mario, Mayara, Mayra, Pedro BG, Rayana, Erivan, Rafael, Marcelo, Gabriel, Pedro Peu, Guga, Vanessa Brasil) por todas as aulas relax que a gente tinha e ainda vai ter nas tardes de sexta.

Às rangueiras (Caio, Eloyse, Iasmim, Carol, Rayana, Leslie, Ádila, Chaves, Vanessa Dias, Manoela) por me mostrarem que a vida pode ser muito mais feliz quando se tem amigos.

Àqueles que por algum motivo, muitas vezes desconhecido, entraram na minha vida pra me trazer alegrias e felicidade.

“Um diamante é um pedaço de carvão que se saiu bem sob pressão.”

Autor Desconhecido

RESUMO

Plantas contêm lectinas, ligantes de carboidratos e proteínas hemaglutininas, capazes de induzir respostas biológicas em células de plantas e animais. *Portulaca elatior* é uma planta tóxica para o gado e cabras. Este estudo identificou um tecido de *P. elatior* com atividade hemaglutinante (AH), isolado a lectina a partir dele e determinada às características da lectina isolada. Extratos de folhas, caule e raiz foram investigados e o extrato de raiz foi o único a apresentar HA, com isso foi selecionado para isolamento da lectina por cromatografia em coluna de quitina. A lectina de raiz de *P. elatior* (PeRoL) eluída da coluna de quitina apresentou peptídeos com 32 e 15 kDa na SDS-PAGE sob condições não redutoras e redutoras, respectivamente. A AH de PeRoL se manteve a 120°C e numa faixa de pH de 4.0 a 8.0 e os íons Ca^{2+} e Mn^{2+} não estimularam a lectina. O dissacarídeo trealose foi o melhor carboidrato inibidor da AH. Ensaio revelaram que o extrato da raiz de *P. elatior* contém trealose e apresentou uma AH de 4^{-1} e pós-purificado de 4096^{-1} enquanto o extrato tratado com trealase apresentou AH de 256^{-1} . Estes resultados revelam que trealose é o inibidor endógeno da AH de PeRoL. PeRoL apresentou atividade bacteriostática contra *Pseudomonas aeruginosa* (CMI 32,5 µg/mL), *Enterococcus faecalis* (CMI 8,1 µg/mL) e *Staphylococcus aureus* (CMI 4,06 µg/mL) e atividade fungicida contra *Candida albicans* (CMI e CMF 16,5 µg/mL), *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* e *Candida tropicalis* (CMI e CMF 15 µg/mL). O estudo demonstrou que a raiz de *P. elatior* contém PeRoL, um ligante de quitina e lectina antimicrobiana, bem como a trealose, o carboidrato inibidor de PeRoL.

Palavras-chave: Bactérias, fungos, PeRoL, raiz, trealose.

ABSTRACT

Plants contain lectins, carbohydrate binding and hemagglutinin proteins, capable of induce biological responses in cells of plants and animals. *Portulaca elatior* is a plant toxic to cattle and goats. This study identified the *P. elatior* tissue with the best specific hemagglutinating activity (SHA), isolated the lectin from it and determined characteristics of isolated lectin. Leaf, stem and root extracts were investigated and the root extract, which was the one that presented HA, was selected to isolate lectin by chitin column chromatography. *P. elatior* root lectin (PeRoL) eluted from chitin column showed polypeptide bands with 32 and 15 kDa on SDS-PAGE under non-reducing and reducing conditions, respectively. The PeRoL HA was active at 120°C and pH range from 4.0 to 8.0 and Ca^{2+} and Mn^{2+} did not affect its HA. The disaccharide threalose was the best carbohydrate inhibitor of HA. Assays revealed that the root extract containing threalose and showed HA 4^{-1} and post-purification 4096^{-1} while the root extract treated with threalase showed HA 256^{-1} . These data revealed that trehalose is an endogenous inhibitor of PeRoL HA. PeRoL showed bacteriostatic activity against *Pseudomonas aeruginosa* (MIC 32.5 $\mu\text{g/mL}$), *Enterococcus faecalis* (MIC 8.1 $\mu\text{g/mL}$) and *Staphylococcus aureus* (MIC 4.06 $\mu\text{g/mL}$) and fungicide activity against *Candida albicans* (MIC and MFC 16.5 $\mu\text{g/mL}$), *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* and *Candida tropicalis* (MIC and MFC 15 $\mu\text{g/mL}$). The study demonstrated that root of *P. elatior* contain PeRoL, a chitin-binding and antimicrobial lectin as well as threalose, a carbohydrate inhibitor of PeRoL.

Keywords: Bacteria, fungi, PeRoL, root, threalose.

LISTA DE FIGURAS

	Pág
<u>Fundamentação teórica</u>	
Figura 1. Distribuição Geográfica da Caatinga.	17
Figura 2. <i>Portulaca elatior</i> .	21
Figura 3. Esquema representando a aglutinação de eritrócitos promovida por lectinas.	23
Figura 4. Representação da diversidade funcional das lectinas.	24
Figura 5. Classificação das lectinas quanto a estrutura.	25
 <u>Capítulo 1</u>	
Figure 1. Purification of <i>P. elatior</i> root lectin (PeRoL).	53
Figure 2. Effect of temperature (A) and effect of pH (B) on hemagglutinating activity (HA) of PeRoL.	55
Figure 3. HPLC profile of trehalose (A) and <i>P. elatior</i> root extract (B). The arrows indicate the peaks corresponding to trehalose.	57

LISTA DE TABELAS

Pág

Fundamentação teórica

Tabela 1. Atividades biológicas e aplicações das lectinas em diferentes áreas.	27
---	----

Capítulo 1

Figure 1. Hemagglutinating activity of PeRoL in presence of carbohydrates and glycoproteins.	53
---	----

Sumário

1. INTRODUÇÃO	15
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	17
2.1. Ecossistema Caatinga.....	17
2.2. Plantas Tóxicas	19
2.3. Família Portulacaceae.....	20
2.4. Lectinas.....	22
2.4.1. Classificação	25
2.4.2. Funções e Aplicações	26
2.4.3. Aplicação das Lectinas na Microbiologia	28
3. OBJETIVOS	32
3.1. Objetivo geral	32
3.2. Objetivos específicos	32
4. REFERÊNCIAS.....	33
5. ARTIGO	43
1. Introduction.....	46
2.1. Preparation of extracts.....	47
2.2. Protein concentration and hemagglutinating activity	48
2.3. Isolation of Portulaca elatior root lectin (PeRoL).....	48
2.4. Lectin characterization	49
2.5. Endogenous inhibitor investigation	50
2.6. Antimicrobial assay	51
3. Results and discussion.....	52
4. Conclusion.....	58
5. References	59
6. CONCLUSÃO	64

1. INTRODUÇÃO

A rica biodiversidade brasileira inclui inúmeras plantas com potencial farmacológico e que vêm sendo utilizadas pela população no controle de diversas doenças (SANTOS *et al.*, 2009). O semiárido brasileiro possui uma parte significativa desta diversidade, principalmente na região conhecida como Caatinga (NASCIMENTO *et al.*, 2011). A identificação de compostos bioativos em plantas da Caatinga contribui para promover o desenvolvimento biotecnológico do semiárido e valorizar o bioma como fonte de recursos para o homem, o que estimula a sua conservação (TABARELLI *et al.*, 2000; ALVEZ, 2007).

Lectinas são proteínas que ligam carboidratos ou glicoconjugados, de forma específica e reversível (NUNES *et al.*, 2011). São moléculas com diversas propriedades biológicas e vastamente encontradas em plantas. Sharon e Lis (2004) afirmam que as lectinas desempenham papéis importantes no controle da biossíntese de glicoconjugados, imunidade inata, regulação do crescimento e apoptose das células e regulação do ciclo celular. Do ponto de vista biotecnológico, têm sido relatadas atividades antitumoral, anti-inflamatória, inseticida e antimicrobiana (PAIVA *et al.*, 2010; 2013).

A atividade antibacteriana das lectinas resulta da interação com ácidos teicoicos e teicurônicos, peptideoglicanos e lipopolissacarídeos presentes na parede celular bacteriana. As lectinas podem causar a formação de poros na parede celular promovendo a morte bacteriana pelo extravasamento do conteúdo celular (RATANAPO *et al.*, 2001; CORREIA *et al.*, 2008; PAIVA *et al.*, 2010). A atividade antifúngica de lectinas resulta da interação com a parede celular de hifas, o que

pode levar à redução na absorção de nutrientes, assim como interferir no processo de germinação de esporos (SÁ *et al.*, 2009; LAM & NG, 2011).

O gênero *Portulaca* apresenta cerca de 120 espécies no mundo e no Brasil apenas 13 espécies foram relatadas (COELHO & GIULIETTI, 2010). Diversas espécies desse gênero são descritas no Nordeste brasileiro, sendo *Portulaca elatior* (MART. EX ROHRB, 1872) encontrada nos municípios de Juazeiro e Castro Alves, Estado da Bahia, no município de Petrolândia, Estado do Pernambuco, no município de Aroeiras, Estado da Paraíba e em outros locais do semiárido nordestino. Essa espécie foi relatada por produtores rurais, como causa de manifestações clínicas de perturbações gastrintestinais em bovinos (COELHO *et al.*, 2010).

O presente trabalho teve como objetivos avaliar a presença de lectina em extratos de folhas, caule e raiz de *P. elatior*, purificar lectina a partir do extrato que apresentou a maior atividade hemaglutinante específica e caracterizar a lectina isolada por métodos eletroforéticos, quanto à afinidade da lectina por carboidratos e/ou glicoproteínas, estabilidade frente à variações de temperatura e pH, efeito de íons divalentes. Por fim avaliar a atividade antimicrobiana da lectina frente a diferentes espécies de importância médica. O estudo é a primeira etapa para identificação de moléculas com propriedades farmacológicas em *P. elatior*.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Ecossistema Caatinga

O número de espécies de plantas conhecidas no Brasil é de aproximadamente 43 mil. Uma parte significativa desta diversidade está contida na Caatinga, um ecossistema exclusivamente brasileiro, encontrado na região semiárida nordestina (NASCIMENTO *et al.*, 2011).

A Caatinga ocupa uma área equivalente a 11% do território nacional, distribuída pelos estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte, Piauí, Sergipe e o norte de Minas Gerais (Figura 1). Este tem sido considerado um ecossistema bastante degradado, o que tem comprometido a sua biodiversidade. É composta por uma grande variedade de plantas, a depender dos períodos de chuva, tipo de solo e altitude (LEAL *et al.* 2005; ARAÚJO, *et al.*, 2008; ALVES *et al.* 2009; MMA, 2015).

Figura 1. Distribuição Geográfica da Caatinga.



Fonte: ALVES *et al.*, 2009

De acordo com Drummond *et al.* (2002) e Leal *et al.* (2005), a Caatinga é composta de florestas secas com árvores, arbustos e ervas. A precipitação anual no bioma está abaixo de 1.000 milímetros e é fortemente concentrada numa estação chuvosa curta, seguida por uma estação seca marcante de até 10 meses (MENEZES & SAMPAIO, 2000).

Estima-se que pelo menos 932 espécies já foram registradas para a região, sendo 380 endêmicas (MMA, 2011). A Caatinga é um tipo de formação vegetal com características bem definidas: árvores baixas e arbustos que, em geral, perdem as folhas na estação seca (espécies caducifólias). Apresenta três estratos: arbóreo (8 a 12 metros), arbustivo (2 a 5 metros) e herbáceo (abaixo de 2 metros) (TABARELLI *et al.*, 2000; ALVES, 2007).

Várias espécies de plantas encontradas na Caatinga apresentam atividades biológicas diversas, dentre elas atividade anticolinesterásica (TREVISAN; MACEDO, 2003), gastroprotetora (PEREIRA *et al.*, 2012), analgésica (CARVALHO *et al.*, 1996), antialérgica (ALBUQUERQUE *et al.*, 2011), antiinflamatória (CARVALHO *et al.*, 1996; ALBUQUERQUE *et al.*, 2011), broncodilatadora (LEAL *et al.*, 2006), anticoagulante (ARAÚJO *et al.*, 2011), ansiolítica (RIBEIRO *et al.*, 2006), antiplasmodica (KÖHLER *et al.*, 2002) e antimicrobiana (GOMES *et al.*, 2013; CARVALHO *et al.*, 2015).

