

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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DE LECTINA DE FOLHA DE *Bixa orellana* L.**

POLIANA KARLA AMORIM

**Recife
2018**

POLIANA KARLA AMORIM

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DE LECTINA DE FOLHA DE *Bixa orellana* L.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia como exigências para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco
Área de concentração: Bioquímica e Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão

Coorientadora: Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva

**Recife
2018**

Catálogo na fonte
Elaine C Barroso (CRB4/1728)

Amorim, Poliana Karla

Purificação, caracterização e avaliação de atividade antimicrobiana de lectina de folha de *Bixa orellana* L. / Poliana Karla Amorim- 2018.

50 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Thiago Henrique Napoleão

Coorientadora: Patrícia Maria Guedes Paiva

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.
Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia. Recife, 2018.

Inclui referências

1. Lectina 2. Urucum 3. Atividade bacteriana I. Napoleão, Thiago Henrique (orient.) II. Paiva, Patrícia Maria Guedes (coorient.) III. Título

572.6

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-029

POLIANA KARLA AMORIM

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DE LECTINA DE FOLHA DE *Bixa orellana* L.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia como exigências para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco

DATA: 23 / 02 / 2018

BANCA EXAMINADORA:

PROF. DR. THIAGO HENRIQUE NAPOLEÃO (ORIENTADOR)
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO - UFPE

PROF. DR. EMMANUEL VIANA PONTUAL (MEMBRO INTERNO)
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO - UFRPE

DRA. THÂMARAH DE ALBUQUERQUE LIMA (MEMBRO EXTERNO)
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO - UFPE

DRA. LARISSA CARDOSO CORRÊIA DE ARAÚJO VIDERES (MEMBRO EXTERNO)
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO - UFPE

O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência
em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo,
quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas
admiráveis.

José de Alencar

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por guiar meus passos, por me dar força para chegar até aqui e não desistir até alcançar meus objetivos.

À minha mãe Solange, ao meu pai Williams e aos meus irmãos e sobrinhos por estarem sempre ao meu lado nos momentos bons e difíceis durante minha caminhada acadêmica.

Aos meus irmãos Hugo Carlos, Ana Paula, Humberto Neto e Williams por fazerem parte de minha vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão por me guiar durante a minha caminhada como pesquisadora, sempre ao meu lado procurando soluções em momentos em que eu achava que não tinha como dar certo, sempre atencioso e gentil. Sou muito grata.

À minha coorientadora professora Dra. Patrícia Paiva por ter me recebido no Laboratório de Bioquímica de Proteínas, possibilitando hoje eu alcançar meus objetivos.

Aos meus amigos de laboratório Livia, Caio, Bernardo, Jainaldo, Yasmin, Benny, Bruna, Danilo, Stelinha, Alcides e Suéllen por fazerem parte da minha vida tanto nos momentos bom quanto nos ruins nesses dois anos de mestrado, pelas nossas brincadeiras, fotos, vídeos. Muito obrigado gente.

Aos meus amigos Carlos Bob, Wenio, Pollyanna, Dayvid e Robson por me ajudarem sempre gentis e disponíveis no desenvolvimento do meu projeto, agradeço de coração.

A todos que fazem parte do laboratório Thamara, Nataly, Mayara, Priscila Marcelino, Thâmarah, Ana Patrícia, Leonardo, Fernanda, Leilane, Emmanuel, Marília, Leyde, Gustavo, Jessica, Barbara, Cláudio e Ricardo.

À minha amiga Ana Milena, por esta sempre presente, me escutando, me aconselhando, me dando forças. Obrigada, amiga.

Aos meus amigos Pedro, Nivaldo, Alex e Priscila Lina por fazerem parte da minha vida.

Aos funcionários e técnicos do Departamento de Bioquímica.

Às agências de fomento (CNPq, CAPES e FACEPE) pelo suporte financeiro e incentivo à pesquisa. Ao CNPq, adicionalmente, pela concessão de bolsa de Mestrado.

A todos que, porventura, não foram citados, mas que contribuíram de alguma forma para a realização desta pesquisa, meu muito obrigada.

RESUMO

Bixa orellana L. é uma planta proveniente das regiões tropicais da América. As lectinas são proteínas que se ligam a carboidratos e exibem diversas atividades biológicas. O presente trabalho descreve a purificação e caracterização de uma lectina extraída das folhas de *B. orellana* (BoLL, do inglês *B. orellana leaf lectin*) e a avaliação da atividade antimicrobiana. As proteínas foram extraídas da farinha das folhas através de homogeneização (16 h, 4°C) em NaCl 0,15 M. O extrato obtido foi avaliado quanto à presença de lectinas através do ensaio de atividade hemaglutinante (AH) e tratado com sulfato de amônio (60% de saturação) durante 4 h a 28 °C. A fração de proteínas precipitadas (FP) e a fração sobrenadante (FS) foram dialisadas e avaliadas quanto à concentração de proteínas e AH. FP (fração com maior AH específica) foi submetida ao ensaio de inibição da AH por carboidratos e glicoproteínas e, em seguida, submetida a cromatografias em coluna de troca iônica (CM-Sephadex) e de exclusão molecular (Sephadex G-75), sendo as frações coletadas monitoradas quanto à AH e absorbância a 280 nm. BoLL foi caracterizada quanto ao perfil eletroforético em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE), estabilidade frente a variações de temperatura e pH e resposta da AH à presença de íons. Atividade antibacteriana de BoLL foi investigada contra patógenos humanos e contra fitopatógenos. Atividade antifúngica de BoLL foi investigada contra *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis*. O extrato de folhas apresentou AH específica de 47,0. FP apresentou AH específica de 588,9 (fator de purificação: 12,52), a qual foi inibida pelas glicoproteínas fetuína e albumina sérica bovina, pelos monossacarídeos L (+)-arabinose, D(+)-galactose, D(+)-glicose e N-acetil-D-glicosamina, e pelo dissacarídeo lactose. Cromatografia de FP em coluna de CM-Sephadex resultou em um pico (P1) de proteínas não-adsorvidas com AH específica de 1.252 e um pico (P2) de proteínas adsorvidas e eluídas com NaCl 1,0 M que não foram capazes de aglutinar eritrócitos. Cromatografia de P1 em coluna Sephadex G-75 resultou em dois picos, sendo que o primeiro apresentou maior AH específica (2.533) e foi denominado BoLL, que apresentou uma única banda polipeptídica de aproximadamente 19 kDa em SDS-PAGE. A lectina teve sua AH aumentada na presença de íons Mg^{+2} e manteve sua capacidade de aglutinar eritrócitos mesmo após aquecimento a 100 °C. A AH de BoLL foi estável em pH ácido (4,0 a 6,0), mas perdida quando incubada em pH acima de 8,0. BoLL apresentou efeitos bacteriostático e bactericida contra *E. coli* (CMI: 400 µg/mL e CMB: 800 µg/mL) e *S. aureus* (CMI e CMB: 400 µg/mL), bem como bacteriostática contra *B. megaterium* (CMI: 18,2 µg/mL) e *M. luteus* (CMI: 800 µg/mL). A lectina não foi ativa sobre as bactérias

fitopatogênicas e sobre as espécies de *Candida*. Em conclusão, as folhas de *B. orellana* contêm uma lectina termoestável com atividade antibacteriana sobre patógenos humanos, o que estimula estudos futuros visando sua aplicação farmacológica.

Palavras-chave: Urucum. Lectina. Atividade antibacteriana.

ABSTRACT

Bixa orellana L. is a plant from the tropical regions of America. Lectins are proteins that bind to carbohydrates and exhibit various biological activities. The present work describes the purification and characterization of a lectin extracted from the leaves of *B. orellana* (BoLL), as well as the evaluation of its antimicrobial activity. Proteins were extracted from the leaf powder by homogenization (16 h, 4 °C) in 0.15 M NaCl. The extract obtained was evaluated for the presence of lectins by the hemagglutinating activity (HA) assay and treated with ammonium sulphate (60% saturation) for 4 h at 28 °C. The precipitated protein fraction (PF) and the supernatant fraction (SF) were dialyzed and evaluated for protein concentration and HA. PF (fraction with higher specific HA) was used in HA inhibition assay with carbohydrates and glycoproteins and then submitted to ion exchange (CM-Sephadex) and size exclusion (Sephadex G-75) chromatographies. The collected fractions were monitored for HA and absorbance at 280 nm. BoLL was characterized for profile in electrophoresis in polyacrylamide gel under denaturing conditions (SDS-PAGE), stability to temperature and pH variations and response of its HA to the presence of ions. Antibacterial activity of BoLL was investigated against human pathogens and against phytopathogens. Antifungal activity of BoLL was investigated against *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis* and *Candida parapsilosis*. Leaf extract showed specific HA of 47.0. PF showed specific HA of 588.9 (purification factor: 12.52), which was inhibited by the glycoproteins fetuin and bovine serum albumin, by the monosaccharides L (+)-arabinose, D(+)-galactose, D(+)-glucose and N-acetyl-D-glucosamine, and by the disaccharide lactose. Chromatography of PF on CM-Sephadex column resulted in a peak (P1) of non-adsorbed proteins with specific HA of 1,252 and a peak (P2) of proteins adsorbed and eluted with 1.0 M NaCl that were not able to agglutinate erythrocytes. Chromatography of P1 on Sephadex G-75 column resulted in two peaks, the first of which presented a higher specific HA (2,533) and was named BoLL, which presented a single polypeptide band of approximately 19 kDa on SDS-PAGE. The lectin had its HA increased in the presence of Mg^{2+} ions and maintained its capacity to agglutinate erythrocytes even after heating to 100 °C. The AH of BoLL was stable at acidic pH, but lost when incubated at pH above 8.0. BoLL showed bacteriostatic and bactericidal effects against *E. coli* (MIC: 400 µg/mL and MBC: 800 µg/mL) and *S. aureus* (MIC and MBC: 400 µg/mL), as well as bacteriostatic effects against *B. megaterium* (MIC: 18.2 µg/mL) and *M. luteus* (MIC: 800 µg/mL). The lectin was not active on phytopathogenic bacteria and on *Candida* species. In conclusion, the leaves of *B. orellana* contain a thermostable lectin with

antibacterial activity on human pathogens, which stimulates future studies aiming at its biomedical application.

Key words: Achiote. Lectin. Antibacterial activity.

