

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO BIOCÊNCIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**DESENVOLVIMENTO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE IgG ANTI-  
LECTINA COAGULANTE DE SEMENTES DE *Moringa oleifera* (cMoL)**

**BENNY FERREIRA DE OLIVEIRA**

**ORIENTADORA: Profa. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho**  
**COORIENTADORA: Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva**

**RECIFE - PE**

**2017**

**BENNY FERREIRA DE OLIVEIRA**

**DESENVOLVIMENTO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE IgG ANTI-  
LECTINA COAGULANTE DE SEMENTES DE *Moringa oleifera* (cMoL)**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pernambuco

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

**COORIENTADORA: Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva**

**RECIFE ó PE**

**2017**

Catálogo na fonte  
Elaine Barroso  
CRB 1728

**Oliveira, Benny Ferreira de**

**Desenvolvimento, purificação e caracterização de IgC anti-lectina coagulante de sementes de *Moringa oleifera* (cMoL) / Benny Ferreira de Oliveira- Recife: O Autor, 2017.**

**58 folhas: il., fig., tab.**

**Orientadora: Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho**

**Coorientadora: Patrícia Maria Guedes Paiva**

**Dissertação (mestrado) Ë Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Ciências Biológicas, 2017.**

**Inclui referências**

- 1. Fitoquímica 2. *Moringa oleifera* 3. Lectinas I. Coelho, Luana Cassandra Breitenbach Barroso (orientadora) II. Paiva, Patrícia Maria Guedes (coorientadora) III. Título**

**572.2**

**CDD (22.ed.)**

**UFPE/CCB-2017-181**

**BENNY FERREIRA DE OLIVEIRA**

**DESENVOLVIMENTO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE IgG ANTI-  
LECTINA COAGULANTE DE SEMENTES DE *Moringa oleifera* (cMoL)**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pernambuco

**Aprovado por:**

---

Prof<sup>a</sup>.Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof. Dr. Emmanuel Viana Pontual  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>.Teresinha Gonçalves da Silva  
Universidade Federal de Pernambuco

Data: 17/02/2017

*Aos meus pais, minha filha e amigos, obrigada  
pelo carinho e confiança, que me fizeram forte  
durante o desenvolvimento desta Dissertação.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por mais uma oportunidade de evolução científica e como ser humano, por ter me dado força a todo momento e por ter me guiado através do Espírito Santo para que eu superasse os obstáculos e vencesse os desafios.

À minha avó Josefa (*in memorian*), pelo carinho dedicado na infância e por ter mostrado o valor da educação e da fé.

Aos meus pais José Nilo e Glória por todo carinho, apoio, por acreditarem e torcerem por mim, eu amo muito vocês.

À minha filha, amor de minha vida por quem eu luto todos os dias.

A Erleide pelos cuidados com minha filha, por compartilhar comigo a educação.

A minha orientadora Luana Cassandra por ter sido tão especial para mim, pela confiança, motivação e principalmente pelos ensinamentos na ciência e na vida.

Ao Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão e à Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva por terem me recebido no Laboratório de Bioquímica de Proteínas, um ambiente alegre, produtivo, no qual as pessoas se ajudam.

Ao Técnico de Laboratório Dr. Carlos Eduardo Sales da Silva por todo apoio e parceria no desenvolvimento do trabalho e também por sua amizade.

À Dra. Adriana Ferreira Cruz do Núcleo Central de Pesquisa Experimental-UFPE, pelo apoio na manipulação dos animais.

A todos do Laboratório de Bioquímica de Proteínas òBIOPROTö, Pollyana, Polyana Karla, Danilo, David, Robson, Claudio, Bernardo, Yasmim, Caio, Suelen, Lívia, Bruninha, por compartilhar dias felizes, de confraternização, pelas brincadeiras; aos que eu não tive muito contato, mas que são pessoas amigas e prontas para ajudar: Priscila, Tâmara, Thamarah, Maiara, Lady, Ana Paty, Guga, João, Jéssica, Léo, Eduarda, enfim a todos que fazem parte desse grupo que, com imensa alegria, faço parte.

õTalvez não tenha conseguido fazer o melhor,  
mas lutei para que o melhor fosse feito. Não  
sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não  
sou o que era antesõ.

Marthin Luther King

## RESUMO

Lectinas são proteínas capazes de formar ligação com carboidratos de forma reversível. Os anticorpos ou imunoglobulinas (Ig) também de origem proteica, são gerados pelo sistema imune, e possuem elevado padrão de especificidade aos antígenos. Quando purificados e imobilizados servem como reagentes em diagnósticos de contaminantes químicos e biológicos, além disso quando desenvolvidos contra lectinas são capazes de reconhecer proteínas homólogas. Este trabalho teve como objetivo empregar um protocolo simplificado para a purificação da lectina coagulante de sementes de *Moringa oleifera* (cMoL), avaliar seu potencial antimicrobiano bem como desenvolver anticorpo contra a lectina. A caracterização parcial foi efetuada através de eletroforeses para proteínas nativas, bem como eletroforese contendo sulfato sódico de dodecila (SDS-PAGE) na presença de agente redutor. A purificação de cMoL com gel de guar produzido pelo protocolo desenvolvido neste trabalho foi eficiente; a atividade hemaglutinante específica (AHE) da lectina foi de 2.500. De acordo com a eletroforese a proteína purificada é básica e possui o mesmo padrão de massa molecular da cMoL anteriormente obtida por gel de guar utilizando protocolo previamente descrito. Também foram realizados os seguintes testes de atividade biológica: ensaio hemolítico com o extrato, fração e a lectina purificada da *M. oleifera*, preparações que não apresentaram hemólise das hemácias em todas as concentrações testadas; um ensaio de atividade antibacteriana, com a lectina purificada no qual em concentração de 10 mg/mL, houve inibição do crescimento das espécies *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Serratia sp.* e *Bacillus subtilis*, não houve resultado com a espécie *Proteus mirabilis*; e efeito bactericida não foi observado para nenhuma linhagem. cMoL inibiu as espécies leveduriformes *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. tropicales* e *C. glabrata*; efeito fungicida foi detectado nas espécies *C. albicans* e *C. tropicales*. Um anticorpo policlonal contra a lectina foi desenvolvido e poderá após purificação ser caracterizado e aplicado a imunoenaios. Conclusivamente, a metodologia utilizada poderá servir como base para futuras aplicações de cMoL purificada à homogeneidade. A lectina não promove efeito hemolítico em eritrócitos humanos do sangue tipo O. Os ensaios antimicrobianos revelaram maior toxicidade para os fungos comparados às bactérias. Os resultados da imunodifusão foram positivos na segunda inoculação ocorrendo precipitação entre IgG, extrato e lectina demonstrando que cMoL é imunogênica.

**Palavras chave:** *Moringa oleifera*. cMoL. Atividade Antimicrobiana. IgG anti-cMoL.

## ABSTRACT

Lectins are proteins that can form carbohydrate binding reversibly. Antibodies or immunoglobulins (Ig) also of protein origin, are generated by the immune system, and have a high specificity to the antigens. When purified and immobilized they serve as reagents in diagnostics of chemical and biological contaminants, furthermore when developed against lectins they are able to recognize homologous proteins. The objective of this work was to employ a simplified protocol for the purification of *Moringa oleifera* seed coagulant lectin (cMoL), to evaluate its antimicrobial potential as well as to develop antibody against the lectin. Partial characterization was performed by electrophoresis for native proteins, as well as sodium dodecyl sulphate electrophoresis (SDS-PAGE) in the presence of reducing agent. The purification of cMoL with guar gel produced by the protocol developed in this work was efficient; The specific hemagglutinating activity (AHE) of the lectin was 2,500. According to the electrophoresis the purified protein is basic and has the same molecular mass standard of cMoL previously obtained by guar gel using protocol previously described. The following biological activity tests were also performed: hemolytic assay with extract, fraction and purified lectin of *M. oleifera*, in which all preparations did not show red cell hemolysis at all concentrations tested, an antibacterial activity assay with Purified lectin in which at a concentration of 10 mg / mL, inhibition of the growth of the species *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Serratia sp.* And *Bacillus subtilis*, there was no result with the species *Proteus mirabilis*; A bactericidal effect was not observed for any one lineage. CMoL inhibited yeast species *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. tropicales* and *C. glabrata*; Fungicidal effect was detected in *C. albicans* and *C. tropicales* species. A polyclonal antibody against the lectin has been developed and may after purification be characterized and applied to immunoassays. Conclusion, the methodology used may serve as a basis for future applications of purified cMoL to homogeneity. The lectin does not promote hemolytic effect in human erythrocytes of type O blood. The antimicrobial assays revealed greater toxicity to fungi compared to bacteria. The immunodiffusion results were positive for second inoculation with precipitation occurring between IgG, extract and lectin demonstrating that cMoL is immunogenic.

**Key words:** *Moringa oleifera*. cMoL. Antimicrobial Activity. Anti-cMoL IgG.

## LISTA DE FIGURAS

### FIGURA

- |   |   |    |
|---|---|----|
| 1 | <i>Moringa oleifera</i> (A) Fruto (B) semente (C) Flores (D) Folhas | 15 |
| 2 | Atividade Hemaglutinante e Inibição por Carboidratos                | 17 |
| 3 | Estrutura do Anticorpo  | 22 |

### ARTIGO

#### FIGURA

- |   |   |    |
|---|---|----|
| 1 | (A) Cromatografia da fração do precipitado 60% (10 mg de proteína) a partir do extrato de semente em coluna de gel de guar (10 cm x 1,0 cm). Utilizou-se na etapa de lavagem NaCl 0,15 M, cMoL foi eluída com NaCl 1,0 M, foram coletadas frações de 2,0 mL. A absorbância foi determinada em um comprimento de onda $A_{280}$ nm. (B) SDS-PAGE (12%, p / v) de cMoL (25 g) e marcadores de massa molecular corados com azul de Coomassie. (C) Eletroforese para proteínas nativas cMoL (25 g) e citocromo, corados com negro de amido. | 41 |
| 2 | Ensaio de imunodifusão dupla em gel de agarose mostrando a precipitação entre IgG, cMoL e fração. Poço central: A, IgG anti-cMoL. Poços laterais: 1, cMoL; 2, Fração; 3, Extrato.   | 42 |

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO

### TABELA

<b>1</b>	Sumário da Purificação da cMoL	43
<b>2</b>	Atividade Antifúngica da cMoL	43