O semiárido brasileiro possui uma parte significativa da grande biodiversidade do país, principalmente na Caatinga (NASCIMENTO *et al.*, 2011). A identificação de compostos bioativos em plantas desta região contribui para promover o desenvolvimento biotecnológico e valorizar o ecossistema como fonte de recursos para o homem, o que estimula a sua conservação (TABARELLI *et al.*, 2000; ALVES *et al.*, 2007).

2.2. Plantas Tóxicas

Entende-se por planta tóxica aquela capaz de causar uma determinada enfermidade ou até mesmo morte, para homens e/ou animais, quando consumida *in natura* (RIET-CORREA *et al.*, 1993). Numerosas espécies de plantas, no mundo todo, são consideradas tóxicas, principalmente na pecuária (BURROWS AND TYRL, 2013). No Brasil, o número de plantas conhecidas e relatadas como tóxicas para ruminantes e equinos têm tido um aumento gradual. Em 1990, Tokarnia *et al.* (1990) mencionam a existência de 60 espécies tóxicas. Em 2000, eram conhecidas 90 espécies pertencentes a 52 gêneros (RIET-CORREA & MEDEIROS, 2001). Em 2004 este número aumentou para 113 espécies e 64 gêneros (RIET-CORREA *et al.*, 2007); em 2008, 122 espécies e 71 gêneros (RIET-CORREA *et al.*, 2009) e, em 2012, 129 espécies e 78 gêneros (RIET-CORREA *et al.*, 2012).

São conhecidas pelo menos 38 plantas tóxicas na Região Nordeste, sendo as mais importantes *Mimosa tenuiflora*, para caprinos e ovinos, *Mascagnia rigida* e *Thilao glaucocarpa* para bovinos (TOKARNIA *et al.*, 2000, RIET-CORREA *et al.*, 2006). O número de plantas tóxicas conhecidas aumenta consideravelmente com a exploração de novas áreas. Um exemplo disso é o Estado da Paraíba, onde até o ano 2000 eram conhecidas 8 plantas tóxicas e, após a criação de um grupo de pesquisa em plantas tóxicas esse número aumentou para 21 (RIET-CORREA *et al.*, 2006).

Dentre as diversas patologias causadas por plantas tóxicas, destacam-se os distúrbios gastrointestinais, pois podem causar morte súbita nos animais (PESSOA *et al.*, 2013). São conhecidas, no nordeste brasileiro, atualmente, 7 espécies de plantas tóxicas que afetam o sistema digestivo dos ruminantes: *Enterolobium*

contortisiliquum (TOKARNIA *et al.*, 1999; BENÍCIO *et al.*, 2007) *Stryphnodendron coriaceum* (TOKARNIA *et al.*, 1991) e *Luetzelburgia auriculata*, que causam alterações digestivas com lesões degenerativas dos pré-estômagos e diarreia ou fezes amolecidas (MELLO *et al.*, 2010); *Arrabidaea corallina*, que causa diarreia (PESSOA *et al.*, 2010); *Plumbago scandens*, que causa degeneração e necrose da mucosa dos pré-estômagos com pigmentação da urina e mucosa do trato digestivo (TOKARNIA & DÖBEREINER 1975, 1976, MEDEIROS *et al.*, 2001); *Centratherum brachylepis*, que causa degeneração e necrose dos pré-estômagos com edema de face e garganta (MEDEIROS *et al.*, 2009); *Dieffenbachia* sp., que causa edema na língua e face (DANTAS *et al.*, 2007) e *Portulaca elatior*, que ataca primariamente o sistema digestivo e depois o sistema nervoso dos ruminantes (GALIZA *et al.*, 2011).

2.3. Família Portulacaceae

Com distribuição cosmopolita, a família Portulacaceae possui cerca de 30 gêneros e 500 espécies. Os gêneros mais representativos são: *Portulaca* com cerca de 100 espécies, *Calandrinia* com cerca de 150 espécies e *Talinum* com mais de 50 espécies (CAROLIN, 1993; NYFFELER & EGGLI 2010). Coelho (2015) relatou, no Brasil, 15 espécies em dois gêneros: *Talinum* e *Portulaca*, sendo o *Portulaca* com 13 espécies.

O gênero *Portulaca* apresenta plantas herbáceas, raramente arbustivas ou arbóreas, geralmente suculentas, de folhas simples, alternas, sub-opostas, verticiladas, inflorescências cimosas ou apresentando flores solitárias. Suas flores são bissexuadas, raramente unissexuadas, actinomorfas e monoclamídeas (geralmente com um par de bractéolas) (COELHO *et al.*, 2010).

A espécie *Portulaca elatior* (Figura 2) é caracterizada por apresentar hábito ereto, pouco comum no gênero *Portulaca*, com caules variando de 20 a 80 cm de altura. O caule é bastante ramificado desde a base, apresentando cor verde ou avermelhado, neste último caso quando encontrado em ambientes áridos da Caatinga. As folhas se apresentam lineares e pouco suculentas (COELHO *et al.*, 2010).

Figura 2. *Portulaca elatior*.



Fonte: COELHO *et al.*, 2010

Diversas espécies do gênero *Portulaca* são descritas na região do semiárido brasileiro. *P. elatior* já foi relatada no Estado da Bahia, municípios de Castro Alves e Juazeiro, em Pernambuco no município de Petrolândia e na Paraíba no município de Aroeiras (GALIZA *et al.*, 2011; MACHADO-FILHO *et al.*, 2012). Como já mencionado, essa espécie foi descrita por produtores rurais, como causa de manifestações clínicas de perturbações gastrintestinais em ruminantes. Os sinais

clínicos observados foram intensa salivação, relutância em se movimentar, tremores de lábios, marcha levemente incoordenada arrastando as pinças dos membros posteriores, diarreia, timpanismo, dor abdominal, gemidos, desidratação e berros constantes. A morte ocorria 2 a 48 horas após o início dos sinais clínicos. (DURVAL *et al.* 2006; ALBUQUERQUE *et al.* 2007; SILVA *et al.* 2009; COELHO *et al.*, 2010; GALIZA *et al.*, 2010).

2.4. Lectinas

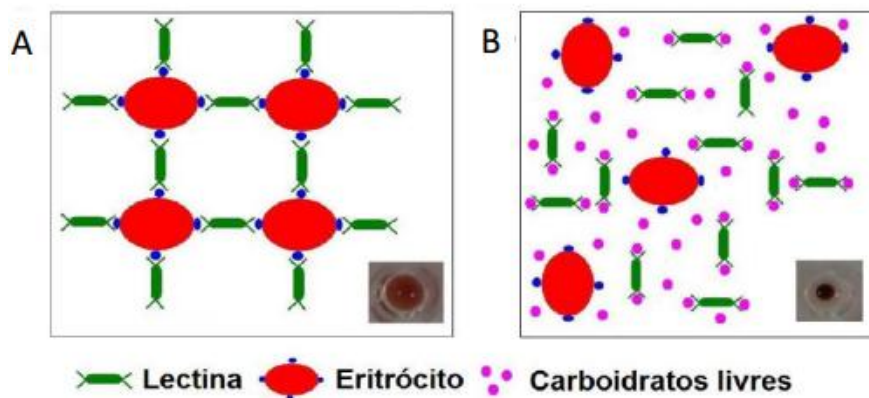
Lectinas são proteínas com a capacidade de reconhecer e se associar por interações de Van der Waals ou pontes de hidrogênio, de forma reversível e com elevada afinidade, a carboidratos específicos sem, contudo, apresentarem características imunológicas ou promovem alteração na estrutura covalente do carboidrato (LIS & SHARON, 1998; CAMACHO, 2007; SILVA *et al.*, 2010; KARNCHANATAT, 2012; FREIRE *et al.*, 2015). Estas proteínas detectadas pela sua capacidade de se ligar aos carboidratos da superfície de células (PAIVA *et al.*, 1992; LAM *et al.*, 2011; GEMEDE *et al.*, 2014).

A presença de lectinas em uma amostra pode ser detectada a partir de ensaios de aglutinação, sendo mais comumente utilizado o de hemaglutinação (Figura 3), no qual é realizado através de uma diluição seriada da amostra contendo lectina e posterior incubação com eritrócitos; a rede formada entre os eritrócitos constitui o fenômeno de hemaglutinação. Os eritrócitos utilizados podem ser de humanos ou de animais, os quais podem ser tratados enzimaticamente (com tripsina, papaína, entre outras) ou quimicamente (com glutaraldeído ou formaldeído), aumentando ou não a sensibilidade das células à lectina (COELHO & SILVA, 2000;

SANTOS *et al.*, 2005). O ensaio de inibição por carboidratos se dá pela adição de um açúcar ou glicoproteína ao tampão NaCl 0,15M, assim é possível verificar a especificidade da lectina.

Atualmente, sabe-se que as lectinas são amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em seres unicelulares (IMBERT *et al.*, 2004), animais (MOURA *et al.*, 2006) e vegetais (LEITE *et al.*, 2005; PAIVA *et al.*, 2010). No entanto, as primeiras lectinas foram extraídas de plantas, devido à facilidade de extração e ao rendimento elevado (SHARON & LIS, 1990).

Figura 3. Esquema representando a aglutinação de eritrócitos promovida por lectinas. Rede de aglutinação formada pela ligação de uma lectina aos carboidratos da superfície dos eritrócitos (A). Inibição da formação da rede de aglutinação por carboidratos livres (B).

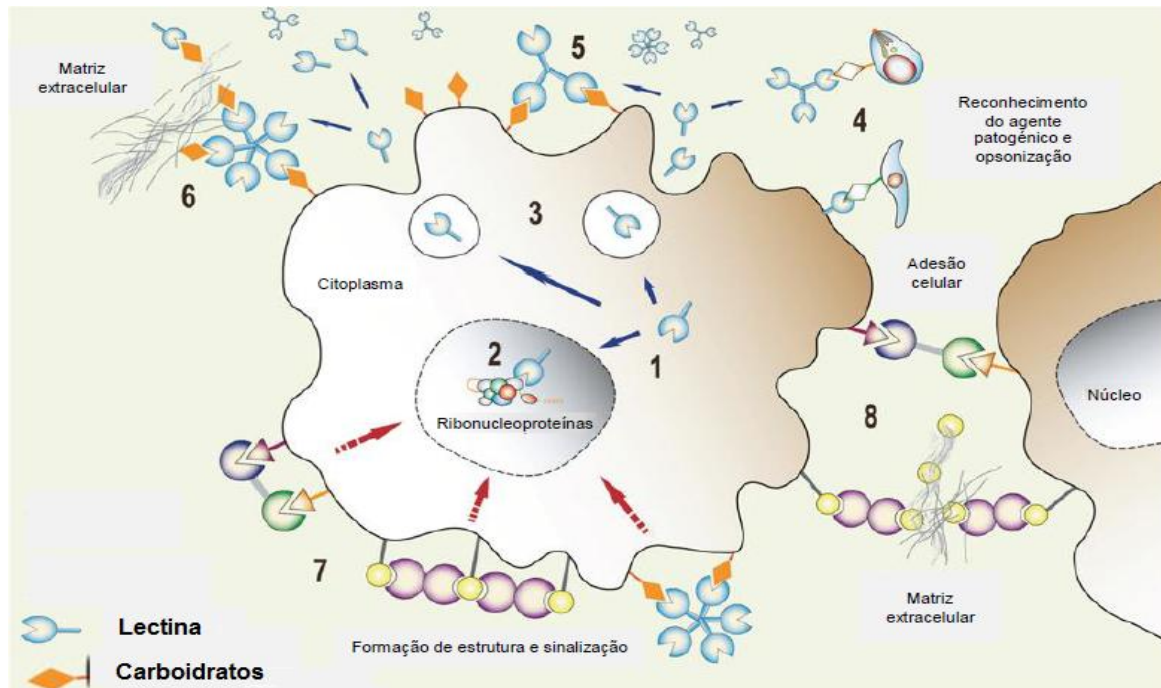


Fonte: PAIVA *et al.*, 2011

Nos vegetais, as lectinas têm sido encontradas em cerne (SÁ *et al.*, 2008), folhas (NAPOLEÃO *et al.*, 2012), flores (SANTOS *et al.*, 2009), sementes (SILVA *et al.*, 2012), cascas (VAZ *et al.*, 2010), raízes (AGRAWAL *et al.*, 2011) e rizomas (YANG *et al.*, 2011; SANTANA *et al.*, 2012).