LISTA DE FIGURAS

Fundamentação Teórica

- Figura 1 -** Atividade hemaglutinante (A) e inibição da atividade hemaglutinante (B). 17
- Figura 2 -** Métodos cromatográficos utilizados na purificação de proteínas: (A) Cromatografia de troca iônica, (B) cromatografia de exclusão molecular e (C) Cromatografia de afinidade. 19
- Figura 3 -** *Bixa orellana* - A: urucuzeiro; B: flor do urucum; C e D: fruto; E: fruto aberto com sementes expostas; F: sementes de urucum. 24

Artigo

- Figure 1 -** Purification of *Bixa orellana* leaf lectin (BoLL). (A) Chromatography of PF on CM-Sephadex column equilibrated with citrate-phosphate buffer. Adsorbed proteins were eluted with 1.0 M NaCl. (B) (B) Chromatography of P1 on Sephadex G-75 column equilibrated with 0.15 M NaCl. (C) SDS-PAGE of molecular mass markers and BoLL. 40

LISTA DE TABELAS

Artigo

Table 1 -	Summary of the purification of <i>Bixa orellana</i> leaf lectin (BoLL)	38
Table 2 -	Hemagglutinating activity of PF (precipitated fraction obtained after treatment of the <i>B. orellana</i> leaf extract with ammonium sulphate) in presence of carbohydrates and glycoproteins.	39
Table 3 -	Antibacterial activity of <i>Bixa orellana</i> leaf lectin (BoLL).	39

LISTA DE ABREVIATURAS

AH	Atividade Hemaglutinante
CM	Carboximetil
CMB	Concentração mínima bactericida
CMI	Concentração mínima inibitória
CRD	Domínio de Reconhecimento de Carboidrato
DEAE	Dietilaminoetil
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FPLC	Cromatografia Líquida de Rápida Resolução
HPLC-RP	Cromatografia Líquida de Alta Resolução em Fase Reversa
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PEG	Polietilenoglicol
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	OBJETIVOS.....	15
1.1.1	Objetivo Geral.....	15
1.1.2	Objetivos Específicos.....	15
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	16
2.1	LECTINAS.....	16
2.1.1	Purificação de lectinas.....	17
2.1.2	Aplicações biotecnológicas e atividades biológicas de lectinas.....	20
2.1.2.1	Atividade antimicrobiana de lectinas.....	21
2.2	A ESPÉCIE <i>Bixa orellana</i> L.....	23
3	ARTIGO - ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF AN ANTIBACTERIAL LECTIN FROM <i>Bixa orellana</i> LEAVES.....	25
4	CONCLUSÕES.....	41
	REFERÊNCIAS.....	42

1 INTRODUÇÃO

O conceito de “biodiversidade” procura referir e integrar toda a variedade de vida existente na natureza. De acordo com Barbieri (2010, p. 7), “biodiversidade é a diversidade da natureza viva”, desde as maiores espécies animais e vegetais do mundo, aos microrganismos e os processos ecológicos e os ecossistemas aos quais fazem parte (SCHERER *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2017). Além de ser essencial para a manutenção dos ecossistemas da Terra, estima-se que 40% da economia mundial gira em torno de produtos e processos relacionados à biodiversidade como, por exemplo, a utilização de matérias primas em indústrias farmacêutica, alimentícia e de combustíveis (CDB, 2014; CNI, 2014). O Brasil é um país com uma numerosa diversidade biológica, tanto em número de espécies quanto na variedade e na complexidade de seus biomas. Essa diversidade biológica vem sendo bastante estudada sob vários aspectos, entre eles o interesse nas propriedades medicinais de compostos orgânicos naturais de origem vegetal (ARAÚJO *et al.*, 2011; JOLY *et al.*, 2011; PIMENTEL *et al.*, 2015).

As lectinas são proteínas que interagem com carboidratos de forma reversível e específica. São amplamente encontradas na natureza e, nas plantas, têm sido isoladas a partir de folhas, entrecascas, raízes, rizomas, bulbos, vagens, sementes, frutos e flores. A capacidade de ligação a carboidratos presentes em superfícies celulares confere às lectinas uma gama de propriedades biológicas, tais como antitumoral, antiviral, antimicrobiana, cicatrizante e inseticida (PAIVA *et al.*, 2011; DIAS *et al.*, 2015; PROCÓPIO *et al.*, 2017a).

Algumas lectinas de plantas fazem parte dos mecanismos de defesa contra a ação de microrganismos patógenos. A atividade antibacteriana das lectinas pode ser consequência da interação com ácidos teicoicos e teicurônicos, peptidoglicanos e lipopolissacarídeos da parede celular. As lectinas podem formar poros na superfície da célula bacteriana, ocasionando extravasamento do conteúdo celular (CORREIA *et al.*, 2008; PAIVA *et al.*, 2010). As lectinas podem ainda afetar processos fisiológicos dos microrganismos devido sua interação com glicoconjugados na membrana do microrganismo que são capazes de gerar respostas intracelulares, resultando na inibição do crescimento e/ou morte (GOMES *et al.*, 2014).

A resistência bacteriana a antibióticos se caracteriza quando uma bactéria consegue multiplicar-se *in vitro* na presença de concentrações mais altas de antibióticos do que as doses ministradas a humanos e/ou animais (BITTENCOURT, 2014; NASCIMENTO, 2016). A propagação de bactérias resistentes pode ser associada vários fatores, incluindo o uso exacerbado e indiscriminado de antibióticos. Os antimicrobianos obtidos de plantas têm sido uma alternativa no tratamento de doenças infecciosas causadas por microrganismos resistentes

aos antibióticos comerciais, apresentando menos efeitos colaterais (CALIXTO, 2005; BELLA CRUZ *et al.*, 2010).

Bixa orellana é uma planta que pertence à família Bixaceae, proveniente da América Tropical. Acredita-se que tenha sido uma das primeiras plantas domesticadas pelos índios da região para pintar o corpo em ritos cerimoniais. Além disso, era utilizada para proteção contra picadas de insetos e a radiação solar (VAZQUEZ-YANES *et al.*, 1999; SANDI *et al.*, 2003; BARBOSA FILHO, 2006). Sua maior aplicação está concentrada na indústria de alimentos, onde é empregada como corante; além disso, extratos das sementes apresentaram atividade larvicida contra *Aedes aegypti*, ação antibacteriana e atividade antileishmania (COSTA, 2013; MAJOLO *et al.*, 2013; VILAR, 2015).

Dentro do contexto descrito acima, a presente dissertação descreve a purificação de uma lectina denominada BoLL (*B. orellana leaf lectin*) a partir do extrato salino de folhas de *B. orellana*, a caracterização da mesma e avaliação de sua atividade antimicrobiana frente patógenos ao homem e a plantas.

1.1 OBJETIVO

1.1.1 Objetivo Geral

Isolar e caracterizar lectina de folhas de *Bixa orellana* (BoLL) e investigar sua atividade antimicrobiana.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Definir protocolo de isolamento da lectina de folhas de *B. orellana*.
- Caracterizar a lectina quanto à estabilidade frente a variações de temperatura, de pH e resposta à presença de íons.
- Caracterizar a lectina quanto ao perfil em eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes.
- Determinar o efeito da lectina sobre o crescimento e sobrevivência de espécies de bactérias e fungos de importância médica, bem como bactérias fitopatogênicas.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 LECTINAS

O termo lectina se origina do latim *lectus*, que significa selecionado, tendo sido empregado por Boyd e Shapleigh (1954) para designar um grupo de proteínas que apresentava a capacidade de interação com carboidratos de forma seletiva. As lectinas são também conhecidas como aglutininas devido a sua habilidade de aglutinar células (COELHO *et al.*, 2017). A capacidade de ligação a carboidratos presentes em superfícies celulares resulta em uma gama de propriedades biológicas, tais como antitumoral, antiviral, antimicrobiana, cicatrizante e inseticida (PAIVA *et al.*, 2011; DIAS *et al.*, 2015; COELHO *et al.*, 2017).

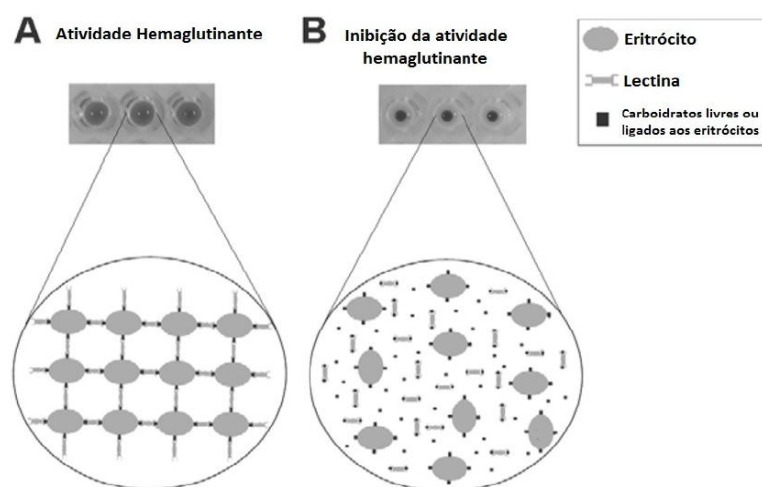
Estas proteínas têm sido encontradas em vegetais, vírus, bactérias, fungos, invertebrados e vertebrados, sendo que aquelas encontradas nas plantas têm sido mais estudadas (BATTISON; SUMMERFIELD, 2009; NUNES *et al.*, 2011; SINGH *et al.*, 2011; MANIKANDAN *et al.*, 2012). Nas plantas, estas proteínas têm sido isoladas de sementes (SANTOS *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2012; FARIAS, 2013), folhas (GOMES *et al.*, 2013; PROCÓPIO *et al.*, 2017b), flores (SANTOS *et al.*, 2009; BRITO *et al.*, 2017), tubérculos (KAUR *et al.*, 2006), entrecascas (ARAÚJO *et al.*, 2012), frutos (SILVA *et al.*, 2016), raízes (SOUZA *et al.*, 2011) e rizomas (SANTANA *et al.*, 2012).

Nas plantas, as lectinas estão diretamente envolvidas na relação planta/simbiontes, nos mecanismos de defesa, inibindo o crescimento de bactérias fitopatogênicas e atuando contra ataques de vírus, fungos e insetos (CAVADA *et al.*, 2000; RATANAPO *et al.*, 2001; LIMPENS; BISSENG, 2003; PROCÓPIO *et al.*, 2017a), na estimulação da proliferação e crescimento celular (WITITSUWANNAKUL *et al.*, 1998) e no estoque de carboidratos e proteínas (VAN DAMME *et al.*, 1997).

As lectinas apresentam uma grande diversidade estrutural, mas possuem em comum a presença de pelo menos um sítio específico de ligação a carboidratos, denominado “Domínio de Reconhecimento de Carboidrato” (DRC); a interação com carboidratos ocorre através de ligações como: pontes de hidrogênio, interações de van der Waals e interações hidrofóbicas (WEIS; DRICKAMER, 1996; COMINETTI *et al.*, 2002; SHARON; LIS, 2002). Algumas destas proteínas são capazes de interagir mais facilmente ou exclusivamente com carboidratos complexos (oligo e polissacarídeos), em comparação com monossacarídeos (BENEVIDES, 2011; NAPOLEÃO *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2016; PATRIOTA *et al.*, 2017).

A presença de lectinas é detectada através do ensaio de atividade hemaglutinante (Figura 1A), no qual se observa a formação de uma rede ou malha devido à interação entre as lectinas e os carboidratos presentes na membrana dos eritrócitos (PAIVA *et al.*, 2013; COELHO *et al.*, 2017). A especificidade a carboidratos de uma lectina pode ser avaliada através de ensaios de inibição da atividade hemaglutinante (Figura 1B) utilizando monossacarídeos, oligossacarídeos ou glicoproteínas.

Figura 1 - Atividade hemaglutinante (A) e inibição da atividade hemaglutinante (B)



Fonte: PAIVA *et al.*, 2013

2.1.1 Purificação de lectinas

Devido à imensidade de propriedades e aplicações em diversas áreas da Medicina, Química e Biologia, o interesse na purificação de lectinas tem sido contínuo. A purificação de lectinas pode ser realizada utilizando técnicas comuns a protocolos de isolamento de proteínas baseados em características como: carga elétrica, tamanho, solubilidade e afinidade de ligação (SANTOS *et al.*, 2013).

A primeira etapa para a purificação consiste na extração das proteínas do tecido/órgão/célula em solução aquosa (OLIVEIRA *et al.*, 2016), salina (BRITO *et al.*, 2017; PATRIOTA *et al.*, 2017) ou em tampões (SOUZA *et al.*, 2011). O tempo e a temperatura de extração são também fatores importantes (SANTOS *et al.*, 2013). Como descrito acima, a detecção de lectinas no extrato bruto é feita através do ensaio de atividade hemaglutinante; porém, alguns compostos comumente presentes em extratos vegetais, como taninos, podem promover a dispersão dos eritrócitos quando presentes em altas concentrações. O aspecto macroscópico da dispersão é similar ao da rede de aglutinação e, por essa razão, o ensaio de

inibição da atividade hemaglutinante deve ser realizado para confirmar que o fenômeno observado é uma aglutinação promovida pelo DRCs das lectinas (CORREIA *et al.*, 2008).

