

EXTRAÇÃO, ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE LECTINA DE FOLHAS DE *Bauhinia variegata* var. “candida”

Engenheiro Químico Manuel Messias de Oliveira

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de Concentração Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho, M. C., Ph.D.

Co-orientadora: Prof^a. Sandra Rodrigues de Souza, M.C., Dra.

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-CCB-UFPE

Agosto-2006

Oliveira, Manuel Messias de

Extração, isolamento e caracterização parcial de lectina de folhas de *Bauhinia variegata* var. "cândida"/ Manuel Messias de Oliveira. – Recife : O Autor, 2006.

69 folhas. il., fig.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Ciências Biológicas – Biotecnologia, 2006.

Inclui bibliografia.

1. Lectina.	2. <i>Bauhinia variegata</i> var. candida	
3. Purificação	I. Título.	
582.736	CDU (2.ed.)	UFPE
583.74	CDD (22.ed.)	CCB 070

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

Aos oito dias do mês de agosto de dois mil e seis, às catorze horas, no Auditório do Centro de Ciências Biológicas, realizou-se a defesa de dissertação apresentada pelo Mestrando **Manuel Messias de Oliveira**, intitulada: "**Extração, isolamento e caracterização parcial de lectina de folhas de *Bauhinia variegata* var. *candida***". A Banca Examinadora foi homologada em vinte e sete de julho de dois mil e seis, pela PROPESQ, tendo como membros titulares, os Professores: **Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho** (Orientadora) Doutora Ph.D em Bioquímica, pela Universidade de Londres, Inglaterra, **Maria Tereza dos Santos Correia**, Doutora em Ciências Biológicas, pela Universidade Federal de São Paulo, **Sandra Rodrigues de Souza**, Doutora em Ciências Biológicas, pela Universidade Federal de Pernambuco; **Suely Lins Galdino**, Doutora em Ciências Farmacêuticas, pela Universidade de Joseph Fourier, França e **Adriana Carla Cavalcante Malta Argôlo**, Doutora em Ciências Biológicas, pela Universidade Federal de Pernambuco, suplentes. A Prof.^a Tereza Correia deu início à Sessão, para apresentação de defesa de Mestrado, agradeceu a presença de todos e passou a palavra para Prof.^a Luana Coelho, que após ler os termos convidou o Mestrando para apresentação de sua defesa, que efetuou durante quarenta minutos. Continuando, a presidenta solicitou à Comissão Examinadora a ocupar seus lugares. A seguir, procedeu-se à arguição na seguinte ordem: Dr.^a Sandra de Souza (1º examinador), Dr.^a Tereza Correia (2º examinador), Dr.^a Luana Coelho (3º examinador). A presidenta fez agradecimentos e em seguida solicitou dos convidados que se retirassem por alguns minutos a fim proceder a avaliação. A Banca Examinadora atribuiu a **Manuel Messias de Oliveira** a seguinte menção: "**Aprovado com Distinção**" por unanimidade. Face ao resultado o mesmo está apto a colar o grau de Mestre em Ciências Biológicas, Área **Biotecnologia**, pela Universidade Federal de Pernambuco. Nada mais havendo a tratar a sessão foi encerrada e para constar eu, Adenilda Eugênia de Lima, Secretária, lavrei, datei e assinei a presente ata que também assinam os demais presentes, Recife, 08 de agosto de 2006.

Manuel Messias de Oliveira
Luana Coelho
Sandra Rodrigues de Souza
Suely Lins Galdino
Adriana Carla Cavalcante Malta Argôlo
Adenilda Eugênia de Lima
Fortuna Oliveira, Matilde Cezarina da Silva, Renato Barros Neres
Walkyria Almeida Santana, Daiz de Souza Ferreira, Jéssica
Francisco dos Santos Araújo 11. 12 R 1.10.06

FOLHA DE JULGAMENTO

Título: Extração, Isolamento e Caracterização Parcial de Lectina de Folhas de

Bauhinia variegata var. “candida”.

Candidato: Engenheiro Químico Manuel Messias de Oliveira

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-CCB-UFPE

Data da defesa: Recife, 08 de agosto de 2006

Aprovada por:

Prof^a. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho, M.C., Ph.D., UFPE

Prof^a. Sandra Rodrigues de Souza, M.C., Dra, FAFIRE-PE

Prof^a. Maria Tereza dos Santos Correia, M.C., Dra, UFPE



DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho as pessoas da minha família, minha esposa, Fátima e meu filhos, Guilherme e Manuella, como gratidão e amizade e ajuda mútua durante os anos de nossa convivência.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi o meio motivador de uma busca de vida por uma especialização, aprendizado, superação de realização, desde pessoal (fator limitante de uma empreitada) até técnicos por mudança de área profissional, que provoca entendimento e coerência, tanto na obra como na vida. Assim agradeço, especialmente à Profa. Dra. Luana Cassandra B. B. Coelho por ter me acolhido e dado oportunidade para mais uma realização profissional, aconselhando e educando conforme cobranças necessárias do dia a dia e ao mesmo tempo pela preocupação em querer compactuar com os meus objetivos e, ao mesmo tempo, com visão de enfrentamento das dificuldades. Não posso me esquecer dos amigos integrantes do curso e os companheiros de trabalho no Laboratório de Glicoproteína pela amizade sincera, apoio e palavras providenciais que foram de importância ímpar para a minha permanência e conclusão do curso.

À coordenadora do programa Profa. Dra. Sueli Lins Galdino e à vice-coordenadora Maria Tereza dos Santos Correia e as secretárias Adenilda Eugenia e Liane que conduzem de maneira a primar pela excelência, meus sinceros agradecimentos.

Ao corpo docente do Programa pela acolhida, atenção, ensinamento e pela experiência transmitida.

À Profa. Dra. Sandra Rodrigues por ter me conduzido após uma especialização à continuidade de uma busca pelo aprimoramento, mostrado pelo seu exemplo de vida.

Em especial, à técnica Maria Barbosa Reis da Silva pelas oportunidades que me ofereceu, pela preocupação em querer transmitir seus conhecimentos e ensinamentos experimentais. Finalmente à minha família (esposa Fátima e meus filhos Guilherme e Manuella) pelo apoio irrestrito, presença e ajuda sempre, sendo a luz pelo caminho que trilho; aos meus pais, pelo início e continuidade; e por fim a Deus por mais esta lição de vida.

“Se não fôssemos capazes ou não desejássemos olhar em novas direções, se não tivéssemos dúvidas ou não soubéssemos reconhecer a nossa ignorância, nunca conseguiríamos ter idéias novas. Não haveria nada para verificar, pois já conheceríamos a verdade. Aquilo a que hoje chamamos conhecimento científico é um corpo de afirmações com diversos graus de certeza. Algumas são muito incertas, outras são quase certas, mas nenhuma é absolutamente certa. Os cientistas estão habituados a isso. Sabemos que é consistente conseguir viver sem saber toda a verdade. Algumas pessoas perguntam: Como é que você consegue viver sem saber? Não entendo o que querem dizer com isso. Sempre vivi sem saber. Isto é fácil. Como é possível saber é o que eu quero saber”.

Richard P. Feynman

Resumo da Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.C.).

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-CCB-UFPE).

Extração, Isolamento e Caracterização Parcial de Lectina de Folhas de *Bauhinia variegata* var. “candida”.

Engenheiro Químico Manuel Messias de Oliveira

Julho/2006

Orientador: Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho, Ph.D., M.C.

Co-orientador: Sandra Rodrigues de Souza, M.C., Dra.

Lectinas são proteínas/glicoproteínas que estão abundantemente distribuídas nas plantas; essas lectinas aglutinam eritrócitos, interagem com carboidratos e têm atraído grandes interesses principalmente como ferramentas de investigação na biotecnologia. O gênero *Bauhinia* pertencente à família das Leguminosae, e algumas espécies vem sendo amplamente utilizado pela população em forma de chás para o tratamento de diabetes como diurético e também para nutrição animal pelo seu alto conteúdo protéico. O pó da folha de *Bauhinia variegata* var. “candida” foi usada para extrair, isolar e caracterizar parcialmente as propriedades biológicas e físico-química. A lectina de *Bauhinia variegata* demonstrou especificidade por galactose.. A proteína em solução salina foi isolada de folhas da *Bauhinia variegata* var “candida” e purificada por cromatografia de afinidade em matriz de quitina (polímero natural de N-acetilglicosamina-GlcNAc). A homogeneidade da lectina foi demonstrada por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de sulfato sódico de dodecila, e por eletroforese em gel de poliacrilamida para proteínas nativas básicas, mostrando uma única banda protéica de massa molecular aparente de 14.4 kDa. A lectina de *B. variegata* mostra especificidade por galactose e reconhece também outros carboidratos, bem como glicoproteínas em soro fetal bovino, tiroglobulina e asialofetúina. A lectina aglutinou hemácias de coelho, galinha, rato e do sistema humano ABO; manteve uma estabilidade térmica de 75% da atividade hemaglutinante original após 60 min em temperatura de 90°C num pH ótimo de 7,0.

Palavras chaves: Lectina; *Bauhinia variegata* var. “candida”; Purificação

Abstract of Dissertation presented to the Pos-Graduation Program in Biological Science –CCB-UFPE as partial fulfillments of requirements to the degree of Master of Science (M.Sc.).

Extraction, isolation and partial characterization of *Bauhinia variegata* var. “candida” leaf lectin

Chemical Engineer Manuel Messias de Oliveira

July/2006

Advisor: Luana Cassandra Breitenbach.Barroso Coelho, Ph.D

Co-Advisor: Sandra Rodrigues de Souza, Dra.

Field: Biotechnology / LECTINS

Lectins constitute a class of ubiquitous proteins/glycoproteins abundantly found in legumes; they agglutinate erythrocytes, interact with carbohydrates, and have attracted interest mainly as invaluable tools in structural and functional biotechnology investigation. The *Bauhinia* genus belongs to leguminosae family and some species have been used in the medicine folk in the form of tea for treatment of diabetes, as a diuretic; plants, with high protein contents, have also been used for animal nutrition. Leaf powder of *Bauhinia variegata* var. “candida” was used to extract, isolate and partially characterize *Bauhinia variegata* leaf lectin, BvaLL, a galactose specific lectin. The protein in saline solution was isolated from leaf extract and purified by chitin affinity chromatography (natural N-acetylglycosamine-GlcNac polymer). The homogeneity of the lectin was demonstrated by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) in the presence and absence of sodium dodecyl sulphate; a unique native basic band was revealed with a polypeptide apparent molecular mass of 14.4 kDa. The lectin was inhibited by bovine fetal serum glycoproteins. BvaLL agglutinated rabbit erythrocytes and was relatively stable to heat treatment, retaining 75% of its original activity after 60 min at 90 °C at pH optimum 7.0.

Key words:Lectins; *Bauhinia variegata* var. “candida”; Purification;

SUMÁRIO

Apresentação	1
Julgamento	2
Dedicatória	3
Agradecimento	4
Epígrafe	5
Resumo	6
Abstract	7
Sumário	8
Lista de ilustrações	11
Lista de abreviaturas	12
Capítulo 1 – Introdução	14
1.0 Introdução	15
2.0 Bauhinia	19
2.1 Taxonomia	20
3.0 Lectinas	21
3.1 História	22
3.2 Fontes	23
3.3 Detecção e dosagem	24
3.4 Purificação	25
3.5 Especificidade a carboidrato	27
3.6 Estrutura molecular	27
3.7 Composição de aminoácidos e carboidratos	29
3.8 Sítios funcionais de ligação a carboidratos	30
3.9 Caracterização	31
3.10 Aplicação	32
6.0 Referências bibliográficas	33
Capítulo 2 Trabalho submetido ao “WORKSHOP da UNICAP”	40
Título: Extração, isolamento e caracterização parcial de lectina de folhas de <i>Bauhinia variegata</i> var. “candida”	41
Resumo	42
1.0 Introdução	43
	10

2.0 Materiais e métodos	43
2.1 Material	44
2.2 Preparação da amostra	44
2.3 Eritrócitos	44
2.4 Atividade Hemaglutinante	44
2.5 Estimativa do teor de proteínas	44
2.6 Especificidade para carboidrato e glicoproteína	44
2.7 Protocolo de purificação	44
2.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida	45
2.9 Estabilidade térmica	45
3.0 Resultados e discussão	45
4.0 Conclusão	49
5.0 Referências bibliográficas	49
Capítulo 3 Trabalho submetido ao periódico “BIOLOGICALS”	52
Title: Extraction, isolation and partial characterization of <i>Bauhinia variegata</i> var. ‘candida’ leaf lectin.	53
Abstract	54
1.0 Introduction	55
2.0 Material and is e methods	56
2.1 Plant material	56
2.2 Preparation of BvaLL from vegetative tissue	56
2.3 Erythrocytes	56
2.4 Reagents	56
2.5 Hemagglutinating activity	56
2.6 Protein Content Estimation	56
2.7 Sugar specificity	57
2.8 Glycoprotein recognition	57
2.9 Purification protocols for BvaLL	57
2.10 Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) of native and denatured protein	57
2.11 Heat stability	58
3.0 Results and discussion	58
4.0 Conclusion	63

5.0 Acknowledgments	67
6.0 References	67
Capítulo IV-Conclusão	70
1.0 Conclusões	71
Anexo	72
Anexo 1 –Biologicals –Guide for authors	73

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo I		Página
Figura 1	Aspecto do arbusto	21
Tabela 2	Eventos que marcaram e contribuíram para o desenvolvimento de lectinas	23
Tabela 3	Aplicações de lectinas	33
Capítulo II		Página
Figura 1	Purificação de BvaLL por cromatografia em quitina	48
Figura 2	Eletroforese em gel SDS-PAGE em condições não redutoras	49
Tabela 1	Atividade hemaglutinante (AH) da fração dialisada em diferentes eritrócitos	46
Tabela 2	Carboidratos: Inibição da atividade hemaglutinante de BvaLL (IHA)	46
Tabela 3	Glicoproteína: Inibição da atividade hemaglutinante de BvaLL	46
Tabela 4	Rendimento de BvaLL em vários estágios de fracionamento e purificação	48
Capítulo III		Página
Figure 1	Chitin affinity chromatogram purification.	60
Figure 2	PAGE showing basic BvaLL native protein (2) and cytochrome C (1).	62
Figure 3	SDS-PAGE of purified BvaLL under denaturing conditions	63
Table 1	Hemagglutination activity of dialyzed fraction (0-60%) with different erythrocytes	59
Table 2	Recovery of protein and HA from <i>B. variegata</i> leaves at various stages of purification.	61
Table 3	Carbohydrate inhibition of BvaLL hemagglutinating activity.	61
Table 4	Glycoprotein inhibition of BvaLL hemagglutinating activity	62

LISTA DE ABREVIATURAS

AH	Atividade hemaglutinante
AHE	Atividade Hemaglutinante Específica
B	Bauhinia
BSA	Albumina sérica bovina
BvaL	<i>Bauhinia variegata</i> var. <i>candida</i> leaf lectin
Con A	<i>Canavalina ensiformis</i>
CRD	Domínio de reconhecimento de carboidrato
F	Fração
FS	Fração Sobrenadante
HCl	ácido clorídrico
kDa	KiloDalton
L	Litro
M	Concentração de solução expressa em Molaridade (molar)
mA	Mile-Ampères
min	Minuto
ml	Mililitro
mM	Concentração da solução expressa em milemolar
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
nm	Nanômetro
°C	Grau centígrado
p/v	Relação peso por volume
rpm	Rotação por minuto
SDS	Sulfato sódico de dodecila
UH	Unidade de hemaglutinação
Uv	Ultravioleta
V/v	Relação volume por volume
Vis	Visível
µl	Microlitro

CAPITULO I – INTRODUÇÃO

1.0 INTRODUÇÃO

A Ciência da Saúde tem se preocupado muito com a utilização das plantas como fonte de medicamentos que popularmente cognominamos de plantas medicinais. O alto custo dos medicamentos, associado à impossibilidade de consulta médica adequada, tem feito com que a exploração comercial prevalecesse no lançamento de produtos ditos “naturais” com etiologia desconhecida ou duvidosa. A população de um modo geral vem utilizando manipulações caseiras de diferentes tipos de plantas, na tentativa de que sejam resolvidos problemas tais como diabetes, enxaquecas, infecções e outros.