As lectinas, devido as suas diferenças estruturais e de especificidade, apresentam uma grande variedade funcional. A Figura 4 representa algumas funções desempenhadas pelas lectinas.

Figura 4. Representação da diversidade funcional das lectinas.



Adaptado de VASTA *et al.* (2012)

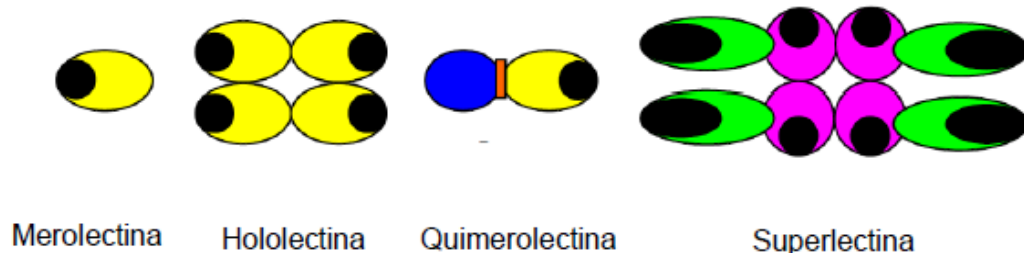
As lectinas sintetizadas que se encontram no citoplasma (1) podem ser armazenadas nos vacúolos de reserva proteica, podem ser translocadas para o núcleo da célula (2) ou secretadas para o meio extracelular (3), onde funcionam como receptores de carboidratos de agentes patogênicos (4), estabelecem ligações entre si, formando complexos que se ligam a carboidratos presentes na célula que as sintetizou (5) e a carboidratos da matriz extracelular (6). Podem desencadear cascatas de sinalização (apoptose, migração celular, liberação de mediadores) (7) ou promover interações célula-célula e célula-matriz (8) (VASTA *et al.*, 2012).

2.4.1. Classificação

As lectinas podem ser classificadas de acordo com sua estrutura, especificidade de ligação ao carboidrato e domínio de reconhecimento ao carboidrato (CRD – *Carbohydrate Recognition Domain*) (VANDENBORRE *et al.*, 2011).

Quanto à estrutura, as lectinas podem ser classificadas em quatro grupos: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas (Figura 5). As merolectinas são proteínas que contêm apenas um domínio de ligação a carboidratos. As hololectinas têm pelo menos dois domínios de ligação a carboidratos idênticos. As quimerolectinas são constituídas por um ou mais domínios de ligação a carboidratos incorporando outros domínios que exercem outra atividade biológica, sendo as hololectinas e as quimerolectinas estruturas bastante abundantes nas lectinas de plantas. Por fim, as superlectinas que possuem pelo menos dois domínios de ligação a carboidratos estruturalmente diferentes (VANDENBORRE *et al.*, 2011; KARNCHANATAT, 2012; FREIRE *et al.*, 2015).

Figura 5. Classificação das lectinas quanto a estrutura, com os sítios de ligação a carboidratos representados em preto e domínio que exerce atividade biológica em azul.



Adaptado de: Karnchanatat (2012).

As lectinas também são classificadas de acordo com a especificidade de ligação ao carboidrato em seis grupos: ligadoras de glicose/manose, ligadoras de galactose/N-acetilgalactosamina, ligadoras de N-acetilglicosamina, ligadoras de L-fucose, ligadoras de ácido siálico e ligadoras de glicanos complexos (PEUMANS *et al.*, 1995; KARNCHANATAT, 2012).

A classificação *CRD* é atribuída em função da estrutura dos domínios que estabelecem e reconhecem a ligação ao carboidrato. Sendo assim, as lectinas de plantas são classificadas em quatro grupos: lectinas de monocotiledôneas que se ligam a carboidratos α -D-manose, lectinas de domínio folhas- β , domínio homólogo à cianovirina-N e lectinas de leguminosas, sendo este último grupo o mais estudado (VARROT *et al.*, 2011; JOHN *et al.*, 2013).

2.4.2. Funções e Aplicações

As lectinas de plantas desempenham diversas funções fisiológicas, uma delas é a proteção contra agentes patogênicos externos devido a sua capacidade de aglutinar e imobilizar esses agentes. Para desempenhar esta função as lectinas estão presentes nos locais com maior potencial de invasão e tem a capacidade de se ligar a vários fungos inibindo o seu crescimento nas plantas; outra função é a capacidade de interagir com células animais, o que pode ser visto no contexto ecológico como proteção das plantas aos predadores. Quando ingeridas por insetos e herbívoros ligam-se a receptores glicosilados ao longo do trato intestinal provocando desconforto, repelindo assim o predador (efeito antinutricional) (SHARON & LIS, 2004; VANDENBORRE *et al.*, 2011; KARNCHANATAT, 2012; BUUL & BROUNS, 2014).

Atualmente, as lectinas são alvo de grande interesse devido as suas aplicações na agricultura, na biotecnologia e investigação biomédica (Tabela 1).

Tabela 1. Atividades biológicas e aplicações das lectinas em diferentes áreas

Atividade / aplicação	Eventos envolvidos
Inseticida	Modulação da atividade enzimática com consequente ruptura das microvilosidades, interações entre lectina e receptores glicosilados do trato digestivo dos insetos. ⁽²⁾
Antibacteriana	Interação com componentes da parede celular bacteriana. ⁽²⁾⁽⁴⁾
Antifúngica	Ligação às hifas, resultando na diminuição da absorção de nutrientes e interferência no processo de germinação dos esporos. ⁽³⁾⁽⁴⁾
Antiviral	Interferência na fase inicial do ciclo de replicação do vírus suprimindo o crescimento. ⁽²⁾⁽³⁾
Antitumoral	Reconhecimento de células tumorais e indução de apoptose e necrose, estimulação mitogênica e ação imunomoduladora. ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾
Biomarcador	Marcadores de superfície celular. ⁽⁵⁾
Purificação e caracterização de polissacarídeos e glicoconjugados	Emprego de lectinas imobilizadas em matrizes cromatográficas para estudos de proteoglicanos, glicoproteínas ou glicolípidos. ⁽³⁾

Referências: SILVA *et al.*, 2010 (1); HAMID, 2013 (2); BAH *et al.*, 2013 (3); SILVA *et al.*, 2013 (4); RÉGO *et al.*, 2013 (5);

2.4.3. Aplicação das Lectinas na Microbiologia

Recentes estudos têm mostrado o potencial das lectinas na Microbiologia. As lectinas possuem a habilidade de reconhecer especificamente carboidratos e com isso se tornam ferramentas valiosas para estudar a interação entre os carboidratos presentes nas células eucarióticas e patógenos. Muitos patógenos iniciam a adesão seguida da infecção usando carboidratos da superfície celular como receptores ou ligantes (ORDÓÑEZ *et al.*, 2006; CARVALHO *et al.*, 2015; BRAGA *et al.*, 2015). Como exemplos, foi demonstrado que *Escherichia coli* se liga a resíduos de manose nas células hospedeiras (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2009), *Neisseria gonorrhoea* se liga especificamente a N-acetil-lactosamina, *Streptococcus pneumonia* se liga a pentasacarídeos, tetra e trisacarídeos, enquanto *Pseudomonas aeruginosa* se liga especificamente a fucose (BARTHELSON *et al.*, 1998).

As bactérias possuem em suas paredes celulares ácidos teicóicos e teicurônicos, peptidoglicanos e lipopolissacarídeos que podem interagir com lectinas. A habilidade de lectinas de ligar especificamente a carboidratos permite o emprego dessas proteínas como sondas-diagnóstico para identificação de bactérias patógenas, o que se baseia na reação de aglutinação seletiva entre lectina e bactéria (IORDACHE *et al.*, 2015). Diferentes padrões de aglutinação de bactérias, promovidas por 23 lectinas, foram analisadas e mostraram que a interação lectina-bactéria é uma boa ferramenta para identificar rapidamente espécies de *Mycobacterium* (ATHAMNA *et al.*, 2006). Monteiro *et al.* (2002) mostraram que o uso da lectina de sementes de *Amburana cearenses* é um bom marcador para *S. aureus* e *Candida sp.* Ratanapo *et al.* (2001) mostraram duas lectinas, MLL 1 e 2, de folhas

de *Morus alba*, com especificidade para ácido N-glicosilneuramínico contra bactérias fitopatogênicas, propondo uma possível função na defesa de plantas.

Lectinas também têm sido usadas com grande sucesso na identificação de fungos, devido a sua alta especificidade a carboidratos presentes na parede celular fúngica (ZABEL & MORRELL, 1992; MONTEIRO *et al.*, 2002). O conhecimento do perfil sacarídico na superfície fúngica habilita o uso de lectinas como promissoras sondas celulares, que podem servir como carreadores de agentes antifúngicos que utilizam, como alvos específicos, os carboidratos existentes na superfície da célula do microrganismo (LEAL *et al.*, 2007).

As lectinas possuem ação antimicrobiana, o que pode levar à inibição do crescimento ou até mesmo à morte do microrganismo. Atividade antifúngica foi observada para uma lectina isolada de folhas de *Schinus terebinthifolius* que teve ação frente a *Candida albicans* (CMI de 6,5 e CMB de 26 µg/mL) (GOMES *et al.*, 2013), sementes de *Castanea molissima* frente aos fungos *Botrytis cinerea*, *Mycosphaerella arachidicola* e *Physalospora piricola* (WANG & NG, 2003), bem como para a lectina de sementes de *Indigofera heterantha*, na qual teve ação frente a *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus oryzie*, e *Aspergillus niger* (QADIR *et al.*, 2013). Xu *et al.* (1998) purificaram e caracterizaram uma lectina da *Gastrodia elata* que inibiu o crescimento dos fungos fitopatógenos *Valsa ambiens*, *Rhizoctonia solani*, *Gibberella zeae*, *Ganoderma lucidum* e *Botrytis cinerea*. Boteli *et al.* (2007) mostraram que lectinas podem formar uma barreira na superfície da parede celular de *Candida sp.*, alterando sua estrutura e permeabilidade (BOTELI *et al.*, 2007). Efeitos indiretos relacionados a ligação de quitina na parede celular também estão sendo estudados (LATGE *et al.*, 2007; LAM *et al.*, 2011).

Estudos comparativos com a lectina extraída de sementes de *Artocarpus heterophyllus*, *Canavalia ensiflora*, *Pisum sativum* e *Lens culinaris* apresentou um CMI de 1 mg/mL para as 4 lectinas testadas contra *Bacillus subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, porém apenas a lectina de *Artocarpus heterophyllus* foi bactericida (NAIR, et al., 2013). Petnual et al. (2010) reportou atividade antimicrobiana da lectina de rizoma de *Curcuma longa* para *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, e *C. albicans*, sendo *P. aeruginosa* a mais sensível após tratamento com a proteína. A lectina de sementes de *Indigofera heterantha* apresentou um efeito bactericida, sendo o CMB de 500 µg/mL, contra *K. pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli* e *Bacillus subtilis* (QADIR et al., 2013). A lectina extraída de folhas de *Schinus terebinthifolius* (StELL) apresentou atividade bactericida contra *E. coli* (CMI de 28,75 e CMB de 115 µg/mL), *K. pneumoniae* (CMI de 3,59 e CMB de 115 µg/mL), *P. aeruginosa* (CMI de 1,79 e CMB de 14,37 µg/mL), *Proteus mirabilis* (CMI de 3,59 e CMB de 14,37 µg/mL), *S. aureus* (CMI de 1,79 e CMB de 7,18 µg/mL) e *Salmonella enteritidis* (CMI de 0,45 e CMB de 115 µg/mL) (GOMES et al., 2013).