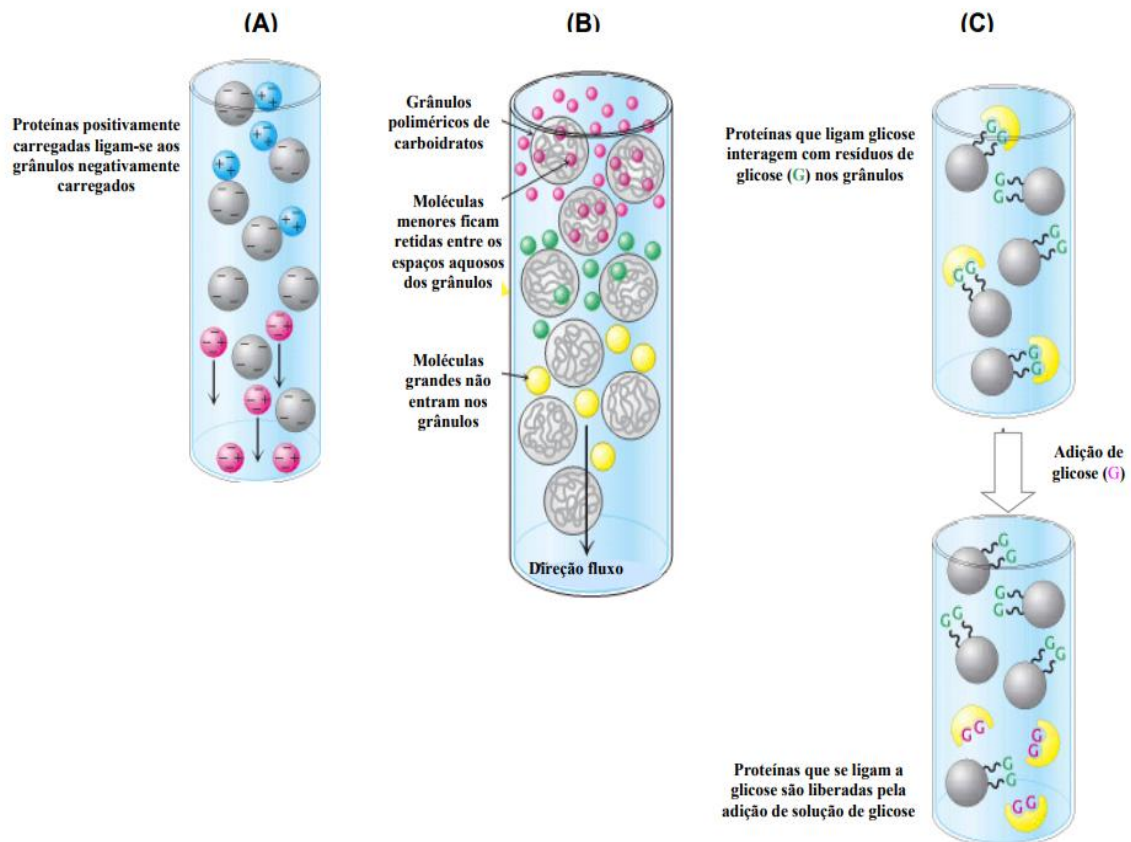
As lectinas presentes no extrato bruto podem ser purificadas parcialmente pelo método de fracionamento salino com sulfato de amônio, por exemplo. O sulfato de amônio, altamente hidrofílico, remove a camada de solvatação das proteínas fazendo com que elas precipitem, porém, mantendo sua conformação nativa (SANTOS *et al.*, 2013). Em alguns casos, a lectina pode permanecer no sobrenadante, enquanto proteínas contaminantes são precipitadas (SILVA *et al.*, 2016). Outros métodos de precipitação utilizando ácidos fortes e solventes orgânicos podem ser utilizados, porém podem comprometer a estrutura nativa da proteína. Também podem ser utilizadas técnicas de clarificação para remoção de pigmentos, por exemplo, através da utilização de polietilenoglicol (PEG 8000) (WITITSUWANNAKUL *et al.*, 1998) e carvão ativado (GOMES *et al.*, 2013).

Após a extração e purificação parcial, diversos métodos cromatográficos podem ser usados para purificação de lectinas (Figura 2). Essas técnicas cromatográficas separam as lectinas de acordo com a massa molecular (cromatografia de gel filtração ou exclusão molecular), carga (cromatografia de troca iônica) e afinidade específica de ligação a carboidratos (cromatografia de afinidade) (COELHO *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2013). Alguns protocolos de purificação utilizam um ou mais métodos cromatográficos.

Na cromatografia de troca iônica (Figura 2A) a proteína é separada em função de sua carga líquida. Proteínas com carga de sinal contrário à da matriz insolúvel ficarão adsorvidas, enquanto as de carga similar (ou seja, com nenhuma ou pouca interação com a matriz) serão eliminadas na etapa de lavagem. Para dessorção das proteínas que se ligaram à matriz, a coluna é lavada com uma solução de maior força iônica ou por alteração do valor de pH do meio (PAIVA *et al.*, 2011). Uma das matrizes mais utilizadas nesta cromatografia é a celulose, como por exemplo, a carboximetil (CM) celulose, um trocador catiônico, e a dietilaminoetil (DEAE) celulose, um trocador aniônico.

A cromatografia de exclusão molecular ou de gel filtração (Figura 2B) é um método que baseia na separação de biomoléculas de acordo com seu tamanho. A matriz utilizada nessa coluna é formada por polímeros que possuem pequenos poros, nos quais as moléculas menores penetram e vão migrando lentamente, enquanto as maiores não penetram nos poros e são eluídas primeiro (SILVA 2018). Essa cromatografia é muito utilizada tanto para obter preparações proteicas homogêneas (PROCÓPIO *et al.*, 2017b) como para definição da massa molecular nativa da proteína (BRITO *et al.*, 2017). Como exemplo de suporte de exclusão molecular utiliza-se a Superdex e Sephadex.

Figura 2 - Métodos cromatográficos utilizados na purificação de proteínas: (A) Cromatografia de troca iônica, (B) Cromatografia de exclusão molecular e (C) Cromatografia de afinidade.



Fonte: Adaptado de Berg *et al.* (2004) por Nunes (2011)

A cromatografia de afinidade (Figura 2C) baseia-se na habilidade das lectinas de se ligarem especificamente a carboidratos presentes na matriz. Esses açúcares ligantes são componentes da própria matriz ou são covalentemente imobilizados a um suporte insolúvel. A proteína desejada é geralmente obtida com alto grau de pureza, alterando-se as condições de pH (SÁ *et al.*, 2008), força iônica (LUZ *et al.*, 2013) ou pela eluição com uma solução contendo um competidor (CORIOLANO *et al.*, 2012).

A caracterização de lectinas é realizada por meio da determinação de diferentes propriedades relacionadas com a estrutura e a atividade biológica da molécula. Métodos eletroforéticos, uni ou bidimensional, são utilizados para avaliar a homogeneidade da proteína, definir a natureza da carga líquida da proteína e o peso molecular das subunidades (PATRIOTA *et al.*, 2017). A eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) sob condições desnaturantes (presença de dodecilsulfato de sódio) e redutoras (na presença de β -mercaptoetanol) revela a composição e a massa molecular de subunidades (COELHO *et al.*, 2012).

A temperatura e o pH podem causar alterações na estrutura tridimensional de uma proteína, podendo causar desnaturação. Algumas lectinas são termossensíveis, outras termoestáveis, tendo sua atividade otimizada em determinadas temperaturas. As lectinas do cogumelo *Ganoderma capense* e da sarcotesta do fruto de *Punica granatum* mantêm sua AH após exposição a 100 °C, enquanto a lectina de *Schinus terebinthifolius* mantém uma atividade máxima a 50 °C (NGAI & NG, 2004; GOMES *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2018). Com relação ao pH, em alguns casos a mudança não afeta a atividade (WITITSUWANNAKUL *et al.*, 1998), em outros a lectina perde sua atividade em determinada faixa de pH, como é o caso da lectina da inflorescência de *Alpinia purpurata* (BRITO *et al.*, 2017).

Algumas lectinas contêm metais em sua estrutura, dependendo da presença de íons para exercer sua atividade biológica (SHARON & LIS, 1990). A lectina de *Macrotyloma axillare* necessita de Ca^{2+} e Mn^{2+} para se ligar o carboidrato pelo qual tem afinidade (SANTANA *et al.*, 2008). A lectina da inflorescência de *A. purpurata* tem sua AH estimulada na presença de cálcio e magnésio, embora não seja dependente desses íons (BRITO *et al.*, 2017). Por outro lado, a AH da lectina da folha de *Phthirusa pyrifolia* não tem sua atividade afetada por íons metálicos (COSTA *et al.*, 2010).

As técnicas de cromatografia líquida de rápida resolução (FPLC) e cromatografia líquida de alta resolução em fase reversa (HPLC-RP) têm sido bastante utilizadas para purificação mais refinada de lectinas (WONG & NG 2003; JIANG *et al.*, 2009), bem como para avaliar a homogeneidade, separar subunidades proteicas e determinar se são monoméricas ou não (KAWSAR *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2009; ARAÚJO *et al.*, 2012).

2.1.2 Aplicações biotecnológicas e atividades biológicas de lectinas

Por apresentarem a propriedade de se ligarem a glicoconjugados em solução ou em superfícies celulares, as lectinas são importantes ferramentas em diferentes aplicações biotecnológicas (CORREIA *et al.*, 2008), nas mais diversas áreas, tais como Ciências Biológicas, Farmácia, Medicina.

Essas proteínas aparecem como ferramentas de destaque no campo da tecnologia de bioreconhecimento, sendo utilizadas em estudos citoquímicos e histoquímicos com tecidos de humanos e animais (LIMA *et al.*, 2010), como moléculas de reconhecimento para diferenciação de casos de câncer e hiperplasias benignas (KEKKI *et al.*, 2017), como moléculas úteis no endereçamento de drogas (BIES *et al.*, 2004) e no isolamento de glicoconjugados quando imobilizadas em suportes insolúveis (NAPOLEÃO *et al.*, 2013).

Trabalhos demonstraram a utilização das lectinas como reconhecedoras específicas de carboidratos, sendo empregadas nos diagnósticos de bactérias patogênicas (GAO *et al.*, 2010). Um teste de comparação de diferentes padrões de aglutinação promovidos por 23 lectinas apresentou potencial para uso na identificação de espécies de *Mycobacterium* (ATHAMNA *et al.*, 2006).

As atividades biológicas de lectinas incluem: atividade antiinflamatória (MELO *et al.*, 2010), antitumoral (NUNES *et al.*, 2012; TATSUTA *et al.*, 2014; MONTE *et al.*, 2014), antifúngica (SÁ *et al.*, 2009; SANTANA *et al.*, 2009; RAMOS *et al.*, 2014; PROCÓPIO *et al.*, 2017b; SILVA *et al.*, 2018), antibacteriana (MOURA *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2016), antiviral (SATO *et al.*, 2011; KOHARUDIN *et al.*, 2011; AKKOUH *et al.*, 2015), nematocida (MEDEIROS *et al.*, 2018) e inseticida (NAPOLEÃO *et al.*, 2012; PAIVA *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2016), entre outras.