O gênero *Bauhinia* foi selecionado por ter sido estudado por vários autores como possuidor de atividade coadjuvante terapêutica do diabetes (Cruz, 1985; Caribé & Campos, 1991) e também pelo fato de grande parte da população recorrer às suas folhas, caules e raízes como sendo uma das preparações mais eficazes no combate a diabetes (Cruz, 1985). Segundo alguns autores este gênero de plantas apresenta ainda propriedade como diurético e depurativo (Caribé & Campos, 1991).

O estudo de lectinas data do final do século XIX com o trabalho de Stillmark que descobriu que extratos do feijão castor aglutinavam eritrócitos. O termo lectina foi generalizado para todas as proteínas que possuíam capacidade de aglutinar células ou precipitar polissacarídeo e glicoproteínas, pelo fato de se ligarem específica e reversivelmente a determinados carboidratos, sejam eles açúcares simples ou complexos. As lectinas não possuem origem imune e podem ser encontradas em animais, plantas e microorganismos (Sharon & Lis, 1993).

As lectinas de plantas são importantes ferramentas em Glicobiologia e Glicobioquímica devido à multiplicidade de eventos que se pode conhecer em função da habilidade de ligarem a carboidratos. Esta habilidade só foi devidamente explorada segundo sua importância quando a comunidade científica percebeu que os oligossacarídeos compreendem um extraordinário sistema de armazenagem de informação de alta densidade, constituindo o chamado código do açúcar (Rüdiger *et al.*, 2000; Gabius *et al.*, 2002). A partir de então, as lectinas têm sido largamente utilizadas na investigação estrutural e funcional de carboidratos complexos, glicoproteínas e para examinar mudanças decorrentes de processos fisiológicos e patológicos na superfície

celular. Portanto o desenvolvimento da glicociência sempre esteve atrelado às pesquisas com lectinas.

Para que uma lectina seja assim classificada, a (glico) proteína precisa satisfazer as características abaixo referidas (Rüdiger & Gabius 2001).

- Uma lectina é uma (glico)proteína que se liga carboidrato: por esse critério, taninos, alguns lipídios, substâncias catiônicas e carboidratos cognatos que também aglutinam ou precipitam células estão excluídos.
- Lectinas não se enquadram na categoria de imunoglobulinas: no primeiro momento as lectinas foram consideradas substâncias do tipo anticorpo por causa de sua aparente especificidade de ligação, mas o termo lectina foi adotado para diferenciá-las de imunoglobinas, pois estas precisam de um estímulo antigênico para ser sintetizadas.
- Lectinas não modificam bioquimicamente os carboidratos os quais se ligam: segundo este requisito, glicotransferases, glicosidades e enzimas que introduzem substituintes em carboidratos como grupos sulfatos, estão excluídos. Este item se faz necessário porque há relatos de que: (1) a aglutinação de células em baixa temperatura promovida por algumas glicosidases precede a hidrólise das ligações glicosídicas; (2) porque é indispensável demonstrar se a atividade enzimática da proteína sob investigação é independente do centro de reconhecimento do carboidrato.

As lectinas de plantas são consideradas um grupo heterogêneo por serem diferentes entre si, no que diz respeito às propriedades bioquímicas e físico-químicas, relação evolucionária, estrutura molecular, especificidade, atividades biológicas, o que torna laboriosa a tarefa de classificá-las considerando todos os aspectos que as descrevem simultaneamente.

As lectinas de plantas produzidas em órgãos de estocagem (sementes na maioria, mas também tubérculos, bulbos, raízes dependendo da planta) dominam o cenário por serem encontradas em quantidades maiores. Entretanto, as lectinas estão distribuídas por todos os órgãos da planta como casca, folhas e flores, mas, em quantidades menores. As lectinas mais estudadas pertencem à família das Leguminosae, mas, muitas lectinas de outras famílias têm sido freqüentemente isoladas e caracterizadas, por exemplo, as lectinas de *Solanaceae*, *Gramineae*, *Alliacaceae*,

Amaryllidaceae, Aracaceae, Caprifoliaceae, Cucurbitaceae, Euphorbiaceae, Liliaceae, Moraceae, Orchidaceae, Urticaceae, Viscaceae, Papaveraceae, Phytolaccaceae e Convolvulaceae (Rüdiger 1998; Van Damme *et al.*, 1998). É importante que a classificação taxonômica da espécie a ser investigada seja considerada, pois ela pode ser decisiva na busca por lectinas inéditas ou homólogas.

As lectinas podem assumir diferentes papéis biológicos, todavia, não existe uma função biológica universal para todas elas. De maneira abrangente, as lectinas podem ser organizadas em dois grupos segundo o seu ligante: podem assumir papéis exógenos se associadas a ligantes externos, por exemplo, atividade antifúngica contra fitopatógenos, ou podem assumir papéis endógenos se interagirem com ligantes do próprio organismo, por exemplo, auxiliar a deposição de proteínas de reserva nos corpos protéicos. Felizmente as questões concernentes às funções biológicas que as lectinas desempenham nos organismos em que são produzidas têm ganhado atenção crescente diminuindo o contraste de interesse entre função e aplicação que predominavam no passado.

O papel biológico extrínseco das lectinas de plantas vem sendo investigado e revisado, refletindo a potencialidade e diversidade de atividades destas proteínas frente aos predadores e fitopatógenos, em defesa destas. Dentre elas, atividade antifúngica, inseticida, antinutricional e tóxica vêm sendo objeto de intensa pesquisa. Investigações concernentes aos mecanismos de ação, diversidade e organismos em que elas atuam em diversas concentrações têm mostrado o foco de intenso interesse em diversos campos de aplicação nos ramos agrícola (cultivo de plantas transgênicas resistentes a pragas), farmacêuticos (como agentes terapêuticos contra fungos e bactérias causadores de patologias em humanos e como agentes hipoglicemiantes no combate de doenças) e nos estudos de reações tóxicas em animais (Seletrennikoff, 2001; Carlini & Grossi de Sá; 2002; Ng, 2004; Vasconcelos & Oliveira 2004).

O estudo de propriedades físico-químicas e características de substâncias naturais, como as lectinas extraídas de folhas de *B. variegata* poderão ser responsáveis pelo reconhecimento celular induzindo propriedades biológicas do tipo ação hipoglicemiante, de reconhecimento de células tumorais e outras.

2.0 Bauhinia

O gênero *Bauhinia* foi criado em 1753 por Carolus Linnaeus, em homenagem ao botânico suíço Gaspar Bauhin e compreende cerca de 300 espécies (Lewis, 1987), sendo que 64 destas podem ser encontrada no Brasil.

B. variegata é uma planta nativa da Índia, mas se adaptou a áreas tropicais e subtropicais do planeta. No Brasil é conhecida como unha de vaca, casco de vaca ou pata de vaca devido às folhas bifoliadas e em forma de uma pata de vaca. São plantas muito ornamentais devido às suas flores vistosas e por isso são utilizadas no paisagismo e na arborização urbana.

As propriedades medicinais do gênero *Bauhinia* estão sendo amplamente estudadas fitoquímica e farmalogicamente; muitos compostos já foram isolados e identificados (Silva & Cechinel, 2002).

Dentre as substâncias mais estudadas das espécies podemos relacionar: dois flavonóides da casca de *B. manca*, (2S)-7,4'-di-hidroxiflavan e (2S)-3', 4'-di-hidroxi-7-metoxiflavan, que demonstraram atividades antifungo em *Coprinus cinereus* e *Saprolegnia asterophora* (Achenbach *et al.*, 1988). O extrato metanólico de gemas de *B. racemosa* (2 g/kg) reduziu significativamente a produção de ácido e pepsina em ratos com úlceras induzidas por aspirina (Aktar & Ahmad, 1995). Extratos de ramos de *B. cumanensis* ou de *B. excisa* são utilizados para tratar mordidas de cobra nos caçadores indígenas e nos seus cães em Trinidad, (Lans *et al.*, 2001). Extrato de casca de *B. guianensis* (50 mg/kg) demonstrou atividade anti-malária *in vivo* em ratos com *Plasmodium vincket*, mas *in vitro* foi inativo contra *P. falciparu* (Muñoz *et al.*, 2000). Extrato de casca de *B. purpurea* estimulou a função tiroidal em ratos aumentando os níveis de T3 e T4 livres de soro (Panda & Kar, 1999). Extrato metanólico de raiz de *B. vahlii* (25 mg/ ml) demonstrou uma atividade antiviral total *in vitro* contra *Sindbis irus* (SINV), mas não teve atividade contra *Pólio vírus 1* e *herpes simplex vírus 1* (Taylor *et al.*, 1996). Atividade hipoglicemiante foi demonstrada em folhas de *B. divaricata* (Roman – Ramos *et al.*, 1992), em *B. candicans* (Lemus *et al.*, 1999) e mais recentemente em *B. forficata* (Pepato *et al.*, 2002). Os flavonóides existentes no extrato hidroalcoólico (1000 mg/kg) das sementes de *B. variegata* mostraram efeito hipoglicemiante em ratos, nos quais diabetes foram induzidas pela streptozotocina (55mg/kg, Silva & Cechinel, 2002).

2.2 Taxonomia, segundo De Souza, 1969.

- Reino: Plantae
- Divisão: Magnoliophyta
- Classe: Magnoliopsida
- Ordem: Fabales
- Família: *Fabaceae*
- Subfamília: *Caesalpinioideae*
- Gênero: *Bauhinia*
- Espécie: *variegata*
- Domínio da espécie: *var*
- Subespécie: *candida*
- Nome Vulgar: Unha de vaca branca



Figura 1 Aspecto do arbusto.

Fonte: <http://www.TopTropicals.com>, acessado em 25/02/2006

3.0 LECTINAS

Lectinas (originado do latim *lectus* que significa escolhido ou selecionado) refere-se a proteínas ou glicoproteínas de origem não imune que aglutinam células ou precipitam glycoconjugados, ligando-se de forma não covalente e com considerável especificidade a carboidratos (Singh *et al.*, 1999); existem em vírus e na maioria dos organismos vivos, bactérias, plantas e animais (Ambrosi, *et al.*, 2005).

Comentários*:

A molécula da lectina contém pelo menos dois sítios ativos; proteína que se liga com um único sítio não aglutinará ou precipitará estruturas que contêm resíduos de carboidrato, e não são classificadas como lectinas.

A especificidade de uma lectina é usualmente definida pelo monossacarídeo ou oligossacarídeo que são melhores para inibir a aglutinação ou precipitação de lectinas.

Lectinas ocorrem em muitos tipos de organismos: elas podem ser solúveis ou ligadas a membranas; elas podem ser glicoproteínas.

As enzimas, as proteínas de transporte e as toxinas podem se qualificar como lectinas se tiverem sítios de ligação a carboidrato.

3.1 História

A história das lectinas é caracterizada pela existência de fatos marcantes que servem de degraus, dando sempre novo impulso às investigações. Estas investigações começaram no século XIX, mesmo antes da descoberta de que certos extratos vegetais eram capazes de aglutinarem glóbulos vermelhos, motivados pelo fato de que havia especulação sobre a natureza das substâncias tóxicas presentes em determinadas sementes.

Nas décadas seguintes aos trabalhos de pesquisas de Stillmark o estudo das lectinas não se desenvolveu rapidamente devido ao limitado conhecimento que se tinha sobre proteínas e a química de carboidratos. Segundo Rüdiger *et al.* (2000) este panorama começou a mudar com o trabalho de Watkins e Morgan de 1952 que confirmou de maneira indubitável que as lectinas se ligavam a carboidratos. A tabela 1 cita os eventos que contribuíram sobremaneira para o avanço dos estudos envolvendo lectinas.

*Nota: IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN) and Nomenclature Commission of IUB (NC-IUB). Newsletter, 1981; Archives of Biochemistry and Biophysics, 1981, v.206, p. 458-462; European Journal of Biochemistry, 1981, v.114, p.1-4; Journal of Biochemistry. 1981, v. 256, p. 12-14.

Tabela 1: Eventos que marcaram e contribuíram para o desenvolvimento de lectinas.

ANO	PESQUISADOR	EVENTO	REFERÊNCIAS
1860	S. W.Mitchell	Descrição da coagulação do sangue como indicação da atividade lectínica em veneno de cobra.	[1]
1888	H. Stillmark	Atividade hemaglutinante em sementes de <i>Ricinus communis</i> .	[2]
1902	R. Kraus	Detecção de aglutininas bacterial	[2]
1907	K. Landsteiner; H Raubitscheck	Atividade hemaglutinante em plantas não tóxicas (<i>Phaseolus</i> , <i>Pisum</i> e <i>Lens</i>)	[1]
1919	J.B. Sumner	Isolamento e cristalização da Con A.	[2]
1936	J. B.Sumner; S.F. Howell	Especificidade da Concanavalina por açúcar	[3]
1952	W.M Watkins, W.T.J. Morgan	Natureza sacarídica dos determinantes do grupo sangüíneo por aglutinação mediada ppor lectinas	[4]
1954	W.C. Boyd; E. Shapleigh	Introdução do termo lectina.	[5]
1960	P.C. Nowell	Aglutinação de células malignas por lectinas.	[2]
1965	I. J. Goldstein; B.B.L.Agrawall	Cromatografia de afinidade para purificação de lectinas.	[6]
1966	W.C.Boyd; L. R. Almodóvar; L.G. Boyd	Lectinas em algas.	[7]
1974	G. Ashewell	Isolamento de uma lectina de mamífero em fígado.	[1]
1978	-----	<i>First International Lectin Meeting</i>	[8]
1979	H. Rüdiger	Detecção de ligantes endógenos para lectinas de plantas.	[2]
1984	H.J. Gabius; R. Lotan; A Raz	Isolamento de lectinas em tumores	[2].
1987	H.J. Gabius <i>et al.</i>	Introdução de neoglicoconjugados para diagnóstico de tumores.	[1]
1989	W. J.Peumans	Detecção da afinidade fungicida de uma lectina de planta.	[2]
1995	J. Jiménez-Barbero, <i>et al.</i>	Análise estrutural do complexo lectina-ligante em solução por espectroscopia de NMR.	[2].
2003	M. Hayashida, <i>et al.</i>	Similaridades entre as interações proteína e proteína-carboidrato para estudos de minestismo funcional	[9]
2004	E.J.M.Van Damme <i>et al.</i>	Análise de lectinas citoplasmáticas e nucleares; papel endógeno na planta e relação evolucionária com lectinas.	[10]
2005	A Castillo-Villanueva and F Abdullaev	Mecanismo de ação de lectinas de plantas na atividade anti-câncer.	[11]
2006	EC Lavelle	Lectinas e micro particulas em vacinas.	[12]

- 1-Gabius, H-J; Eukaryotic Glycosylation and lectins: Hardware of the sugar Code (Glicocode) in Biological Information Transfer.Journal. Theoretical. Biology.; 1965, v. 10, p. 89-113.
- 2- Rüdger, H.; Siebert, H. C.; Solis, D.; Jimenez-Barbero, J.; Romero, A.; Von Der Lieth, C.; Diaz-Mauriño, T.; Gabius, H. J.; Medical chemistry base on the sugar code: fundamentals of lectinology and experimental strategies with lectin as target; Current Medical Chemistry, 2000, v. 7, p. 389-416.
- 3- Summer, J.B.; Howell, S.F. The identification of the hemagglutinin of the jack bean with Concanavalin A. Journal of Bacteriology, 1936, v.32, p. 227 237.
- 4- Watkins, W.M.; Morgan, W.T.J. Neutralization of anti-H agglutinin in cell serum by simple sugar, Nature, 1952, v. 169, p. 825-826.
- 5- W.C. Boyd; W.C.; Shapleigh, E.; Separation of Individuals of Any Blood Group into Secretors and Non-Secretors by Use of a Plant Agglutinin (Lectin). Blood, 1954, v. 9, no. 12, p. 1195-1198.
- 6-Agrawal, B.B.;Goldstein, I.J.; Specific binding of Concanavalin A to cross-linked dextran gels.The Biochemical Journal, v. 96, n.23-26.
- 7- Boyd W.C.; Almodovar;L.R.; Boyd, L.G; Agglutinin in marine algae for human erythrocytes. Transfusion,1966,, p.82-83.
- 8-T.C. Borg-Hansen Copenhagen, 1978.
- 9-Hayashida, M; Fujii T ; Hamasu, M ; Ishiguro, M ; Hata Y.; Similarity between protein-protein and protein-carbohydrate interactions, revealed by two crystal structures of lectins from the roots of pokeweed. Journal of Molecular Biology. 2003; 334(3):551-65.
- 10-Van Damme, E.J.M.; Barre, A; Rouge,P.;Peumans,W.J.; Citoplasmic/nuclear plant lectin: a new story;Trends Plant science. 2004, v. 10, p. 484-489.
- 11-A Castillo-Villanueva, A and Abdullaev, F.; Plant lectins and their effects on cancer; La Revista Investigacion Clinica, 2005, v. 57, n.1, p. 55-64.
- 12-Lavelle, E.C.; Lectins and microparticles for enhanced oral vaccination.Methods, 2006, v. 38, n.2, p. 84-89.