Moura et al. (2015) mostraram que a lectina de *Moringa oleifera* (WSMoL) inibiu o crescimento bacteriano, em poucas horas, de *Bacillus pumillus*, *Bacillus megaterium*, *Micrococcus* sp., *Pseudomonas* sp., *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas fluorescens* e *Serratia marcescens*. WSMoL também provocou a perda da integridade da membrana celular de *S. marcescens*, além da liberação de proteínas intracelulares para o meio extracelular.

Avanços biotecnológicos e farmacêuticos em diversas áreas vêm sendo estudados, através da ação das lectinas na regulação de vias celulares, nas suas funções fisiológicas de comunicação célula-célula e patológicas de interação hospedeiro-patógeno. Contudo, estudos mais detalhados sobre o efeito das lectinas

nas células humanas, a médio e longo prazo, devem ser realizados, principalmente, por conta dos efeitos tóxicos que algumas destas proteínas possuem.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Isolar, caracterizar e determinar o potencial antimicrobiano da lectina presente em raiz de *P. elatior*.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a presença de lectina em extratos de folhas, caule e raiz de *P. elatior*.
- Purificar lectina a partir do extrato com a maior atividade hemaglutinante específica.
- Caracterizar a lectina isolada por métodos eletroforéticos.
- Determinar a afinidade da lectina por carboidratos e/ou glicoproteínas, sua estabilidade frente à variações de temperatura, pH e o efeito de íons divalentes na sua atividade hemaglutinante;
- Avaliar a atividade antimicrobiana da lectina, determinando a concentração mínima inibitória (CMI), a concentração mínima bactericida (CMB) e a concentração mínima fungicida (CMF) frente a diferentes espécies de importância médica.
- Avaliação e identificação do inibidor endógeno.

4. REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, P.; *et al.* **A *Mesorhizobium* lipopolysaccharide (LPS) specific lectin (CRL) from the roots of nodulating host plant, *Cicer arietinum*.** Biochimie, 2011. 93: 440–449.
- ALBUQUERQUE, R. J. D. M.; LEAL, L. K. A. M.; BANDEIRA, M. A.; VIANA, G. S. B.; RODRIGUES, L. V. **Chalcones from *Myracrodruon urundeuva* are efficacious in guinea pig ovalbumin- induced allergic conjunctivitis.** Revista Brasileira de Farmacognosia, 2011. 21(6): 953–962.
- ALBUQUERQUE, U. P.; MEDEIROS, P. M.; ALMEIDA, A. L. S.; MONTEIRO, J. M.; NETO, E. M. F. L.; MELO, J. G.; SANTOS, J. P. **Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach.** Journal Ethnopharmacol, 2007. 114: 325-354.
- ALVES, J. J. A. **Geoeecologia da caatinga no semiárido do Nordeste brasileiro.** CLIMEP: Climatologia e Estudos de Paisagem, 2007. 2(1): 58-71.
- ALVES, J. J. A.; ARAÚJO, M. A.; NASCIMENTO, S. S. **Degradação da Caatinga: uma investigação ecogeográfica.** Revista Caatinga, 2009. 22(3): 126–135.
- ARAÚJO, R. M. S.; VAZ, A. F. M.; SANTOS, M. E.; *et al.* **A new exogen anticoagulant with high selectivity to intrinsic pathway of coagulation.** Thrombosis Research, 2011. 128: 395–397.
- ARAÚJO, T. A. S.; ALENCAR, N.; AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P. **A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge.** Journal of Ethnopharmacology, 2008. 120: 72–80.
- ATHAMNA, A.; *et al.* **Adherence of *Mycoplasma pneumoniae* to human alveolar macrophages.** Immunology & Medical Microbiology, 2006. 15(2-3): 135–141.
- BAH, C.; FANG, E.; NG, T. **Medicinal Applications of Plant Lectins.** In: FANG, E.; NG, T. *Antitumor Potential and other Emerging Medicinal Properties of Natural Compounds*. 1.^a ed. Springer Science+Business Media Dordrecht, 2013. 55-74.
- BARTHELSON, R.; *et al.* **Adherence of *Streptococcus pneumoniae* to respiratory epithelial cells is inhibited by sialylated oligosaccharides.** Infection and Immunity, 1998. 66(4): 1439-44.

- BENÍCIO, T. M. A.; *et al.* **Intoxication by the pods of *Enterolobium contortisiliquum* in goats.** In: Panter K.E., Wierenga T.L. & Pfister J.A. (Ed.), *Poisonous Plants: global research and solutions*. 2007. 80-85.
- BOLETI, A. P.; FREIRE, M. G.; COELHO, M. B.; SILVA W.; BALDASSO P. A.; GOMES, V. M.; MARANGONI S.; NOVELLO J. C.; MACEDO M. L. **Insecticidal and antifungal activity of a protein from *Pouteria torta* seeds with lectin-like properties.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007. 55(7): 2653-8.
- BRAGA, A. A.; RODRIGUES E LACERDA, R.; MEDEIROS, G. K.; GONÇALVES, G. F.; PESSOA, H. D. E.; *et al.* **Antibacterial and Hemolytic Activity of a new Lectin Purified from the Seeds of *Sterculia Foetida* L.** *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2015 175: 1689–1699.
- BURROWS, G. E.; TYRL, R. J. **Toxic Plants of North America (second ed.)**. Iowa State University Press, 2013.
- BUUL, V.; BROUNS, F. **Health effects of wheat lectins: A review.** *Journal of Cereal Science*, 2014. 59: 112-117.
- CAMACHO, N. N. **Expressão heteróloga da lectina de *Bauhinia forficata* Link em *Escherichia coli* e efeito sobre linhagens celulares tumorais.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pelotas, 2007.
- CAROLIN, R.C. *Portulacaceae*. In: K. KUBITZKI, J.B. RHOWER & V. BITTRICH. **The Families and Genera of Vascular Plants.** Flowering Plants –Dicotyledons (2), Berlin, Ed. Springer Verlag. 1993. 544-555.
- CARVALHO, J. C. T.; TEIXEIRA, J. R. M.; SOUZA, P. J. C.; *et al.* **Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract.** *Journal of Ethnopharmacology*, 1996. 53: 175–178.
- CARVALHO; *et al.* **Purification, characterization and antibacterial potential of a lectin isolated from *Apuleia leiocarpa* seeds.** *International Journal of Biological Macromolecules*, 2015. 75: 402–408.
- COELHO, A. A. O. P.; GIULIETTI, A. M. **O gênero *Portulaca* L. (Portulacaceae) no Brasil.** *Acta Botanica Brasilica*, Feira de Santana, 2010. 24(3): 655-670.

COELHO, A. A. O. P.; GIULIETTI, A. M.; HARLEY, R. M.; YESILYURT J. C. **Synonymies and typifications in *Portulaca* (Portulacaceae) of Brazil.** Kew Bulletin, 2010. 65: 37-43.

COELHO, A. A. O. P.; ZAPPI, D. **Portulacaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB20618>>. Acesso em: 22 Fev. 2015.

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.

DANTAS, A. C.; *et al.* **Intoxicação natural por comigo-ninguém-pode (*Dieffenbachia* sp.) em caprino.** Ciência Veterinária nos Trópicos, 2007. 10: 119-123.

DRUMOND, M. A.; *et al.* **Inventário e sociabilidade de espécies arbóreas e arbustivas da Caatinga na Região de Petrolina, PE.** Brasil Florestal, 2002. 21(74): 37–43.

DURVAL, M. S.; RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R. M. T.; OLIVEIRA, O. F. **Plantas tóxicas para ruminantes e eqüídeos no Seridó Oriental e Ocidental do Rio Grande do Norte.** Pesquisa Veterinária Brasileira, 2006. 26: 223-236.

FREIRE, J. E. C.; VASCONCELOS, I. M.; *et al.* **Mo-CBP3, an Antifungal Chitin-Binding Protein from *Moringa oleifera* Seeds, Is a Member of the 2S Albumin Family.** PLoS ONE, 2015. 10(3): e0119871.

GALIZA, G. J. N.; PIMENTEL, L. A.; OLIVEIRA, D. M.; *et al.* **Intoxicação por *Portulaca elatior* (Portulacaceae) em caprinos.** Pesquisa Veterinária Brasileira, 2011. 31(6): 465-470.

GEMEDE, H.; RATTI, N. **Antinutritional factors in plant foods: potential health benefits and adverse effects.** Global Advanced Research Journal of Food Science and Technology, 2014. 3: 103-117.

GOMES, F. S.; PROCÓPIO, T. F.; NAPOLEÃO, T. H.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G. **Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf.** Journal of Applied Microbiology., 2013. 114: 672-679.

- HAMID, R.; MASOOD, A.; WANI, I.; RAFIQ, S. **Lectins: Proteins with Diverse Applications**. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 2013. 3: 93-103.
- IMBERT, A.; WIMMEROVÁ, M.; MITCHELL, E. P.; GILBOA-GARBER, N. **Structures of the lectins from *Pseudomonas aeruginosa*: insights into the molecular basis for host glycan recognition**. Microbes and Infection, 2004. 6(2): 221-228.
- IODACHE, F.; *et al.* **Antimicrobial and Antiparasitic Activity of Lectins**. Current Pharmaceutical Biotechnology, 2015. 16: 152-161.
- JONH, F.; TABBASUM, K.; RAO, C. **Chemico-biological aspects of plant lectins with a preference to legume lectins**. In: Atta-ur-Rahman. Studies in Natural Products Chemistry, 2013. 40: 359-378.
- KARNCHANATAT, A. **Antimicrobial Activity of Lectins from Plants**. In: Bobbarala, V. Antimicrobial Agents, 2012. 145-178.
- KÖHLER, I.; JENETT-SIEMS, K.; SIEMS, K.; *et al.* **In vitro antiplasmodial investigation of medicinal plants from El Salvador**. Zeitschrift für Naturforschung C., 2002. 57: 277–281.
- LAM S. K.; NG T. B. **Lectins: production and practical applications**. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011. 89: 45-55;
- LATGE, J. P. **The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell**. Molecular Microbiology, 2007. 66: 279–90.
- LEAL, A. *et al.* **Novo método para marcação com lectinas em fungo filamentoso**. In: LEAL, I. R.; SILVA, J. M. C.; TABARELLI, M. AND LACHER-JUNIOR, T. E. Mudando o curso da conservação da biodiversidade na caatinga do Nordeste do Brasil. Megadiversidade, 2005. 1(1): 139–146.
- LEAL, A. *et al.* **Novo método para marcação com lectinas em fungo filamentoso**. In: 5° Congresso Brasileiro de Micologia, Programação e resumos, Recife, 2007.
- LEAL, L. K. A. M.; COSTA, M. F.; PITOMBEIRA, M.; *et al.* **Mechanisms underlying the relaxation induced by isokaempferide from *Amburana cearensis* in the guinea-pig isolated trachea**. Life sciences, 2006. 79: 98–104.
- LEITE, Y. F. M. M.; SILVA, L. M. C. M.; AMORIM, R. C. N.; FREIRE, E.A.; MELO, J. D. 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*, 2005 1724: 137-145.

LIS, H.; SHARON, N. **Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition**. *Chemical Reviews*, 1998. 98: 637-674.

MACHADO-FILHO, H. O.; *et al.* **Flora da região de Xingó, Alagoas-Sergipe: Portulacaceae sensu lato**. *Biotemas*, 2012. 25 (4): 103-108.

MEDEIROS, R. M. T.; *et al.* **Intoxication by *Plumbago scandens* in goats in Paraíba, northeastern Brazil**. *Veterinary and Human Toxicology*, 2001. 43(3): 167-169.

MEDEIROS, R. M. T.; *et al.* **Poisoning by *Centraterum brachylepis* in ruminants**. *Toxicon*, 2009. 54(1): 77-79.

MELLO, G. W. S.; *et al.* **Poisoning of goats by the pods of *Luetzelburgia auriculata***. *Toxicon*, 2010. 55: 1115-1118.