2.1.2.1 Atividade antimicrobiana de lectinas

O surgimento de microrganismos resistentes a antibióticos tem tornado necessária a busca por agentes eficazes com propriedades terapêuticas (YIM *et al.*, 2013; RAMOS *et al.*, 2014). A resistência microbiana é um fenômeno biológico e natural e está relacionado a diferentes mecanismos bioquímicos que impedem a ação dos medicamentos, sendo bastante preocupante em todo o mundo, principalmente em ambientes hospitalares (BITTENCOURT 2014; MELIM, 2011). A propagação de bactérias resistentes pode ser associada por vários fatores, tais como: o uso abusivo de antimicrobianos, antibióticos ineficientes devido à má utilização, tempo de permanência hospitalar, cuidados em terapia intensiva, falta de saneamento e falha na orientação da população (BITTENCOURT 2014; NASCIMENTO, 2016).

Os antimicrobianos obtidos de plantas têm sido uma ótima alternativa no tratamento de doenças devido ao seu alto potencial terapêutico e menos efeitos colaterais quando comparados com antimicrobianos sintéticos (CALIXTO 2005; BELLA CRUZ *et al.*, 2010). Como exemplos podem-se citar enzimas, óleos essenciais e lectinas (PAIVA *et al.*, 2010; PROCÓPIO *et al.*, 2017a). Lectinas podem afetar o processo fisiológico dos microrganismos devido sua interação com carboidratos encontrados na parede celular de bactérias e fungos, inibindo o crescimento ou levando à morte (GOMES *et al.*, 2014).

A lectina ligadora de quitina encontrada no rizoma *Setcreasea purpurea* inibiu a germinação de *Rhizoctonia solani*, *Penicillium italicum*, *Sclerotinia sclerotiorum* e

Helminthosporium maydis (YAO *et al.*, 2010). Lectina de *Gastrodia elata* inibiu o crescimento dos fungos fitopatógenos *Valsa ambiens*, *R. solani*, *Gibberella zeae*, *Ganoderma lucidum* e *Botrytis cinerea*. Lectinas de raízes de *Bauhinia monandra* e rizoma de *Microgramma vacciniifolia* apresentaram atividade contra espécies de *Fusarium* (SOUZA *et al.*, 2011; ALBUQUERQUE *et al.*, 2014). Lectina recombinante de *Aleuria aurantia*, expressa em *E. coli*, demonstrou atividade contra *Mucor racemosus* (AMANO *et al.*, 2012). A lectina da semente de *Castanea molissima* foi eficaz frente aos fungos *Botrytis cinerea*, *Mycosphaerella arachidicola* e *Physalospora piricola* (WANG; NG, 2003). Já a lectina obtida das sementes de *Indigofera heterantha*, teve ação frente a *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger* (QADIR *et al.*, 2013). Lectina isolada de folhas de *Schinus terebinthifolius* apresentou atividade frente a *Candida albicans* (GOMES *et al.*, 2013).

Boteli *et al.* (2007) demonstraram que lectina de sementes de *Pouteria torta* é capaz de formar uma camada na parede celular de *Candida* e alterar a sua estrutura e permeabilidade. De acordo com Procópio *et al.* (2017b) a lectina de folíolos de *Calliandra surinamensis* apresentou atividade antifúngica contra *Candida krusei* causando alterações na morfologia celular e danos à parede celular.

Lectinas antibacterianas já foram isoladas de plantas como *Myracrodruon urundeuva*, *Punica granatum*, *Lablab purpureus*, *Moringa oleifera* e *Schinus terebinthifolius* e de animais como *Bothrops leucurus* e *Crassostrea hongkongensis* (SÁ *et al.*, 2009; COSTA *et al.*, 2010; NUNES *et al.*, 2011; HE *et al.*, 2011; GOMES *et al.*, 2013; SAHA *et al.*, 2014; MOURA *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2016). A lectina da folha de *Schinus terebinthifolius* apresentou atividade bactericida contra *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *S. aureus* e *Salmonella enteritidis* (GOMES *et al.*, 2013). Petnual *et al.* (2010) demonstrou a atividade antimicrobiana da lectina de rizoma de *Curcuma longa* para *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. subtilis* e *E. coli*.

Sugeriu-se que o mecanismo de ação das lectinas antibacterianas é através da formação de poros na parede celular, o que induz a morte por extravasamento do conteúdo celular (CORREIA *et al.*, 2008). Moura *et al.* (2015) mostraram que a lectina solúvel em água de sementes da *Moringa oleifera* (WSMoL) foi capaz de inibir o crescimento bacteriano de *Bacillus pumilus*, *Bacillus megaterium*, *Micrococcus* sp., *Pseudomonas* sp., *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas fluorescens* e *Serratia marcescens*, WSMoL causou perda da integridade da membrana celular de *S. marcescens*, resultando em liberação de proteínas intracelulares para o meio extracelular.

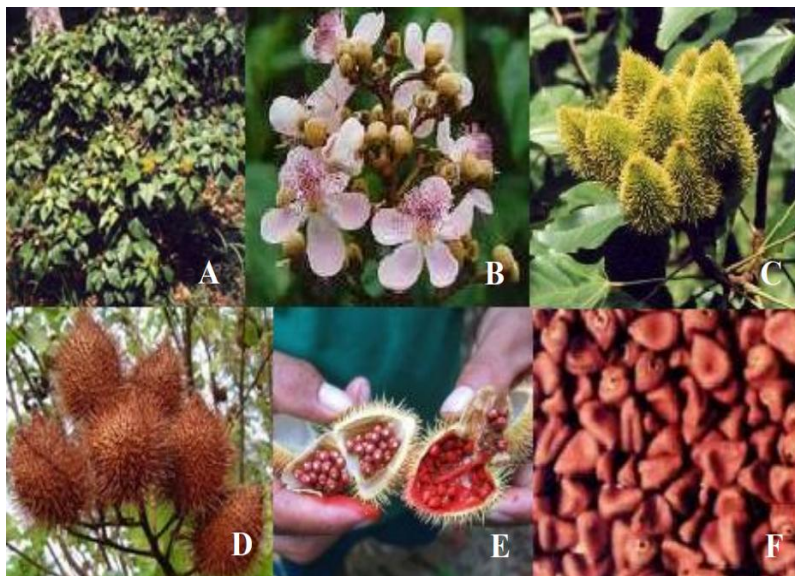
2.2 A ESPÉCIE *Bixa orellana* L.

O urucueiro ou urucuzeiro (Figura 3A) é uma planta arbustiva denominada botanicamente de *Bixa orellana* L., como forma de homenagear o botânico e explorador Francisco Orellana (GIULIANO *et al.*, 2003; SANDI *et al.*, 2003). Pertencente à família Bixaceae, originada da América Tropical, e é uma planta de origem pré-colombiana encontrada na flora amazônica. O nome popular do seu fruto, urucum, provém do vocábulo tupi *uru-ku*, que significa “vermelho” (CASTRO *et al.*, 2009).

Os primeiros registros escritos sobre o urucum são encontrados na Carta de Pero Vaz de Caminha ao Rei D. Manoel de Portugal em 1500, na qual descreve sobre diversas espécies vegetais brasileiras, dentre elas, o urucum com a seguinte descrição: “... uns ouriços verdes, de árvores que, na cor, queriam parecer de castanheiros, embora mais e mais pequenos, e eram cheios duns grãos vermelhos pequenos, que, esmagados entre os dedos, faziam tintura vermelha, de que eles andavam tintos. E quanto mais se molhavam, tanto mais vermelhos ficavam” (FILGUEIRAS & PEIXOTO, 2002).

Bixa orellana trata-se de um arbusto grande ou árvore pequena que pode atingir de 3 a 6 m de altura, dependendo das condições ecológicas e de sua idade. Cresce em altitudes de até 1000m, contudo, desenvolve-se melhor em zonas relativamente baixas, de 100 a 500 m, suportando temperaturas de 24 a 35 °C (REVILLA, 2001; COELHO *et al.*, 2003; OLIVEIRA, 2005; ROHDE *et al.*, 2006). As flores (Figura 3B) são pentâmeras, com bastante estames e inflorescências paniculadas terminais de coloração rósea (JOLY, 1987); as folhas são simples, glabras, medindo de 8 a 11 cm de comprimento; os frutos (Figura 3C e D) são ovóides, tipo cápsula e, dependendo da variedade, apresentam um denso revestimento de espinhos moles e inofensivos de até 0,5 cm de comprimento; as cápsulas são chamadas de “cachopas” variando de 360 a 4.900 por planta, comportando em seu interior uma média de 54 sementes (Figura 3E e 3F), envoltas por arilos vermelhos que lhes dão a cor característica (JOLY, 1987). O urucueiro pode florescer e frutificar durante o ano todo, porém, a maior ocorrência são as floradas na primavera e outra no final do verão, esta última em maior produção (REBOUÇAS; SÃO JOSÉ, 1996).

Figura 3 - *Bixa orellana*. **A:** urucuzeiro **B:** flor do urucum; **C e D:** fruto; **E:** fruto aberto com sementes expostas; **F:** sementes de urucum.

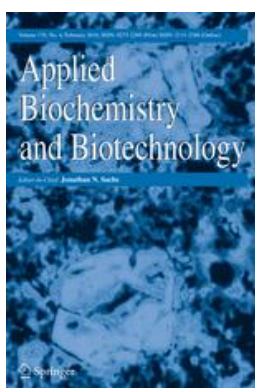


Fonte: ROSSONI Jr. (2008).

Em relação à aplicabilidade dessa planta, acredita-se que tenha sido uma das primeiras plantas domesticadas pelas tribos indígenas brasileiras e peruanas quando extraíam um pigmento vermelho das sementes usando para pintar o corpo em ritos cerimoniais e para proteção contra picadas de insetos e radiação solar (VAZQUEZ-YANES *et al*, 1999; SANDI *et al.*, 2003; BARBOSA FILHO 2006). Atualmente suas sementes são usadas nas indústrias alimentícia e cosmética (ALONSO 2004) empregadas como corante. Os extratos das sementes apresentaram atividade larvicida contra *Aedes aegypti*, ação antibacteriana e atividade antimicrobiana (IROBI 1996; SANDI *et al.*, 2003; GONÇALVES *et al.*, 2005); a decocção das folhas é usada para combater vômitos na gravidez; o uso da raiz para problemas digestivos (CORRÊA & PENNA 1984). Além disso, outros usos populares das folhas incluem casos de diarreia, dores renais, malária, queimaduras, asma, como cicatrizante e diurético (ALONSO 2004).

3 ARTIGO - ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF AN ANTIBACTERIAL LECTIN FROM *Bixa orellana* LEAVES

ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO “Applied Biochemistry and Biotechnology”



Fator de impacto: 1.751

Instruções para autores: <http://www.springer.com/chemistry/biotechnology/journal/12010>

Isolation and characterization of an antibacterial lectin from *Bixa orellana* leaves

Poliana Karla Amorim^a, Robson Raion de Vasconcelos Alves^a, Pollyanna Michelle da Silva^a, Maiara Celine de Moura^a, Carlos Eduardo Sales da Silva^a, Ana Rosa Peixoto^b, Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho^a, Patrícia Maria Guedes Paiva^a, Thiago Henrique Napoleão^a

^a*Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.*

^b*Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais, Universidade do Estado da Bahia, Juazeiro, Bahia, Brazil.*

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

E-mail address: thiagohn86@yahoo.com.br

Abstract

This work describes the purification and characterization of a lectin extracted from the leaves of *B. orellana* (BoLL), as well as the evaluation of its antimicrobial activity. BoLL was isolated from saline (0.15 M NaCl) extract through protein precipitation with ammonium sulphate (60% saturation) followed by ion exchange (CM-Sephadex) and size exclusion (Sephadex G-75) chromatographies. The lectin was characterized for profile in polyacrylamide gel electrophoresis under denaturing conditions (SDS-PAGE), stability to temperature and pH variations and hemagglutinating activity (HA) in the presence of ions. Antimicrobial activity of BoLL was investigated against human and plant pathogens. BoLL was isolated with high specific HA (purification fold: 53.27) and showed a single polypeptide band of approximately 19 kDa on SDS-PAGE. The HA of BoLL increased in the presence of Mg^{2+} ions, was resistant to heating at 100 °C, stable at acidic pH, but lost when incubated at pH above 8.0. BoLL showed bacteriostatic and bactericidal effects against *Escherichia coli* [minimal inhibitory (MIC) and bactericide (MBC) concentrations of 400 and 800 µg/mL] and *Staphylococcus aureus* (MIC and MBC: 400 µg/mL), as well as bacteriostatic effects against *Bacillus megaterium* (MIC: 18.2 µg/mL) and *Micrococcus luteus* (MIC: 800 µg/mL). The lectin was not active on *Pectobacterium* phytopathogenic bacteria and *Candida* species. In conclusion, the leaves of *B. orellana* contain a thermostable lectin with antibacterial activity on human pathogens, which stimulates future studies aiming at its biomedical application.