3.2 Fontes

As lectinas estão amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em vírus, bactérias, protozoários, fungos, vegetais (inferiores ou superiores) e animais (invertebrados ou vertebrados), Sharon & Lis (1989a), apesar de que ao longo de sua história muitas hipóteses têm sido formuladas, mas, até o presente momento o

verdadeiro papel fisiológico não foi muito bem entendido. Entretanto, nos dias de hoje podemos fazer a seguinte abordagem quanto às suas funções fisiológicas:

As lectinas estão amplamente distribuídas no reino vegetal, e sua presença já foi detectada em mais 1000 espécies de plantas (Sharon & Lis, 1989a).

No entanto, as lectinas podem ser encontradas em tecidos vegetativos como sementes, cascas, bulbo, vagem, raiz, folha, fruto e flor (Ratanapo *et al.*, 2001).

A família das leguminosas se destaca em relação às demais, pois a maioria das lectinas já estudadas foi isolada de plantas de diferentes tribos desta família (Sharon & Lis, 1990).

Em muitas plantas, as sementes maduras representam a maior fonte de lectinas (Hitler, 1986). Nas sementes das leguminosas as lectinas constituem 10% do total de proteínas solúveis, com únicas ou múltiplas formas moleculares (Sharon & Lis, 1990; Paiva & Coelho, 1992; Konozy *et al.*, 2003).

Lilley *et al.*, (1999) sugeriram o papel das lectinas de plantas como “vacinas comestíveis” desenvolvidas em plantas transgênicas: à medida que os animais se alimentassem dessas plantas estariam se imunizando contra seus parasitos. Para que isso seja possível, muitos estudos ainda são necessários para analisar as propriedades das lectinas de plantas e seus possíveis efeitos em animais.

3.3 Detecção e dosagem

A presença de uma lectina em uma dada preparação pode ser detectada testando se a mesma aglutina eritrócitos ou precipita polissacarídeos e glicoproteínas, demonstrando serem estes efeitos inibidos por carboidrato simples ou complexos.

A atividade hemaglutinante é usualmente determinada pelo método de diluição seriada e o ponto final determinado quer por olho nu ou pelo uso de lupa. A especificidade, por sua vez, pode ser determinada com ajuda de um painel de eritrócitos de diferentes grupos sanguíneos humanos ou de outros animais, ou mesmo pelo eritrócito de único animal. Para intensificar a resposta podem ser usados eritrócitos modificados por tratamento com enzimas proteolíticas ou com neuraminidase (Banerjee

et al., 2004), que deixam as células mais sensíveis à aglutinação. Com a finalidade de estabilizar as hemácias, obtendo assim uma preparação padrão, as células podem ser tratadas quimicamente (Coelho & Silva, 2000; Gaidamasvili *et al.*, 2002) com formaldeído ou glutaraldeído aumentando a sensibilidade das células à lectina.

Somente a aglutinação de eritrócitos não é o suficiente para comprovar a presença de lectina, pois alguns agentes, como taninos, certos lipídios ou cátions divalentes em altas concentrações podem aglutinar eritrócitos (Rüdger & Gabius, 2001). Faz-se necessário realizar ensaios de inibição da atividade hemaglutinante (AH) com carboidratos para comprovar a presença de lectina (Correia & Coelho, 1995; Sharon & Lis, 2001).

É da maior importância estabelecer a especificidade de uma lectina por carboidratos de modo a poder usá-la como ferramenta em estudos bioquímicos e imunoquímicos. A especificidade por carboidrato é normalmente determinada pela técnica de inibição de haptenos, comparando com açúcares com base na concentração mínima necessária para inibir a reação de hemaglutinação ou de precipitação de macromoléculas reativas.

3.4 Purificação

O isolamento de uma lectina segue os métodos de separação das proteínas, baseado na carga elétrica, tamanho e arquitetura molecular, solubilidade e propriedades exibidas pelas mesmas, as quais variam de uma proteína para outra.

O processo é iniciado com a preparação do extrato, onde as células precisam ser rompidas e as proteínas liberadas em meio salino ou em solução tampão (Kawasgiski *et al.*, 2001, Mladenov *et al.*, 2002). Em seguida o fracionamento é feito a partir da adição de um sal em virtude das proteínas possuírem água na sua superfície e muitos grupos carregados, entretanto a solubilidade depende da concentração de sais dissolvidos, aumentando à proporção que os sais são adicionados (“salting in”) e voltando a diminuir à medida que os sais são adicionados (“salting out”) levando à precipitação da proteína. O sal mais utilizado é o sulfato de amônio devido a sua alta solubilidade permitir a precipitação protéica em soluções com elevada força iônica (Heu *et al.*, 1995).

O método de separação dos componentes de uma mistura comumente utiliza processos cromatográficos realizados através da distribuição destes entre duas fases, que estão em contato íntimo, sendo uma fase estacionária e outra móvel. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos entre as duas fases, de tal forma que cada um dos componentes é seletivamente retido de alguma forma pela fase estacionária.

A técnica de cromatografia de afinidade é a mais usada. Esta tem como princípio de separação a capacidade de proteínas se ligarem especificamente a outras moléculas, como as lectinas, que se ligam especificamente a carboidratos, através de ligações não covalentes desde que as lectinas têm a propriedade de se ligar a carboidratos em colunas comerciais contendo suportes polissacarídeos tais como: Sephadex (polímero de glicose), Sepharose (polímero de galactose) e quitina (polímero de N-acetilglicosamina), estas têm sido as mais usadas (Cavada *et al.*, 1998; Jimbo *et al.*, 2000; Freire *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003), bem como Sepharose conjugada com glicoproteína (Gerlach *et al.*, 2002).

A técnica de cromatografia de troca iônica tem por base a ligação da proteína com grupos de cargas de sinais contrários imobilizados na matriz. A coluna é lavada com solução tampão e as proteínas com nenhuma ou pouca interação com o trocador de íons são eluídas. As proteínas adsorvidas na matriz podem ser eluídas pelo aumento da força iônica ou alteração do valor do pH do meio (Datta *et al.*, 2001). São alguns exemplos de trocadores aniônicos: Carboximetil (CM) celulose, CM-Sephadex (Hedge *et al.*, 1989), e catiônicos: Dietilaminoetil (DEAE) celulose, DEAE Sepharose (Kolberg & Sletten, 1982).

A técnica de cromatografia de filtração em gel tem por base a separação de biomoléculas de acordo com o seu tamanho. A mistura protéica passa através de uma coluna contendo esferas de gel cujos poros possuem diâmetros de dimensões relativamente estreitas. As moléculas maiores que não passam pelos poros do gel são eluídas primeiro, enquanto que as moléculas de tamanhos menores capazes de penetrar no gel vão passar lentamente, de modo que a separação é de ordem decrescente de massa molar (Heu *et al.*, 1995). Este tipo de cromatografia foi usado para obter preparações protéicas homogêneas (Bezerra *et al.*, 2001), como para definir a massa molar da proteína nativa (Kawagishi *et al.*, 2001). Estas cromatografias podem ser

usadas em técnicas de alta resolução para purificação de lectinas em sistemas como cromatografia líquida de rápida resolução (FPLC, do inglês, *Fast Protein Liquid Chromatography*) utilizando cromatografia de troca iônica sobre coluna Mono Q ou Mono S (Mo *et al.*, 1993; Chung *et al.*, 2001), bem como, exclusão molecular (Jimbo *et al.*, 2000); ainda podemos destacar a cromatografia líquida de alta pressão (HPLC, do inglês, *High Pressure Liquid Chromatography*), utilizada para estimar massas moleculares de lectinas purificadas (Feton-Navarro *et al.*, 2003; Tasumi *et al.*, 2004).

3.5 Especificidade a carboidrato

A especificidade a carboidratos de uma lectina é comumente realizada através de um ensaio por haptenos comparando açúcares com base na concentração mínima necessária para inibir a reação de hemaglutinação ou de precipitação de macromoléculas. Com base no conhecimento de sítios de ligação da lectina generalizações puderam ser feitas.

Estudos de complexo lectinas e oligossacarídeos são especialmente de interesse, porque provém de bases de entendimento das proteínas com ligantes naturais, mostrando uma extraordinária especificidade por di, tri e tetrassacarídeos, onde as constantes de associação são maiores do que em monossacarídeos (Ambrosi *et al.*, 2005). A constante de associação entre a lectina e monossacarídeos variam entre 10^2 a $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ (Sharon & Lis, 1990), enquanto que a constante de associação entre lectinas e oligossacarídeos está na faixa de 10^4 a 10^7 M^{-1} (Sharon & Lis, 1989a).

Os sítios de ligação a carboidrato são freqüentemente depressões na superfície da proteína, sendo que em todos os casos o sítio aparece bem definido (Weis & Drickamer, 1996) havendo mudança na conformação para que haja a ligação. Em todas as leguminosas, independente de suas especificidades, quatro resíduos constantes de aminoácidos estão sempre participando na ponte de ligação: ácido aspártico, uma asparagina, uma glicina (conservado e em todas as lectinas da família da Con A) e um aminoácido aromático (Sharon, 1993) ou leucina (Imberty *et al.*, 1994): Asp83, Gly104, Asn127 e Try 125 para PNA (Banerjee *et al.*, 1996).

Lectinas se ligam a carboidratos através de redes de ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas (Ambrosi *et al.*, 2005). Forças de Van der Waals

embora sejam fracas (usualmente uma fração de 4,2 kJ/mol por cada par de átomos), freqüentemente são numerosas, contribuindo significativamente para ligação global (Lis & Sharon, 1998). A disposição estérica do grupo hidroxila nos carboidratos criam caminhos hidrofóbicos (Davis, 1999) na superfície do açúcar que pode interagir com as regiões hidrofóbicas da proteína (Rini, 1999).

Contatos entre o ligante e a proteína são freqüentemente mediados por moléculas de água. A água age como uma molécula redutora de impacto, sua pequena dimensão e sua habilidade fazem com que ela se comporte como um doador de hidrogênio e receptor fazendo uma aproximação para esta função. A ligação firme da molécula de água considerada estrutural, por exemplo, como se fosse uma extensão da superfície da proteína e desta forma desempenha um papel significativo no reconhecimento de carboidrato concedendo em alguns casos extraordinária especificidade (Ambrosi *et al.* 2005).

A reação entre lectinas e carboidratos é essencialmente exergônica foi determinado um valor de aproximadamente 6,18Kcal/mol para a variação de energia livre padrão de associação entre Con A e 4-metilumbeliferil alfa-D-manopiranosídeo (Poola & Kella, 1986).

Uma vez que as lectinas de leguminosas demonstram similaridades estruturais e de seqüência, suas especificidades de ligação a carboidratos são muito diferentes. Através da especificidade, as lectinas são classificadas em cinco grupos, tendo por base o monossacarídeo que demonstra a maior afinidade, apesar de que estas ligações sejam mais fracas, as estruturas completas de carboidratos são reconhecidas por lectinas. Os grupos são: grupo I, glicose e manose (Glc/Man); grupo II, galactose (Gal) e galactose e N-acetilgalactosamina (GalNac); grupo III, N-acetilglicosamina (GlcNAc complexo em vez de um monossacarídeo) grupo IV, L-fucose (Fuc) e grupo V, ácido siálico. O membro de cada grupo pode diferir em sua afinidade para monossacarídeos análogos ou derivados; muitos sítios de lectinas não reconhecem uma alteração na posição C2 e C3 do carboidrato ligante, contudo a posição C4 parece crítica para a configuração do grupo 4-OH (Sharon & Lis, 1990).

Vale ressaltar o grau de importância da localização do carbono na configuração, como por exemplo: no caso do carbono 2 as lectinas específicas para

manose usualmente também reagem com a glicose, em menor intensidade, com a N-acetil-glicosamina (Goldestein & Poretz, 1986; Sharon & Lis, 1989a; Sharon & Lis, 1990); variações no carbono 3 são também toleradas, entretanto é crucial a variação no carbono 4, desde que lectinas específicas para glicose/manose não reagem com galactose e vice-versa (Sharon & Lis, 1990).

Muitas lectinas possuem uma maior afinidade por oligossacarídeos, reagindo freqüentemente com o monossacarídeo da extremidade não redutora, apesar de algumas lectinas também reconhecerem monossacarídeo que ocupam posições internas (Sharon & Lis, 1989 a).

A observação de que os carboidratos podem gerar uma enormidade de isômeros devido à disponibilidade de vários grupos hidroxilas para a formação de ligações glicosídicas levou os pesquisadores a compreender que os carboidratos complexos, por sua microheterogeneidade, consistiam de moléculas que podem estar envolvidas em processos de sinalização e transferência de informação entre células. Assim, a abordagem do sistema de codificação biológica sem a inclusão dos carboidratos seria incompleta (Rudiger *et al.*, 2000; Gabius *et al.*, 2002).

3.6 Estrutura molecular

As lectinas representam uma classe de proteínas com grande heterogeneidade de estruturas, não havendo propriedades estruturais comuns a todas elas, exceto o fato de serem proteínas e se constituírem de subunidades ou protômeros (Sharon & Lis, 1989 a).

A capacidade das lectinas de se ligar a carboidratos é modulada por uma série de domínios adicional presentes na molécula, o que determinam muitas das suas funções. Esses domínios podem apresentar habilidade de ligar-se a estruturas de carboidratos via proteína-proteína, proteína-lipídio ou proteína-ácido nucléica. Tais características classificam as lectinas com moléculas bifuncionais (Barondes, 1998).

A formação do complexo carboidrato-proteína envolve o deslocamento de uma molécula de água associada ao grupo polar da proteína e a formação de novas pontes de hidrogênio com os carboidratos altamente polares. Essas últimas ligações e as

forças de Van der Waals são dominantes na estabilização do complexo carboidrato-proteína (Weis & Drickaner, 1996).

Com base na estrutura quaternária das proteínas as lectinas de plantas têm sido agrupadas por Peumans & Van Damne (1998) em quatro itens: Merolectinas, aquelas que possuem um domínio ligante a carboidrato, podem se ligar a células produzindo modificações fisiológicas nas mesmas, sem, no entanto, serem capazes de aglutiná-las ou precipitar glicoconjugados. Hololectinas, aquelas que possuem mais de um domínio ligante, se destacam pela sua característica mais marcante, a de aglutinar células e glicoconjugados. Quimerolectinas, aquelas que possuem pelo menos dois domínios com atividade distinta: um capaz de se ligar a carboidrato e glicoconjugados (domínio B, ligante), outro capaz de exercer uma atividade enzimática. Superlectinas, aquelas que correspondem a um tipo especial de quimerolectinas, onde os dois domínios são ligantes, no entanto, apresentam especificidades distintas.

Tipicamente, lectinas de leguminosas consistem de duas a quatro subunidades com massa moleculares 25 - 30 kDa cada, que são comumente formadas de peptídeo ligado a oligossacarídeo. Normalmente cada protômero contém um sítio ligado a carboidrato que por sua vez liga-se a um íon de cálcio e a um íon metálico, usualmente manganês (Ambrosi, *et al.*, 2005).