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AH</b>	Atividade Hemaglutinante
<b>AHE</b>	Atividade Hemaglutinante Específica
<b>CMI</b>	Concentração Mínima Inibitória
<b>CMF</b>	Concentração Mínima Fungicida
<b>CMB</b>	Concentração Mínima Bactericida
<b>cMoL</b>	Lectina Coagulante de <i>Moringa Oleifera</i>
<b>ConA</b>	Concavalina A
<b>EB</b>	Extrato Bruto
<b>Ig</b>	Imunoglobulina
<b>M</b>	Concentração Molar
<b>WSMoL</b>	Lectina de <i>Moringa oleifera</i> solúvel em água
<b>SDS</b>	Sulfato Sódico De Dodecila
<b>SDS-PAGE</b>	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida Contendo Sulfato Sódico de Dodecila

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	12
<b>2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	14
2.1 <i>Moringa oleifera</i>	14
2.2 Lectinas	16
2.2.1 Generalidades	16
2.2.2 Lectinas de semente de <i>Moringa oleifera</i>	18
2.2.3 Purificação e caracterização	18
2.2.4 Aplicações biotecnológicas e atividades biológicas	20
2.2.5 Atividade antimicrobiana	20
2.3 Anticorpos	21
2.3.1 Desenvolvimento, caracterização imunológica e produção de anticorpos	22
<b>3 OBJETIVOS</b>	24
3.1 Objetivo geral	24
3.2 Objetivo específico	24
<b>4 ARTIGO A SER SUBMETIDO: Anais da Academia Brasileira de Ciências</b>	25
<b>5 CONCLUSÃO</b>	44
<b>REFERÊNCIAS</b>	45
<b>ANEXO: Normas da Revista Anais da Academia Brasileira de Ciências</b>	56

## 1 INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade, extratos e fitoquímicos das plantas têm sido utilizados com fins na medicina, devido à capacidade de produção de substâncias antibióticas. Países em desenvolvimento são os principais dependentes desses compostos, sendo eles: alcalóides, bem como substâncias fenólicas e polifenóis, que são fenóis simples, ácidos fenólicos, quinonas, flavonas, flavonóis e flavonóides, tanino, cumarinas, lectinas e polipeptídeos (GONÇALVES et al., 2005).

*Moringa oleifera* Lam. é uma planta que possui componentes com propriedades curativas, sendo seus compostos utilizados para os mais diversos fins, como por exemplo, no tratamento de distúrbios nervosos (HANNAN et al., 2014) e como antioxidante (SANTOS et al., 2012). Além disso a planta também é rica em nutrientes e tem sido utilizada no combate à fome em regiões com populações com elevado índice de desnutrição como a África, Ásia, América Latina e Caribe (ANWAR et al., 2007). No semi-árido nordestino tem sido bastante utilizada por ser uma espécie de baixo custo de produção, com boa adaptação a climas diversos sendo bastante utilizada no tratamento da água para o consumo da população, removendo impurezas (SANTOS et al., 2015).

Essas propriedades específicas encontradas em suas sementes são decorrentes, entre outros constituintes, da presença de proteínas coagulantes, tais como, a lectina coagulante de sementes de *M. oleifera* (cMoL), que remove a turbidez da água tratando e tornando-a útil para o consumo das populações (SANTOS et al., 2009). A lectina é composta por subunidades de 26,5 e 14,9 kDa, tratando-se de uma proteína de natureza catiônica, que reconhece carboidratos de forma específica e reversível; seu isolamento ocorre por extração salina seguida de cromatografia em gel de guar; a caracterização de sua homogeneidade ocorre por eletroforese (SANTOS et al., 2013).

Os anticorpos ou imunoglobulinas (Ig) são proteínas que também apresentam domínio de reconhecimento de moléculas, esse grupo possui forma estruturalmente semelhante a uma molécula em formato de Y constituída por duas cadeias leves e duas cadeias pesadas de polipeptídios, onde na região próxima ao topo dessa estrutura ocorre a existência de diferentes aminoácidos que determinam sua especificidade ao antígeno. São produzidos por células de defesa do sistema imune, linfócitos B e classificadas em cinco principais classes de acordo com a especificidade: IgA, IgE, IgG, IgM e IgD. Podem ser policlonais, clones de vários linfócitos B, com epítomos diferentes para diversos antígenos ou monoclonais, com apenas um local específico de ligação (GIL et al., 1999).

Os anticorpos constituem a base para realização de imunoenaios e esses testes têm sido bastante utilizados para análise química em diversos setores, como por exemplo na criação de imunossensores. Também são utilizados como métodos diagnósticos no combate de doenças (LUNA, et al.,2015), entre outros métodos diagnósticos, como por exemplo imunoprecipitação, métodos enzimáticos, sistemas de injeção em fluxo acoplados a imunoenaios, cromatografia por imunoafinidade e estão ganhando cada vez mais destaque por serem altamente específicos e seletivos (GIL et al.,1999).

Este trabalho teve como objetivo empregar um protocolo simplificado para purificação da lectina coagulante de semente de *M. oleifera* (cMoL) e avaliar o potencial antimicrobiano dessa proteína contra bactérias e fungos patogênicos. Igualmente, desenvolver anticorpo contra a lectina que poderá ser útil em avaliações imunológicas.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 *Moringa oleifera*

*Moringa oleifera* Lamark é uma espécie nativa da Índia amplamente distribuída pelos continentes mundiais, sendo observado seu cultivo na Nigéria, Senegal, Tanzânia, Afeganistão, Indonésia, Paquistão, Bangladesh, Ilhas do Pacífico, Caribe, e também no Nordeste Brasileiro (SANTOS et al., 2015). Esta planta possui boa adaptação a climas extremamente secos, sobrevivendo em regiões pobres em nutrientes e escassez de umidade; suas sementes quando submetidas a um déficit hídrico aumentam a capacidade de tolerância a seca (MACCONNACHIE et al., 1999; RIVA et al., 2013).

Apresenta-se inicialmente como uma pequena árvore chegando a alcançar 12 metros, esta planta tropical é uma das quatorze espécies da família das Moringaceae, ordem Papaverales, por sua caracterização morfológica possui um tronco estreito, copa aberta tipo sombrinha, o fruto quando maduro é seco, tipo cápsula trilobada, deiscente e no interior encontram-se as sementes (Figura1 A), estas apresentam-se aladas e globosas, oleaginosas e cotilédones (Figura1 B); as flores agrupam-se por inflorescência do tipo cimosa (Figura1 C) suas folhas são bipenadas com sete folíolos (Figura1 D) (RAMOS et al., 2010; GUALBERTO et al., 2014).

Possui elevado valor nutricional e a distribuição de macro e micronutrientes é feita de forma diferente na planta variando no tecido em que se encontra. Passos e colaboradores (2012), relatam em sua pesquisa a composição química da planta, distribuída da seguinte forma: carboidrato (11,63 a 71,84%), proteínas (1,44 a 23,29%) e lipídeos (0,49 a 17,37%), com elevado teor de nutrientes na moringa seca, como também em suas sementes, no qual apresenta 177,13mg de ácido ascórbico/100g de vitamina C encontrados na semente in natura.

**Figura 1** - Aspectos de *M. oleifera*: A, frutos; B, sementes; C, Flores;D, Folhas



Fonte: <http://ideiaweb.org/?p=1462>

Essa árvore de grande importância econômica tem se destacado mundialmente, pois seus tecidos assim como os componentes químicos, possuem aplicações em diversas áreas como por exemplo, artesanato, produção de biodiesel (FERNANDES et al., 2015), nos processos de coagulação removendo impurezas (MUNIZ et al., 2015), entre outras utilidades como alimentação animal e também para dieta humana (SANTOS et al., 2015). Suas sementes possuem substâncias com propriedades coagulantes, muito utilizadas nos processos de tratamento de águas turvas em substituição ao sal de alumínio (OKUDA et al., 2001); estas também produzem óleos com aplicações para indústria de cosmético, a farinha das folhas de *Moringa oleifera* têm sido relatadas como uma rica fonte de nutrientes muito utilizada na alimentação humana, principalmente por populações carentes (ANWAR et al., 2007), sendo as folhas altamente ricas em vitamina C, cálcio, vitamina A, superando as demais fontes destes compostos (HSU et al 2006).

A espécie também é utilizada na medicina no tratamento de diversas doenças, por possuir compostos com atividade biológicas com várias propriedades, sendo estas:

antimicrobiana, antitripanossoma, hipotensora, anti-úlceras, hipocolesterolêmico, anti-espasmódico, antioxidante, anti-inflamatória e anti-câncer (SREELATHA et al 2011; AWODELE et al., 2012; SATISH et al.; 2013; TILOKE et al., VONGSAK et al., 2013; CHUTURGOON et al., 2013., HANNAN et al., 2014).

## 2.2 Lectinas

### 2.2.1 Generalidades

Lectinas são moléculas de reconhecimento, que se ligam a carboidratos específicos de modo reversível, não possui origem no sistema imune e que aglutinam células e precipitam glicoconjugados, (PNEUMANS; VAN DAMME, 1995; SANTOS et al.,2009). Essas proteínas são encontradas em todos os organismos como por exemplo microrganismos (FRANCIS, 2011) plantas (SILVA, 2009) e animais (NUNES et al.,2011).

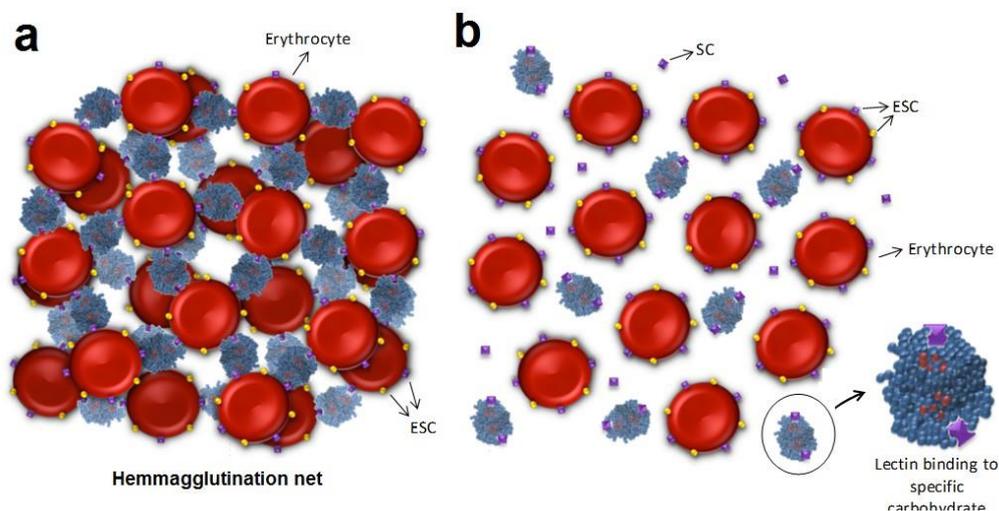
Foram inicialmente descritas como hemaglutininas ou fitohemaglutininas, devido a origem de sua descoberta ter sido de extratos de plantas e também pela capacidade de aglutinar células sanguíneas. Sua descoberta ocorreu quando Stillmark em 1888 realizou estudos sobre a toxicidade da árvore de rícino (*Ricinus communis*) ficando esta aglutinina conhecida como ricina, posteriormente o mesmo pesquisador concluiu que a molécula estudada seria uma proteína (CORREIA et al., 1995). Em seguida Hellin (1889) observou em seus estudos que extratos do feijão Jequiriti (ervilha do rosário) também era capaz de aglutinar células sendo esta molécula chamada abrina; devido à habilidade de aglutinar células e inativar ribossomos, abrina e ricina foram utilizadas como modelos antígeno em estudos imunológicos (SHARON, 2004). Boyd e Shapleigh em 1954, utilizou a palavra latina "lectus" de significado selecionar para classificar proteínas com características semelhantes no

reconhecimento, seleção e interação com carboidratos. Sharon e Lis (1972) incluiu em sua classificação todas as proteínas de fontes diversas capazes formar ligações com carboidratos sendo ou não específico para o eritrócito. A partir do extrato de *Canavalia ensiformis* foi obtida a primeira lectina pura, chamada concavalina A (Con A); que em pesquisas posteriores foi relatada a sua aglutinação preferencial por células malignas, iniciando assim estudos de aplicações com lectinas (CORREIA et al., 1995; INBAR; SACHES, 1969)