MENEZES, R. S. C.; SAMPAIO, E. V. S. B. **Agricultura sustentável no Semi-Árido nordestino**. In: OLIVEIRA, T. S.; ROMERO, R. E.; ASSIS JÚNIOR, R. N.; SILVA, J. R. C. S. (Ed.). *Agricultura, sustentabilidade e o Semi-Árido*. Fortaleza: SBCE: UFC-DCS, 2000. 20-46.

Ministério do Meio Ambiente (MMA). **Bioma Caatinga**. Disponível em <<http://www.mma.gov.br/biomas/caatinga>>. Data de acesso: 20/01/2015.

Ministério do Meio Ambiente (MMA). **Projeto de Monitoramento do Desmatamento dos Biomas Brasileiros por Satélite - PMDBBS**. 2011.

MONTEIRO, R. M.; MOREIRA, A. C. O. M. **Aplicação da lectina de sementes de *Amburana cearensis* como marcador na identificação de microrganismos**. XII Simposio de plantas medicinais do Brasil. 2002.

MOURA, M. C.; *et al.* **Water-soluble *Moringa oleifera* lectin interferes with growth, survival and cell permeability of corrosive and pathogenic bacteria**. *Journal of Applied Microbiology*., 2015. 119(3): 666-76.

MOURA, R. M.; *et al.* **CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*: Isolation, characterization and its effects on pathogenic bacteria and**

Leishmania promastigotes. Comparative Biochemistry and Physiology A, 2006. 145(4): 517-523.

MUKHOPADHYAY, A.; *et al.* **Synthesis of a tetrasaccharide related to the repeating unit of the O-antigen from Escherichia coli K-12.** Carbohydrate Research, 2009. 344: 2311-2316.

NAIR, S. S.; MADEMBIL, N. C.; NAIR, P.; RAMAN S.; VEERABADRAPPA, S. B. **Comparative analysis of the antibacterial activity of some phytolectins.** International Current Pharmaceutical Journal, 2013. 2(2), 18-22.

NAPOLEÃO, T. H.; PONTUAL, E. V.; *et al.* **Effect of Myracrodruon urundeuva leaf lectin on survival and digestive enzymes of Aedes aegypti larvae.** Parasitology Research, 2012. 110: 609–616.

NASCIMENTO, V. T.; MOURA, N. P.; VASCONCELOS, M. A. S.; MACIEL, M. I. S.; ALBUQUERQUE, U. P. **Chemical characterization of native wild plants of dry seasonal forests of the semi-arid region of northeastern Brazil.** Food Research International, 2011. 44: 2112–2119.

NYFFELER, R.; EGGLI, U. **An up-to-date familial and suprafamilial classification of succulent plants.** Bradleya, Winterthurerst, 2010. 28: 125-144.

ORDÓÑEZ, R. M.; *et al.* **Antimicrobial activity of glycosidase inhibitory protein isolated from Cyphomandra betacea Sendt. fruit.** Peptides, 2006. 27: 1187-1191.

PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B. **Purification and partial characterization of two lectin isoforms from Cratylia mollis Mart. (camaratu bean).** Applied Biochemistry and Biotechnology, 1992. 36: 113-118.

PAIVA, P. M. G.; GOMES, F. S.; NAPOLEÃO, T. H.; SÁ, R. A.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B. **Antimicrobial activity of secondary metabolites and lectins from plants.** In: Antonio Mendez Vilas. (Org.). Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. : Formatex Research Center., 2010. 1:396-406.

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

- PEREIRA, I. T.; BURCI, L. M.; SILVA, L. M.; *et al.* **Antiulcer Effect of bark extract of *Tabebuia avellanedae*: Activation of cell proliferation in gastric mucosa during the healing process.** *Phytotherapy Research*, 2012. 27(7): 1067-73
- PESSOA, C. R. M.; MEDEIROS, R. M. T.; RIET-CORREA, F. **Importância econômica, epidemiologia e controle das intoxicações por plantas no Brasil.** *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 2013. 33(6): 752-758.
- PETNUAL, P.; SANGVANICH, P.; KARNCHANATAT, A. **A lectin from the rhizomes of turmeric (*Curcuma longa* L.) and its antifungal, antibacterial and alpha-glucosidase inhibitory activities.** *Food Science Biotechnology*, 2010. 19: 907-916.
- PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. **Lectins as plant defense proteins.** *Plant Physiology*, 1995. 109: 347–52.
- QADIR, S.; WANI, I. H.; RAFIQ, S.; AHMAD, S.; AKBAR G.; HAMID R. M. **Evaluation of antimicrobial activity of a lectin isolated and purified from *Indigofera heterantha*.** *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 2013. 4: 999-1006.
- RATANAPO, S.; NGAMJUNYAPORN, W.; CHULAVATNATOL, M. **Interaction of a mulberry leaf lectin with a phytopathogenic bacterium, *P. syringae* pv *mori*.** *Plant Science*, 2001. 160(4): 739-744.
- RÊGO, M. J. B. M.; VIEIRA-DE-MELLO, G. S.; ARAÚJO, C. W.; CAVALCANTI, M. S. M.; BELTRÃO, E. I. C. **Evaluation of WGA and Concanavalin A (Con A) lectin as biomarkers of hepatosplenic schistosomiasis in human biopsies with no evidence of egg-granuloma system.** *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 2013. 55(3): 213-5.
- RIBEIRO, M. D.; ONUSIC, G. M.; POLTRONIERI, S. C.; VIANA, M. B. **Effect of *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu* in rats submitted to animal models of anxiety and depression.** *Brazilian journal of medical and biological research*, 2006. 39: 263–270.
- RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R. M. T. **Intoxicações por plantas em ruminantes no Brasil e no Uruguai: importância econômica, controle e riscos para a saúde pública.** *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2001. 21: 38-42.

RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R. M. T.; DANTAS, A. F. **Plantas tóxicas da Paraíba**. SEBRAE, João Pessoa. 2006. 54p.

RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R. M. T.; TOKARNIA C. H.; DÖBEREINER J. **Toxic plants for livestock in Brazil: toxic species, economic impact and public health**. Proc. 8th Int. Symposium on Poisonous Plants, Logan, Utah. 2006

RIET-CORREA, F.; MÉNDEZ, M. C. **Intoxicações por plantas e micotoxinas**. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; LEMOS, R. A. A.; BORGES, J. R. J. (Eds), *Doença de Ruminantes e Equídeos*, 2007. 99-221

RIET-CORREA, F.; MÉNDEZ, M. C.; SCHILD, A. L. **A review of poisonous plants that cause reproductive failure and malformations in the ruminants of Brazil**. Journal of Applied Toxicology, 2012. 32: 245-254.

RIET-CORREA, F.; MÉNDEZ, M. C.; SCHILD, A. L. **Intoxicação por Plantas e Micotoxicoses em Animais Domésticos**. Editorial Hemisfério Sul do Brasil, Pelotas. 1993.

RIET-CORREA, F.; PFISTER, J.; SCHILD, A. L.; MEDEIROS, R. M.; DANTAS, A. F. M. **Poisonings by Plants, Mycotoxins and Related Substances in Brazilian Livestock**. Pallotti, Santa Maria. 2009. 246p.

SÁ, R. A.; *et al.* **Induction of mortality on *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae) by *Myracrodruon urundeuva* heartwood lectin**. International Biodeterioration & Biodegradation, 2008. 62(4): 460–464

SANTANA, G. M. S.; *et al.* **Electrochemical potential of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin**. Bioelectrochemistry, 2012 85: 56-60.

SANTOS, A. F. S.; LUZ, L. A.; ARGOLO, A. C. C.; TEIXEIRA, J. A.; PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B. **Isolation of a seed coagulant *Moringa oleifera* lectin**. Process Biochemistry, 2009. 44: 504–508.

SHARON, N.; LIS, H. **History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules**. Glycobiology, 2004. 14(11): 53R-62R.

SHARON, N.; LIS, H. **Legume lectins – a large family of homologous proteins**. The FASEB Journal, 1990. 14(4): 3198-3208.

SILVA, K. A.; ARAÚJO, E. L.; FERRAZ, E. M. N. **Estudo florístico do componente herbáceo e relação com solos em áreas de caatinga do embasamento cristalino e bacia sedimentar, Petrolândia, PE, Brasil.** Acta Botanica Brasilica, 2009. 23: 100-110.

SILVA, M. C. C. *et al.* **Purification, primary structure and potential functions of a novel lectin from *Bauhinia forficata* seeds.** Process Biochemistry, 2012. 47: 1049–1059.

SILVA, M. V.; MACEDO, A. J.; PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B.; BAUMVOL, I.J. R. (Org.). **A Caatinga e seu potencial biotecnológico.** Ed. Universitária da UFPE, Recife, 2013. 43-45.

SILVA, M.; CORRÊA, A.; SANTOS, C.; MARCOS, F.; ABREU, C. **Extração da lectina da folha de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e o efeito de cátions divalentes na atividade hemaglutinante.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2010. 30: 103-107.

TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C.; SANTOS, A. M. M. **Análise de representatividade das unidades de conservação de uso direto e indireto no bioma Caatinga.** 2000. 13p. Trabalho apresentado no Seminário Avaliação e Identificação de Ações Prioritárias para a Conservação, Utilização Sustentável dos Benefícios da Biodiversidade do Bioma Caatinga, Petrolina, 2000.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO P. V. **Plantas Tóxicas do Brasil.** Editora Helianthus, Rio de Janeiro, 2000. 310p.

TOKARNIA, C. H.; *et al.* **Experimentos em bovinos com favas de *Enterolobium contortisiliquum* e *E. timbouva* para verificar propriedades fotossensibilizante e/ou abortivas.** Pesquisa Veterinária Brasileira. 1999. 19: 39-45.

TOKARNIA, C. H.; *et al.* **Intoxicação experimental por *Stryphnodendron coriaceum* (Leg. Mimosoideae) em bovinos.** Pesquisa Veterinária Brasileira. 1991. 11: 25-29.

TOKARNIA, C. H.; *et al.* **Poisonous plants affecting heart function of cattle in Brazil.** Pesquisa Veterinária Brasileira. 1990. 10(1/2): 1-10.

- TREVISAN, M. T. S.; MACEDO, F. V. V. **Seleção de plantas com atividade anticolinesterásica para tratamento da doença de Alzheimer.** Química Nova, 2003. 26(3): 301–304.
- VANDENBORRE, G.; SMAGGHE, G.; VAN DAMME, E. **Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects.** Phytochemistry, 2011. 72: 1538-1550.
- VARROT, A.; BLANCHARD, B.; IMBERTY, A. (2011). **Lectin binding and its structural basis.** In: Wang, B.; Boons, G. *Carbohydrate Recognition: Biological Problems, Methods, and Applications*. 2011. 1.^aed. John Wiley & Sons: 329-348.
- VASTA, G.; *et al.* **Galectins as self/non-self recognition receptors in innate and adaptive immunity: an unresolved paradox.** Frontiers in Immunology, 2012. 199: 1-14.
- VAZ, A. F. M.; *et al.* **Biocontrol of Fusarium species by a novel lectin with low ecotoxicity isolated from Sebastiania jacobinensis.** Food Chemistry, 2010. 119: 1507–1513.
- 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. 2006. 342(1): 349-353
- XU, Q.; LIU, Y.; WANG, X.; GU, H.; CHEN, Z. **Purification and characterization of a novel anti-fungal protein from *Gastrodia elata*.** Plant Physiology and Biochemistry, 1998. 36: 899–905.
- YANG Y.; XU H. L.; *et al.* **Characterization, molecular cloning, and in silico analysis of a novel mannose-binding lectin from *Polygonatum odoratum* (Mill.) with anti-HSV-II and apoptosis-inducing activities.** Phytomedicine, 2011. 18: 748–755.
- ZABEL, R. A.; MORRELL, J. J. **Wood microbiology: decay and its prevention.** Academic Press, San Diego, CA, USA. 1992. 476 p.