A região molecular de ligação ao carboidrato é denominada de domínio de reconhecimento de carboidrato (CRD), sendo que cada subunidade da lectina possui pelo menos um domínio. A “divalência” ou “polivalência” permite a interação com açúcares localizados na superfície de células adjacentes, resultando em aglutinação destas células (Lis & Sharon, 1986). Os sítios para ligação de carboidratos reconhecem e ajustam-se de acordo com o modelo chave e fechadura, através de um complexo sistema de ligações de hidrogênio. A formação do complexo carboidrato-proteína envolve o deslocamento da molécula de água associada com o grupo polar da proteína e em torno do carboidrato altamente polar, com o estabelecimento de novas pontes de hidrogênio. Essas últimas ligações bem como forças de Van der Waals são dominantes na estabilização da ligação (Quioco, 1986). Este domínio ligante de carboidrato pode estar presente em várias proteínas desempenhando papel de reconhecimento de substrato ou de direcionador a um sítio específico (Gabijs, 1994).

A capacidade da lectina de se ligar a carboidrato é modulada também por vários outros domínios presentes na molécula (Gabijs, 1994). A interação do CRD com outros domínios adicionais determina muita das funções das lectinas (Drickamer & Taylor, 1993).

3.7 Composição de aminoácidos e carboidratos

As lectinas de vegetais superiores são caracteristicamente ricas em aminoácidos ácidos e hidroxilados, os quais podem até perfazer mais de 30% do conteúdo de aminoácidos e são pobres ou destituídos de aminoácidos sulfurados (Lis & Sharon, 1981a). Algumas famílias de lectinas possuem uma composição de aminoácidos singular, bastante diferente das demais. As lectinas de Gramíneas possuem alto teor de glicina (23%) e cisteína (21%), sendo que todos os resíduos de cisteína estão envolvidos em pontes dissulfeto (Stinissen & Peumans, 1985).

A maioria das lectinas é glicoproteína cujo conteúdo de carboidrato pode chegar até mais de 50% da massa molecular, como é caso da lectina encontrada na batata, *Solanum tuberosum* (Lis & Sharon, 1981). Os principais carboidratos encontrados nas lectinas são N-acetil-glicosamina, L-fucose e xilose. Estes carboidratos são característicos das leguminosas (Sharon & Lis, 1989 a).

3.8 Sítios funcionais de ligação a carboidratos

Cada lectina se liga a um carboidrato específico ou grupos de carboidratos em oligossacarídeos ou glicoproteínas, através de seus sítios de ligação, que tendem a se localizar na superfície da molécula protéica e a seletividade da ligação é obtida através de pontes de hidrogênio, interação de van der Waals, interações hidrofóbicas e coordenação metálica, entre o carboidrato e a proteína (Sharon & Lis, 2002). Pequenas alterações na estrutura da molécula protéica podem levar a modificações na orientação do carboidrato ligado a ela, e, portanto altera a especificidade da lectina (Ng *et al.*, 1996).

Algumas vezes as interações com carboidratos requerem íons metálicos como cálcio, manganês e magnésio e outros que estão presentes no sítio de ligação e/ou adjacentes a eles. Os aminoácidos que coordenam o íon metálico incluem asparagina e ácido aspártico. A presença destes íons é considerada como um coadjuvante auxiliar na manutenção da estrutura terciária da lectina em uma conformação favorável

para a ligação do carboidrato, mas não interage diretamente (Audette *et al* 2000; Sharon & Lis, 2001).

Hidrofobicidade é a força principal de interação entre lectinas e carboidratos através de sítios de ligação (Quiócho, 1986), e com proteínas ou outras substâncias através de sítios hidrofóbicos (Barondes, 1988). Quando há a presença de pelo menos um domínio de ligação não catalítico, que liga reversível, mas especificamente um mono ou oligossacarídeo, já é o suficiente para obter o nome lectina (Peumans & Van Damme, 1995). Por exemplo, as proteínas de orquídea que ligam manose são parecidas com as lectinas de orquídea específicas para manose, exceto que elas são monômeros (Van Damme *et al.*, 1994).

3.9 Caracterização

A eletroforese em gel de poliacrilamida se baseia na separação de proteína que ocorre por meio de migração diferenciada, tornando possível definir de forma aparente no ensaio a massa molecular e subunidades constituintes pela adição de sulfato sódico de dodecila (SDS) com ou sem o agente beta-mercaptoetanol (Kawagishi *et al.*, 2001). SDS-PAGE se tornou um método analítico comumente utilizado na avaliação do grau de pureza de uma proteína, além de fornecer estimativas de peso molecular, presença de subunidades e ponto isoelétrico (este último sem presença de SDS, Lehninger, 2000). Na ausência destes reagentes e com técnicas específicas a eletroforese pode indicar a natureza ácida (Coelho & Silva, 2000) ou básica (Correia & Coelho, 1995) da lectina isolada.

A determinação da concentração de proteínas pelo método de Lowry se baseia na reação de oxidação dos aminoácidos catalisada pelo cobre (sob condições alcalinas), seguida da redução do reagente Folin Ciocalteau (ácido fosfomolibdico-fotúngstico) para a formação do azul do heteropolímero. O produto formado na reação gera um azul intenso e o método é largamente empregado devido à sua elevada sensibilidade de 0,1 mg/ml de proteína (Scorps, 1994)

A avaliação da atividade biológica em função do pH, da temperatura e da presença de íons, além de contribuir para a caracterização da proteína, define as

condições a serem utilizadas na aplicação biotecnológica da lectina e na avaliação dos seus efeitos fisiológicos (Machuka *et al.*, 1999).

3.10 Aplicação

As lectinas têm se mostrado como ferramentas poderosas tanto para propósitos analíticos como preparativos em bioquímica, biologia celular, imunologia e áreas relacionadas (Karasaki *et al.*, 2001; Ohba *et al.*, 2003). O uso de lectinas de plantas como ferramenta para análise de glicoconjugados de células animais tem uma longa duração e uma história produtiva (Lis & Sharon; 1998).

Lectinas têm sido particularmente importantes no estudo do reconhecimento de moléculas presentes na superfície de células neurais. Muitas moléculas da superfície celular são glicoproteínas ligantes de carboidratos, glicolipídios ou proteoglicanos e estão envolvidos nos eventos de interação célula-célula ou célula-matriz durante o desenvolvimento, assim como, na atividade sináptica (Rollenhagen *et al.*, 2001).

De acordo com Sharon & Lis (2004) as maiores aplicações de lectinas estão relacionadas na tabela 2.

Tabela 2: Aplicações de lectinas

Identificação e separação celular

Detecção, isolamento e estudos estruturais de glicoproteínas.

Investigação de carboidratos em superfícies celulares e organelas subcelular; histoquímica e citoquímica.

Mapeamento de caminhos neuronais.

Estimulação mitogênica de linfócitos *.

Purificação de medula óssea pra transplante *

Seleção de lectinas resistente à mutação

Estudos de biosíntese de glicoproteína.

Nota; * Em uso clínico

4-0 OBJETIVO GERAL

Extrair, detectar, isolar, purificar e caracterizar parcialmente as lectinas de folhas da leguminosa *B. variegata* var. “candida” (BvaLL).

4.1 Objetivos específicos

- Avaliar comportamento de soluções tampões e/ou solução salina que permita maior estabilidade da lectina em estudo.
- Proceder ao isolamento parcial da BvaLL por fracionamento com sulfato de amônio.
- Determinar as ferramentas como, atividade hemaglutinante, teor de proteína e atividade hemaglutinante específica.
- Purificar BvaLL através de métodos cromatográficos por afinidade.
- Determinar a especificidade para carboidratos e glicoproteínas
- Avaliar qualitativamente a pureza da BvaLL por processos eletroforéticos e determinando a massa molecular aparente.
- Determinar a temperatura de desnaturação da lectina.

5.0 JUSTIFICATIVA

A ciência da saúde tem se preocupado bastante com a utilização de plantas como fonte de medicamentos naturais baseado em conhecimento empírico do homem primitivo, todavia o alto custo dos medicamentos industrializados associados às dificuldades de uma assistência médica adequada, fez com que parte da população utilize manipulações caseiras de diversos tipos de plantas na tentativa de resolver problemas de combate a determinadas doenças tal como diabetes tipo II.

Entre as inúmeras espécies vegetais de interesse medicinal, encontram-se as plantas do gênero *Bauhinia*, pertencentes à família das Leguminosae, a qual foi selecionada por ter sido estudado por vários cientistas como possuidor de atividade coadjuvante terapêutica de diabetes. Estas são encontradas nas áreas tropicais do planeta. A existência de amplo estudo fitoquímico e farmacológico deste gênero inclusive com compostos isolados e identificados e também porque parte da população já faz uso de folhas, caules e raízes como preparativos eficazes ao combate de diabetes II.

Desta forma, a contribuição científica na busca de dar subsídios ao desenvolvimento da espécie humana fez necessário, avaliar a lectina de folhas de *Bauhinia variegata* quanto à presença de proteína de reconhecimento de carboidrato para num futuro, verificarmos se a lectina estudada tem propriedade hipoglicemiante.

4.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHENBACH, H. STÖCKER, M.; CONSTENLA, A.; Flavanoid and other constituents of *Bauhinia manca*. *Phytochemistry*, v.27, n. 6, p. 1835-1841, 1988.

AKTAR, A.H.; AHMAD, K.U.; Anti-ulcerogenic evaluation of the methanolic extracts of some indigenous medicinal plants of Pakistan in aspirin-ulcerated rats; *Journal of Ethnopharmacology*, v. 46, p.1-6, 1995.

AMBROSI, N.; CAMERON, N.R; DAVIS, B.G. Lectins: tools for the molecular understanding of the glycocode. *Organic Biomolecular Chemistry*, v. 3, p. 1593-1608, 2005.

AUDETTE, G. F.; VANDONSELOAR, M.; DELBAERE, L. T. J.; The 2,2 ŠResolution Structure of the O (H) Blood Specific Lectin I from *Ulex europaeus*. *Journal of Molecular Biology*, v.304, p. 423-433, 2000.

BANERJEE, C.; STEIN, J.L., VAN, WIJNEN, A.J; FRENKEL, B; LIAN J.B, STEIN G.S.; Transforming growth factor-beta 1 responsiveness of the rat osteocalcin gene is mediated by an activator protein-1 binding site. *Endocrinology*, v.137, n.5, p. 1991-2000.

BANERJEE,S.; CHAKI,S; BHOWAL, J; CHATTERJEE, B. P.; Mucin binding mitogenic from freshwater Indian gastropod *Belamya bengalensis*: purification and molecular characterization. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 421, p. 125-134, 2004.

BARONDES, S.H.; Bifuncional properties of lectins: lectins redefined. *Trends in Biochemical Science*, v. 13, p. 480-482, 1998.

BEZERRA, R.S.; SANTOS, J.F.; PAIVA, P.M.G.; CORREIA, M.T.S.; COELHO, L.C.B.B.; VIEIRA, V, L.. A.; CARVALHO-JR, L.B.; Partial purification and characterization of a thermostable trypsin from pylory caeca of tambaqui (*Colossoma macropomum*); *Journal of Food Biochemistry*, v. 25, p. 199-210, 2001.

CARIBÉ, J.; CAMPO, A. J. M.; Plantas que ajudam ao homem: guia prático para a época atual. São Paulo, Cultrix / Pensamento, 1991; pp.321.

CARLINI, C. R., GROSSI-DE SÁ, M. F.; Plant toxic protein with insecticidal properties: A review on their potentialities as bioinsecticides; *Toxicon*, v.40, p.1515-1539, 2002.

CAVADA, B.S.; SANTOS, C.F.; GRANGEIRO.T.B.; NUNES, E.P.; SALES, P.V.P.; RAMOS, R.L.; DE SOUZA, CRISOSTOMO, C. V.; CALVETE, J.J.; Purification and

characterization of lectin from seeds of *Vatairea macrocarpa* Duke; *Phytochemistry*, v. 49, n. 3, p. 675-680, 1998.

CHUNG, J.J.; RATNAPALA, L. A.; COOCKE, I.M; YANAYIHARA, A.A.; Partial purification and characterization of hemolysin (CAHI) from Hawaiian box jellyfish (*Carbdea alata*) venom., *Toxicon*, v. 39, p. 981-990, 2001.

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

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

CRUZ, G. L.; *Dicionário das plantas úteis do Brasil. 3ª Edição* Rio de Janeiro: Civilização Brasileira, 1985; pp. 599.

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

DAVIS, B. G.; Recent Developments in Glycoconjugates *Journal of the chemical Society Perkin Transaction 1*, p. 3215 – 3237, 1999.

DE SOUZA, H. M.; Arborização de rua; *O Agrônomo*, v. 21, p.109-34, 1969.

DRICKAMER, K.; TAYLOR, M.E.; Biology of animal lectins. *Annual Reviews of Cell Biology*, v.9; p. 23-264, 1993.

FETON-NAVARRO, B.; ARREGUIN-L, B., GARCÍA-HEMÁNDEZ, E.; HEIMER, E; AGUILAR,M. B.; RODRIGUEZ-A, C.; ARREGUIN-ESPINOSA, R.; Purification and structural characterization of lectins from the cnidarian *Bunodeopsis antellienis*. *Toxicon*, v. 43, p. 525-532, 2003.

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

GABIUS, H. J.; Non-carbohydrate binding partners/domains of animal lectins; *International Journal of Biochemistry*, v. 80, p. 131-135, 1994.

GABIUS, H., ANDRÉ, S., KALTNER, H., SIEBERT, H. C.; The sugar code: Functional Lectinomics; *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1572, p. 165-177, 2002.

GAIDAMASHVILI, M.; STANDEN, J. V.; Interaction of lectin-like protein of South African medicinal plants with *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 80, p. 131-135, 2002.

GERLACH, D., WAGNER, M.; SCHLOTT, B.; ZÄHRINGER U.; Chemical and physicochemical characterization of the sialic acid-specific lectin from *Cepaea hortensis*; Fem Microbiology Letters, v. 10579, p. 61-68, 2002.

GOLDSTEIN, I. J., PORETZ, R. D.; Isolation, physicochemical characterization of lectin, p.33-247; The Lectin: Properties, Function and Applications in Biology and Medicine; Academic Press, New York.1986a, pp600.

HEDGE, S. P.; SHET, M.S.; MADAIH, M.; Purification and partial characterization of lectin from *Ariopsis peltata* tubers; Phytochemistry, v. 28, p. 2897- 2900, 1989.

HEU, M.S.; KIM, H.R.; PYEUN, J. H.; Comparison of trypsin and chymotrypsin from the viscera of anchovy, *Engraulis japonica*. Comparative Biochemistry and Physiology, v. 112(B), n. 3, p. 557-567, 1995.

IMBERTY, A.; CASSET, F.; GEGG, C. V.; ETZLER, M. E., PEREZ, S.; Molecular modeling of the *Dolichos biflorus* seed lectin and its specific interactions with carbohydrates: -D-N-acetyl-galactosamine, Forssman disaccharide and blood group A trisaccharide; Glycoconjugate Journal, v. 11, n. 5; p. 400-413, 1994.

JIMBO, M.; YANOHARA, T.; KOIRE, K.; SAKAI, R.; MURAMOTO, K.; KAMIYA, H.; The galactose binding lectin of the octocoral *Sinularia lochmodes*: characterization and possible relationships to the symbiotic dinoflagellates. Comparative Biochemistry and Physiology, v. 125(B), p. 227-236, 2000.

KARASAKI, Y.; TSUKAMOTO, S.; MIZUSAKI, K.; SUGIURA,T.; GOTOH, S.; A garlic lectin exerted an antitumor activity and induced apoptosis in human tumour cells; Food Research International, v. 34, p. 7-13, 2001.

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

KOLBERG, J.; SLETTEN, K.; Purification and properties of mitogenic lectin from *Lathyrus sativas* seeds; Biochimia et Biophysica Acta, v. 704; p. 26-30, 1982.

KONOZY, E. H.; BERNARDES, E.S.; ROSA, C.; FACA, V.; GREENE, L.J., WARD, R.J.; Isolation, purification and physicochemical characterization of a D-galactose-binding lectin from seeds of *Erythrina apesciosa*; Archives of Biochemistry and Biophysics, v.410, p.222-229, 2003.

LANS, C.; HARPER, T.; GEORGES, K. BRIDGEWATER, E.; Medicinal and ethnoveterinary remedies of hunters in Trinidad; BioMed Central (BMC) Complementary and Alternative Medicine, v 1, p.10, 2001.

LEMUS, I.; GARCIA, R. DELVILLAR, E.; KNOP, G.; Hypoglycaemic activity of four plants used in Chilean popular medicine. Phytotherapy Research; 1999; v. 12; p. 91 – 94.