O papel biológico das lectinas é determinado pela sua especificidade ao carboidrato porém outros locais de interação da lectina são também importantes e participam desta propriedade como o sítios de interação hidrofóbica e de interação com CHO. Sua diferenciação ocorre pela composição do aminoácido, interação com íons metálicos, estrutura tridimensional e peso molecular, assim como são diferentes de outras moléculas ligadoras de carboidratos pela capacidade de aglutinação celular e dos anticorpos por sua origem não imune (SANTOS et al., 2014).

A sua detecção ocorre por ensaios de hemaglutinação (AH) figura 1a seguido de testes de inibição por carboidratos, figura 2b (CORREIA et al., 2008), no teste de hemaglutinação ocorre a ligação da lectina em sítios específicos aos carboidratos na superfície de eritrócitos (BUTERA et al., 2007).

**Figura 2** - Atividade de hemaglutinação e Inibição por carboidratos



Fonte: SANTOS et al., 2013

### 2.2.2 Lectinas de semente de *Moringa oleifera*

Nas sementes de *Moringa oleifera* podemos encontrar lectinas com diferentes atividades biológicas, entre elas a WSMoL. Essa lectina solúvel em água, foi descrita primeiramente por SANTOS e colaboradores (2005), mostrando atividade principal por células de coelho, o seu isolamento foi feito por cromatografia em quitina e a sequência N-terminal foi determinada (QAVQLTHQQQGQVGPQQVR) (COELHO et al., 2009), MoL purificada por Katre e colaboradores (2008) tratando-se de uma proteína de natureza catiônica formada estruturalmente por polipeptídios com subunidades de 7,1 kDa na presença do agente redutor 2-mercaptoetanol, e duas bandas de 13,1 e 27,1 kDa na ausência do mesmo, o seu isolamento foi efetuado por um trocador iônico do tipo DEAE-Celulose e CM-Sephadex (KATRE et al., 2008).

Santos e colaboradores (2009), revelaram a presença de uma lectina coagulante de semente de *M.oleifera* (cMoL); essa proteína básica, mostrou estabilidade em pH entre 4,0-9,0 e termo resistência a 100°C durante 7 h. Seu isolamento foi realizado por cromatografia de afinidade utilizando em sua matriz o gel de guar, a presença dos íons  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  e  $K^+$  aumentou a AH e pelo resultado da eletroforese sob condições desnaturantes ficou evidente uma única banda de 26,5 kDa e em condições reduzidas com o agente redutor - mercaptoetanol duas subunidades de 26,5 e 14,9 kDa. LUZ e colaboradores (2013), caracterizaram estruturalmente a lectina cMoL e também seu efeito sobre parâmetros hemostáticos, revelando como uma proteína composta por 101 aminoácidos, apresentando 81% de similaridade com a lectina floculante de *M. oleifera* (MoL), e em seus resultados ela também agiu como uma proteína anticoagulante nos testes *in vitro*.

### 2.2.3 Purificação e caracterização

A purificação é um processo fundamental para entendermos a estrutura e atividade biológica da lectina sendo esta feita por diferentes estratégias; a etapa inicial da purificação consiste em extração por soluções aquosas, salinas e tampões, seguido de fracionamento com o sal sulfato de amônio, ocorrendo precipitação das proteínas e em seguida será feita a diálise, preparando as amostras para os processos cromatográficos (SANTOS et al., 2013). A quantificação de proteínas nas amostras pode ser feita por métodos colorimétricos; para o método de Lowry é utilizado o reagente de Folin e a reação acontece pela oxidação dos sais de cobre com o anel aromático do aminoácido (LOWRY, 1951); no ensaio de Bradford ocorrerá a ligação da proteína com o corante Azul Brillhante de Coomassie G-250, sendo monitorada a mudança da coloração a partir de um comprimento de onda de 595nm (BRADFORD, 1976).

Os processos cromatográficos baseiam-se na separação de contaminantes em uma mistura na qual esta será dissolvida em fase móvel e transportada através de uma fase estacionária, podendo também separar formas desnaturadas e nativas da proteína (COELHO et al., 2012). Entre as técnicas mais utilizadas podemos citar a cromatografia de afinidade para obtenção alto padrão de purificação. A ligação com carboidratos ocorre de maneira específica e reversível, pela interação desta com a fase sólida, sendo utilizadas diferentes matrizes como por exemplo quitina, agarose, gel de guar (COELHO et al., 2009; SANTOS et al., 2009; SOUSA et al., 2011; COELHO et al., 2012).

Outro método também utilizado na purificação de proteínas é a cromatografia por troca iônica, na qual ocorre adsorção das moléculas na matriz de acordo com a carga. Esse processo é feito por trocadores como por exemplo, DEAE-celulose responsáveis pela purificação de moléculas (KATRE, 2008), sendo estes do tipo DEAE-50 (BHOWAL et al., 2005), CM-celulose (ARAÚJO et al., 2012) e CM Sephadex (KATRE et al., 2008).

Proteínas também podem ser separadas de acordo com o tamanho molecular por

cromatografia de exclusão molecular (gel filtração). Nessa técnica a proteína é filtrada através dos poros de matrizes inertes, sendo esta gradualmente separada pelo tamanho molecular (KENNEDY et al., 1995); são utilizadas como matrizes de exclusão para purificação de proteínas Sephadex G-100 (COSTA et al., 2010), e Sephacryl S200 (SHAO et al., 2011).

A caracterização das lectinas pode ser realizada por eletroforese, esse método baseia-se na migração de partículas carregadas, influenciadas por um campo elétrico, sendo útil na avaliação do grau de pureza de estruturas moleculares, a eletroforese contendo sulfato sódico dedodecila SDS-PAGE revela formas moleculares desnaturadas, na presença do agente redutor ( -mercaptoetanol) mostra a composição de subunidades (PAJIC et al.,2002).

#### 2.2.4 Aplicações biotecnológicas e atividades biológicas

Devido a sua capacidade de reconhecimento de moléculas diferentes, as lectinas são utilizadas na distinção da tipagem sanguínea, como agentes mitogênicos, para explorar superfícies celulares, em estudos citoquímicos e histoquímicos (CORREIA et al., 1995), também são importantes ferramentas em áreas de pesquisa, como por exemplo, como controle biológico (ALBUQUERQUE et al., 2012), controle de fitopatógeno (SÁ et al.,2009), e possui diversas atividades biológicas entre as quais podemos exemplificar: antimicrobiana (SUN et al., 2008), antitumoral (QUIROGA et al., 2015), ação coagulante (SANTOS et al., 2009) e inseticida (COELHO et al., 2009; DE OLIVEIRA et al., 2011).

#### 2.2.5 Atividade antimicrobiana

O uso indevido de antibióticos de origem sintética tem aumentado a população de microrganismos resistentes, fazendo-se necessária a busca por novos compostos com

atividade antimicrobiana (RAMOS et al., 2014). Nesse sentido lectinas podem ser utilizadas para tal finalidade devido à sua capacidade em interagir com moléculas glicídicas expostas na parede celular de bactérias e fungos inibindo o crescimento e causando a morte bacteriana (GOMES et al., 2014); também podem ser aplicadas na análise de bactérias Gram- positivas e Gram- negativas patogênicas, devido à sua especificidade a carboidratos diversos como ácido teicoico, peptidoglicano e lipopolissacarídeos (CORREIA et al., 2008).

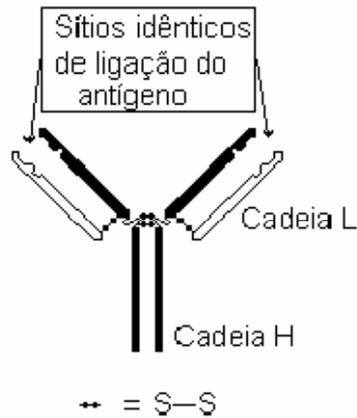
Estudos demonstram atividades antibacterianas em lectinas de plantas; Ferreira e colaboradores (2011) testaram atividades antibacterianas em lectina de sementes de *M. oleifera* solúvel em água (WSMoL); a lectina inibiu o crescimento de *Escherichia coli*. A atividade bacteriana de lectinas isoladas do feijão da praia *Canavalia maritima* (ConM e ConM II) foi avaliada por Farias (2013) que verificou não haver crescimento das linhagens bacterianas na presença das lectinas, revelando sensibilidade para *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. No mesmo trabalho também foram testados o potencial antifúngico das lectinas ConM e ConMII testadas nas espécies de leveduras *Candida albicans*, *C. Tropicalis* e *C. neoformans*. Foi evidenciada uma maior inibição de *C. neoformans* pela lectina ConM, do que a lectina ConMII; entretanto não houve inibição do crescimento em nenhuma das duas lectinas pelas espécies *C. Albicans* e *C. tropicalis*.

### 2.3 Anticorpos

Outra classe protéica de suma importância no reconhecimento de moléculas biológicas são os anticorpos (Figura 3), os quais são originados do sistema imune pela ativação de células de defesa (linfócitos B), e possuem a capacidade de ligar-se de maneira reversível e com ampla afinidade a sítios específicos da molécula alvo (YONG et al., 1995); são

constituídos por polipeptídios, estruturalmente formados por duas cadeias leves e duas pesadas, unidas entre si por pontes dissulfeto (BENJAMINI et al., 1988).