Key words: achiote; leaf lectin; antimicrobial activity; thermostable protein.

Introduction

Lectins are proteins that interact with carbohydrates in a reversible and specific way. They are widely found in nature and, in plants, have been isolated from leaves, barks, roots, rhizomes, bulbs, pods, seeds, fruits and flowers. The ability to bind to carbohydrates present on cell surfaces confers on lectins a range of biological properties, such as antitumor, antiviral, antimicrobial, healing and insecticide activities (Paiva et al., 2011; Dias et al., 2015; Coelho et al., 2017). Some plant lectins are part of the defense mechanisms against the action of pathogenic microorganisms (Procópio et al., 2017a).

The spread of drug-resistant microorganisms can be associated with several factors, including the exacerbated and indiscriminate use of antibiotics. In the current scenario, antimicrobials obtained from plants have been considered an alternative in the treatment of infectious diseases caused by microorganisms resistant to commercial antibiotics, presenting even fewer side effects (Calixto, 2005; Bella Cruz et al., 2010).

Bixa orellana L. is a shrubby plant that belongs to the family Bixaceae, coming from tropical America. It is known as “urucuzeiro” in Portuguese and achiote in English. Its major application is concentrated in the food industry, where it is used as a dye. In addition, seed extracts presented larvicidal activity against *Aedes aegypti*, antibacterial action and anti-*Leishmania* activity (Costa, 2013; Majolo et al., 2013; Vilar, 2015). Decoction of leaves is used to combat vomiting in pregnancy and roots are used for digestive problems (Corrêa and Penna, 1984). Other popular uses include cases of diarrhea, kidney pain, malaria, burns, and asthma (Alonso, 2004).

In the context described above, the present work describes the purification of a lectin (BoLL, *B. orellana* leaf lectin) from saline extract of *B. orellana* leaves and evaluation of its antimicrobial activity against pathogens for humans and plants.

Materials and methods

Plant material and protein extraction

Leaves of *B. orellana* were collected at the *Centro de Biociências* of the *Universidade Federal de Pernambuco* (UFPE), with authorization (no. 36301) of the *Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade* from Brazilian Ministry of Environment. The leaves were left to dry during 3 days at 25 °C and then powdered using a blender.

The leaf powder was added to 0.15 M NaCl (in the proportion of 10%, w/v) and the suspension was stirred during 16 h at 28°C. Next, the material was passed through filter paper and centrifuged (3,000 *g*, 15 min, 4 °C). The supernatant corresponded to the saline extract.

Protein concentration

Protein concentration was determined according to Lowry et al. (1951) using a standard curve (31.25–500 µg/mL) of bovine serum albumin.

Hemagglutinating activity (HA) assay

The presence of lectins along the purification steps was monitored by the HA assay performed as described by Procópio et al. (2017b). Rabbit erythrocytes treated with glutaraldehyde (Bing et al., 1967) were used. The sample (50 µL) was serially two-fold diluted in 0.15 M NaCl in a row of a 96-well microplate and then 50 µL of the erythrocyte suspension were added to each well. Erythrocytes incubated only in 0.15 M NaCl were used as control. The number of HA units corresponded to the reciprocal of the highest sample dilution that promoted full agglutination of erythrocytes. Specific HA (SHA) was defined as the ratio between HA and the protein concentration (mg/mL). The erythrocytes were collected as approved by the Ethics Committee on Animal Use of UFPE (process 23076.033782/2015-70).

HA inhibition assay was performed using 0.2 M monosaccharides [L(+)-arabinose, D(+)-galactose, D(+)-glucose and *N*-acetyl-D-glucosamine, D(+)-xylose e D(+)-raffinose], 0.2 M lactose, and 0.5 mg/mL glycoproteins (fetuin and bovine serum albumin). In these assays, the 0.15 M NaCl solution was replaced by the carbohydrate/glycoprotein solutions and a incubation step of 15 min was included before the addition of erythrocytes.

Lectin purification

The extract was treated with ammonium sulfate (60% saturation) according to Green and Hughes (1955). The precipitated protein fraction (PF) and supernatant fraction (FS) were dialyzed and evaluated for protein concentration and HA. FP (fraction with higher specific HA) was then dialyzed (2 h) against 10 mM citrate phosphate pH 5.5 (2 h) and loaded (1 mL, 14 mg of protein) onto a CM-Sephadex (Sigma-Aldrich, USA) column (7.5 × 1.5 cm) equilibrated with this buffer at a flow rate of 0.3 mL/min. The column was washed with the equilibrating

solution and the adsorbed proteins were eluted with 1.0 M NaCl. Fractions of 2 mL fractions were collected absorbance at 280 nm was monitored using a GeneQuant TM 1300 spectrophotometer (GE Healthcare Life Sciences, USA). The HA of all fractions was determined.

Next, the peak called P1 (see 'Results and discussion') from CM-Sephadex chromatography was dialyzed against distilled water, lyophilized, resuspended in 0.15 M NaCl and loaded (3.2 mg) onto a Sephadex G-75 (GE Healthcare Life Sciences, USA) column (20.0 × 2.0 cm) equilibrated with 0.15 M NaCl at a flow rate of 0.3 mL/min. Fractions were collected and evaluated for absorbance at 280 and HA. The first protein peak obtained in this chromatography was denominated BoLL.

Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

BoLL (100 µg) was submitted to PAGE in presence of sodium dodecyl sulfate (SDS) in 12% (w/v) acrylamide gel prepared according to Laemmli (1970). Polypeptide bands of the lectin and molecular mass markers (bovine serum albumin, 66 kDa, ovalbumin, 45 kDa, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, 36 kDa, bovine carbonic anhydrase, 29 kDa, bovine trypsinogen, 24 kDa, soybean trypsin inhibitor, 20.1 kDa, α-lactalbumin, 14.4 kDa) were stained with 0.02% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R 250 in 10% (v/v) acetic acid.

Effects of temperature, pH and ions on BoLL HA

To evaluate the thermostability of BoLL, the lectin was incubated at different temperatures (30–100 °C) for 30 min prior to the HA assay. For pH stability, the lectin was incubated in different buffers with pH values between 4.0 and 12.0 for 12 h at 4 °C and then HA was determined. Finally, the HA of BoLL was determined in presence of 20 mM CaCl₂ or MgCl₂ ions.

Microorganisms

The following human pathogenic bacteria, provided by the *Departamento de Antibióticos* from UFPE were used: *Bacillus megaterium* ATCC 14945, *Escherichia coli* UFPEDA-224, *Micrococcus luteus* F00112, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella enterica* serovar. Enteritidis UFPEDA-414, *Staphylococcus aureus* UFPEDA-02,

Streptococcus pyogenes ATCC 16642, *Streptococcus pyogenes* HC, and *Streptococcus pyogenes* HRP. The phytopathogenic bacteria *Pectobacterium carotovorum brasiliensis* UNEB-23, *Pectobacterium carotovorum carotovorum* UNEB-2, *Pectobacterium* sp. isolated from arugula UNEB-25, and *Pectobacterium* sp. isolated from lettuce UNEB-28 were obtained from the Phytopathology Laboratory of the *Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais* from the *Universidade do Estado da Bahia*. The fungi *Candida albicans* URM-7098, *Candida tropicalis* URM-7092, *Candida krusei* URM-6391 and *Candida parapsilosis* URM-7087 were from the culture collection Universidade Recife Mycologia (URM), *Departamento de Micologia*, UFPE.

Human pathogenic bacteria were cultured in Mueller Hinton Agar (MHA) plates while the phytopathogens were grown in Nutrient Yeast Dextrose Agar (NYDA), both overnight at 37 °C. The fungi were cultured in Sabouraud Dextrose Agar (SDA) at 28 °C overnight. Next, the colonies were suspended in sterile 0.15 M NaCl and the optical density at 600 nm (OD₆₀₀) was adjusted to equivalent of 10⁶ colony-forming units (CFU) per mL.

Antimicrobial assay

The minimum inhibitory concentrations (MIC) of BoLL were determined by the microtiter test proposed by the Clinical and Laboratory Standards Institute (2012). In 96-well microtiter plates, the sample (passed through a 0.22 µm PVDF syringe filter) was added (80 µL) into the third well, from which it was serially diluted in sterile Milli-Q water to the twelfth well of the same row. Subsequently, 40 µL of Mueller Hinton Broth, NYD medium or Sabouraud Dextrose Broth was added to all wells, except the first, which was filled with 200 µL of the culture medium (corresponding to the sterility control). Finally, the microbial suspension (80 µL; 10⁶ CFU/mL) was added from the second well until the last well in the row. The second well (containing microorganisms in the absence of the sample) corresponded to the 100% growth control. Plates were incubated at 37 °C (bacteria) or 28 °C (fungi) and OD₆₀₀ was measured at time zero and after 24 h of incubation. The MIC corresponded to the lowest concentration of BoLL capable of promoting a reduction ≥50% in OD₆₀₀ as compared with the 100% growth control. The antibiotics ampicillin and tetracycline were used as positive controls for human pathogenic bacteria pathogenic and fluconazole for fungi.

For the determination of MBC, aliquots (10 µL) of the wells containing BoLL concentrations ≥MIC were inoculated into petri plates containing MHA, NYDA or SDA, which were subsequently incubated at 37 °C (bacteria) or 28 °C (fungi) for 24 h. The MBC

corresponded to the lowest concentration of BoLL capable of reducing the number of CFU by 99.9% in regard with the initial inoculum. Each assay was performed in triplicate and three independent experiments were performed.

Results and discussion

In this work, it was established a protocol for purification of a lectin from *B. orellana* leaves and its antimicrobial activity was evaluated against species of human and plant pathogens. Table 1 summarizes the results of BoLL purification, which started obtaining a saline extract that showed SHA of 47.0. Aiming to eliminate some proteins without HA, the extract was fractionated with ammonium sulfate. Lectin molecules were precipitated by the salt since, after ressolubilization and dialysis, HA was only detected in PF. This fraction showed a much greater specific HA than the extract proving that the fractionation step led to partial purification of lectin. The HA of PF was inhibited by the glycoproteins fetuin and bovine serum albumin, by the monosaccharides L(+)-arabinose, D(+)-galactose, D(+)-glucose and *N*-acetyl-D-glucosamine, and by disaccharide lactose (Table 2). This result confirms the presence of lectins as agglutinating agents.

Chromatography of PF in CM-Sephadex column (Figure 1A) resulted in a peak (P1) of non-adsorbed proteins with HA and a peak (P2) of adsorbed proteins eluted with 1.0 M NaCl and that were not able to agglutinate erythrocytes. P1 showed specific HA higher than PF (Table 1) and was loaded onto Sephadex G-75 column. This chromatography separated P1 in two peaks (Figure 1B): the first presented higher specific HA (Table 1) and was called BoLL.