5. ARTIGO

Purification and characterization of an antimicrobial lectin from *Portulaca elatior* root

A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO “**Journal of Applied Microbiology**”

Purification and characterization of an antimicrobial lectin from *Portulaca elatior* root

José Dayvid Ferreira da Silva^a, Suéllen Pedrosa da Silva^b, Livia Laís de Santana Silva^a, Pollyana Michelle da Silva^a, Amanda Mota Vieira^b, Irapuan Oliveira Pinheiro^b, Maria do Socorro de Mendonça Cavalcanti^b, Thiago Henrique Napoleão^a, Patrícia Maria Guedes Paiva^{a,*}

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

^b*Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.*

***Corresponding author.** Tel: +558121268540; fax: +558121268576.

E-mail address: ppaivaufpe@yahoo.com.br

Abstract

Plants contain lectins, carbohydrate binding and hemagglutinin proteins, capable of induce biological responses in cells of plants and animals. *Portulaca elatior* is a plant toxic to cattle and goats. This study identified the *P. elatior* tissue with the best specific hemagglutinating activity (SHA), isolated the lectin from it and determined characteristics of isolated lectin. Leaf, stem and root extracts were investigated and the root extract, which was the one that presented HA, was selected to isolate lectin by chitin column chromatography. *P. elatior* root lectin (PeRoL) eluted from chitin column showed polypeptide bands with 32 and 15 kDa on SDS-PAGE under non-reducing and reducing conditions, respectively. The PeRoL HA was active at 120°C and pH range from 4.0 to 8.0 and Ca^{2+} and Mn^{2+} did not affect its HA. The disaccharide threalose was the best carbohydrate inhibitor of HA. Assays revealed that the root extract containing threalose and showed HA 4^{-1} and post-purification 4096^{-1} while the root extract treated with threalase showed HA 256^{-1} . These data revealed that trehalose is an endogenous inhibitor of PeRoL HA. PeRoL showed bacteriostatic activity against *Pseudomonas aeruginosa* (MIC 32.5 $\mu\text{g/mL}$), *Enterococcus faecalis* (MIC 8.1 $\mu\text{g/mL}$) and *Staphylococcus aureus* (MIC 4.06 $\mu\text{g/mL}$) and fungicide activity against *Candida albicans* (MIC and MFC 16.5 $\mu\text{g/mL}$), *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* and *Candida tropicalis* (MIC and MFC 15 $\mu\text{g/mL}$). The study demonstrated that root of *P. elatior* contain PeRoL, a chitin-binding and antimicrobial lectin as well as threalose, a carbohydrate inhibitor of PeRoL.

Keywords: Bacteria, fungi, PeRoL, root, threalose.

1. Introduction

The rich Brazilian biodiversity includes numerous plants with pharmacological potential and that have been used by people for treatment of several diseases (Santos *et al.*, 2009). The Brazilian semiarid region comprises a significant part of this diversity, especially in the region known as Caatinga (Nascimento *et al.*, 2011). The identification of bioactive compounds in plants from Caatinga helps to promote biotechnological development of this ecosystem, which stimulates its conservation (Tabarelli *et al.*, 2000; Alvez, 2007).

The *Portulaca* genus includes about 120 species in the world and 13 species have been reported in Brazil (Coelho & Giulietti, 2010). Among the species of this genus described in Caatinga, there is *Portulaca elatior* Mart. ex Rohrb. Farmers reported this species as a cause of clinical manifestations of gastrointestinal disorders in cattle (Coelho *et al.*, 2010).

Lectins are proteins that bind reversibly to carbohydrates and glycoconjugates (Nunes *et al.*, 2011). This class of proteins is widely found in plants and includes molecules with diverse structures and many biological properties. Sharon and Lis (2004) state that lectins play important roles in the control of biosynthesis of glycoconjugates, defense responses and growth regulation. In the biotechnological point of view, it has been reported anti-inflammatory, antimicrobial and insecticidal activities of lectins, among others (Paiva *et al.*, 2010).

The antibacterial activity of lectins may result from the interaction with teichoic and teichuronic acids, peptidoglycan and lipopolysaccharide present in the bacterial cell wall. Lectins can also promote protein leakage and the formation of pores in the cell wall promoting bacterial death (Ratanapo *et al.* 2001; Correia *et al.*, 2008; PAIVA *et al.*, 2010; Moura *et al.*, 2015). The antifungal activity of lectins results from

interaction with chitin and other components of cell walls, which can lead to reduced absorption of nutrients, as well as interfere with the spore germination process (Sá *et al.*, 2009; Lam and Ng, 2011).

This study aimed to evaluate the presence of lectin in extracts from *P. elatior* leaves, stems and root and to isolate and characterize a lectin from the extract with highest lectin concentration. In addition, the isolated lectin was investigated for antimicrobial activity against bacteria and fungi of medical importance. The study is the first aiming to identify molecules with pharmacological properties from *P. elatior*.

2. Materials and methods

2.1. Preparation of extracts

Leaves, stem and roots of *P. elatior* Mart. ex Rohrb. were collected in Aroeiras city, State of Paraíba, northeastern Brazil, with authorization of the *Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade* (number 38690) from Brazilian Ministry of Environment. The material was dried at 60°C for 5 days and then powdered using a blender.

The powder of leaves, stem or roots was homogenized with 0.15 M NaCl, in a proportion of 1:10 (w/v), using a magnetic stirrer during 6 h at 4°C. The extracts were obtained after filtration through filter paper and centrifugation (9,000 g; 15 min, 4°C).

2.2. Protein concentration and hemagglutinating activity

The concentration of proteins was estimated according to Lowry *et al.* (1951) using a standard curve (31.25 to 500 $\mu\text{g/mL}$) of bovine serum albumin. Hemagglutinating activity was investigated according to Paiva and Coelho (1992) in 96-well microplates with V-bottom. The sample (50 μL) was two-fold serially diluted in 0.15 M NaCl and then, 50 μL of a suspension (2.5% v/v) of rabbit erythrocytes treated with glutaraldehyde was added to each well and the plate was incubated at 27°C for 45 min. In the control, the erythrocyte suspension was incubated with 0.15 M NaCl. The hemagglutinating activity (HA) was expressed as the reciprocal of the highest dilution of sample able to promote agglutination. Specific hemagglutinating activity (SHA) was calculated by the ratio between the hemagglutinating activity and the protein concentration (mg/mL).

2.3. Isolation of *Portulaca elatior* root lectin (PeRoL)

The root extract was selected to isolate lectin because it was the one that presented HA. The extract (2 mL; 10.26 mg of protein) was loaded onto a chitin column (7.5 x 1.5 cm) previously equilibrated (20 mL/h) with 0.15 M NaCl. After loading of sample, the column was washed with 0.15 M NaCl until that absorbance at 280 nm was lower than 0.030. Then, 1.0 M acetic acid was passed through the column in order to elute the adsorbed proteins. The eluted fractions with absorbance higher than 0.100 were pooled (PeRoL) and dialyzed against 0.15 M NaCl during 8 h (one change each 2 h) to eliminate the eluent.

2.4. *Lectin characterization*

Sample of PeRoL (100 µg) was submitted to polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulphate (SDS-PAGE), under non-reducing and reducing conditions, according to Laemmli (1970). Polypeptide bands of PeRoL and molecular mass standards (bovine albumin, 66 kDa; ovalbumin, 45 kDa; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, 36 kDa; bovine carbonic anhydrase, 29 kDa; bovine trypsinogen, 24 kDa; trypsin inhibitor soybean, 20.1 kDa; α-lactalbumin, 14.4 kDa) were stained with 0.02% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 in 10% acetic acid.

The carbohydrate-binding specificity of PeRoL was determined by hemagglutinating activity inhibition assay replacing the 0.15 M NaCl by solutions of glycidic molecules. The assays used the carbohydrates (0.2 M) D-galactose, D-mannose, D-glucose, D-threulose, N-acetyl-glucosamine, D-ribose, xylan, chitosan, inulin and the glycoproteins (500 µg/mL) fetuin, casein, ovalbumin, and thyroglobulin. After dilution of sample in the glycidic solutions, the assay was incubated for 15 min before the addition of rabbit erythrocyte suspension.

The thermal stability of PeRoL hemagglutinating activity was evaluated by incubating the lectin at different temperatures (30–120°C) for 30 min prior to the assay. The effect of pH was determined by incubating the lectin at buffers with pH values between 4.0 and 12.0. The hemagglutinating activity of PeRoL was also determined after incubation of lectin with divalent ions (Ca^{2+} e Mg^{2+}). For this, the NaCl solution was replaced by 10 mM CaCl_2 or MgCl_2 solutions; in controls, the erythrocytes were incubated with these solutions.

2.5. *Endogenous inhibitor investigation*

Total carbohydrate content in root extract was determined by phenol-sulphuric acid method (Masuko *et al.*, 2005). Reducing sugars were detected by the dinitrosalicylic acid method (Miller, 1959) and hexuronic acids were investigated by carbazol reaction (Kosakai, 1978).

PeRoL HA was also performed in presence of the root extract in order to evaluate the presence of an endogenous inhibitor in the extract. For this, a HA inhibition assay was performed as described in the previous section replacing the glycidic solution by the root extract (5.1 mg/mL of protein and 6.8 mg/mL of carbohydrates).

The root extract (20 μ L) was loaded onto a Aminex HPX-87H ion exclusion column (300 mm x 7.8 mm I.D., Bio-Rad®, Hercules, CA, USA) coupled to a liquid chromatography system (Hewlett Packard Agilent Technologies—1200 Series) with binary pump, automatic injector, and Diode Arrays Detector (DAD) at 210 nm. The mobile phase was composed by 5.0 mM sulphuric acid at a flow rate of 0.6 mL/min at 35°C. The running time was 25 min. D-threulose (Sigma-Aldrich, USA) was used as standard.

The root extract (50 μ L) was also incubated (40 min at 37°C) with trehalase from porcine kidney (30 μ L; 1 mg/mL) in 50% glycerol containing 1% Triton X-100 and 25 mM potassium phosphate (Sigma-Aldrich, USA). After this, the HA from treated extract was determined as described above. A control assay (control 1) was performed by incubating the root extract (50 μ L) with the buffering solution without

enzyme (30 μ L) at the same conditions. Another control was also performed by incubating the erythrocyte suspension (50 μ L) with the enzyme (50 μ L).

2.6. Antimicrobial assay

Gram-positive (*Enterococcus faecalis* WDCM 00117, *Staphylococcus aureus* WDCM 00032) and Gram-negative (*Pseudomonas aeruginosa* WDCM 00025, *Escherichia coli* WDCM 00013) bacteria were provided by the *Departamento de Antibióticos* of the *Universidade Federal de Pernambuco* (UFPE). Yeasts (*Candida albicans* 7098, *Candida tropicalis* 7092, *Candida krusei* 6391, *Candida pelliculosa* 6284 e *Candida parapsilosis* 7087) were provided by the *University Recife Mycologia* (URM), *Departamento de Micologia*, UFPE. The microorganisms were inoculated in Nutrient Broth (bacteria) or Sabouraud-Dextrose (yeasts) and incubated at 37°C for 16 h, under shaking. The culture concentrations were adjusted turbidimetrically (600 nm) to 10⁶ colony-forming units (CFU) for use in the assays for determination of the minimal inhibitory (MIC), bactericidal (MBC) and fungicidal (MFC) concentrations.

In a 96-microplate row, the sample (PeRoL in 0.15 M NaCl) was two-fold serially diluted from the third well in the culture medium. In the first well, it was added only the culture medium (sterility control) and in the second well it was added the culture medium diluted 1:1 with 0.15 M NaCl (100% growth control). Next, 20 μ L of the microbial suspension was added to each well and the plate was the optical density (OD) at 600 nm was determined. After incubation at 37°C for 24 h, the OD was read again. The assays were performed in triplicate. The MIC corresponded to the lowest concentration of the sample that promoted a reduction higher or equal to 50% in OD in comparison with the 100% growth control (Amsterdam, 1996).

To determine the MBC or MFC, inoculations (10 µl) from wells corresponding to concentrations higher or equal to MIC were transferred to Nutrient Agar (bacteria) or Sabouraud Dextrose Agar (yeasts) plates, which were incubated at 37°C for 24 h. The MBC corresponded to the lowest concentration able to reduce the viability of initial inoculum in 99.9%.