**Figura 3** - Estrutura geral de um anticorpo



Fonte: LENZ, 2004

### 2.3.1 Produção de anticorpos a partir de lectinas imunogênicas

Apesar da importância da produção de anticorpos em vários ramos da ciência, poucos trabalhos foram publicados relacionados à purificação e desenvolvimento de anticorpos policlonais contra lectinas de plantas. Ashford e colaboradores (1982), produziram antissoro contra lectina da batata; o anticorpo produzido contra essa proteína gerou reações cruzadas com lectinas de *Datura stramonium* e do tomate (*Lycopersicon esculentum*). Hankins e colaboradores (1979) também obtiveram em seus resultados reações cruzadas do antissoro gerado contra a lectina de *B. purpúrea* contra outras lectinas, em ensaios de imunodifusões. Carlini e colaboradores (1987) demonstraram em seus resultados, também por imunodifusão, que as IgG geradas contra a lectina e a toxina de *C. ensiformis*, mostraram uma maior homologia entre a toxina. Correia e colaboradores (1995) purificaram isoformas de lectinas de sementes de *Cratylia mollis*, específica para manose e desenvolveram um anticorpo contra a isoforma1 (ISO1), mostrando atividade de conjugação em imunoensaio. Nesse estudo são

referidas algumas aplicações da isoforma, entre as quais explorar superfícies celulares, avaliar homologia entre espécies de lectinas iguais ou diferentes e também servir como matriz de afinidade para purificar glicoproteínas. Haver (2002) desenvolveu, purificou, imobilizou e caracterizou por eletroquímica um anticorpo antilectina de folha de *Bauhinia monandra*; em um de seus resultados ocorreu imunoprecipitação de IgGanti-BmoLL com extrato de outros tecidos de *B.monandra*; também foram reveladas outras formas moleculares da lectina. Santos (2013), produziu anticorpos policlonais para determinação de isoflavonas em leguminosas; nesse ensaio foi observado que das 42 leguminosas testadas, utilizando anticorpos policlonais e PTA-ELISA, todas apresentaram resultados positivos para isoflavonas.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

- ✓ Purificar e caracterizar cMoL avaliando sua atividade imunogênica.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Purificar cMol utilizando cromatografia de afinidade através de novos protocolos;
- ✓ Avaliar atividades biológicas de cMoL (antimicrobiana e hemolítica);
- ✓ Desenvolver antissoro de coelho contra cMoL;
- ✓ Caracterizar IgG anti-cMol através de imunodifusão.

#### **4 ARTIGO A SER SUBMETIDO A PERIÓDICO**

**PROTOCOLO SIMPLES DE PURIFICAÇÃO À HOMOGENEIDADE DA LECTINA  
COAGULANTE DE SEMENTES DE *Moringa oleífera* (cMoL) E  
DESENVOLVIMENTO DE IgG ANTI-cMoL**

**ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO Anais da Academia Brasileira de  
Ciências.**

**PROTOCOLO SIMPLES DE PURIFICAÇÃO À HOMOGENEIDADE DA LECTINA  
COAGULANTE DE SEMENTES DE *Moringa oleifera* (cMoL) E  
DESENVOLVIMENTO DE IgG ANTI-cMoL**

Benny F. de Oliveira<sup>1</sup>, Carlos E. S. Silva<sup>1</sup>, Pollyanna M. da Silva<sup>1</sup>, Maria G. S. Gomes<sup>1</sup>,  
Wagner P. Felix<sup>2</sup>, Thiago H. Napoleão<sup>1</sup>, Patrícia M. G. Paiva<sup>1</sup>, Luana C. B. B. Coelho<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE

<sup>2</sup> Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina-PE

**Correspondência**

Luana C. B. B. Coelho, Departamento de Bioquímica, CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Prof. Moraes Rego S/N, Cidade Universitária, 50670-420, Recife-PE, Brazil.

E-mail: lcbccoelho@gmail.com

**RESUMO**

O presente trabalho empregou uma metodologia simplificada para produção do gel de guar o qual constitui a matriz de afinidade para purificação da lectina coagulante de sementes de *Moringa oleifera* (cMoL). A caracterização parcial da lectina foi efetuada através de eletroforeses para proteínas nativas básicas ou ácidas, bem como eletroforese contendo sulfato sódico de dodecila (SDS). A purificação de cMoL com gel de guar produzido pelo protocolo descrito foi eficiente; a atividade hemaglutinante específica da lectina (AHE) foi de 2.500. De acordo com a eletroforese a proteína purificada é básica e possui o mesmo padrão de massa molecular da cMoL anteriormente descrita. Também foi realizado um ensaio de atividade antibacteriana, no qual, houve inibição do crescimento das espécies *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Serratia sp.*, *Bacillus subtilis* e a espécie *Proteus mirabilis*. Também foi

testado o potencial de inibição de cMoL para as espécies leveduriformes *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. tropicales* e *C. glabrata*, no qual houve inibição de todas as cepas apenas em elevadas concentrações de 10 mg. Um anticorpo policlonal para lectina foi desenvolvido em coelhos, e testado por imunodifusão; os resultados foram positivos para a segunda inoculação ocorrendo precipitação entre IgG, extrato e lectina demonstrando que cMoL é imunogênica.

**Palavras-chave:** *Moringa oleifera*, lectina coagulante, purificação de proteína, gel de guar, atividade antimicrobiana, IgG anti-cMoL.

## INTRODUÇÃO

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas capazes de formar ligações a oligo, mono e polissacarídeos de forma específica e reversível. Devido a essa interação possuem importância biotecnológica, podendo ser isoladas de diversos organismos: microrganismos, líquens, plantas e animais (SANTOS et al., 2013). Nas plantas possuem distribuição nos diversos tecidos, com predomínio nas sementes (SANTOS et al., 2009), e podem ter diversas aplicações, incluindo ação antimicrobiana e anticoagulante (FERREIRA et al., 2011), bem como inseticida (ARAÚJO et al., 2012).

Diversos métodos são aplicados para obtenção de lectina pura iniciando o protocolo com a preparação do extrato e fracionamento salino em diversas concentrações, diálise, teste de atividade hemaglutinante (AH), e em seguida são realizadas cromatografias, podendo essas ser de exclusão molecular, troca iônica e de afinidade (COELHO et al., 2012). Para a obtenção de uma purificação à homogeneidade e com bom rendimento se faz necessário o desenvolvimento de protocolos eficientes e simplificados.

Antissoros para lectinas possuem ampla aplicação nos processos de detecção da ligação de lectinas a tecidos, sendo utilizados preferencialmente na forma de imunoglobulina

G (IgG) e, quando conjugado a peroxidase, pode amplificar uma reação imunológica (CORREIA et al., 1995). Desenvolvidos contra lectinas de plantas, os anticorpos podem ser utilizados para que estas sejam identificadas em outros tecidos vegetais ou para que se revelem formas homólogas por meio de reações cruzadas da proteína com outras lectinas de plantas, em relação ao anticorpo (HAVER et al., 2002).

*Moringa oleifera* (família das Moringaceae) é uma planta originária da Índia com ampla distribuição mundial e possui boa adaptação a regiões de climas extremos. Seu cultivo vem tendo crescente interesse devido aos elevados valores nutricionais de tecidos da planta bem como as suas diversas aplicações em várias áreas: medicina, indústria de cosméticos, na alimentação humana e ração animal, e também no tratamento de água (SANTOS et al., 2015).

Este trabalho teve como objetivo empregar um protocolo simplificado para purificação da lectina coagulante de semente de *M. oleifera* (cMoL) e avaliar o potencial antimicrobiano dessa proteína contra bactérias e fungos patogênicos. Igualmente, desenvolver anticorpo contra a lectina que poderá ser útil na identificação de lectinas homólogas presentes nas sementes ou em outros tecidos da planta.

## **METODOLOGIA**

### **Obtenção de sementes**

As sementes de *M. oleifera* Lam foram coletadas na cidade do Recife, Estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil, na Universidade Federal de Pernambuco.

### **Extração de proteínas**

A farinha das sementes (50 g) foi misturada a NaCl 0,15M (500 mL) mantendo a proporção da mistura em 10% (p/v). A extração foi realizada por 6h seguida por filtração em

gaze e centrifugação a 8.000 rpm, por 20 min, em temperatura ambiente. O extrato resultante foi denominado extrato salino (ES).

### **Precipitação com sulfato de amônio**

A etapa inicial de isolamento foi o fracionamento das proteínas do extrato através da adição de sulfato de amônio (GREEN e HUGHES, 1995). ES foi submetido a precipitação com sulfato de amônio 0-60%. A fração com maior AH obtida com sulfato de amônio foi submetida a cromatografia de afinidade em gel de guar.

### **Produção do Gel de Guar através do método Appukutan**

Para a produção do gel de guar, foi utilizado o método de Appukutan et al. (1977); o protocolo recomenda a pesagem de 10 g de goma de guar e dissolução em 30mL de NaOH 3M e 3,0 mL de epiclorigrina. Logo após, a mistura foi submetida a aquecimento em estufa a 40 °C por 24 h e, posteriormente, a 70°C por 12 h. Em seguida, foram realizadas três lavagens do gel de guar com água destilada e mantida sob refrigeração até seu uso.

#### **1.1 ISOLAMENTO DA LECTINA**

O precipitado do extrato bruto obtido do fracionamento salino, foi submetido a uma coluna de gel de guar (10 x 1 cm), elaborado segundo a metodologia descrita acima. A coluna foi previamente equilibrada com uma solução de NaCl 0,15 M a um fluxo de 20mL/h. O pico proteico ativo foi eluído irrigando a matriz com NaCl 1,0 M. As frações eluídas da coluna foram avaliadas em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 280nm e acompanhadas por atividade hemaglutinante (AH).

### **Caracterização das amostras obtidas**

O ensaio de hemaglutinação foi realizado em placa de microtitulação de acordo com Paiva e Coelho (1992). AH específica (AHE) foi determinada pela razão AH/concentração de proteínas (mg/mL). A dosagem de proteínas foi determinada utilizando uma curva padrão de albumina sérica bovina (BSA), com amplitude de 31,25 a 500 µg/mL, de acordo com o método de dosagem de proteínas segundo Lowry (1951).

### **Eletroforeses**

As preparações proteicas ao longo do processo de purificação foram monitoradas através de eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes contendo sulfato sódico de doceila (SDS-PAGE), de acordo com Laemmli (1970). A detecção das bandas polipeptídicas foi feita com solução azul de Coomassie a 0,02 % (p/v) em etanol a 40% (v/v) e ácido acético a 10 % (v/v) para os géis oriundos da SDS-PAGE. Já o gel de poliácridamida, para proteínas nativas básicas, foi preparado segundo a técnica de Reisfeld (1962) sendo utilizadas duas placas de vidro (8 x 8 cm x 1,5 mm ) lavadas, desengorduradas e seladas. A coloração para detecção de proteínas no gel, foi realizada com solução de Negro de Amido a 1 % (p/v) em ácido acético a 10 % (v/v), por 30s. Para a descoloração, foram procedidas sucessivas lavagens do gel com ácido acético 10% (v/v).