LEHNINGER; Principles of Biochemistry; David L. Nelson, Michael M. Cox. 3^{er}. Edition, Worth Publishers; 2000.

- LEWIS, G.P.; legumes of Bahia; Kew Botanic Garden; 1987; pp. 369;
- LILLEY, C.J., DELVIN, P., URWIN, P.E., ATKINSON, S.J.; Parasitic nematodes Proteinases and Transgenic Plants; Parasitology Today, v.15, p. 414-417, 1999.
- LIS, H.; SHARON, N.; Lectins as molecules and as tools. Annual Review of Biochemistry, v. 55, p. 35 -67, 1986.
- LIS, H., SHARON, N.; Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition.; Chemical Review, v.98, n.2, p.637-674, 1998.
- MACHUKA, J.S.; OKEOLA, O.G.; ELS, J.M.V.D.; CHRISPPEELS, M. J.; LEUVEN, F.V.; PEUMANS, W.J.; Isolation and partial characterization of galactose-specific lectins from African yam beams, *Sphenostyles stenocarpa* Harms; Phytochemistry, v. 51, p. 721-728, 1999.
- MLADENOV, I.V.; HARALAMBIEVA, I. H.; LANKO, I. D.; MITOV, I.G.; Characterization of 20-kDa lectin- spermagglutinin from *Arum maculatum* that prevents *Chlamydia pneumoniae* infection of L-929 fibroblast cells; FEMS Immunology and medical Microbiology, v. 1386, p.1-6, 2002.
- MO, H.; VAN DAMME, E.J.P.; PEUMANS, W.J.; GOLDSTEIN, I. J.; Purification and characterization of a mannose-specific lectin from shallot (*Allium ascalonicum*) bulbs; Achieves of Biochemistry and Biophysics, v. 306 n. 2; p. 431-438, 1993.
- MUNOZ, V.; SAUVAIN, M.; BOURDY, G.; CALLAPA, J.; BERGERON, S.; ROJAS, I.; BRAVO J. A.; BALDERRAMA, L.; ORTIZ, B.; GIMENEZ, A.; DEHARO, E.; A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach; Part I – Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Chacobo Indians; Journal of Ethnopharmacology, v. 69, p. 127-137, 2000.
- NG, K.K.S.; DRIVKAMER, K., WEIS, I.; Structural analysis of monosaccharide recognition by rat liver mannose-binding protein. Journal Biological Chemistry, v. 271, p. 663-667, 1986.
- NG. T. B.; Antifungal Protein and Peptides of Leguminous and non-Leguminous origins, v.25, p. 1215-1222, 2004.
- OHBA, H.; BAKALOVA, R.; MORIWAKI, S.; MURAKI, M.; Cytoagglutination and cytotoxicity of Wheat Germ Agglutinin isolectins against normal lymphocytes and cultured leukemic cells lines relationship between structure and biological activity; Biochimica et Biophysica Acta, v. 1619, p. 144-150, 2003.
- PAIVA, P. M.G., COELHO, L.C.B.B.; Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* mart. (Camaratu bean); Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 36, p. 113- 119, 1992.
- PANDA, S., KAR, A.; *Withania somnifera* and *Bauhinia purpurea* in the regulation of circulating thyroid hormone concentrations in female mice; Journal of Ethnopharmacology, v. 67, p. 233 – 239, 1999.

PEPATO, M.T.; KELLER, E. H.; BAVIERA, A. M.; KETTELHUT, I. C.; VENDRAMINI, R.C.; BRUNETTI, I. L.; Anti – diabetic activity of Bauhinia forficata decoction in streptozotocin – diabetic rats.; Journal of Ethnopharmacology, v. 81, p. 191 – 197, 2002.

PEUMANS, W.J., VAN DAMME, E.J.M.; Plant lectins: specific tools for the identification, isolation, and characterization of O-linked glycans; Critical Reviews of Biochemistry and Molecular Biology, v. 33, p. 209-58, 1998.

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

POOLA, I., KELLA, N.K.D.; Binding of metyllumbelliferyl N-acetyl-beta-D-glucopyranoside and metyllumbelliferyl N, N'-diacetyl-beta-chitobioside to rice lectin: Studies by equilibrium dialysis and fluorescence quenching titrations; Biochimica et Biophysica Acta, v. 882, p.12-17, 1986.

QUIOCHO, F. A; Carbohydrate-binding proteins: tertiary structures and protein-sugar interactions. Annual Reviews of Biochemistry, v.55, p. 287-315, 1986.

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

RINI, J.M.; Lectin structure; *Annual Review of Biophysics and. Biomolecular. Structure*, v. 24, p. 551-577, 1995.

ROLLENHAGEN, A., CZANIERA, R.; ALBERT, M., WINTERGERST, E.S.; REYNOSO-CAMACHO, R.; MEJIA, E. G. DE; LOARCA-PINA; Purification and acute toxicity of lectin extracted from therapy bean (*Phaseolus acutifolius*); Food and Chemical Toxicology, v.41,p21-27, 2003.

ROMAN-RAMOS, R.; ALARCON – AGUILAR, F.; LARA – LEMUS, A.; FLORES – SAENZ, J.L.; Hypoglycaemic effect of plants used in Mexico as anti – diabetics., Archives of Medical Biological Research, v. 23, p. 11 – 20, 1990.

RÜDGER, H.; Plant lectins more than just tools for glycoscientists: occurrence, structure and possible functions of plant lectins; Acta Anatomica (Basel), v. 7, p. 1-12, 1998.

RÜDGER, H.; SIEBERT, H. C.; SOLIS, D.; JIMENEZ-BARBERO, J.; ROMERO, A.; VON DER LIETH, C.; DIAZ MAURIÑO, T.; GABIUS, H. J.; Medical chemistry base on the sugar code: fundamentals of lectinology and experimental strategies with lectin as target; Current Medical Chemistry, v. 7, p. 389-416, 2000.

RÜDGER, H.; GABIUS, H. J.; Plant lectins: occurrence biochemistry, functions and applications, v.18, p. 589-613, 2001.

SCORPS, R.K.; Protein purification, 3rd ed., Spring Verlag, 1994, 380p.

SELITRENNIKOFF, C.P.; Antifungal Protein; Applied and Environmental Microbiology, v. 67, p. 2883-2894, 2001.

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

SHARON, N., LIS, H.; Lectins, Chapman & Hall, London, .1989a; pp 126

SHARON, N., LIS, H.; Lectins as cell recognition molecules. Science, v. 246, p.227-234, 1989b.

SHARON, N., LIS, H.; Carbohydrates in cell recognition. Scientific American, v. 268, p. 82-89, 1990.

SHARON, N.; Lectin-carbohydrate complexes of plants and animals: an atomic view. Trends Biochemical Sciences, v.18, n. 6, p. 221-226, 1993.

SHARON, N., LIS, H.; The structural basis for carbohydrate recognition by lectins. The Molecular Immunology of Complex carbohydrates-2; Taiwan; Kuwer Academic/Plenum Publishers; p. 1-19, 2001

SHARON, N., LIS, H.; How protein Bind Carbohydrates: Lessons from legume Lectins; Journal of Agriculture food Chemistry, v.50, p. 6586-6591, 2002.

SHARON, N., LIS, H.; History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules; Glycobiology, v. 14, n. 11, p. 53R-64R, 2004.

SILVA, K. L. DA, CECHINEL FILHO, V.; Plantas do gênero Bauhinia: Composição Química e Potencial Farmacológico, Química nova, v. 25, n. 3, p. 449-454, 2002.

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

STINISSEN, H. M., PEUMANS, W. J.; Recent advances in biochemistry, cell biology physiology, biosynthesis and genetics of gramineae lectins. Biochemie und Physiologie der Pflanze, v. 180, p. 85-106, 1985.

TASUMI, S.; YANG, W-J.; USAMI,T.; OHIRA, T.; KAWAZOE, L.; WILDER, M.N.; AIDA, K.; SUZUKI, Y.; Characteristics and primary structure of a galectin in the skin mucus of the Japanese eel, *Anguilla japonica*. Development Comparative Immunology, v.28, p.325-335, 2004

TAYLOR, R.S. L.; HUDSON, J. B.; MANDANDHAR, N. P.; TOWERS, G.H.N.; Antiviral activities of medicinal plants of southern Nepal; Journal of Ethno pharmacology,v. 53, p. 97 – 104, 1996.

VASCONCELOS, I. M.; OLIVEIRA, J. T. A.; Antinutritional Properties of Plants Lectins; Toxicon, v. 44, p. 285-403, 2004.

VAN DAMME, E.J.M.; PEUMANS, W.J; PUSTZAI, A; BARDOCZ, S.; Handbook of plant lectins: properties and biomedical applications, London: Wiley, p. 31-50, 1998;

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

WEIS W.I.; DRICKAMER K; Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. Annual Review Biochemistry, v. 65, p. 441-73, 1996,

CAPÍTULO II

EXTRAÇÃO, ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE LECTINA DE FOLHAS DE *Bauhinia variegata* var. "candida"

Manuel. Messias de Oliveira¹; Maria Barbosa Reis da Silva¹; Sandra. Rodrigues de Souza²; Luana Cassandra Breitenbach. Barroso Coelho¹.

- 1- Laboratório de Glicoproteínas do Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Avenida Prof. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil. CEP-50670-420; messias@hotmail.com.br.
- 2- Faculdade Frassinete do Recife, FAFIRE, Avenida Conde da Boa Vista, 921, Boa Vista, Recife, PE, Brasil. CEP 50060-002

Artigo aprovado para o 1º WORKSHORP
MEIO AMBIENTE, CIÊNCIAS E TECNOLOGIA.
DE MÃOS DADAS PARA O FUTURO.

UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO-UNICAP
15-18 DE AGOSTO DE 2006

RESUMO:

As lectinas constituem uma classe de proteínas com propriedades de interação específica e reversível a carboidratos e glicoconjugados sem promover modificação química na estrutura covalente. Estas moléculas são extensivamente distribuídas na natureza e centenas de lectinas têm sido isoladas de plantas, vírus, bactérias e animais vertebrados e invertebrados. Uma lectina foi isolada das folhas de *Bauhinia variegata* var. "candida" por cromatografia de afinidade em coluna de quitina, um polímero natural de N-acetilglicosamina. A homogeneidade da lectina foi demonstrada por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de sulfato sódico de dodecila, mostrando uma banda protéica de massa molecular aparente de 14,4 Da. A lectina de folhas de *B. variegata* mostra especificidade para galactose e foi inibida por glicoproteína em soro fetal bovino. A lectina aglutinou hemácias de coelho e foi relativamente resistente ao tratamento térmico retendo 75% da atividade hemaglutinante até 90°C, com um pH ótimo de 7,0, tendo uma temperatura de desnaturação de 120°C.

1 – INTRODUÇÃO

As lectinas constituem um grupo de proteínas ou glicoproteínas de origem não imune que se liga específica e reversivelmente a carboidratos e usualmente aglutinam células ou precipitam polissacarídeos e glicoconjugados (Goldstein *et al.*, 1980). As lectinas foram redefinidas por Peumans & Van Damme (1995) como proteínas possuindo pelo menos um domínio não catalítico, que se liga reversivelmente a mono ou oligossacarídeo. Como consequência de suas propriedades químicas elas se tornaram ferramentas úteis em vários campos de pesquisas biológicas (imunologia, biologia celular, pesquisa de câncer, engenharia genética e outras).

As lectinas podem ser encontradas em vegetais, animais e microorganismos (Sharon & Lis, 1993). Lectinas de plantas já foram purificadas de sementes (Wang & Ng, 2003), folhas (Coelho & Silva, 2000), bulbos (Mo *et al.*, 1993), vagens (Kamemura *et al.*, 1996a), cascas (Wititsuwammakul *et al.*, 1998), raízes (Naeem *et al.*, 2001) e frutos (Mach *et al.*, 1991), e assumem papel biologicamente fundamental incluindo parte do seu mecanismo de defesa (Peumans & Van Damme, 1995).

O uso medicinal das plantas pertencentes ao gênero *Bauhinia* pela população de diferentes partes do mundo tem encontrado respaldo nos estudos científicos, que comprovam a eficácia destas plantas em vários modelos experimentais. Neste contexto, alguns efeitos biológicos ou farmacológicos, como antifúngicos, antibacterianos, analgésicos, antiinflamatórios e especialmente antidiabéticos são relatados na literatura, comprovando e justificando o uso destas espécies na medicina popular.

Dentre as preparações de espécies mais estudadas podemos relacionar: extratos de ramos de *B. cumanensis* ou de *B. excisa* são utilizados para tratarem de mordidas de cobras nos caçadores indígenas e nos seus cães em Trinidad (Lans *et al.*, 2001). Extrato de casca de *B. purpurea* estimulou a função tiroidal em ratos aumentando os níveis de T3 e T4 livres de soro (Panda & Kar, 1999). Atividade hipoglicemiante foi demonstrada em folhas *B. forficata* (Pepato *et al.*, 2002). Os extratos de *Bauhinia forficata* podem reduzir a taxa de glicose, triglicerídeos e colesterol, sendo útil no tratamento de diabetes tipo II (Lino *et al.*, 2004). Os flavonóides existentes no extrato hidroalcoólico (1000 mg/kg) das sementes de *B. variegata* mostraram efeito hipoglicemiante em ratos, no qual a diabete foi induzida pela streptozotocina (55 mg/kg)

(Silva & Cechinel, 2002). No presente trabalho foi procedido à extração, isolamento e caracterização parcial da lectina de folhas de *Bauhinia variegata* var. “candida”, BvaLL.

2.0 Materiais

2.1 *Bauhinia*

As folhas de *B. variegata* foram coletadas no município de Igarassú – PE. Uma amostra do material foi identificado e arquivado no “Herbário Dárdamo de Andrade Lima” (Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária, Recife, PE).

2.2 Preparação da amostra:

As folhas foram removidas e lavadas em água corrente, seguida com água destilada sendo mantidas em temperatura ambiente por 96 h. As folhas desidratadas foram pulverizadas em multiprocessador e preparadas o extrato (10% p/v) em NaCl 0,15 M por 16 h a 4°C sob agitação constante. O extrato foi centrifugado a 6000 g x 15 min a 4°C, filtrado em gaze e submetido a fracionamento com sulfato de amônio 60%, p/v (F0-60%) por 4 h em temperatura ambiente. O material foi centrifugado a 6000 g x por 15 min a 4 °C; o precipitado foi ressuspenso e dialisado contra água destilada por 2 h (duas trocas) seguida por uma solução de NaCl 0,15 M.

2.3 Eritrócitos:

O método foi descrito por Bukantz *et al.* (1946), para eritrócitos frescos e tratados com glutaraldeído (Bing *et al.*, 1967).

2.4 Atividade hemaglutinante (AH):

O método foi descrito por Correia e Coelho (1995).

2.5 Estimativa do teor de proteínas:

A concentração de proteínas de diferentes frações foi medida de acordo com o descrito por Lowry *et al.*, (1951).

2.6 Especificidade para carboidrato e glicoproteína:

A especificidade da ligação de carboidrato a lectina foi estimada pela inibição de AH usando diferentes carboidratos conforme tabela 2 e várias glicoproteínas conforme tabela 3, seguindo a metodologia descrita por Coelho e Silva (2000).

2.6 Protocolo de purificação:

O protocolo de purificação de BvaLL foi obtido através de cromatografia de afinidade em coluna de quitina (10,5 cm x 1,1 cm, 10 ml). A coluna foi equilibrada com NaCl 0,15 M, sendo aplicados 2,0 ml (20,4 mg de proteína) da fração dialisada. A coluna foi eluída com uma solução de equilíbrio a um fluxo de 20 ml/h. As frações (2 ml) coletadas foram monitoradas para a AH e proteína (A280 nm). A lectina foi desorvida por eluição (20 ml/h) com solução de ácido acético 1,0 M. As frações (2 ml) foram monitoradas a 280 nm e dialisadas com solução de NaCl 0,15 M até pH neutro. A proteína no material foi medida de acordo com Lowry *et al.* (1951) e estocada (-20 °C).

2.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida: Conforme metodologia descrita por Laemmli (1970).

Estabilidade Térmica: O método foi descrito por Plummer, (1978).