3. Results and discussion

Leaf, stem and root extracts from *P. elatior* showed 5.87, 5.42 e 5.13 mg/mL of proteins, respectively while HA was only detected in the root extract (SHA: 1.55). However, the HA was low, which can be due to a low concentration of lectin or the presence of contaminants able to inhibit lectin HA.

The root extract was chromatographed on a chitin column (Figure 1) aiming to separate the *P. elatior* root lectin (PeRoL) from others compounds. The chitin matrix was selected due its efficiency to isolate chitin-binding lectins which are reported to have antimicrobial activity (Gomes *et al.*, 2013; Albuquerque *et al.*, 2014; Moura *et al.*, 2015; Carvalho *et al.*, 2015). The non-adsorbed fractions did not show HA, while PeRoL (pool of fractions eluted with 1.0 M acetic acid) showed SHA of 34.133 corresponding to a purification factor 43.760 times.

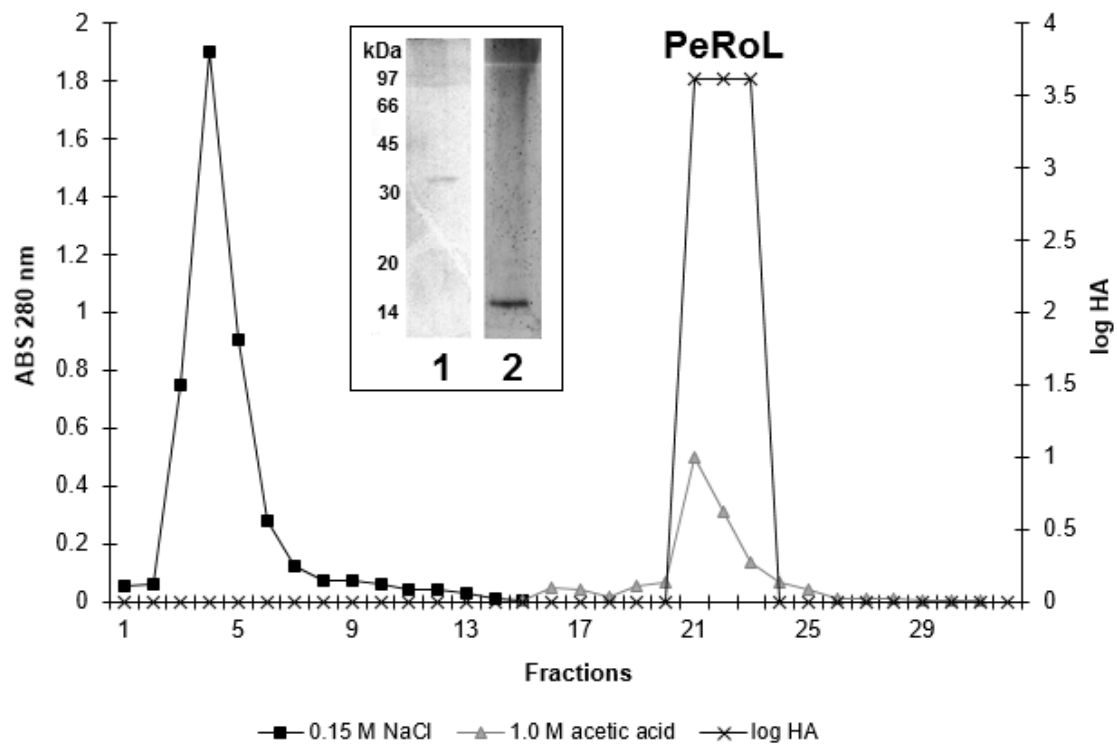


Figure 1. Purification of *P. elatior* root lectin (PeRoL). Chromatography of root extract (10.3 mg of protein) onto a chitin column. The washing step used 0.15 M NaCl. PeRoL was eluted using 1.0 M acetic acid. Fractions of 2.0 mL were collected and evaluated for absorbance at 280 nm and hemagglutinating activity. The insert shows SDS-PAGE (12%, w/v) of PeRoL under non-reducing (1) and reducing (2) conditions. The gels are stained with Coomassie Blue.

Polypeptide bands with 32 and 15 kDa were detected on SDS-PAGE under non-reducing and reducing conditions, respectively (Figure 1, insert). This result revealed that PeRoL is a homodimeric protein with subunits linked by disulfide bridges, similarly to reported for lectins isolated from *Astragalus mongholicus*, with 2 subunits 29.6 kDa, and *Erophaca Baetica*, with 2 subunits 30 kDa (Yan *et al.*, 2005; Megías *et al.*, 2013).

The data from HA inhibitory assay (Table 1) revealed that threulose was the best inhibitor of PeRoL HA while chitosan, inulin, ribose and xylan did not interfere on HA and the tested monosaccharides promoted low reduction of HA (Table 1). Lectins that bind preferentially to complex sugars such as oligosaccharide moieties of

thyroglobulin, fetuin, α 1-acid glycoprotein, ovalbumin and transferrin have been isolated from *Flammulina velutipes*, *Griffonia simplicifolia*, *Phaseolus vulgaris*, *Olearya tesota* and *Acacia constricta* (Guzman-Partida *et al.*, 2004; NG *et al.*, 2006; Fouquaert *et al.*, 2009; Bhat *et al.*, 2010; Shimokawa *et al.*, 2016). It is important to carry out the HA inhibition assay using carbohydrates and glycoproteins in order to confirm that the agent responsible for agglutination is really a lectin as well as to establish the carbohydrate specificity of lectin (Gomes *et al.*, 2013; Cruz *et al.*, 2015).

Table 1. Hemagglutinating activity of PeRoL in presence of carbohydrates and glycoproteins.

Carbohydrates / Glycoproteins	SHA of PeRoL
<i>Monosaccharides</i> (200 mM)	
Galactose	8,533
Glucose	8,533
Mannose	8,533
N-acetyl-glucosamine	17,066
Ribose	34,133
<i>Disaccharide</i> (200 mM)	
Trehalose	266
<i>Polysaccharides</i> (1.0 mg/mL)	
Chitosan	34,133
Inulin	34,133
Xylan	34,133
<i>Glycoproteins</i> (1.0 mg/mL)	
Casein	17,066
Fetuin	2,133
Ovalbumin	8,533
Thyroglobulin	533

SHA of PeRoL in 0.15 M NaCl: 34,133

The thermal stability assay indicated that PeRoL is resistant to heating since its HA was preserved even after heating at 120°C for 30 min (Figure 2A). This result can be linked to the presence of disulfide bonds similar to reported for other heat-

stable plant lectins containing disulfide bonds including those isolated from seeds of *Apuleia leiocarpa*, *Bauhinia forficata* and *Moringa oleifera* (Santos *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2012; Carvalho *et al.*, 2015).

Figure 2B shows that PeRoL HA was stable at a pH range from acidic to slightly alkaline (4.0–8.0) but the lectin was inactive in the alkaline pH range (9.0 - 12.0). The pH variations modify the net charge of the proteins and may break electrostatic interactions and hydrogen bonds that stabilize protein structure, thus leading to denaturation and loss of biological activity. The pH range at which PeRoL was active was similar to those determined for lectins isolated from *Capparis spinosa* seeds and *Schinus terebinthifolius* leaves (Lam *et al.*, 2009; Gomes *et al.*, 2013). The assays in presence of divalent cations showed that Ca^{2+} e Mn^{2+} did not affect the PeRoL HA.

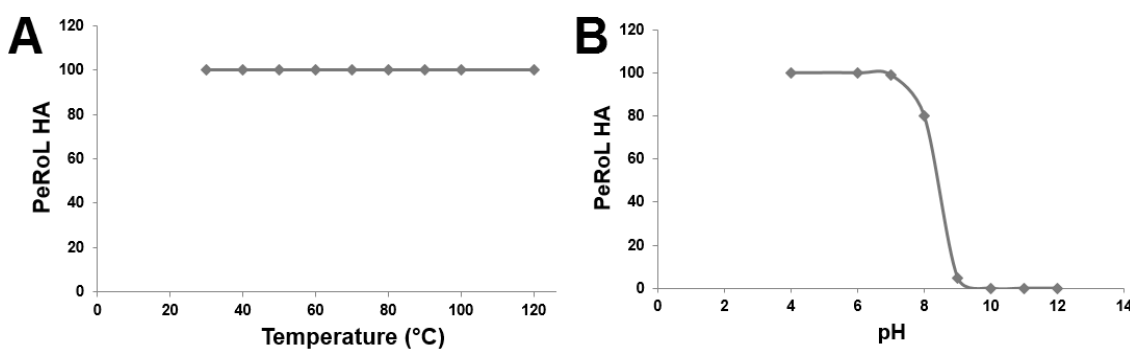


Figure 2. Effect of temperature (A) and effect of pH (B) on hemagglutinating activity (HA) of PeRoL.

The expressive purification factor of PeRoL could indicate that the chromatographic process was efficient to eliminate an endogenous inhibitor present in the root extract. Aiming to investigate this hypothesis, the carbohydrate content of extract and the effect of extract on PeRoL HA were determined. The root extract contains total carbohydrates (6.6 mg/mL), reducing carbohydrates (1.5 mg/mL) and

hexuronic acids (1.2 mg/mL) and it was able to reduce the HA of PeRoL from 4096^{-1} to 4^{-1} . These data revealed that the root extract containing carbohydrate inhibited the PeRoL-erythrocyte interaction. The extract was then subjected to HPLC and the chromatographic profile was compared with those from trehalose, which was the best inhibitor of PeRoL HA (Table 1). Figure 3 shows that the main peak detected in the chromatographic profile of root extract (3A) corresponded to those of trehalose (3B) and thus this carbohydrate is probably the endogenous inhibitor of PeRoL HA.

In order to prove that trehalose corresponds to the endogenous inhibitor, the root extract was treated with trehalase before the use of extract in the HA assay. The data revealed that lectin incubated with extract untreated with the enzyme (control 1) showed HA of 8 while the extract treated with enzyme showed HA of 256. The erythrocytes incubated only with the enzyme (control 2) showed normal precipitation, indicating that the enzyme solution did not interfere with the assay. The data revealed that the trehalose present in the root extract is an endogenous inhibitor of PeRoL activity since increase of HA was detected when this disaccharide was removed from extract by enzymatic hydrolysis.

PeRoL showed bacteriostatic activity against *Enterococcus faecalis* (MIC de 8.1 µg/mL), *Pseudomonas aeruginosa* (MIC 32.5 µg/mL) and *Staphylococcus aureus* (MIC 4.06 µg/mL), but it did not inhibit the growth of *Escherichia coli*. Bacteriostatic agents may act through inhibition of enzymatic activity associated with growth and/or cell lysis (Matsumoto *et al.*, 1999).

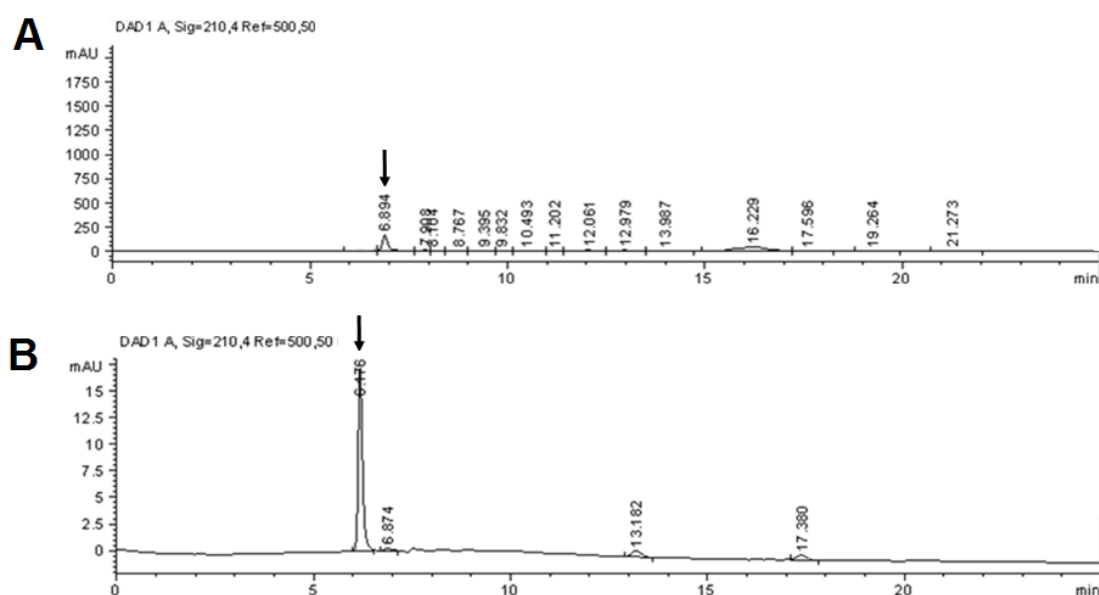


Figure 3. HPLC profile of *P. elatior* root extract (A) and trehalose (B). The arrows indicate the peaks corresponding to trehalose.