### **Atividade antimicrobiana**

Atividade bacteriana foi investigada contra bactérias Gram-positiva (*Bacillus subtilis* UFPEDA86), (*Enterococcus faecalis* UFPEDA138) e Gram-negativa (*Escherichia coli* UFPEDA224), (*Proteus mirabilis* UFPEDA767), (*Serratia sp.*UFPEDA 398), fornecidas pela coleção de culturas (WDCM 114) do *Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco*.

A atividade antifúngica foi investigada contra espécies de *Candida*: *C. albicans* (URM 5901), *C. krusei* (URM 6391), *C. tropicalis* (URM6551) e *C. glabrata* foram obtidas da cultura de Coleções do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.

As bactérias foram cultivadas em caldo Mueller Hinton Broth (MHB) a 37°C e os fungos em Sabouraud Dextrose Broth (SDB) a 28°C, por 16 h, sob agitação suave. A densidade das culturas foi ajustada turbidimetricamente a um comprimento de onda de 600 nm a  $1,5 \times 10^8$  unidades formadoras de colônias (CFU) por ml. Para utilização em ensaios antimicrobianos as culturas foram diluídas em meio para  $3 \times 10^6$  CFU/mL. Cada ensaio antimicrobiano correspondeu a uma linha de uma microplaca de 96 poços. Primeiramente 100 µL de meio foram adicionados a cada poço da linha. cMoL em água destilada (100 µL; 10 mg/mL) foi adicionada ao terceiro poço, misturada com o meio, e em seguida submetida a diluição seriada em MHB até uma proporção final de 1:1024. O primeiro poço correspondeu a um controle de esterilidade do meio e o segundo ao controle correspondente a 100% de crescimento. Em seguida foram inoculados 20 µL da cultura microbiana todos os poços (exceto o primeiro). A densidade óptica a 600 nm (OD600) foi medida utilizando um leitor de microplacas (Biotek Instruments Inc., VT, EUA) e, em seguida, o ensaio foi incubado a 37°C durante 24 h. Após o período de incubação, a DO600 foi medida novamente. O aumento em DO600 em comparação com o tempo zero foi considerado como o crescimento bacteriano. A concentração inibitória mínima (CMI) foi determinada como a menor concentração de cMoL capaz de promover uma redução de DO600 maior ou igual a 50%, em comparação com o controle de crescimento 100% em DO600 (Amsterdam, 1996). Cada ensaio foi realizado em triplicata e três experimentos independentes foram realizados.

Para determinar a concentração mínima bactericida (CMB) e mínima fungicida (CMF) foram transferidos 10 µL do inóculo para placas de petri contendo o meio agar (MHA) a partir

de poços em que houve inibição do crescimento superior ou igual a 50%. Em seguida foram incubadas a 37°C durante 24 h. CMB e CMF corresponderam à concentração mais baixa de cMoL capaz de reduzir a viabilidade do inóculo inicial em 99,9%. Cada ensaio foi realizado em triplicata e três experimentos independentes foram realizados.

### **Atividade Hemolítica**

Com o extrato, a fração e a lectina cMoL, nas concentrações de 250, 500, 750, e 1000µg, utilizando eritrócitos humanos tipo O, apresentando um resultado negativo para o grau de hemólise, abaixo de 50%, quando comparado ao reagente Triton X100 (controle negativo) com 100% de hemólise e solução salina (controle negativo) 0% de hemólise; o grau de hemólise é considerado em valores acima de 50% e a avaliação foi feita em um comprimento de onda de 545 nm.

### **Preparação do soro IgG anti-cMoL**

cMol purificada (150 µg) em 1 mL de tampão citrato fosfato 0,1 M, pH 6,8, contendo 0,15 M NaCl, foi emulsificada com 1 mL de Freund's adjuvante completo para a primeira inoculação em um coelho branco, macho, da raça Nova Zelândia, com aproximadamente seis meses. Subsequentes injeções de 1 mL de adjuvante incompleto de Freund (três inoculações) foram efetuadas em intervalos quinzenais. Antes da primeira inoculação foi realizada sangria de cerca de 10 mL para a coleta do soro pré-imune (controle). No intervalo de quinze dias imediatamente antes de cada inoculação, 10 mL de sangue foi coletado da artéria central da orelhada animal. Cada mililitro foi coagulado em um tubo de vidro em um ângulo de 45° em temperatura ambiente por 1 h e colocado no mesmo ângulo a 4° C durante a noite. O soro obtido foi centrifugado em três tempos de 1.300 xg, por 5 min em temperatura ambiente.

Alíquotas foram armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . O trabalho está na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) UFPE sob número 23076.049690/2016-92.

### **Ensaio de Imunodifusão Dupla**

A imunodifusão dupla foi realizada de acordo com Ashford et al. (1982). Géis de 1% (p / v) de agarose contendo NaCl 0,15 M foram moldados em placas de vidro de 2,5 cm x 7,5 cm, com 3mm de espessura. Em cada gel foram cortados 4 poços de 3 mm de diâmetro. Foi permitida a difusão durante 48 h a  $4^{\circ}\text{C}$  em câmaras umedecidas. Os géis foram lavados com NaCl 0,15 M e água destilada, seca e corada com 0,1% (p/v) de azul brilhante de Coomassie R-250 em 45% (v / v) de etanol contendo 10% (v / v) de ácido acético.

## **RESULTADOS E DISCUSSÕES**

AH foi detectada em todas as etapas da purificação, extrato, fração e cMoL. A figura 1 resume as etapas de purificação. Através da purificação da lectina feita pelo método de Appukuttan e colaboradores (1977) para confecção do gel de guar, não foi verificada a presença de AH no não adsorvido, estando esta presente apenas no pico adsorvido como mostra a (Figura 1 A). Assim a metodologia empregada neste trabalho mostrou eficiência quando comparada ao método de Gupta e colaboradores (1979), protocolo utilizado por Santos e colaboradores (2009), uma vez que a lectina foi totalmente adsorvida na matriz, diferente do método aplicado anteriormente no qual a maior parte da lectina foi encontrada no pico não adsorvido. A eletroforese para proteínas básicas nativas revelou uma única banda de cMoL (Figura 1 C), indicando a homogeneidade da lectina. Na eletroforese para proteínas ácidas não foi verificada a presença da lectina. Em SDS-PAGE, foram reveladas duas bandas polipeptídicas de peso molecular equivalente a 26,5 e 19 KDa (Figura 1 B).

O perfil de sensibilidade da linhagem bacteriana foi evidenciado pela determinação do (CMI). Os resultados demonstraram inibição do crescimento das linhagens bacterianas na presença de cMoL em altas concentrações, com uma concentração mínima inibitória (CMI) de 10 mg/mL. Desse modo as linhagens bacterianas *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Serratia sp*, *Bacillus subtilis*, foram pouco sensíveis a ação de cMoL e não houve resultado contra a espécie *Proteus mirabilis*. Na avaliação da concentração mínima bactericida (CMB), não houve resultado para nenhuma das linhagens bacterianas testadas. Ferreira e colaboradores (2011) demonstraram atividade antibacteriana de uma outra lectina solúvel em água, presente nas sementes de *M. oleifera*, WSMoL, foi capaz de inibir o crescimento das linhagens bacterianas *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Visando avaliar o potencial antifúngico de cMoL, foram testadas as seguintes leveduras: *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. glabata*. Nos ensaios cMoL foi submetida às cepas em concentrações variadas. Nos resultados cMoL produziu inibição sobre o crescimento de *C. albicans* e *C. glabata* em uma concentração de 5 mg/mL, *C. krusei* em 10 mg/mL e *C. tropicalis* em 0,16 mg/mL; igualmente, a concentração mínima fungicida (CMF) é mostrada na Tabela 2. Estudos relatam que lectinas possuem a capacidade de ligar-se de maneira específica a hifas de cepas fúngicas impedindo a captação de nutrientes e de compostos necessários ao crescimento dos fungos (LIS e SHARON, 1981). Lectinas são altamente específicas a carboidratos presentes na parede celular dos fungos (FARIAS, 2013).

Foi feito um teste hemolítico do extrato, fração e lectina cMoL, nas preparações de 250, 500, 750, e 1000µg, utilizando eritrócitos humanos tipo O, apresentando resultado negativo para o grau de hemólise, abaixo de 50%, quando comparado ao reagente Triton X100 (controle negativo) com 100% de hemólise e solução salina (controle negativo) 0% de hemólise, o grau de hemólise é considerado em valores acima de 50% e a avaliação foi feita em um comprimento de onda de 545nm.

Os resultados de imunogenicidade foram positivos após a segunda inoculação ocorrendo precipitação entre IgG, fração e lectina; não houve ligação entre o anticorpo e o extrato, como também não houve resultado positivo para o soro pré-imune e a primeira inoculação (Figura 2). Correia (1995) relatou que os soros de todos os estágios de imunização contra a lectina de sementes de *Cratylia mollis* foram positivos, com intensificação da reação a partir da terceira inoculação. Haver (2002) mostrou através de imunodifusão dupla que após a terceira inoculação o soro positivo revelando imunoprecipitação foi obtido; também observou reações cruzadas entre IgG anti-BmoLL e as lectinas de *Bauhinia purpurea* e *Ulex europeus*.

A lectina coagulante de sementes de *M. oleifera*, cMoL, foi purificada à homogeneidade através do critério de pureza empregando eletroforese em gel de poliacrilamida para proteínas básicas; foi obtido um bom aproveitamento com a metodologia aplicada.

Quanto às atividades biológicas, a lectina não possui efeito hemolítico, foi capaz de inibir a maioria das bactérias testadas apenas em elevadas concentrações e no ensaio com fungos promoveu efeito inibitório e fungicida.

A lectina é imunogênica, e o antissoro obtido será purificado, caracterizado e aplicado em imunoensaios.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas Bolsas de Produtividade em Pesquisa (THN, PMGP e LCBBC) e Auxílios Financeiros; igualmente agradecem à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco, FACEPE (BFO).

## REFERÊNCIAS

AMSTERDAM, D. Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media. In Antibiotics in Laboratory. **Medicine ed. Loman**, v. pp. 526-111. Baltimore, MD: Williams and Wilkins, 1996.

APPUKUTTAN, P. S.; SUROLIA, A.; BACHAWAT, B. K. Isolation of two galactose-binding proteins from *Ricinus communis* by affinity chromatography. **Indian Journal of biochemistry & Biophysics**, v. 14, p.382-384. 1977.

ARAÚJO, R. M. S.; FERREIRA, R. S.; NAPOLEÃO, T. H.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G.; COELHO, L. C. B. B.; CORREIA, M. T. S.; OLIVA, M. L. V.; PAIVA, P. M. G. *Cratavea tapia* bark lectin is an affinity adsorbent and insecticidal agent. **Plant Science**, v.183, p. 20-26, 2012.