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

As plantas do gênero *Bauhinia* estão sendo amplamente difundidas nos trópicos e subtropicais, são utilizadas em paisagismo por ter flores vistosas e são importantes para nutrição vegetal pelo seu alto teor protéico. A algumas espécies, estão sendo atribuídas propriedades antifúngicas, antibacteriana, antiinflamatórias e, dentre elas *Bauhinia variegata* var. “*candida*” apresenta também propriedade antidiabética (Silva e Cechinel, 2002). Evidentemente, para avaliar se essas propriedades podem ser atribuídas à atividade de reconhecimento de carboidrato pela proteína se faz necessário o isolamento e a caracterização da lectina.

A influência dos diversos tipos de solventes em diferentes valores de pH foi avaliado e máximo do teor de proteína e atividade hemaglutinante, atividade hemaglutinante específica, foi encontrada no pH 6,5 em tampão citrato-fosfato 10 mM e pH 7,0 em NaCl 0,15 M. Após o processo de purificação havia um declínio na atividade hemaglutinante com tendência à zero, quando do uso de tampão citrato-fosfato; utilizando NaCl 0,15 M a atividade foi mantida. Interações carga a carga e pontes salinas que mudam a superfície da proteína, a tornam mais atrativa do que repulsiva em pH neutro, contribuindo favoravelmente para a sua estabilidade (Pace *et al.* 2004). A detecção da existência de lectinas nas folhas de *B. variegata* (BvaLL) foi determinada através de ensaio de hemaglutinação. A tabela 1 revela que eritrócitos humanos foram fracamente aglutinados; eritrócitos de coelho apresentaram o melhor resultado.

Tabela 1: Atividade hemaglutinante (AH) do extrato e fração dialisada (0-60 %) em diferentes eritrócitos.

Extrato		Fração dialisada F (0-60 %)
Eritrócitos	Tipos	AH (UH/ml)
Humano	A	16
	B	16
	AB	32
	O	32
Rato		1024
Galinha		4096
Coelho		262144

Unidade de Hemaglutinação (UH) é definido como a quantidade de proteína requerida para causar

aglutinação usando eritrócitos de coelho.

Eritrócitos de coelho foram selecionados para os testes de inibição da atividade hemaglutinante em carboidratos, como mostrado na tabela 2 e na tabela 3. A atividade hemaglutinante da BvaLL foi inibida por galactose e outros carboidratos (Tabela 2) bem como por glicoproteínas (Tabela 3). A ligação de especificidade por carboidrato é também uma característica da lectina isolada de *B. purpurea* (Young *et al.*, 1985) e da lectina de folhas de *B. monandra* (Coelho & Silva, 2000). É interessante ressaltar que as lectinas específicas à galactose não se ligam à manose (Ambroise *et al.*, 2005).

Os sítios de ligação a carboidratos são frequentemente depressões na superfície da proteína e em todos os casos estes sítios de ligação têm boa "performance"; a disposição estérica dos grupos hidroxila nos carboidratos criam caminhos hidrofóbicos na sua superfície que interagem com as regiões hidrofóbicas da proteína (Ambrosi *et al.*, 2005). Pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas formam uma rede na ligação lectina-carboidrato.

Tabela 2 - Carboidratos: Inibição da atividade Hemaglutinante (AH)

Carboidratos	Concentração (mM)
D (+) – Maltose	NI
D (+) – Manose	NI
D (+) – Galactose	1,56
D (+) – Lactose	3,12
D (-) – Frutose	3,12
D (+) – Glicose	12,50
D (+) – Sacarose	12,50

^a NI = Substância não inibitória, 200 µg/ml.

^b A inibição foi avaliada pela concentração mínima de carboidrato requerida para inibir 16 unidades de hemaglutinação (UH)

Forças de Van der Waals são frequentemente numerosas contribuindo significativamente para ligação global entre a lectina e o carboidrato. A habilidade das lectinas em distinguir sutis variações na estrutura de oligossacarídeos fazem delas decodificadoras de informações; enquanto os carboidratos são capazes de levar informações biológicas, as lectinas são capazes de decifrar os glicocódigos (Ambrosi *et al.*, 2005).

Tabela 3-Glicoproteína: Inibição da atividade hemaglutinante de BvaLL.

Glicoproteína	Concentração (mM)	AH (UH)
Soro fetal bovino	500	128
Asialofetuína	500	32
Tiroglobulina	500	32
Ovalbumina	500	NI

^a NI = Substância não inibitória, 200 µg/ml.

^b A inibição foi avaliada pela concentração mínima de carboidrato requerida para inibir 16 unidades de hemaglutinação (UH).

A utilização de cromatografia por afinidade é uma importante ferramenta para o processo de purificação de lectina, por ser fundamentada na interação reversível entre a proteína e a matriz pela mudança de pH ou por uma eluição competitiva de uma solução de carboidrato.

O protocolo estabelecido para purificação de BvaLL foi seguido por duas etapas. Fracionamento em sulfato de amônio precipitou proteínas por elevada força iônica; seguida pelo processo cromatográfico, teve a vantagem de selecionar a biomolécula por afinidade e recuperação. Quitina foi escolhida como matriz porque consiste de um polissacarídeo formado por unidades de N-acetilglicosamina, GlcNac, existente em grande abundância na natureza. Quitina é o constituinte principal das carapaças (exosqueleto) dos artrópodes e está presente, com menor importância, em muitas outras espécies animais sendo também, o constituinte principal das paredes celulares nos fungos (Latha *et al.*, 2006). A cromatografia em quitina utilizada é considerada de afinidade (Minic *et al.*, 2000), entretanto a dessorção aplicada não é biosseletiva. BvaLL foi purificada através de cromatografia por afinidade em quitina (Figura 1), foram obtidos dois picos bem definidos: o primeiro não adsorvido à coluna, com coloração de tom marrom claro, típica de F₁, sem atividade biológica e o segundo foi dessorvido quando eluído em uma solução de ácido acético 1,0 M, clarificado e com atividade biológica. Todas as frações foram dialisadas e testadas com eritrócitos de coelho sendo medido o teor de proteína. O rendimento em lectina obtido está representado na tabela 4; BvaLL constitui 6,6% do total de proteína. O protocolo estabelecido utilizando quitina constitui um meio bastante econômico, uma vez que a matriz foi reutilizada por várias vezes consecutivas, com o mesmo rendimento. O resultado foi bastante significativo, uma vez que lectinas ligantes de quitina podem ter um papel na defesa de plantas contra fungos e insetos.

Tabela 4: Rendimentos de BvaLL em vários estágios de fracionamento e purificação.

Fração	Título	Volume	Proteína	AHE	Total	Rendimento
	(UH)	(ml)	(mg/ml)	(HU/mg)	(título x vol. x 10 ³)	%
Extrato a 10%	524288	10	18,5	28339	5242	100
F 0-60 %	262144	17	10,2	25700	4456	85
Matriz de quitina						
F 0-60%						
P2	4096	84	1,04	3938	344	6,6

A estabilidade das proteínas a uma determinada temperatura tem revelado que depende do efeito hidrofóbico e da conformação entrópica (Pace *et al.*, 2004); Loladze *et al.*, (2002) enfocou que os resultados de estudos termodinâmicos de desnaturação de proteína estão alicerçados por interações das Forças de Van der Waals e pontes de hidrogênio, as quais dão grande contribuição para alteração na entalpia que atua diretamente no comportamento da proteína. BvaLL foi estável depois de 20 meses de armazenamento em temperaturas(-20°C).

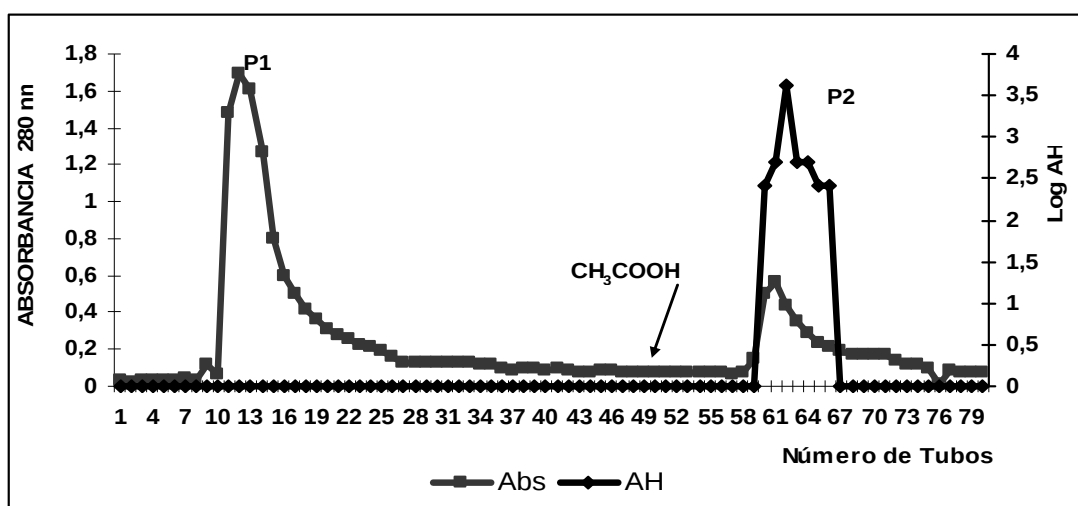


Figure 1: Purificação da BvaLL por cromatografia em quitina.

A coluna foi equilibrada e lavada com NaCl 0,15 M para remover o material não adsorvido (P1). A lectina purificada (P2) foi eluída com solução de ácido acético 1,0 M.

A estabilidade térmica de lectinas de distintas fontes é variável, apesar de várias destas proteínas somente perderem sua atividade acima de 60°C (Kawagishi & Mori, 1991). A temperatura de desnaturação de 120°C (Figura 2).

Quando foi efetuado o ensaio de acordo com Plummer(1978) foi obtida uma estabilidade térmica até 90°C que correspondeu a 75% da atividade hemaglutinante original.

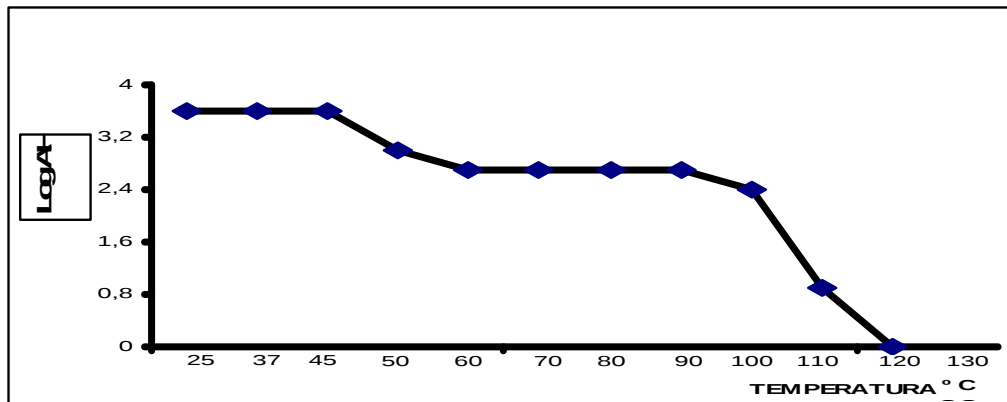


Figura 2: Temperatura de desnaturação

Eletroforese em gel de poliacrilamida da lectina tratada com sulfato sódico de dodecila (SDS) é uma técnica que tem por base a mobilidade determinada por fatores de carga e estrutura da biomolécula. O SDS se unirá a proteína, dotando-a de elevada carga elétrica negativa, que por repulsão provocará o deslocamento da mesma (linearidade). A preparação contendo BvaLL purificada revelou uma banda estreita de peso molecular aparente de 14,4 kDa (Figura 3).

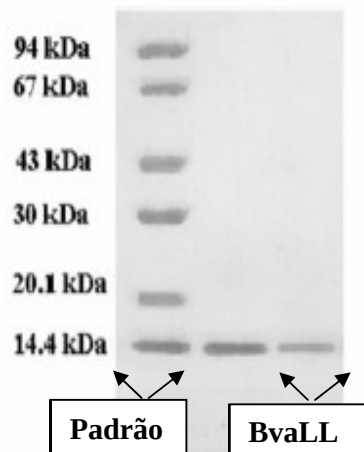


Figura 3: Eletroforese em gel SDS-PAGE em condições não redutoras: Padrão de peso molecular; fosforilase b (94 kDa), ovalbumina (67 kDa), ovalbumina (43 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), tripsinogênio (24 kDa), inibidor de tripsina (20 kDa) e α -lactoalbumina (14,4 kDa); BvaLL purificada (400 μ g).

4 – CONCLUSÃO

1- NaCl 0,15 M permite a estabilidade da lectina durante o processo de purificação e na estocagem.

2-Purificação por cromatografia de afinidade em coluna de quitina apresentou um rendimento em lectina de 6,6 %.

3-Atividade hemaglutinante foi fortemente inibida por D(+)-galactose e glicoproteínas de soro fetal bovino.

4-Eletroforese contendo SDS revelou uma única banda protéica com um peso molecular aparente de 14,4 kDa.

5-BvaLL aglutinou eritrócitos de coelho e manteve estabilidade térmica em 75% da atividade original até a temperatura a 90 °C e teve uma temperatura de desnaturação de 120 °C

5 – Referências bibliográficas

AMBROSI, N.; CAMERON, N.R; DAVIS, B.G. Lectins: tools for the molecular understanding of the glycode. Organic Biomolecular Chemistry. 2005. v.3, p.1593-1608.

BING, D. H.; WEYAND, J.G.M.; STAVITSKY, A. B. Haemagglutination with aldehyde-fixed erythrocytes for assay of antigens and antibodies. Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1967. v. 124, p. 1166-1171.

BUKANTZ, C. S. C., REIN, L. C. C. R., KENT C. J. F. Studies in complement fixation. Preservation of sheep's blood in citrate dextrose mixtures (modified Alsever's solution) for use in the complement fixation reaction. Journal of Laboratory and Clinical Medicine. 1946. v. 31, p. 394-399.

COELHO, L. C. B. B.; Da SILVA, M.B.R. Simple Method to Purify Milligram Quantities of the Galactose-Specific Lectin from the Leaves of *Bauhinia monandra*; Phytochemical Analysis. 2000. v. 11, p. 295-300.

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

GOLDSTEIN, I.J. HUGHES, R.C., MONSIGNY, M., OZAWA, T. e SHARON, N.. 1980. What should be called a lectin? Nature. 1980. v. 285, p. 60.

KAMEMURA, K.; FURUICHI Y.; UMEKAWA H.; TAKASSHI T.; Purification and characterization of a pod lectin from the leaves of Great Northern bean, *Phaseolus vulgaris* L.; Biochimica et Biophysica Acta 1996a. v. 1289, p 87-94.

KAWASGISHI, H, MORI, H. Chemical modification and NMR studies on a mushroom lectin *Ischnoderma resinosum* agglutinin (IRA). Biochimica et Biophysica Acta, 1991. v.1076, p.179-186.

LAEMMILI, U. K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature*, 1970. v. 227, n.5259, p. 680-685.

LATHA, V. L., RAO, R. N., NADIMPALLI, S. K. Affinity purification, physicochemical and immunological characterization of a galactose-specific lectin from the seeds of *Dolichos lablab* (Indian lablab beans); *Protein Expression and Purification*. 2006. v. 45, p. 296-306.

LANS, C.; HARPER, T.; GEORGES, K. BRIDGEWATER, E, Medicinal and ethnoveterinary remedies of hunters in Trinidad; *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2001. p.1-10.

LINO, C.de S; DIOGENES, J.P.; PEREIRA, B.A.; ANDRADE NETO,M.; ALVES,R.S.;De QUEIROZ, M.G.; De SOUZA, F.C.; VIANA, G.S. Antidiabetic activity of *Bauhinia forficata* extracts in alloxan-diabetic rats. *Biology Pharmacology Bulletin*. 2004. v. 27, p. 125-127.

LOLADZE, V.V.; ERMOLENKO, D.N.; MAKHATADZE, G.I. Thermodynamic consequences of burial of polar and non-polar amino acid residues in the protein interior. *Journal of Molecular Biology*. 2002. v.320, p. 343-357.

LOWRY, D.H.; ROSEBROUGH N.J.; FARR A.L. Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*; 1951. v. 193, n. 1; p. 265-275.