SDS-PAGE of BoLL revealed a single polypeptide band of approximately 19 kDa (Figure 1C), confirming the homogeneity of the lectin and suggesting that it is a monomeric protein or is constituted by subunits with similar molecular mass. The molecular mass of BoLL was lower than that of PgTeL, the lectin from *Punica granatum* sarcotesta (26 kDa), but higher than that of SteLL, the lectin from *Schinus terebinthifolus* leaves (14 kDa) (Gomes et al., 2013; Silva et al., 2016).

The hemagglutinating activity of BoLL was not significantly altered when it was heated until 100 °C, revealing a high thermostability. Similar results were reported for lectins isolated from *Moringa oleifera* seeds, *Myracrodruon urundeuva* bark, heartwood and leaves, *Alpinia purpurata* bracts, *Calliandra surinamensis* leaf pinnulae, *Microgramma vacciniifolia* fronds, and *P. granatum* sarcotesta (Coelho et al., 2009; Napoleão et al., 2011; Brito et al., 2017; Patriota et al., 2017; Procópio et al., 2017b; Silva et al., 2018). The thermostability of proteins

may be due several factors, such as presence of disulfide bridges, better hydrogen bonding, better hydrophobic internal packing as well as the presence of a disordered tertiary structure (Vogt and Argos, 1997; Zavodszky et al., 2001; Carvalho et al., 2015).

The HA of BoLL was stable at acidic pH but lost when incubated at alkaline pH above 8.0. Although this result does not indicate that BoLL is not able to recognize sugars in alkaline medium, it reveals that this lectin undergoes conformational changes that impact on the ability of its carbohydrate-binding domains to promote erythrocyte agglutination. This should be considered in future studies that require the application of BoLL in medium with pH higher than 8.0.

The HA increased in the presence of Mg^{2+} ions, similarly to reported for the lectin from *A. purpurata* bracts (Brito et al., 2017) and *M. vacciniifolia* rhizome (Santana et al., 2012). Bivalent ions may be required as an essential component within carbohydrate-binding sites of some lectins or may have the capacity to affect the protein overall conformation, modulating the protein activity (Santana et al., 2012).

BoLL showed bacteriostatic and bactericidal activity against *E. coli* and *S. aureus* and bacteriostatic on *B. megaterium* and *M. luteus* (Table 3). Antibacterial activity was not detected against the phytopathogenic isolates of *Pectobacterium*. In addition, BoLL was not active on the *Candida* species evaluated.

The lectin SteLL was more effective than BoLL against *E. coli* (MIC and MBC of 8.75 and 115 $\mu\text{g/mL}$, respectively) and *S. aureus* (MIC and MBC of 1.75 and 7.18 $\mu\text{g/mL}$, respectively) (Gomes et al., 2013). Conversely, BoLL was a more efficient antibacterial agent than the lectin isolated from *Canavalia maritima* seeds, which was not active against *E. coli* and *S. aureus* (Farias, 2013).

The antibacterial activity of lectins may be a consequence of the interaction with teicuronic and theicuronic acids, peptideoglycans and lipopolysaccharides of the cell wall. The lectins can form pores on the surface of the bacterial or fungal cells, causing leakage of the cellular content (Paiva et al., 2010; Moura et al., 2015). In addition, these proteins can affect physiological processes of the microorganisms due to their interaction with glycoconjugates in the membrane of the microorganism which can generate intracellular responses, resulting in inhibition of growth and/or death (Gomes et al., 2014; Iordache et al., 2015). BoLL can bind *N*-acetylglucosamine, which is a key component of peptidoglycan and glucosamines are also components of lipopolysaccharides. The interaction of this lectin with these sugars may be involved in their antibacterial activity.

4. Conclusion

Leaves of *B. orellana* contain a thermostable lectin with antibacterial activity against human pathogens, which stimulates future studies aiming at its biomedical application.

Acknowledgements

The authors express their gratitude to the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq; 446902/2014-4) for research grants and fellowship (LCBBC, PMGP and THN), and the *Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco* (FACEPE; APQ-0108-2.08/14; APQ-0661-2.08/15) for financial support. PKA would like to thank CNPq for graduate scholarship. MCM would like to thank the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES) for post-doctoral scholarship.

References

- ALONSO, J. **Tratado de Fitofármacos y Nutracêuticos**. Rosário: Corpus, 1359 p, 2004.
- BELLA CRUZ, A.B. *et al.* Métodos “*In Vitro*” na Avaliação da Atividade Biológica de Produtos Naturais e Sintéticos. In: BRESOLIN, T. M. B. (Org.); CECHINEL-FILHO, V. (Org.). **Fármacos e Medicamentos: Uma abordagem multidisciplinar**. São Paulo: Santos, pp. 175-205, 2010.
- BING, D.H., *et al.* Hemagglutination with aldehyde fixed erythrocytes for assay of antigens and antibodies. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 124, p. 1166–1170, 1967.
- BRITO, J.S. *et al.* Lectin from inflorescences of ornamental crop *Alpinia purpurata* acts on immune cells to promote Th1 and Th17 responses, nitric oxide release, and lymphocyte activation. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 94, p. 865-872, 2017
- CALIXTO, J.B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America – A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 131-134, 2005.
- CARVALHO, A.S. *et al.* Purification, characterization and antibacterial potential of a lectin isolated from *Apuleia leiocarpa* seeds. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 75, p. 402-408, 2015.

- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 21st informational supplement (M100–S22)**, Wayne, PA: CLSI, 2012.
- COELHO, J.S. *et al.* Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae. **Chemosphere**, v. 77, p. 934-938, 2009.
- COELHO, L.C.B.B. *et al.* Lectins, Interconnecting Proteins with Biotechnological/ Pharmacological and Therapeutic Applications. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, artigo 1594074, 2017.
- CORRÊA, M.P.; PENNA, L.A. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, v. 6. pp. 358-359, 1984.
- COSTA, R.O. **Investigação do efeito larvicida de extratos e da substância isolada da semente de *Bixa orellana* sobre o *Aedes aegypti***. Monografia (Ciências da Natureza - Licenciatura em Química), Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Fluminense. 2013.
- DIAS, R.O. *et al.* Insights into animal and plant lectins with antimicrobial activities. **Molecules**, v. 20, p. 519-541, 2015.
- FARIAS, D.L. **Isolamento, purificação e atividades biológicas de uma nova lectina de sementes de feijão da praia (*Canavalia maritima*)**. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular), Universidade Federal da Paraíba, 2013.
- GOMES, F.S. *et al.* Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, p. 672-679, 2013.
- GOMES, F.S. *et al.* Saprophytic, Symbiotic and Parasitic Bacteria: Importance to Environment, Biotechnological Applications and Biocontrol. **Advances in Research**, v. 2, p. 250-265, 2014.
- GREEN, A.A., HUGHES, L. Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solution of salts and organic solvents. In: COLOWICK, S., KAPLAN, N. (Eds.), **Methods in Enzymology**, Academic Press, New York, pp. 67-90, 1955.
- IORDACHE, F. *et al.* Antimicrobial and antiparasitic activity of lectins. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 16, p. 152-161, 2015.
- 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. *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265–275, 1951.

- MAJOLO, C.; CARVALHO, H.H.; WIEST, J.M. Atividade antibacteriana “in vitro” de diferentes acessos de urucum (*Bixa orellana* L.) e sua relação com o teor de bixina presente nas sementes. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 31, p. 115-124, 2013.
- 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**, v. 119, p. 666-676, 2015.
- NAPOLEÃO, T.H. *et al.* Termiticidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* against *Nasutitermes corniger* and its mechanisms. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, p. 52-59, 2011.
- PAIVA, P.M.G. *et al.* Antimicrobial activity of secondary metabolites and lectins from plants. In: MENDEZ-VILLAS, A. (Org.). **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**, Formatex Research Center, Badajoz, vol. 1, pp. 396-406, 2010.
- PAIVA, P.M.G. *et al.* Plant compounds with *Aedes aegypti* larvicidal activity and other biological properties. In: LIONG, M-T. (Ed.) **Bioprocess Sciences and Technology**. Nova Science Publishers, New York, pp. 271-295, 2011.
- PATRIOTA, L.L.S. *et al.* *Microgramma vacciniifolia* (Polypodiaceae) fronds contain a multifunctional lectin with immunomodulatory properties on human cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 103, p. 36-46, 2017.
- PROCÓPIO, T.F. *et al.* Antibacterial lectins: Action mechanisms, defensive roles and biotechnological potential. In: COLLINS, E. (Ed.) **Antibacterials: Synthesis, Properties and Biological Activities**. Nova Science Publishers, New York, pp. 69-90, 2017a.
- PROCÓPIO, T.F. *et al.* CasuL: A new lectin isolated from *Calliandra surinamensis* leafpinnulae with cytotoxicity to cancer cells, antimicrobial activity and antibiofilm effect. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, p. 419–429, 2017b.
- SANTANA, G.M.S. *et al.* Electrochemical potential of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin. **Bioelectrochemistry**, v. 85, p. 56-60, 2012.
- SILVA, P.M. *et al.* PgTeL, the lectin found in *Punica granatum* juice, is an antifungal agent against *Candida albicans* and *Candida krusei*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 391–400, 2018.
- SILVA, P.M. *et al.* The juicy sarcotesta of *Punica granatum* contains a lectin that affects growth, survival as well as adherence and invasive capacities of human pathogenic bacteria. **Journal of Functional Foods**, v. 27, p. 695-702, 2016.

- VILAR, D.A. **Estudo fitoquímico da bixina e fração oleosa extraídos da *Bixa orellana* biomonitorado pela atividade leishmanicida.** Tese (Doutorado em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos), Universidade Federal da Paraíba 2015.
- VOGT, G., ARGOS, P. Protein thermal stability: hydrogen bonds or internal packing? *Folding and Design*, v. 2, supl. 1, p. S40-S46, 1997.
- ZAVODSZKY, M. Disulfide bond effects on protein stability: Designed variants of *Cucurbita maxima* trypsin inhibitor-V. **Protein Science**, v. 10, p. 149–160, 2001.

Table 1. Summary of the purification of *Bixa orellana* leaf lectin (BoLL)

Sample	Protein (mg/mL)	HA	Specific HA	Purification fator
Extract	21.79	1,024	47.0	1
PF	13.91	8,192	588.9	12,52
P1	3.271	4,096	1,252	26.63
BoLL	0.4042	512	2,533	53.89

HA: hemagglutinating activity. Purification factor corresponds to the ratio between the specific HA in the step and the specific HA of the extract. PF: precipitated fraction obtained after treatment of the extract with ammonium sulphate (60% saturation). P1: pool of unadsorbed protein fractions from chromatography of PF on CM-Sephadex column.

Table 2. Hemagglutinating activity of PF (precipitated fraction obtained after treatment of the *B. orellana* leaf extract with ammonium sulphate) in presence of carbohydrates and glycoproteins.

Glycoproteins	Concentration (mg/mL)			
	0.5	0.25	0.125	0.0625
	HA			
Fetuin	8	8	16	16
Bovine serum albumin	8	16	16	16
Carbohydrate	Concentration (M)			
	0.2	0.1	0.05	0.025
	HA			
L(+)-arabinose	256	256	512	512
D(+)-galactose	1,024	2,048	4,096	8,192
Lactose	2,048	8,192	8,192	8,192
D(+)-glucose	2,048	8,192	8,192	8,192
N-acetyl-D-glucosamine	4,096	4096	8,192	8,192
HA of PF in absence of carbohydrates and glycoproteins: 8,192				

Table 3. Antibacterial activity of *Bixa orellana* leaf lectin (BoLL)

Bacteria	BoLL (µg/mL)	
	MIC	MBC
<i>Escherichia coli</i>	400	800
<i>Micrococcus luteus</i>	800	ND
<i>Staphylococcus aureus</i>	400	400
<i>Bacillus megaterium</i>	18.2	ND

MIC: minimal inhibitory concentration. MBC: minimal bactericidal concentration.