COELHO, L. C. B. B.; SANTOS, A. F. S.; NAPOLEÃO, T. H.; CORREIA, M. T. S.; PAIVA, P. M.G. Protein Purification by Affinity Chromatography. In: Rizwan Ahmad, editor. Protein Purification. Rijeka: **InTech**, Open Access Publisher. p.53-72 ISBN: 9789533078311; 2012.

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**, vol.55, p. 261-273, 1995.

FERREIRA, R. S.; NAPOLEÃO, T. H.; SANTOS, A. F. S.; SÁ, R. A.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G.; MORAIS, M. M. C.; SILVA-LUCCA, R. A.; OLIVA, M. L. V.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G, Coagulant and antibacterial activities of the water-soluble seed lectin from *Moringa oleifera*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 53, p. 1866-192, 2011.

GREEN, A. A.; HUGHES, W. L. Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solutions of salts and organic solvents. In: COLOWICK, S.; KAPLAN, N. *Methods in Enzymology*, **New York: Academic Press**, v.1, pp. 67-90, 1995.

GUPTA, K. C.; SAHINI, M. K.; RATHAUR, B. S.; NARANG, C. K.; MATHUR, N. K. Gel filtration medium derived from guar gum. **Journal of Chromatography**, v.169, p.183-190, 1979.

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

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

LUZ, L. A.; SILVA, M. C. C.; FERREIRA, R. S.; SANTANA, L. A.; LUCCA R. A. S.; MENTELE, R.; OLIVA, M. L. V.; PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B. Structural Characterization of coagulant *Moringa oleifera* lectin and its effect on hemostatic parameters **International Journal of Biological Macromolecules**, v.58, p.31-36, 2013.

OLIVEIRA, C. F. R.; LUZ, L. A.; PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B.; MARANGONI, S.; MACEDO, M. L. R. Evaluation of seed coagulant *Moringa oleifera* lectin (cMoL) as a bioinsecticidal tool with potential for the control of insects, **Process Biochemistry**, v.46, p. 4986504, 2011.

HAYER, N. J. Desenvolvimento, Purificação e Caracterização de IgG anti-lectina de folha de *Bauhinia monandra* 2002. 2002. 92 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2002.

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

REISFELD, R. A.; LEWIS, U. J. & WILLIAMS, D. E. Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. *Nature*, v.195, p.281-3,1962.

SANTOS, A. F. S.; LUZ, L. A.; ARGOLO, C. C. A.; TEIXEIRA, J. A.; PAIVA, P. M. G, COELHO, L. C. B. B. Isolation of a seed coagulant *Moringa oleifera* lectin, **Process Biochemistry**. v.44, p.5046508, 2009.

SANTOS, A. F. S.; NAPOLEÃO, T. H.; BEZERRA, R. F.; CARVALHO, E. V. M. M.; CORREIA, M. T. S.; PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B. Strategies to obtain Lectins from Distinct Sources, **Advances in Medicine and Biology**, v.63,p. 33-60, 2013.

SANTOS, A. F. S.; LUZ, L. A. PONTUAL, E. V.; NAPOLEÃO, T. H.; PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B.; *Moringa oleifera*: Resource Management and Multiuse Life Tree, **Advances in Research**.v.4 (6), p. 388-402, 2015.

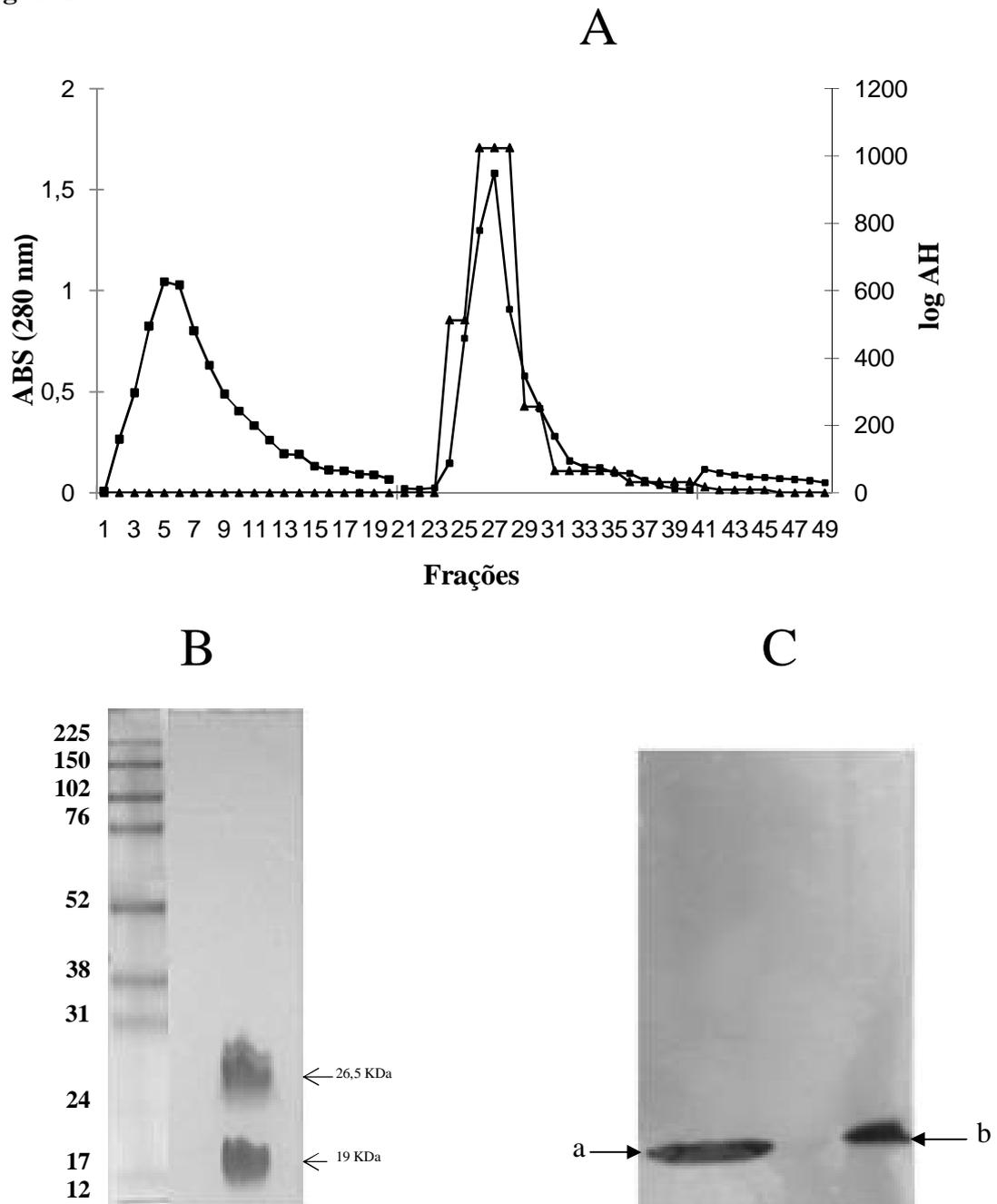
WEBSTER, D.; TASCHEREAU, P.; BELLAND, R.J.; SAND, C.; RENNIE, R.P. Antifungal activity of medicinal plant extracts; preliminary screening studies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, p. 1406146, 2008.

## Legendas das Figuras

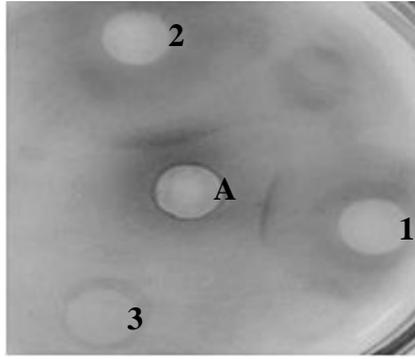
Figura 1 - (A) Cromatografia de afinidade da fração 0-60% (10 mg de proteína) obtida a partir do extrato da farinha de sementes em coluna de gel de guar (10 cm x 1,0 cm). Foi utilizado na etapa de lavagem NaCl 0,15 M cMoL 2 mg foi eluída com NaCl 1,0 M sendo coletadas frações de 2,0 mL. A absorvância foi determinada em um comprimento de onda  $A_{280\text{nm}}$ . O log da atividade hemaglutinante AH está representado. (B) SDS-PAGE (12%, p / v) de cMoL (25 g) e marcadores de massa molecular corados com azul de Coomassie. (C) Eletroforese para proteína nativa básica de cMoL (a) 25 g e citocromo C (b) 20 g, corados com negro de amido.

Figura 2 - Ensaio de imunodifusão dupla em gel de agarose mostrando a precipitação entre IgG, cMoL e fração. Poço central: A, IgG anti-cMoL. Poços laterais: 1, cMoL; 2, Fração; 3, Extrato.

Figura1



**Figura 2**



**Tabela 1-** Sumário da Purificação

Preparação	Proteína (mg/mL)	AH	AHE	Purificação
Extrato	9,68	4096	423,14	1,0
0-60	1,9	2,048	1,077	2,5
cMoL	0,398	1024	2,572	6,07

A partir do extrato da farinha de sementes a 10% (p/v) e posterior fracionamento com sulfato de amônio 60%, 1,9 mg da fração do precipitado foi cromatografada em coluna de afinidade em gel de guar, sendo obtido 0,39 mg de cMoL. A atividade hemaglutinante AH foi verificada em todas as etapas. AHE, atividade hemaglutinante específica.

**Tabela 2 -** Atividade antifúngica de cMoL

Fungo	CMI	CMF
<i>Candida albicans</i>	5	10
<i>Candida krusei</i>	10	ND
<i>Candida tropicalis</i>	0,16	10
<i>Candida glabrata</i>	5	ND

CMI (concentração mínima inibitória) e CMF (concentração mínima fungicida) expressa em mg/mL de proteína. ND: não detectada atividade antifúngica.

## 5 CONCLUSÕES

A lectina coagulante de semente de *M. oleifera* (cMoL) foi purificada à homogeneidade e demonstrou bom aproveitamento com a metodologia utilizada.

A lectina não possui efeito hemolítico, inibiu a maioria das bactérias apenas em elevadas concentrações e promoveu efeito inibitório e fungicida com espécies do gênero *Candida*.

cMol é imunogênica; o antissoro desenvolvido contra cMoL interagiu com a lectina e uma fração do extrato de *M. oleifera*.

## REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, L. P.; SANTANA, G. M. S.; PONTUAL, E. V.; NAPOLEÃO, T. H.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G.; Effect of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin on survival and digestive enzymes of *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae) *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 75, p.158-166, 2012.

ANWAR, F.; LATIF, S.; ASHRAF, M.; GILANI, A. H. *Moringa oleifera*: a food plant with multiple medicinal uses. **Phytotherapy research**, v. 21, p.17-25, 2007.