MACH, L.; SCHERF, W.; AMMANN, M.; POETSCH, J.; BERTSCH, W.; MÄRZ, L.; GLÖSSI, J. Purification and partial characterization of a novel lectin from elder (*Sambucus nigra* L.) fruit; *Biochemical Journal*. 1991. v. 278; p. 667-671.

MINIC, Z.;LEPROUST-LECOESTER,L.; ;APORTE, J.; KOUCHKOVSKY, Y.; BROWN, S.C. Protein isolated from Lucerne roots by affinity chromatography with sugars analogous to Nod factor moieties. *The Biochemical Journal*, 2000. v. 345, p. 255-262.

MO, H.; VAN DAMME, E.J.P.; PEUMANS, W.J.; GOLDSTEIN, I.J. Purification and characterization of a mannose-specific lectin from shallot (*Allium ascalonicum*) bulbs; *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1993. v. 306, n. 2. p. 431-438.

NAEEM, A. HASAN, K.R.; VIKRAM, H.; AKIF, M. Purification of *Cajanus cajan* root lectin and its interaction with rhizobial lipopolysaccharide as studied by different spectroscopic techniques. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2001. v. 306, n. 1, p. 99-105.

PACE, C.N., TREVIÑO, S.; PRABHAKARAN, E.; SCHOLTZ, M. Protein structure, stability and solubility in water and other solvents. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*; 2004. v. 359, n. 1448, p. 1225-1235.

PANDA, S.; KAR, A. *Withania somnifera* and *Bauhinia purpurea* in the regulation of circulating thyroid hormone concentrations in female mice. *Journal of Ethnopharmacology*.1999. v. 67; p. 233-239.

PEPATO, M.T.; KELLER, E. H.; BAVIERA, A. M.; KETTELHUT, I. C.; VENDRAMINI, R.C.; BRUNETTI, I. L.;. Anti-diabetic activity of *Bauhinia forficata* decoction in streptozotocin- diabetic rats; Journal of Ethnopharmacology. 2002. v. 81, p. 191-197.

PEUMANS, W.J.; Van Damme, E.J.M. Lectin as plant defense proteins. Plant Physiology. 1995. v. 109; p. 347-352.

PLUMMER, D.T. An introduction to Practical Biochemistry. 2 ed. London: McGraw-Hill,.1978. Cap 3; p. 47-98; Separation Methods.

SHARON, N; LIS, H. Carbohydrates in Cell Recognition. Science. 1993. v. 268, p. 82-89.

SILVA, K. L.; CECHINEL FILHO, V., Plantas do gênero *Bauhinia*: Composição Química e Potencial Farmacológico, Química nova, 2002. v. 25, n. 3, p. 449-454.

WANG, H.X.; N.G, T.B.; Purification of Castamollin, a novel antifungal protein from Chinese chestnuts; Protein Expression & Purification. 2003. v.32; p. 44-51.

WITITSUWAMMAKUL, R.; WITITSUWAMMAKUL , D.; SKULBORIRUG, C. Lectin from the bark of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*); Phytochemistry. 1998. v.2; n, 47; p. 183-18

YOUNG, M.N.; WATSON, D.C.; WILLIAMS, R.E. Lectins and legume taxonomy. Characterization of the N-acetyl-D-galactosamine specific lectin from *Bauhinia purpurea*. FEBS Letters, 1985. v.182, p.404-406.

CAPÍTULO III

EXTRACTION, ISOLATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF *Bauhinia variegata* var. ‘candida’ LEAF LECTIN

Manuel Messias de Oliveira¹; Maria Barbosa Reis da Silva²; Sandra Rodrigues de Souza³;

Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho².

1-Avenida Beira Mar 2088/Apto 701, Piedade, Jaboatão dos Guararapes,-PE.

CEP 54400-000; Tel 0055-81-33615423; messias@hotmail.com.br

2-Laboratório de Glicoproteínas, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Avenida Prof. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil. CEP-50670-420;.

3-Faculdade Frassinete do Recife, FAFIRE, Avenida Conde da Boa Vista, 921, Boa Vista, Recife, PE, Brasil. CEP 50060-002.

Artigo submetido ao periódico: Biologicals

ABSTRACT

Lectins constitute a class of ubiquitous proteins/glycoproteins abundantly found in legumes; they agglutinate erythrocytes, interact with carbohydrates, and have attracted interest mainly as invaluable tools in structural and functional biotechnology investigation. Leaf powder of *Bauhinia variegata* var. “*candida*” was used to extract, isolate and partially characterize the biological and physicochemical properties of BvaLL, a galactose specific lectin. The protein in saline solution was isolated from leaf extract and purified by chitin affinity chromatography (natural N-acetylglycosamine-GlcNac polymer). The homogeneity of the lectin was demonstrated by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) in the presence of sodium dodecyl sulphate and to native basic protein revealing only one protein band with apparent molecular mass of 14.4 kDa. The lectin was inhibited by bovine fetal serum glycoproteins. BvaLL agglutinated rabbit erythrocytes and was relatively stable to heat treatment, retaining 75% of its original activity until 90 °C and was exhibited the disnature temperature of 120°C.

Key words: *Bauhinia*, lectin, leguminosae, carbohydrate and glycoprotein.

1.0 INTRODUCTION

Lectins are proteins or glycoproteins of ubiquitous distribution in nature, which have at least one carbohydrate or derivative binding site without catalytic function or immunological characteristics [1]. It is the unique ability to recognize and bind reversibly to specific carbohydrate ligands without any chemical modification that distinguishes lectins from other carbohydrate binding proteins and enzymes and make them invaluable tools in biomedical and glycoconjugate research.

Plant lectins are a heterogeneous group of proteins or glycoproteins that have in common the ability to bind specific sugar residues and to agglutinate cells. Lectins are found in many different species and in distinct organs and tissues of plants; it is assumed that they play fundamental biological roles, including part on their defense mechanisms [2].

Plants of the genus *Bauhinia* (family Caesalpiniaceae) are widely distributed in the Tropics, contain a number of ornamental species which have been investigated in folk medicines having coadjuvant activity for treatment of diabetes and as a diuretic; they are important for animal nutrition because of their high protein content. The hypoglycemic effect was detected when *B. monandra* leaf extract was applied to diabetic rats (Pedrosa *et al*, 2005). A significant decrease in hyperglycaemia was observed following the use of *B. divaricata* [3] however, no hyperglycaemic effect on normal subjects or type 2 diabetic patients was detected with infusions from leaves of *B. forficata* [4].

Lectins can be found in plants, animals, bacteria and viruses, and are involved in countless biological recognition functions [5]. The leguminous lectin family has been studied for several decades using biochemical and biophysical techniques, and is considered a model system for protein-carbohydrate interactions [6].

In plants, the lectins are obtained from legume seeds [7], but could be obtained from different vegetative tissues such as leaves [8], bulbs [9], pods [10], barks [11], roots [12], [13] and fruits [14]. Lectins exist as complex mixtures at a single location within the plant [15], conversely several different tissues of one plant may contain the same lectin [16].

There is still, very scarce literature concerning lectins derived from leaf tissue, despite their potential medicinal applications. *B. purpurea* seeds contain a typical legume lectin (BPA) which has been purified by affinity chromatography on

immobilized N-acetyl-D-galactosamine [17]. BPA is useful for detecting galactose-containing glycoconjugates and mucin-type sugar chains, and can also be used as a marker for Reed-Stenberg cells in Hodgkin's disease [18]. A galactose specific lectin has also been purified from leaves of *Bauhinia monandra* [8].

The isolation and characterization of novel lectins reveal properties which are of practical importance for different areas of biological research. Therefore, the objective of this work was to isolate and partially characterize a lectin from *Bauhinia variegata* leaves (BvaLL).

2.0 MATERIALS AND METHODS

2.1 Plant material:

B. variegata leaves were collected in the city of Igarassú (State of Pernambuco, Northeast of Brazil). A sample of the collected material is achieved, at the herbarium "Dardano de Andrade Lima" (Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária, Recife, Pe, Brazil).

2.2 Preparation of BvaLL from vegetative tissue:

Petioles were removed from fresh material and blades were well washed in stream water followed by distilled water, and allowed to dry at room temperature for 96 h. The dried blades were powdered in a multiprocessor and extracts (10% w/v) were obtained by gentle shaking for 16 h at 4°C in 0.15 M NaCl. The extract was passed through gauze and centrifuged at 6000 g x 15 min at 4°C, which was submitted to 60% (w/v) ammonium sulphate fractionation (F0-60%) by addition of solid salt under low agitation, for 4 h at room temperature. The material was centrifuged at 6000 g x for 15 min at 4 °C; the precipitate was resuspended and followed by dialyses process against distilled water for 2 h (two fold), followed by 0.15 M NaCl.

2.3 Erythrocytes:

Fresh erythrocytes from human (A, B, O, and AB types) were obtained as described by Bukantz *et al.* [19] and they were treated with glutaraldehyde as described by Bing *et al.* [20]

2.4 Reagents:

Sugars, acrylamide and bisacrylamide, as well as chitin were from Sigma. All other reagents used were of analytical grade.

2.5 Hemagglutinating activity (HA):

The hemagglutinating activity assays were performed according to [21]. HA was defined as the lowest sample dilution which showed hemagglutination. Specific hemagglutinating activity (SHA) corresponded to HA divide by the protein concentration.

The hemagglutinating activity inhibition (HAI) was assayed by a twofold serially diluted sample (50 μ l) of BvaLL in solutions, followed by 45 min incubation and addition of erythrocyte suspension. The carbohydrate concentration varied from 0-400 mM and HAI was the minimal concentration of inhibition. The glycoprotein concentration was 300 μ g/ml and HAI is the concentration of inhibition.

2.6 Protein Content Estimation:

The protein concentration of different fractions was measured according to Lowry *et al*, [22] use bovine serum albumine (BSA) as standard. The absorbance at 280 nm was used to estimate the protein concentration in column eluate.

2.7 Sugar specificity:

Carbohydrate binding specificity of the lectin was estimated by HAI using several sugars: D(+)maltose, D(+)mannose, D(+)lactose, D(+)galactose, D(-)fructose, D(+)glucose, and D(+) saccharose, as described by Coelho and Da Silva [8].

2.8 Glycoprotein recognition:

Glycoprotein binding of the lectin was estimated by HAI using several glycoproteins such as: thyroglobulin, asialofetuin, ovalbumin and bovine fetal serum, as described by Coelho and Da Silva [8].

2.9 Purification protocols for BvaLL:

A chitin column was prepared (10,5 cm x 1,1 cm, 10 ml), and equilibrated with 0.15 M NaCl. The fraction (F 0-60) exhaustively dialyzed against distilled water for two changes at an interval of 4 h and saline solution NaCl 0.15 M. A

sample (2 ml, 20.4 mg of protein) was applied to chitin column (flow rate: 20 ml/h). The column was washed with the saline solution until absorbance at 280 nm was near zero. After removing unbound material, lectin was desorbed from the column with 1.0 M acetic acid in equilibrium solution until the absorbance at 280 nm was near zero. Fractions with high activity were pooled and dialyzed with several changes of 0.15 M NaCl until pH 7.0. Each step of purification was monitored for lectin activity by measuring agglutination of specifically prepared rabbit's cells and protein concentration was measured according to Lowry *et al.*, [22] and by absorbance at 280 nm; the material was stored at -20 °C. Part of dialyzed samples obtained was lyophilized.

2.10 Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) of native and denatured protein:

PAGE was performed to native basic protein using a 10% acrylamide gel according to Reisfeld *et al.*, [23] using slab gel (8 x 8 x 1.5 mm), stained either by Starch black and destained by many rinses with acetic acid solution 10% (v/v). Lectin molecular mass was evaluated by SDS-PAGE using a 10% acrylamide gradient gel as describe by Laemmli [24] and stained by Coomassie Brilliant Blue.

Standard protein markers were Phosphorylase B (94 kDa), bovine serum albumin (67 KDa), ovalbumin (43 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa), soybean trypsin inhibitor (20.1 kDa) and α -lactalbumin (14.4 kDa). The standards were purchased from Pharmacia Fine Chemical.

2.11 Heat stability:

The heat stability of HA was determined by incubating lectin solutions at different temperatures (25, 37, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, and 120°C) during 30 min each interval; when the temperature reached 90°C the residual activity was measured [25].

3.0 RESULTS AND DISCUSSION

Several lectins have been purified from leguminous tissues and used in different biological application. Search of new pure lectins is of interest to amplify the knowledge about this class of protein as well as to evaluate if they are responsible for pharmacological activity in plant extracts popularly used.

The genus *Bauhinia* (family Caesalpinaceae) contains more than 300 species described and from those 64 exists in Brazil [26]. Within this genus, *Bauhinia*

variegata var. “*candida*” (unha de vaca) is a small tree with bifoliated leaves and white flowers, native from Eastern Asia [27]. Nowadays, plants of *Bauhinia* genus are widely disseminated in other tropical countries mainly in Brazil and some species have been used in folk medicine to treat several ailments, especially diabetes, in the agriculture as properties antifungicide and antibactericide [28].

The classical and still simplest way to detect the presence of a lectin in material biological is to prepare an extract from the material and examine its ability to agglutinate erythrocytes. Hemmagglutination is commonly assayed by serial dilution technique using erythrocytes from human or rabbits.

For agglutination to occur, the lectin must bind to the cells and form crss-bridge between them. There is however no simple relation between the amount of lectin bound and agglutination. This is because agglutination is affect by many factors among them accessibility of receptor sites and also influenced by external conditions of the temperature, cell concentration, mixing and so on.

The influence of pH on solubility and HA of *B. variegata* was examined, since it contribute to the stability of the protein. A maximum protein content and HA was found at pH 7.0 in 0.15 M NaCl. The charge-charge interactions and salt bridges are factors that contribute to the stability; charges on the surface of protein are generally arranged so that there are more attractive than repulsive interactions near neutral pH [29]. Consequently, these electrostatic interactions will generally contribute favorably to protein stability [30]. Most biochemist still believes that hydrophobic interactions are dominant forces in native protein [31]. Intramolecular hydrogen bonds contribute favorably to protein stability. The contribution that polar groups make to protein stability depends strongly on their environment [32] if they were not hydrogen bonded; consequently, polar group burial may contribute more to protein stability than nonpolar group burial. The Van der Waals interactions are important to the contribution of both polar and nonpolar group burial to protein stability. The pH dependence of protein stability depends mainly on the ionable group.

The HA was detected at pH 7.0 in 0.15 M NaCl by addition of distinct erythrocytes (table 1). The highest HA was detected in ammonium sulphate fractions (0-60%) dialyzed and tested; the highest specific activities were obtained with rabbit cells. Human blood group erythrocytes were poorly agglutinated while rat and chicken erythrocytes showed a good performance.

Following a partial purification by ammonium sulphate (precipitates and stabilizes proteins), the saline extract was fractionated and applied to a chitin beads to isolate BvaLL in milligram quantities.

Chitin was chosen as an affinity chromatography matrix since the natural polysaccharide is a major component of arthropod and crustacean shells, like those of lobsters, shrimps or crabs [33]. Chitin is a polysaccharide that consists of repeated units predominantly from N-acetyl- β -D-glucosamine and will normally contains a small number of β -D-glucosamine in a chain; they are linked together by β -1-4-glycosidic bonds and hence have a relatively rigid configuration [33].

Table 1: Hemagglutination activity of dialyzed fraction (0-60%) with different erythrocytes.

Erythrocytes	Types	F (0 – 60 %) AH (UH/ ml)
Human	A	16
	B	16
	AB	32
	O	32
Rat		1024
Chicken		4096
Rabbit		262144

Note: Hemagglutinate unit (UH) is the quantity of protein applied able to induce erythrocyte agglutination.

Chitin binding proteins retain affinity and specificity [34]. When chitin is used as a chromatography column, the adsorption process depends also on the pH [35]. The biopolymer has functional groups OH, NHCOCH_3 and NH_2 . According to Giles & Hassan [36] the hydroxyl groups of the polymer are strongly hydrated and are virtually incapable of forming hydrogen bonds with the material; nevertheless they can adsorb, by the formation of a hydrogen bond, by Van der Waals interactions.

Chitin binds tightly proteins. In acidic pH, the polymer amino groups were protonated and the polymer chain is positively charged, with a predominance of adsorption process through ion exchange. Van der Waals adsorption, as well as adsorption through hydrogen bonding, is also likely to occur to some extent imparting new properties. This form has been used as an efficient, inexpensive and fast general affinity medium for purification of lectins from land plants.