The lectin presented fungicide activity against *Candida albicans* (MIC and MFC 16.5 $\mu\text{g/mL}$), *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* and *Candida tropicalis* (MIC and MFC 15 $\mu\text{g/mL}$). PeRoL was a potent antifungal agent, being more efficient than lectin from seed of *Archidendron jiringa* (MIC 56.7 $\mu\text{g/mL}$) and rhizome of *Curcuma longa* (MIC 46 $\mu\text{g/mL}$) (Silva et al., 2007; Cruz, 2015). The prevalence of diseases caused by fungi of the genus *Candida* is much higher in hospitals. Infections related to *Candida* species are raising interest in fungal diseases (Bassetti et al., 2006; Ostrosky-Zeichner et al., 2006), because these fungi, although low virulent, show great resistance to antifungals (Colombo et al., 2003; Neufeld et al., 2009). This highlights the importance of seeking new compounds with antifungal activity against these yeasts.

The antifungal activities mechanisms of lectins are not completely understood. Study suggests that *Talisia esculenta* lectin inhibited growth is related to the carbohydrate recognition of fungal cell wall and other structures (Pinheiro et al.,

2009). Studies suggest that lectins can form a barrier on the surface of the cell wall of fungi, changing its structure and its permeability (Boleti *et al.*, 2007; Lam *et al.*, 2011). Low molecular weight lectins may cross the yeast cell wall and act on the plasma membrane, blocking the active sites of enzymes related to morphogenesis (Boleti *et al.*, 2007). Lectins with more than 20 kDa can have indirect effects caused by interactions with carbohydrates exposed in the fungal cell membrane (Peumans and Van Damme *et al.*, 1995).

4. Conclusion

Root of *P. elatior* contain an antimicrobial lectin (PeRoL) as well as threalose, the carbohydrate inhibitor of PeRoL.

Acknowledgements

The authors express their gratitude to the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq) for research grants and fellowships (L.C.B.B. Coelho and P.M.G. Paiva), *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES), *Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco* (FACEPE) for research grants.

5. References

- ALBUQUERQUE, L. P.; *et al.* **Antifungal Activity of Microgramma vacciniifolia Rhizome Lectin on Genetically Distinct Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici Races.** Applied Biochemistry and Biotechnology, 2014. 172: 1098–1105.
- ALVES, J. J. A. **Geoeecologia da caatinga no semiárido do Nordeste brasileiro.** CLIMEP: Climatologia e Estudos de Paisagem, 2007. 2(1): 58-71.
- AMSTERDAM, D. **Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media.** In Antibiotics in Laboratory Medicine ed. Loman, 52–111. Baltimore, MD: Williams and Wilkins. 1996.
- BASSETTI, M.; RIGHI, E.; COSTA, A.; FASCE, R.; MOLINARI, M. P.; ROSSO, R.; PALLAVICINI, F. B.; VISCOLI, C. **Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care.** BMC Infection Disease, 2006. 6: 21.
- BHAT, G. G.; *et al.* **Purification, characterization and molecular cloning of a monocot mannose-binding lectin from Remusatia vivipara with nematicidal activity.** Glycoconjugate Journal. 2010. 27: 309–320.
- BOLETI, A. P.; FREIRE, M. G.; COELHO, M. B.; SILVA W.; BALDASSO P. A.; GOMES, V. M.; MARANGONI S.; NOVELLO J. C.; MACEDO M. L. **Insecticidal and antifungal activity of a protein from Pouteria torta seeds with lectin-like properties.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007. 55(7): 2653-8.
- CARVALHO; *et al.* **Purification, characterization and antibacterial potential of a lectin isolated from Apuleia leiocarpa seeds.** International Journal of Biological Macromolecules, 2015. 75: 402–408.
- COELHO, A. A. O. P.; GIULIETTI, A. M. **O gênero Portulaca L. (Portulacaceae) no Brasil.** Acta Botanica Brasilica, Feira de Santana, 2010. 24(3): 655-670.
- COELHO, A. A. O. P.; GIULIETTI, A. M.; HARLEY, R. M.; YESILYURT J. C. **Synonymies and typifications in Portulaca (Portulacaceae) of Brazil.** Kew Bulletin, 2010. 65: 37-43.
- COLOMBO, A. L.; GUIMARAES, T. **Epidemiology of hematogenous infections due to Candida spp.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2003. 36: 599–607.

- CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G. **Lectins, carbohydrate recognition molecules: are they toxic?**. In: *Yasir Hasan Siddique*. (Org.). Recent Trends in Toxicology. Kerala, India: Transworld Research Network, 2008. 37: 47-59.
- CRUZ, D. R. R. **Isolamento, Purificação E Caracterização Parcial Da Lectina De Folhas De *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel, Nativa Do Bioma Caatinga**. Universidade Federal do Vale do São Francisco, 2015. Dissertação.
- FOUQUAERT, E.; *et al.* **Related lectins from snowdrop and maize differ in their carbohydrate-binding specificity**. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2009. 380: 260–265.
- GOMES, F. S.; PROCÓPIO, T. F.; NAPOLEÃO, T. H.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G. **Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf**. Journal of Applied Microbiology. 2013. 114: 672-679.
- GUZMAN-PARTIDA, A. M.; ROBLES-BURGUENO, M. R.; *et al.* **Purification and characterization of complex carbohydrate specific isolectins from wild legume seeds: *Acacia constricta* is (vinorama) highly homologous to *Phaseolus vulgaris* lectins**. Biochimie, 2004 86: 335-342.
- KOKASAI, M.; YOSIZAWA, Z. **Study on factors yielding high color in the carbazole reaction with hexuronic acid-containing substances**. Journal of Biochemistry, 1978. 84: 779-785.
- LAEMMLI, U. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage**. Nature, 1970. 227: 680–685.
- LAM S. K.; NG T. B. **Lectins: production and practical applications**. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011. 89: 45-55.
- LAM, S. K.; HAN, Q. F.; NG, T. B. **Isolation and characterization of a lectin with potentially exploitable activities from caper (*Capparis spinosa*) seeds**. Bioscience Reports, 2009. 29(5): 293-299;
- 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(1): 265-75.
- MASUKO, T. *et al.* **Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format**. Anal Biochemistry. 2005. 339(1): 69-72.

- MATSUMOTO, M.; *et al.* **Inhibitory effect of oolong tea extract on caries-inducing properties of mutans streptococci.** Caries Research, 1999. 33, 441–445.
- MEGÍAS, C.; *et al.* **Purification of an Antiproliferative Lectin from Erophaca Baetica (Leguminosae) Seeds.** Journal of Food and Nutrition Research, 2013. 1(5): 87-91.
- MILLER, G. L. **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar.** Analytical Chemistry, 1959. 31: 426.
- MOURA, M. C.; *et al.* **Water-soluble Moringa oleifera lectin interferes with growth, survival and cell permeability of corrosive and pathogenic bacteria.** Journal of Applied Microbiology, 2015. 119(3): 666-76.
- NASCIMENTO, V. T.; MOURA, N. P.; VASCONCELOS, M. A. S.; MACIEL, M. I. S.; ALBUQUERQUE, U. P. **Chemical characterization of native wild plants of dry seasonal forests of the semi-arid region of northeastern Brazil.** Food Research International, 2011. 44: 2112–2119.
- NEUFELD, P. M.; DOS SANTOS, L. H.; RIBEIRO, M. D.; *et al.* **Prevalência e Susceptibilidade in vitro a Itraconazol e Anfotericina B de Isolados Clínicos de Candida.** RBAC, 2009. 41:119–25.
- NG, T. B.; NGAI, P. H.; XIA L. **An agglutinin with mitogenic and antiproliferative activities from the mushroom Flammulina velutipes.** Mycologia, 2006. 98: 167-171.
- NUNES, E. S.; *et al.* **Purification of a lectin with antibacterial activity from Bothrops leucurus snake venom.** Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, 2011. 159: 57–63.
- OSTROSKY-ZEICHNER, L.; PAPPAS P. G. **Invasive candidiasis in the intensive care unit.** Critical Care Medicine. 2006. 34: 857–63.
- PAIVA, P. M. G.; GOMES, F. S.; NAPOLEÃO, T. H.; SÁ, R. A.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B. **Antimicrobial activity of secondary metabolites and lectins from plants.** In: Antonio Mendez Vilas. (Org.). Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. : Formatex Research Center., 2010. 1:396-406.

- PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. **Lectins as plant defense proteins.** Plant Physiology. 1995. 109: 347–52.
- PINHEIRO, A. Q.; MELO, D. F.; MACEDO, L. M.; *et al.* **Antifungal and marker effects of *Talisia esculenta* lectin on *Microsporum canis* in vitro.** Journal of Applied Microbiology, 2009. 107: 2063–9.
- RATANAPO, S.; NGAMJUNYAPORN, W.; CHULAVATNATOL, M. **Interaction of a mulberry leaf lectin with a phytopathogenic bacterium, *P. syringae* pv *mori*.** Plant Science, 2001. 160(4): 739-744.
- SÁ, R. A., *et al.* **Antibacterial and antifungal activities of *Myracrodruon urundeuva* heartwood.** Wood Science and Technology, 2009. 43: 85-95.
- SANTOS, A. F. S.; LUZ, L. A.; ARGOLO, A. C. C.; TEIXEIRA, J. A.; PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B. **Isolation of a seed coagulant *Moringa oleifera* lectin.** Process Biochemistry, 2009. 44: 504–508.
- SHARON, N.; LIS, H. **History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules.** Glycobiology, 2004. 14(11): 53R-62R.
- SHIMOKAWA, M.; *et al.* **Two carbohydrate recognizing domains from *Cycas revoluta* leaf lectin show the distinct sugar binding specificity – A unique mannoooligosaccharide recognition by N-terminal domain.** Journal of Biochemistry. 2016. 160(1): 27-35
- SILVA, J. A.; DAMICO, D. C.; BALDASSO, P. A.; MATTIOLI, M. A.; WINCK, F. V.; FRACETO, L. F.; NOVELLO, J. C.; MARANGONI, S. **Isolation and biochemical characterization of a galactoside binding lectin from *Bauhinia variegata* candida (Bvcl) seeds.** Protein Journal. 2007. 26: 193–201.
- SILVA, M. C. C. *et al.* **Purification, primary structure and potential functions of a novel lectin from *Bauhinia forficata* seeds.** Process Biochemistry, 2012. 47: 1049–1059.
- TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C.; SANTOS, A. M. M. **Análise de representatividade das unidades de conservação de uso direto e indireto no bioma Caatinga.** 2000. 13p. Trabalho apresentado no Seminário Avaliação e Identificação de Ações Prioritárias para a Conservação, Utilização Sustentável dos Benefícios da Biodiversidade do Bioma Caatinga, Petrolina, 2000.

YAN, Q.; *et al.* **A novel homodimeric lectin from *Astragalus mongholicus* with antifungal activity.** Archives of Biochemistry and Biophysics, 2005. 422: 72–81.

6. CONCLUSÃO

A raiz de *Portulaca elatior* contém lectina ligante de quitina com atividade antimicrobiana e trealose, carboidrato inibidor da lectina. A estabilidade em elevada temperatura e ampla faixa de pH são importantes características, para futuras aplicações da lectina. PeRoL tem potencial de uso como agente antimicrobiano.