ARAÚJO, R. M. S.; FERREIRA, R. S.; NAPOLEÃO, T. H.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G.; COELHO, L. C. B. B.; CORREIA, M. T. S.; OLIVA, M. L. V.; PAIVA, P. M. G. *Crataeva tapia* bark lectin is an affinity adsorbent and insecticidal agent. **Plant Science**, v.183, p. 20-26, 2012.

ASHFORD, D.; ALLEN, A.K.; NEUBERGER, A. The production and properties of an antiserum to potato (*Solanum tuberosum*) lectin. **Biochemistry**, vol. 201, p. 641-645, 1982.

AWODELE, O.; OREAGBA, I. A.; ODOMA, S.; DA SILVA, J. A.; OSUNKALU, V. O. Toxicological evaluation of the aqueous leaf extract of *Moringa oleifera* Lam. (Moringaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, p. 330-336, 2012.

BENJAMINI, E.; LESKOWITZ, S.; Immunology: A short course, ed, Alan R. Liss, New York, p.112, 1988.

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.

BOYD, W.C.; SHAPLEIGH, E. Specific Precipitating Activity of Plant Agglutinins (Lectins). *Science*, v. 119, p. 419, 1954.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.

BUTERA, A. P.; FILHO, J. D. S.; CARVALHO, D. T.; FIGUEIREDO, R. C.; FARIA, L. C. A.; NUNES, M. A.; PRADO, M. A. F.; ALVES, R. J.; ANDRADE, M. H. G.; SILVA, K. T. S. Síntese de amidas e sulfonamidas de  $\alpha$ -D-galactopiranosilamina e  $\alpha$ -lactosilamina e avaliação de suas interações com lectinas de *Erythrina cristagallie* de *Ricinus communis*. *Química Nova*, v. 30, n. 5, p. 1267-1274, 2007.

CARLINI, C. R.; BARCELLOS, G. B. S.; BAETA-NEVES, A. D. V.; GUIMARÃES, J. A. Immunoreactivity for cana toxin and concanavalin A among proteins for leguminous seeds. *Phytochemistry*, vol. 27, n.1, p. 25-30, 1988.

COELHO, J. S.; SANTOS, N. D. L.; NAPOLEÃO, T. H.; GOMES, F. S.; FERREIRA, R. S.; ZINGALI, R. B.; COELHO, L. C. B. B.; LEITE, S. P.; NAVARRO, D. M. A. F.; PAIVA, P. M. G. Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae. *Chemosphere*, v.77, p. 934-938, 2009.

COELHO, L. C. B. B.; SANTOS, A. F. S.; NAPOLEÃO, T. H.; CORREIA, M. T. S.; PAIVA, P. M. G. Protein purification by affinity chromatography. In: Ahmad, R. (ed.) Protein Purification, **Rijeka: InTech**, p. 53-72, 2012.

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**, vol. 55, p. 261-273, 1995.

CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA P. M. G. Lectins, carbohydrate recognition molecules: Are they toxic? In: Siddique, Y. H. (ed.) Recent Trends in Toxicology. **Transworld Research Network**, p. 47-59, 2008.

COSTA, R. M. P. B.; VAZ, A. F. M.; OLIVA, M. L. V.; COELHO, L. C. B. B.; CORREIA, M. T. S, CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G. A new mistletoe *Phthirus apyrifolia* leaf lectin with antimicrobial properties. **ProcessBiochemistry**, v. 45, p. 526-533, 2010.

DE OLIVEIRA, C. F. R.; LUZ, L. A.; PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B.; MARANGONI, S.; MACEDO, M. L. R. Evaluation of seed coagulant *Moringa oleifera* lectin (cMoL) as a bioinsecticidal tool with potential for the control of insects. **Process Biochemistry** (1991), v. 46, p. 498-504, 2011.

FARIAS, D. L. Isolamento Purificação e atividades biológicas de uma nova lectina de feijão da praia (*Canavalia marítima*). 2013. 78f. Dissertação Mestrado em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal da Paraíba, Paraíba, 2013.

FERNANDES, D. M.; SOUSA, R. M. F.; OLIVEIRA, A.; MORAIS, S.A.L.; RICHTER, E.M.; MUÑOZ, R. A. A. *Moringa oleifera*: A potential source for production of biodiesel and antioxidant additives. **Fuel**, v. 146, p. 75-80, 2015.

FERREIRA, R. S.; NAPOLEÃO, T. H.; SANTOS, A. F. S.; SÁ, R. A.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G.; MORAIS, M. M. C.; SILVA-LUCCA, R. A.; OLIVA, M. L. V.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G, Coagulant and antibacterial activities of the water-soluble seed lectin from *Moringa oleifera*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 53, p. 1866-192, 2011.

FRANCIS, F.; JABER, K.; COLINET, F.; PORTETELLE, D.; HAUBRUGE, E. Purification of a new fungal mannose-specific lectin from *Penicillium chrysogenum* and its aphicidal properties. *Fungal Biology*. v. 115, p. 1093-1099, 2011.

GIL, E. S.; LAURO, E.; KUBOTA, T.; YAMAMOTO, Y. I. Alguns aspectos de imunoensaios aplicados à Química Analítica. **Química Nova**, v. 22 (6), p. 874-879, 1999.

GONÇALVES, A. L.; FILHO, A. A.; MENEZES, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 3, p. 353-358, 2005.

GOMES, F. S.; PONTUAL, E. V.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G. Saprophytic, Symbiotic and Parasitic Bacteria: Importance to Environment, Biotechnological Applications and Biocontrol. **Advances in Research**, v.2, p. 250-265, 2014.

GUALBERTO, A. F.; FERRARI, G. M.; ABREU, K. M. P.; PRETO, B. L.; FERRARI, J. L. Características, propriedades e potencialidades da moringa (*Moringa oleifera* Lam.): Aspectos agro ecológicos. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 9, n. 5, p. 19-25, 2014.

HANKINS, C. N.; KINDINGER, J. I.; SHANNON, L. M. Legume Lectins: I. Immunological Cross-Reactions between the Enzymic Lectin from Mung Beans and other Well Characterized Legume Lectins. *Plant Physiology*, v. 64, p.104-107, 1979.

HANNAN, M. A.; KANG, J. Y.; MOHIBBULLAH, M.; HONG, Y. K.; LEE, H.; CHOI, J. S.; CHOI, I. S.; MOON, I. S.; *Moringa oleifera* with promising neuronal survival and neurite out growth promoting potentials. **Journal of Ethnopharmacology**. v.152, p.142-50. 2014.

HAYER, N. J. Desenvolvimento, Purificação e Caracterização de IgG antilectina de folha de *Bauhinia monandra* 2002. 92 f. Tese Doutorado em Ciências biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2002.

HSU, R.; MIDCAP, S.; LUCIENNE W.; A. L. *Moringa oleifera*, medicinal and socio-economic uses. **International Journal on Economic botany**, v.1, p.1-25, 2006.

INBAR, M AND SACHS, L Interaction of the carbohydrate-binding protein concanavalin A with normal and transformed cells. **Proceedings of National Academy of Science**, v.63, p.1418-25, 1969.

KATRE, U. V.; SURESH, C. G.; KHAN, M. I.; GAIKWAD, S. M. Structure-activity relationship of a hemagglutinin from *Moringa oleifera* seeds, **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 42, p. 2036-207, 2008.

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

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

LUZ, L. A.; SILVA, M. C. C.; FERREIRA, R. S.; SANTANA, L. A.; LUCCA R. A. S.; MENTELE, R.; OLIVA, M. L. V.; PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B. Structural Characterization of coagulant *Moringa oleifera* lectin and its effect on hemostatic parameters **International Journal of Biological Macromolecules**, v.58, p.31-36, 2013.

MACCONNACHIE, 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.

NUNES, E. S.; SOUZA, M. A. A.; VAZ, A. F. M.; SANTANA, G. M. S.; GOMES, F. S.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G.; SILVA, R. M. L.; SILVA-LUCCA, R. A.; OLIVA, M. L. V.; GUARNIERI, M. C.; CORREIA, M. T. S. Purification of a lectin with antibacterial

activity from *Bothrops leucurus* snake venom. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v.159, p.57-63, 2011.

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, n.2, p. 405-410, 2001.

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**, v.132, p.213-221, 2002.

PASSOS, R. M.; SANTOS, D. M. C.; SANTOS, B. S.; SOUZA, D. C. L.; SANTOS, A. B.; SILVA, G. F. Qualidade pós-colheita da moringa (*Moringa oleifera* Lam.) utilizada na forma in natura e seca. **Revista GEINTEC**, v.3, n.1, p.113-120, 2012.

PNEUMANS, W. J.; VAN DAMME, J. M. Lectins as Plant Defense Proteins. **Plant Physiology**, v.109, p.347-352, 1995.

QUIROGA, A. V.; BARRIO, D. A.; AÑÓN, M. C. Amaranth lectin presents potential antitumor properties. *LWT - Food Science and Technology*, v.60, p.478-485, 2015.

RAMOS, L. M.; COSTA, R. S.; MÔRO, F. V.; SILVA, R. C. Morfologia de frutos e sementes e morfofunção de plântulas de Moringa (*Moringa oleifera* Lam.) **Comunicata Scientiae**, v.1(2) p. 156-160, 2010.

RAMOS, D. B. M.; GOMES, F. S. NAPOLEÃO, T. H.; PAIVA, P. M. G.; SILVA, M. D. C.; COELHO, L. C. B. B. Antimicrobial Activity of *Cladonia verticillaris* Lichen Preparations on Bacteria and Fungi of Medical Importance. **Chinese Journal of Biology**, v. 2014, p.7, 2014.

RIVAS, R.; OLIVEIRA, M. T.; SANTOS, M. G. Three cycles of water deficit from seed to young plants of *Moringa oleifera* woody species improves stress tolerance, *Plant Physiology and Biochemistry*, v.63, p. 200-208, 2013.

RODRIGUES C. F.; SILVA, S.; HENRIQUES, M. *Candida glabrata*: a review of its features and resistance. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v.33(5), p.673-688, 2014.

SÁ, R. A.; GOMES, F. S.; NAPOLEÃO, T. H.; SANTOS, N. D. L.; MELO, C. M. L.; GUSMÃO, N. B.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G.; BIEBER, L. W. Antibacterial and antifungal activities of *Myracrodruon urundeuva* heartwood. **WoodScience Technology**, v.43, p.85-95, 2009.

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.

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

SANTOS, A. F. S.; ARGOLO, A. C. C.; PAIVA, P. M. G. ; COELHO, L. C. B. B. Antioxidant Activity of *Moringa oleifera* Tissue Extracts, **Phytotherapy Research**. v.6, p.1366-1370, 2012.