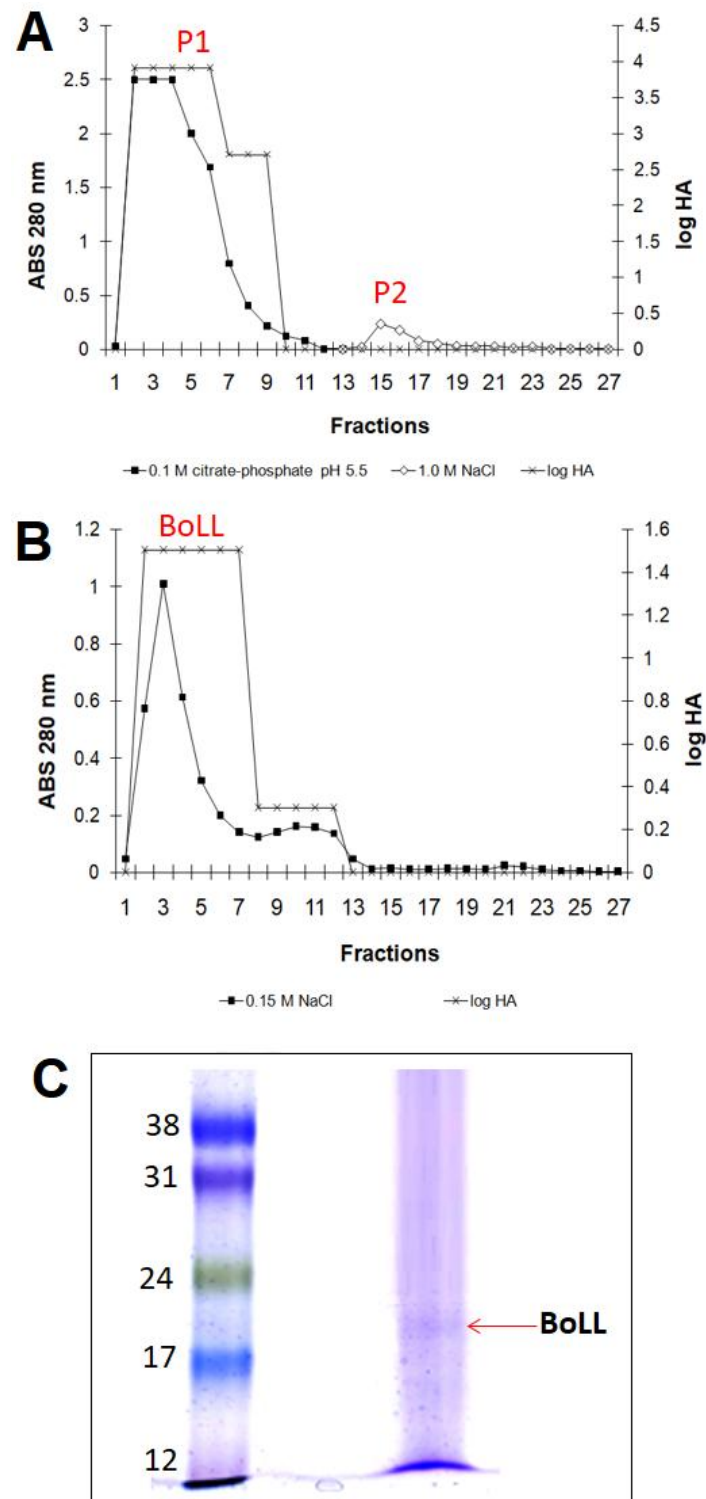


Figure 1. Purification of *Bixa orellana* leaf lectin (BoLL). (A) Chromatography of PF on CM-Sephadex column equilibrated with citrate-phosphate buffer. Adsorbed proteins were eluted with 1.0 M NaCl. (B) (B) Chromatography of P1 on Sephadex G-75 column equilibrated with 0.15 M NaCl. (C) SDS-PAGE of molecular mass markers and BoLL.

4 CONCLUSÕES

- BoLL foi isolada eficientemente através de precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica em CM-Sephadex e cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-75.
- A lectina mostrou ser termoestável e sensível à incubação em pH alcalino.
- BoLL teve sua capacidade de aglutinar eritrócitos estimulada por íons Mg^{+2} .
- BoLL apresentou uma única banda polipeptídica de 19 kDa em SDS-PAGE
- A lectina foi apresentou atividades bacteriostática e bactericida sobre patógenos humanos.

REFERÊNCIAS

- AKKOUH, O. *et al.* Lectins with Anti-HIV Activity: A Review. **Molecules**, v. 20, n. 1, p. 648-668, 2015.
- 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**, v. 172, p. 1098-1105, 2014.
- ALONSO, J. **Tratado de Fitofármacos y Nutracêuticos**. Rosário: Corpus, 1359 p, 2004.
- AMANO, K. *et al.* *Aleuria aurantia* lectin exhibits antifungal activity against *Mucor racemosus*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 76, n. 5, p. 967-970, 2012.
- ARAÚJO, R.M.S. *et al.* *Crataeva tapia* bark lectin is an affinity adsorbent and insecticidal agent. **Plant Science**, v. 183, p. 20-26, 2012.
- ARAÚJO, R.M.S. *et al.* Lectin from *Crataeva tapia* bark exerts antitumor, anti-inflammatory and analgesic activities. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 1, n. 2, p. 97-100, 2011.
- ATHAMNA, A. *et al.* Adherence of *Mycoplasma pneumoniae* to human alveolar macrophages. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 15, p. 135–141, 2006.
- BARBIERI, E. **Biodiversidade: a variedade de vida no planeta terra**. Instituto de Pesca, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, 16 p. 2010.
- BARBOSA FILHO, J.M. *Bixa orellana*: Retrospectiva de usos populares, atividades Biológicas, fitoquímica e emprego na fitocosmética, no continente americano. *Anais Palestra apresentada no SIMBRAU – Simpósio Brasileiro do Urucum*, João Pessoa: 2006.
- BATTISON, A.L.; SUMMERFIELD, R.L. Isolation and partial characterisation of four novel plasma lectins from the American lobster *Homarus americanus*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 33, p. 198–204, 2009.
- BELLA CRUZ, A.B. *et al.* Métodos “*In Vitro*” na Avaliação da Atividade Biológica de Produtos Naturais e Sintéticos. In: BRESOLIN, T. M. B. (Org.); CECHINEL-FILHO, V. (Org.). **Fármacos e Medicamentos: Uma abordagem multidisciplinar**. São Paulo: Santos, pp. 175-205, 2010.
- BENEVIDES, G.R. **Caracterização bioquímica e estrutural de uma lectina recombinante de sementes de *Platypodium elegans* Vogel**. Tese (Doutorado em Bioquímica), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.
- BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L.; STRYER, L. **Bioquímica**. 7ª ed. Guanabara Koogan, 2004, 1200 p.
- BIES, C.; LEHR, C.M.; WOODLEY, J.F. Lectin – mediated drug targeting: history and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 425-435, 2004.

BITTENCOURT, C.C. **O uso dos antimicrobianos: uma proposta de intervenção para a ESF.** Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Atenção Básica em Saúde da Família) Universidade Federal de Minas Gerais, 2014.

BOTELI, A. P. *et al.* Insecticidal and antifungal activity of a protein from *Pouteria torta* seeds with lectin-like properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 2653-2658, 2007.

BOYD, W.C; SHAPLEIGH, F. Separation of individuals of any blood group into secretors and non-secretors by use of a plant agglutinin (lectin). **Blood**, v. 9, n. 12, p. 1194-1198, 1954.

BRITO, J.S. *et al.* Lectin from inflorescences of ornamental crop *Alpinia purpurata* acts on immune cells to promote Th1 and Th17 responses, nitric oxide release, and lymphocyte activation. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 94, p. 865-872, 2017

CALIXTO, J.B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America – A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 131-134, 2005.

CASTRO, C.B. *et al.* **A Cultura do Urucum.** 2ª. ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 61 p., 2009.

CAVADA, B.S. *et al.* Purification, chemical and immunochemical properties of a new lectin from Mimosoideae (*Parkia discolor*). **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 30, p. 271-280, 2000.

CDB – Convenção da Diversidade Biológica. **Global Biodiversity Outlook 4 – A mid-term assessment of progress towards the implementation of the Strategic Plan for Biodiversity 2011-2012.** Montréal, 2014. Disponível em: <<http://www.cbd.int/gbo4/>>. Acesso em: 15 fev. 2018.

CNI – Confederação Nacional da Indústria. **Estudo sobre os impactos da adoção e implementação do Protocolo de Nagoia para a indústria brasileira.** Brasília: CNI, 2014.

COELHO, L.C.B.B. *et al.* Protein purification by affinity chromatography. In: AHMAD, R. (Org.). **Protein Purification.** InTech, Rijeka, pp. 53-72, 2012.

COELHO, L.C.B.B. *et al.* Lectins, Interconnecting Proteins with Biotechnological/ Pharmacological and Therapeutic Applications. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, artigo 1594074, 2017.

COELHO, A.M.S.P. *et al.* Atividade antimicrobiana de *Bixa orellana* L. (Urucum). **Revista Lecta**, v. 21, p. 47-54, 2003.

COMINETTI, M.R. *et al.* Characterization and partial purification of a lectin from the hemolymph of the white shrimp *Litopenaeus schmitti*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 26, p. 715-721, 2002.

CORIOLO, M.C. *et al.* Immunomodulatory Response of Mice Splenocytes Induced by RcaL, a Lectin Isolated from Cobia Fish (*Rachycentron canadum*) Serum. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 168, p. 1335-1348, 2012.

CORRÊA, M.P.; PENNA, L.A. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, v. 6. pp. 358-359, 1984.

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

COSTA, R.M.P.B. *et al.* A new mistletoe e *Phthirusa pyrifolia* leaf lectin with antimicrobial properties. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 526-533, 2010.

COSTA, R.O. **Investigação do efeito larvicida de extratos e da substância isolada da semente de *Bixa orellana* sobre o *Aedes aegypti***. Monografia (Ciências da Natureza - Licenciatura em Química), Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Fluminense. 2013.

DIAS, R.O. *et al.* Insights into animal and plant lectins with antimicrobial activities. **Molecules**, v. 20, p. 519-541, 2015.

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

FIGUEIRAS, T. S.; PEIXOTO, A. L. Flora e vegetação do Brasil na carta de Caminha. **Acta Botanica Brasilica**, v. 16, n. 3, p. 263-272, 2002.

GAO, J. *et al.* Screening lectin-binding specificity of bacterium by lectin microarray with gold nanoparticle probes. **Analytical chemistry**, v. 82, n. 22, p. 9240-9247, 2010.

GIULIANO, G.; ROSATI, C.; BRAMLEY, P.M. To dye or not to dye: biochemistry of annatto unveiled. **Trends in Biotechnology**, v. 21, n. 12, p. 513-516, 2003.

GOMES, F.S. *et al.* Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, p. 672-679, 2013.

GOMES, F.S. *et al.* Saprophytic, Symbiotic and Parasitic Bacteria: Importance to Environment, Biotechnological Applications and Biocontrol. **Advances in Research**, v. 2, p. 250-265, 2014.

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

HE, X. *et al.* A novel sialic acid binding lectin with anti-bacterial activity from the Hong Kong oyster (*Crassostrea hongkongensis*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 31, n. 6, p. 1247- 1250, 2011.

IROBI, O.N.; MOO YOONG, M.; ANDERSON, W.A. Antimicrobial activity of Annatto (*Bixa orellana*) extract. **International Journal of Pharmacognosy**, v. 34, p. 87-90, 1996.