SANTOS, J. F. F. Anticorpos policlonais para determinação de isoflavonas em leguminosas. 2013. 65 f. Dissertação (mestrado em Produção Animal Sustentável), Instituto de Zootecnia, Agência paulista de tecnologia dos agronegócios, Nova Odessa, 2013.

SANTOS, A. F. S.; DA SILVA, M. D. C.; NAPOLEÃO, T. H.; PAIVA, P. M. G.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B. Lectins: Function, structure, biological properties and potential applications, **Current Topics in Peptide & Protein Research**.v.15, p.41-62, 2014.

SANTOS, A. F. S.; LUZ, L. A.; PONTUAL, E.V.; NAPOLEÃO, T. H.; PAIVA, P.M.G.; COELHO, L. C. B. B.; *Moringa oleifera*: Resource Management and Multiuse Life Tree, **Advances in Research**. v.4 (6), p. 388-402, 2015.

SATISH, A.; KUMAR, R. P.; RAKSHITHI.; SATISH, S.; AHMED, F. Antimutagenic and antioxidant activity of *Ficus benghalensis* stem bark and *Moringa oleifera* root extract. **International Journal of Chemical and Analytical Science**, v. 4, n. 2, p. 45-48, 2013.

SHAO, B.; WANG, S.; ZHOU, J.; KE, L.; RAO, P. A novel lectin from fresh rhizome of *Alisma orientale* (Sam.) Juzep. **Process Biochemistry**, v.46, p. 1554-1559, 2011.

SHARON, N & LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules, **Glycobiology**, v.14, n. 11, p. 53R662R, 2004.

SILVA, M. D. C, SÁ RA, NAPOLEÃO, T. H.; GOMES, F. S.; SANTOS, N. D.; ALBUQUERQUE, A. C.; XAVIER, H. S.; PAIVA, P. M. G.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B. Purified *Cladonia verticillaris* lichen lectin: Insecticidal activity on *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae), **International Biodeterioration and Biodegradation**. v.63, p.334-340, 2009.

SOUZA, J. D.; SILVA, M. B. R.; ARGOLO, A. C. C.; NAPOLEÃO, T. H.; SÁ, R. A.; CORREIA, M. T. S.; PAIVA, P. M. G.; SILVA, M. D. C.; COELHO, L. C. B. B. A new *Bauhinia monandra* galactose-specific lectin purified in milligram quantities from secondary roots with antifungal and termiticidal activities, **International Biodeterioration and Biodegradation**. v.65, p.696-702, 2011.

SREELATHA, S.; JEYACHITRA, A.; PADMA, P. R. Antiproliferation and induction of apoptosis by *Moringa oleifera* leaf extract on human cancer cells. **Food and Chemical Toxicology**, v.49, n. 6, p. 1270-1275, 2011.

SUN, Y. D.; FU, L. D.; JIA, Y.P.; DU, X. J.; WANG, Q.; WANG, Y. H.; ZHAO, X. F.; YU, X. Q.; WANG, J. X. A hepatopancreas-specific C-type lectin from the Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* exhibits antimicrobial activity. **Molecular Immunology**, v.45, p.348-361, 2008.

TILOKE, C; PHULUKDAREE, A.; CHUTURGOON, A. A. The antiproliferative effect of *Moringa oleifera* crude aqueous leaf extract on cancerous human alveolar epithelial cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.13, n. 226, p. 1-8, 2013.

VONGSAK, B.; SITHISARN, P.; MANGMOOL, S.; THONGPRADITCHOTE, S.; WONGKRAJANG, Y.; GRITSANAPAN, W. Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method. **Industrial Crops and Products**. v. 44, p. 566- 571, 2013.

## ANEXO A - Instruções aos Autores

A revista ANAIS DA ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS encoraja fortemente as submissões online. Uma vez o artigo preparado de acordo com as instruções abaixo, visite o site de submissão online ( <http://aabc.abc.org.br/>).

As instruções devem ser lidas cuidadosamente e seguidas integralmente. Desta forma, a avaliação e publicação de seu artigo poderão ser feitas com mais eficiência e rapidez. Os editores reservam-se o direito de devolver artigos que não estejam de acordo com estas instruções. Os artigos devem ser escritos em inglês claro e conciso.

### **Objetivo e Política Editorial**

Todos os artigos submetidos devem conter pesquisa original e ainda não publicada ou submetida para publicação. O primeiro critério para aceitação é a qualidade científica. O uso excessivo de abreviaturas ou jargões deve ser evitado, e os artigos devem ser compreensíveis para uma audiência tão vasta quanto possível. Atenção especial deve ser dada ao Abstract, Introdução e Discussão, que devem nitidamente chamar a atenção para a novidade e importância dos dados relatados. A não observância desta recomendação poderá resultar em demora na publicação ou na recusa do artigo.

Os textos podem ser publicados como uma revisão, um artigo ou como uma breve comunicação. A revista é trimestral, sendo publicada nos meses de março, junho, setembro e dezembro.

### **Tipos de Artigos**

**Revisões:** Revisões são publicadas somente a convite. Entretanto, uma revisão pode ser submetida na forma de breve carta ao Editor a qualquer tempo. A carta deve informar os tópicos e autores da revisão proposta e declarar a razão do interesse particular do assunto para a área.

**Artigos:** Sempre que possível, os artigos devem ser subdivididos nas seguintes partes: 1. Página de rosto; 2. Abstract (escrito em página separada, 200 palavras ou menos, sem abreviações); 3. Introdução; 4. Materiais e Métodos; 5. Resultados; 6. Discussão; 7. Agradecimentos quando necessário; 8. Resumo e palavras-chave (em português - os autores estrangeiros receberão assistência); 9. Referências. Artigos de algumas áreas, como Ciências Matemáticas, devem observar seu formato usual. Em certos casos pode ser aconselhável omitir a parte (4) e reunir as partes (5) e (6). Onde se aplicar, a parte de Materiais e Métodos

deve indicar o Comitê de Ética que avaliou os procedimentos para estudos em humanos ou as normas seguidas para a manutenção e os tratamentos experimentais em animais.

**Breves Comunicações:** Breves comunicações devem ser enviadas em espaço duplo. Depois da aprovação não serão permitidas alterações no artigo, a fim de que somente correções de erros tipográficos sejam feitas nas provas.

Os autores devem enviar seus artigos somente em versão eletrônica.

### **Preparo dos Artigos**

Os artigos devem ser preparados em espaço duplo. Depois de aceitos nenhuma modificação será realizada, para que nas provas haja somente correção de erros tipográficos.

**Tamanho dos artigos:** Embora os artigos possam ter o tamanho necessário para a apresentação concisa e discussão dos dados, artigos sucintos e cuidadosamente preparados têm preferência tanto em termos de impacto quando na sua facilidade de leitura.

**Tabelas e ilustrações:** Somente ilustrações de alta qualidade serão aceitas. Todas as ilustrações serão consideradas como figuras, inclusive desenhos, gráficos, mapas, fotografias e tabelas com mais de 12 colunas ou mais de 24 linhas (máximo de figuras gratuitas: cinco figuras). A localização provável das figuras no artigo deve ser indicada.

**Figuras digitalizadas:** As figuras devem ser enviadas de acordo com as seguintes especificações: 1. Desenhos e ilustrações devem ser em formato .PS/.EPS ou .CDR (Postscript ou Corel Draw) e nunca inseridas no texto; 2. Imagens ou figuras em meio tom devem ser no formato .TIF e nunca inseridas no texto; 3. Cada figura deve ser enviada em arquivo separado; 4. Em princípio, as figuras devem ser submetidas no tamanho em que devem aparecer na revista, i.e., largura de 8 cm (uma coluna) ou 12,6 cm (duas colunas) e com altura máxima para cada figura menor ou igual a 22 cm. As legendas das figuras devem ser enviadas em espaço duplo e em folha separada. Cada dimensão linear das menores letras e símbolos não deve ser menor que 2 mm depois da redução. Somente figuras em preto e branco serão aceitas. 5. Artigos de Matemática, Física ou Química podem ser digitados em Tex, AMS-Tex ou Latex; 6. Artigos sem fórmulas matemáticas podem ser enviados em .RTF ou em WORD para Windows.

**Página de rosto:** A página de rosto deve conter os seguintes itens: 1. Título do artigo (o título deve ser curto, específico e informativo); 2. Nome (s) completo (s) do (s) autor (es); 3. Endereço profissional de cada autor; 4. Palavras-chave (4 a 6 palavras, em ordem alfabética); 5. Título abreviado (até 50 letras); 6. Seção da Academia na qual se enquadra o artigo; 7.

Indicação do nome, endereço, números de fax, telefone e endereço eletrônico do autor a quem deve ser endereçada toda correspondência e prova do artigo.

**Agradecimentos:** Devem ser inseridos no final do texto. Agradecimentos pessoais devem preceder os agradecimentos a instituições ou agências. Notas de rodapé devem ser evitadas; quando necessário, devem ser numeradas. Agradecimentos a auxílios ou bolsas, assim como agradecimentos à colaboração de colegas, bem como menção à origem de um artigo (e.g. teses) devem ser indicados nesta seção.

**Abreviaturas:** As abreviaturas devem ser definidas em sua primeira ocorrência no texto, exceto no caso de abreviaturas padrão e oficial. Unidades e seus símbolos devem estar de acordo com os aprovados pela ABNT ou pelo Bureau International des Poids et Mesures (SI).

**Referências:** Os autores são responsáveis pela exatidão das referências. Artigos publicados e aceitos para publicação (no prelo) podem ser incluídos. Comunicações pessoais devem ser autorizadas por escrito pelas pessoas envolvidas. Referências a teses, abstracts de reuniões, simpósios (não publicados em revistas indexadas) e artigos em preparo ou submetidos mas ainda não aceitos, podem ser citados no texto como (Smith et al. unpublished data) e não devem ser incluídos na lista de referências.

As referências devem ser citadas no texto como, por exemplo, (Smith 2004), (Smith and Wesson 2005) ou, para três ou mais autores, (Smith et al. 2006). Dois ou mais artigos do mesmo autor no mesmo ano devem ser distinguidos por letras, e.g. (Smith 2004a), (Smith 2004b) etc. Artigos com três ou mais autores com o mesmo primeiro autor e ano de publicação também devem ser distinguidos por letras.

As referências devem ser listadas em ordem alfabética do primeiro autor sempre na ordem do sobrenome XY no qual X e Y são as iniciais. Se houver mais de 10 autores, use o primeiro seguido de et al. As referências devem ter o nome do artigo. Os nomes das revistas devem ser abreviados. Para as abreviações corretas, consultar a listagem de base de dados na qual a revista é indexada ou consulte a World List of Scientific Periodicals. A abreviatura para os Anais da Academia Brasileira de Ciências é Na Acad Bras Cienc. Os seguintes exemplos são considerados como guia geral para as referências.