JIANG, L. *et al.* Expression, purification and characterization of a group of a lectin-like peptides from the spider *Ornithoctonus huwena*. **Peptides**, v. 30, p. 669-674, 2009.

JOLY, A.B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 8^a. ed. São Paulo: Nacional, p. 482-485, 1987.

JOLY, C.A. *et al.* **Diagnóstico da pesquisa em biodiversidade no Brasil**. **Revista USP**, v. 89, p. 114-133, 2011.

KAUR, M. *et al.* A tuber lectin from *Arisaema helleborifolium* Schott with antiinsect activity against melon fruit fly, *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) and anti-cancer and anti-cancer effect on human cancer cell lines. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 445, p. 156–165, 2006.

KAWSAR, S.M. *et al.* Isolation, purification, characterization and glycan-binding profile of a D-galactoside specific lectin from the marine sponge *Halichondria okadae*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 150, p. 349-357, 2008.

KEKKI, H. *et al.* Improved cancer specificity in PSA assay using *Aleuria aurantia* lectin coated Eu-nanoparticles for detection. **Clinical Biochemistry**, v. 50, p. 54–61, 2017.

KOHARUDIN, L.M. *et al.* Novel fold and carbohydrate specificity of the potent anti-HIV cyanobacterial lectin from *Oscillatoria agardhii*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 2, p. 1588-1597, 2011.

LIMA, A.L.R. *et al.* Histochemical evaluation of human prostatic tissues with *Cratylia mollis*. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, artigo 179817, 2010.

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

LUZ, L.A. *et al.* Structural characterization of coagulant *Moringa oleifera* Lectin and its effect on hemostatic parameters. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 58, p. 31-36, 2013.

MAJOLO, C.; CARVALHO, H.H.; WIEST, J.M. Atividade antibacteriana “in vitro” de diferentes acessos de urucum (*Bixa orellana* L.) e sua relação com o teor de bixina presente nas sementes. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 31, p. 115-124, 2013.

MANIKANDAN, B. & RAMAR, M. Detection and characterization of natural and inducible lectins in human serum. **Results in Immunology**, v. 2, p. 132-141, 2012.

MATSUI, T. *et al.* Comparative study of blood group recognizing lectins toward ABO blood group antigens on neoglycoproteins, glycoproteins and complex-type oligosaccharides. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1525, p. 50-57, 2001.

MEDEIROS, M.L.S. *et al.* Nematicidal activity of a water soluble lectin from seeds of *Moringa oleifera*; **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 782-789, 2018.

MELIM, C. **Avaliação do potencial antimicrobiano de quatro espécies de plantas medicinais da flora brasileira**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade do Vale do Itajaí, 2011.

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

MONTE, L.G. *et al.* Lectin of *Abelmoschus esculentus* (okra) promotes selective antitumor effects in human breast cancer cells. **Biotechnology Letters**, v. 36, n. 3, p. 461-469, 2014.

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**, v. 119, p. 666-676, 2015.

NAPOLEÃO, T.H. *et al.* Effect of *Myracrodruon urundeuva* leaf lectin on survival and digestive enzymes of *Aedes aegypti* larvae. **Parasitology Research**, v. 110, p. 609-616, 2012.

NAPOLEÃO, T.H. *et al.* Affinity Matrices of *Cratylia mollis* Seed Lectins for Isolation of Glycoproteins from Complex Protein Mixtures. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 171, p. 744-755, 2013.

NAPOLEÃO, T.H. *et al.* Termiticidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* against *Nasutitermes corniger* and its mechanisms. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, p. 52-59, 2011.

NASCIMENTO, E.D. **Resistência bacteriana em reservatórios do semiárido brasileiro: caracterização, ações para vigilância ambiental, prevenção e educação em saúde**. Tese (Doutorado em Desenvolvimento e Meio Ambiente), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2016.

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

NUNES, E.S. Purificação, caracterização estrutural e funcional da lectina do veneno de *Bothrops leucurus*: Modulação de eventos citotóxicos após a irradiação gamma. Tese (Ciências Biológicas), Universidade Federal de Pernambuco, 2011.

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

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

OLIVEIRA, A.P.S. *et al.* Biotechnological value of *Moringa oleifera* seed cake as source of insecticidal lectin against *Aedes aegypti*. **Process Biochemistry**, v. 51, p. 1683-1690, 2016.

PAIVA, P.M.G. *et al.* Lectins and trypsin inhibitors from plants: Biochemical characteristics and adverse effects on insect larvae. 1a ed. Nova Science Publishers, New York, 52 p. 2013.

PAIVA, P.M.G. *et al.* Antimicrobial activity of secondary metabolites and lectins from plants. In: MENDEZ-VILLAS, A. (Org.). **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**, Formatex Research Center, Badajoz, vol. 1, pp. 396-406, 2010.

PAIVA, P.M.G. *et al.* Plant compounds with *Aedes aegypti* larvicidal activity and other biological properties. In: LIONG, M-T. (Ed.) **Bioprocess Sciences and Technology**. Nova Science Publishers, New York, pp. 271-295, 2011.

PATRIOTA, L.L.S. *et al.* *Microgramma vacciniifolia* (Polypodiaceae) fronds contain a multifunctional lectin with immunomodulatory properties on human cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 103, p. 36-46, 2017.

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 and Biotechnology**, v. 19, p. 907-916, 2010.

PIMENTEL, V. *et al.* Biodiversidade brasileira como fonte da inovação farmacêutica: uma nova esperança? **Revista do BNDES**, v. 43, p. 41-89, 2015.

PROCÓPIO, T.F. *et al.* Antibacterial lectins: Action mechanisms, defensive roles and biotechnological potential. In: COLLINS, E. (Ed.) **Antibacterials: Synthesis, Properties and Biological Activities**. Nova Science Publishers, New York, pp. 69-90, 2017a.

PROCÓPIO, T.F. *et al.* CasuL: A new lectin isolated from *Calliandra surinamensis* leafpinnulae with cytotoxicity to cancer cells, antimicrobial activity and antibiofilm effect. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, p. 419–429, 2017b.

QADIR, S. *et al.* Evaluation of antimicrobial activity of a lectin isolated and purified from *Indigofera heterantha*. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 4, p. 999- 1006, 2013.

RAMOS, D.B.M. *et al.* Antimicrobial Activity of *Cladonia verticillaris* Lichen Preparations on Bacteria and Fungi of Medical Importance. **Chinese Journal of Biology**, v. 2014, artigo 219392, 2014.

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

REBOUÇAS, T.N.H.; SÃO JOSÉ, A.R. **A cultura do urucum: Práticas de cultivo comercialização**. DFZ/UESB/CBCN, Vitória da Conquista, 120 p., 1996.

REVILLA, J. **Plantas da Amazônia: oportunidades econômicas e sustentáveis**. 2ª ed. Manaus: Programa de Desenvolvimento Empresarial e Tecnológico, pp. 201-205, 2001.

ROHDE, D.C.; SILVEIRA, S.O.; VARGAS, R.R.A. O uso do corante urucum (*Bixa orellana* L.) na técnica de coloração histológica. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 38, n. 2, p. 119-121, 2006.

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

SÁ, R.A. *et al.* Larvicidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* on *Aedes aegypti*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 149, p. 300-306, 2009.

SAHA, R.K. *et al.* Antibacterial and Antioxidant Activities of a Food Lectin Isolated from the Seeds of *Lablab purpureus*. **American Journal of Ethnomedicine**, v. 1, n. 1, p. 008-017, 2014.

SANDI, M.P., CUEN, M.; BACERRA, R. El Achiote, Boletín Bimestral de la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. **Biodiversitas**, n. 46, p. 7-11, 2003.

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

SANTANA, G.M.S. *et al.* Isolation of lectin from *Opuntia ficus-indica* cladodes. **Acta Horticulturae**, v. 43, p. 352-358, 2009.

SANTANA, M.A. *et al.* A novel and efficient and low-cost methodology for purification of *Macrotyloma axillare* (Leguminosae) seed lectin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 43, p. 352-358, 2008.

SANTOS, A.F.S. *et al.* Strategies to obtain lectins from distinct sources. In: BERHARDT, L.V. (Org.). **Advances in Medicine and Biology**, vol. 63, Nova Science Publishers, New York, pp. 33-60, 2013.

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

SATO, Y. *et al.* High mannose-specific lectin (KAA-2) from the red alga *Kappaphycus alvarezii* potently inhibits influenza virus infection in a strain-independent manner. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 405, p. 291-296, 2011.

SCHERER, H.J.; ESSI, L.; PINHEIRO, D.K. O conhecimento da Biodiversidade: um estudo de caso com estudantes de graduação de uma universidade brasileira. **Revista Monografias Ambientais Santa Maria**, v. 14, n. 2, p. 49-58, 2015.

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

SILVA, P.M. *et al.* The juicy sarcotesta of *Punica granatum* contains a lectin that affects growth, survival as well as adherence and invasive capacities of human pathogenic bacteria. **Journal of Functional Foods**, v. 27, p. 695-702, 2016.

SILVA, L.E. ALBUQUERQUE, U.P. AMARAL, W. Uso sustentável da biodiversidade e conservação de recursos naturais. **Guaju – Revista Brasileira de Desenvolvimento Territorial Sustentável**, v. 3, n.1, p. 2-10, 2017.

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

SILVA, M.D.C. *et al.* Purified *Cladonia verticillaris* lichen lectin: insecticidal activity on *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae). **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, p. 334–340, 2009.

SILVA, P.M. *et al.* PgTeL, the lectin found in *Punica granatum* juice, is an antifungal agent against *Candida albicans* and *Candida krusei*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 391–400, 2018.

SINGH, R.S.; BHARI, R.; KAUR, H.P. Current trends of lectins from microfungi. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 31, n. 3, p. 193–210, 2011.

SOUZA, J.D. *et al.* 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.

TATSUTA, T. *et al.* Sialic acid-binding lectin (leczyme) induces apoptosis to malignant mesothelioma and exerts synergistic antitumor effects with TRAIL. **International Journal of Oncology**, v. 44, n. 2, p. 377, 2014.

VAN DAMME, E.J.M. *et al.* Molecular cloning of the bark and seed lectins from the Japanese pagoda tree (*Sophora japonica*). **Plant Molecular Biology**, v. 33, p. 523–536, 1997.

VÁZQUEZ-YANES, C.A.I. *et al.* **Arboles y Arbustos Potencialmente Valiosos Para La Restauración Ecológica Y La Reflorestación**. Reporte Técnico Del Proyecto. CONABIO-Institution De Ecología, UNAM. 1999.

VILAR, D.A. **Estudo fitoquímico da bixina e fração oleosa extraídos da *Bixa orellana* biomonitorado pela atividade leishmanicida**. Tese (Doutorado em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos), Universidade Federal da Paraíba 2015.

WANG, H.X., NG, T.B., Purification of castamollin, a novel antifungal protein from Chinese chestnuts. 2003). **Protein Expression and Purification**, v. 32, p. 44–51, 2003.

WEIS, W.; DRICKAMER, K. Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. **Annual Review of Biochemistry**, v. 65, p. 441–473, 1996.

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

WONG, J.H.; NG, T.B. Purification of a trypsin-stable lectin with antiproliferative and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 301, p. 545–550, 2003.

YAO, Q. *et al.* A new chitin-binding lectin from rhizome of *Setcreasea purpurea* with antifungal, antiviral and apoptosis-inducing activities. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1477–1485, 2010.

YIM, N-H. *et al.* Screening of aqueous extracts of medicinal herbs for antimicrobial activity against oral bacteria. **Integrative Medicine Research**, v. 2, n. 1, p. 18-24, 2013.