The use of affinity chromatography was an important tool in the process of purification of *Bauhinia* lectin. Many lectins from this genus were isolate by this

technique. Table 2 shows a summary of the purification procedure used for BvaLL. The elution pattern of chitin column chromatography showed two peaks of protein and HA (Figure 1). The first peak (P1), eluted with saline solution corresponds to the material that was not retained by the column, with high absorbance and no activity. The second peak (P2) eluted with 1.0 M acetic acid, BvaLL, was defined by the properties and characteristics of purified lectin described below. After three reutilizations, followed by equilibration, the chitin matrix purified the lectin with higher SHA values. The lectin yields obtained are represented in Table 4; BvaLL apparently constitutes 6.6% of the total protein. The chitin chromatography was considered by affinity [34][37] however the desorption applied wasn't bioselective.

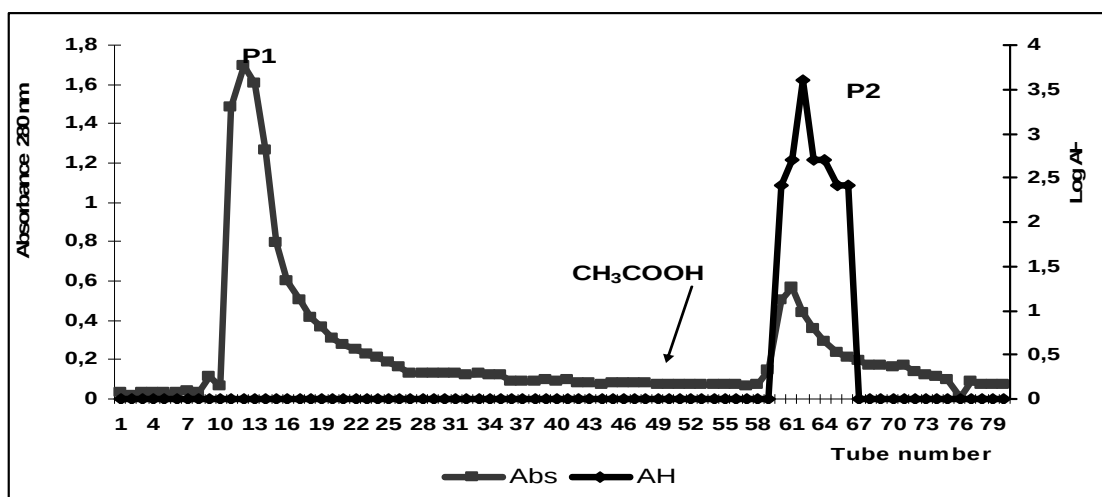


Figure 1 Chitin affinity chromatogram purification. The column was equilibrated and washed with 0.15 M NaCl to remove unbound protein (P1). The lectin (P2) was eluted with 1.0 M acetic acid solution. The lectin sample (2.0 ml containing 20.4 mg of protein with an HA 262144 HU) was applied to a 10 ml column, and fractions (2.0 ml) were collected at 20 ml/h. Absorbance at 280 nm and Log AH were evaluated.

When agglutination does occurs and it is inhibited by mono or oligosaccharides, it serves as an indication that carbohydrate structures for which the lectin is specific are present on the surface of the cell.

Table 2: Yields of BvaLL obtained during the purification of the leaf lectin from *Bauhinia variegata*.

Fraction	Titre	Total Volume	Protein concentration	Specific HA	Total Activity	Yield %
	(HU)	(ml)	(mg)	titre/protein	(titre x vol. x 10 ³)	
Extract	524288	10	18.5	28339	5242	100

(NH ₄) ₂ SO ₄ fractions						
F 0-60 %	262144	17	10.2	25700	4456	85
Chitin matrix						
BvaLL(P2)	4096	84	1.04	3938	344	6.6

The hemagglutination inhibition assays carried out with purified BvaLL revealed that the lectin was inhibited by simple sugars (Table 3) and by glycoprotein (Table 4). The HA of BvaLL was inhibited by galactose (Table 3). This carbohydrate-binding specificity is also characteristic of the lectin isolated from *Bauhinia purpurea* [17] and *Bauhinia monandra* [8].

Carbohydrate-binding sites are often shallow depressions on the surface of the protein [38]. In all cases the combining site appears to be performed [39] since few conformational changes occur upon binding. The steric disposition of hydroxyl groups in carbohydrates creates hydrophobic patches [40] on the sugar surface that can interact with hydrophobic regions of the protein [41].

Table 3: Carbohydrate inhibition of BvaLL hemagglutinating activity.

Carbohydrate	Concentration (mM)*
D (+) – Maltose	NI
D (+) – Mannose	NI
D (+) – Galactose	1,562
D (+) – Lactose	3,125
D (-) - Fructose	3,125
D (+) – Glucose	12.50
D (+) – Saccharose	12.50

*Minimum concentration required to inhibition of hemagglutinating activity.

The inhibition was evaluated by the minimal concentration of carbohydrate required to inhibit 16 HA units

NI = Substance was noninhibitory at concentration of 200 µg/ml

Lectins bind carbohydrates through a network of hydrogen bonds and hydrophobic interactions. Van der Waals forces, although rather weak (usually a fractions of 4.2 kJ/mol for each pair of atoms), are frequently numerous, contributing significantly to the overall binding [42]. Contacts between ligand and protein are often mediated by water molecules. Water acts as a molecular “mortar” [43], its small size and its ability to behave as both hydrogen donor and acceptor make it near-ideal for this function.

Table 4: Glycoprotein inhibition of BvaLL hemagglutinating activity.

GLYCOPROTEIN	Concentration (mM)*	HA (UH)
Bovine fetal serum	500	128
Asyalofetuin	500	32
Thyroglobulin	500	32
Ovalbumin	500	NI

*Minimum concentration required to inhibition of hemagglutinating activity.

NI = Substance was noninhibitory at concentration of 500 µg/ml.

The ability of lectins to distinguish between subtle variations of oligosaccharide structure makes them perfectly suitable as decoders for such carbohydrate-encoded information [38]. In other words, whilst sugar is able to carry biological information, lectins are capable of deciphering this “glicocode”.

Polyacrylamide gel electrophoresis of purified BvaLL preparation, treated with SDS and native for basic protein, showed to be a technique sensitive. The mobility of a macromolecule through a gel under an electric field depends upon its charge on its molecular mass, size and shape [44]. Polyacrylamide gel electrophoresis of the lectin, treated with SDS and β-mercaptoethanol gave only one protein band revealing one homogeneous and dense protein with apparent molecular mass of 14.4 kDa (Figure 2) value very close to molecular weight from the seeds of *Bauhinia variegata* var. *candida* [45].

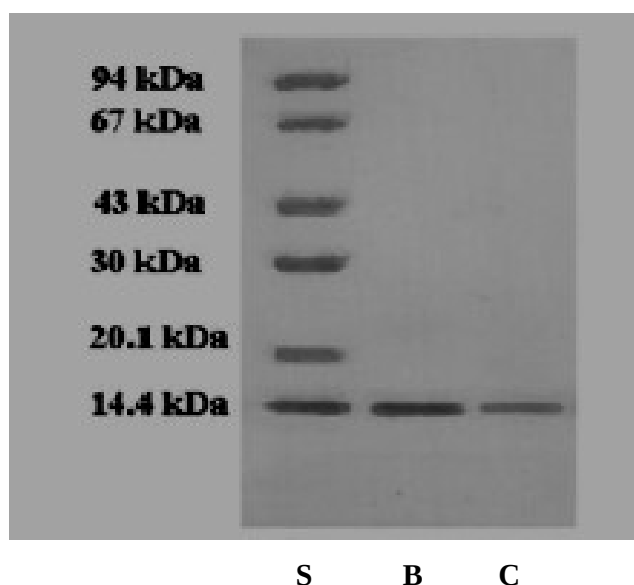


Figure 2: SDS-PAGE of purified BvaLL under denaturing and reducing conditions showing gel stained reagent (C) Coomassie Brilliant Blue (B). S corresponds to protein standard makers (molecular weights showed in kDa).

Native basic proteins (Figure 3) for BvaLL showed homogeneous band by PAGE too, were confirming the purity protein. Comparative SDS-PAGE (Fig 2) under denaturing and reducing conditions and native basic proteins (Fig 2), we can observe that the BvaLL has a band dense and homogenous and pure.

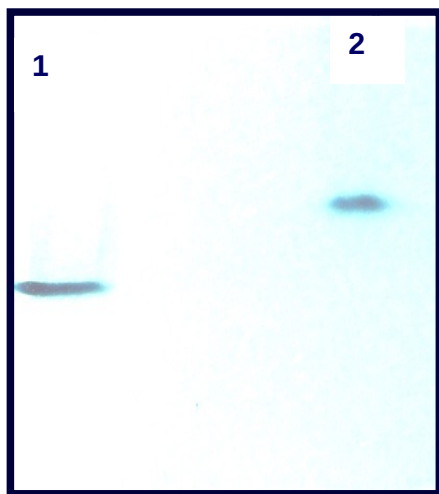


Figure 3. PAGE showing basic BvaLL native protein (2) and cytochrome C (1). The gel was stained with starch black.

Most biochemist still regard hydrophobic interactions as the dominant force in the protein folding, and hydrogen bonding and Van der Waals interactions of polar groups make a contribution to protein stability comparable to that from hydrophobicity [29]. BvaLL was a stable lectin when kept under low temperatures (-20°C for 10 months), when submitted to thermal treatment HA was stable till 45°C (Figure 4). The stability of purified lectin until 90 °C, was retained 75% of its original activity at pH optimum 7.0 and was exhibited the disnature temperature of 120 °C.

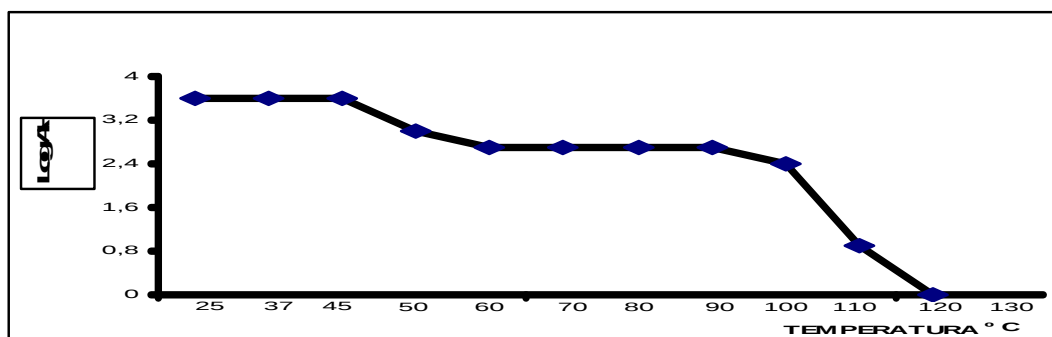


Figure 4: Disnature temperature

4.0 CONCLUSION

Based on experimental results the lectin can be purified on chitin affinity chromatography at room temperature; BvaLL was stable till 45°C at neutral pH. Like other lectins from *Bauhinia* genus, BvaLL showed a primary monosaccharide specificity to galactose. The lectin recognized some glycoproteins and revealed one homogeneous protein band with an apparent molecular mass of 14.4 kDa.

5.0 ACKNOWLEDGMENTS

The authors express their gratitude to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for research grants and fellowship (LCBBC).

6.0 REFERENCES

- [1] Sharon N, Lis H. The structural basis for carbohydrate recognition by lectins. *Adv Exp. Med Biol.* 2001; 491:1-16.
- [2] Peumans W J, Van Damme EJM. Lectin as plant defense proteins. *Plant Physiology.* 1995; 109: 347-352.
- [3] Roman-Ramos R, Alarcon-Aguilar F, Lara-Lemus A, Flores-Saenz JL. Hypoglycaemic effect of plants used in Mexico as anti-diabetics. *Arch Med Biol Res* 1990; 23:11-20.
- [4] Russo EMK, Reichelt AAJ, De-Sá JR, Furlanetto RP, Moisés RCS, Kasamatsu, TS.; Chacra AR Clinical trial of *Myrcia uniflora* and *Bauhinia forficata* leaf extracts in normal and diabetic patients. *Braz J Medl Biol Res* 1990; 23: 11-20.
- [5] Buts L, Dao-Thi, MH, Lotis R, Wyns L, Etzeler M, Hamelryck T. Weak Protein-Protein Interactions in Lectins: The Crystal Structure of Vegetative Lectin from the legume *Dolichos biflorus*. *J Mol Biol* 2001; 309: 193-201.
- [6] Loris R, Hamelryck J, Bouckaert J, Wyns L. Legume lectin structure. *Biochem biophys Acta* 1998; 1389:9-36.
- [7] Wang HX, Ng TB. Purification of *Castamollin*, a novel antifungal protein from Chinese chestnuts. *Protein Expression & Purification* 2003; 32:44-51.
- [8] Coelho, LCBB, Da Silva MBR. Simple Method to Purify Milligram Quantities of the Galactose-Specific Lectin from the Leaves of *Bauhinia monandra*. *Phytochem* 2000; 11: 295-300.

- [9] Mo H.; Van Damme EJP, Peumans WJ, Goldstein I J Purification and characterization of a mannose-specific lectin from shallot (*Allium ascalonicum*) bulbs. Arch Biochem Biophys. 1993; 306(2): 431-8.
- [10] Kamemura K., Furuichi Y., Umekawa H, Takahashi T.; Purification and characterization of a pod lectin from the leaves of Great Northern bean, *Phaseolus vulgaris* L. Biochim Biophys Acta. 1996a; 60(4): 608-11.
- [11] Wititsuwannakul R, Wititsuwannakul D, Skulborirug C. Lectin from the bark of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*). Phytochemistry. 1998; 2(47):183-7.
- [12] Yamashita K, Ohkura T, Umetsu K, Suzuki T. Purification and characterization of a Fuc α 1 $\rightarrow$ 2 Gal β 1 $\rightarrow$ and GalNAc β 1 $\rightarrow$ -specific lectin in root tubers of *Trichosanthes japonica*. J Biol Chem 1992; 267:25414- 22.
- [13] Naeem A, Hasan KR, Vikram H, Akif M. Purification of *Cajanus cajan* root lectin and its interaction with rhizoidal lipopolysaccharide as studied by different spectroscopic techniques. Arch Biochem Biophys 2001;396(1): 99-105.
- [14] Mach L. Scherf W, Ammann M, Poetsch J, Bertsch W, März L, Glössi J. Purification and partial characterization of a novel lectin from elder (*Sambucus nigra* L.) fruit. Biochem J 1991; 278: 667-671.
- [15] Van Damme EJM, Allen AK, Peumans WJ. Isolation and characterization of a lectin with exclusive specificity towards mannose from snowdrop (*Galanthus nivalis*) bulbs. FEBS Lett 1987;215:140-4.
- [16] McPherson A, Hankins CN, Shannon L.; Preliminary X-ray diffraction analysis of crystalline lectins from the seeds and leaves of *Sophora japonica*. J. Biol Chem. 1987; 262:1791- 1794.
- [17] Young MN, Watson DC, Williams RE. Lectins and legume taxonomy. Characterization of the N-acetyl-D-galactosamine specific lectin from *Bauhinia purpurea*. FEBS Letters 1985;182:404-6.
- [18] Sarker AB.; Akagi T, Jeon HJ, Miyake K, Murakami I, Yoshino T, Takashi K, Nose, S. *Bauhinia purpurea*: A new marker for Reed-Stemberg cells of Hodgkin's disease: A comparison with Leu-M1(CD15), LN2 (CD74), peanut agglutinin and BER-H2 (CD30). A J Pathol 1992; 141:19-23.
- [19] Bukantz CSC, Rein LCCR, Kent JF. Studies in complement fixation. Preservation of sheep's blood in citrate dextrose mixtures (modified Elsevier's solution) for use in the complement fixation reaction. J Lab Clin Med 1946; 31: 394-399.
- [20] Bing, DH, Weyand JGM, Stavitsky AB. Haemagglutination with aldehyde-fixed erythrocytes for assay of antigens and antibodies. Proc Soc Exp Biol and Med. 1967; 124:1166-71.

- [21] Correia, MTS, Coelho LCBB Purification of glucose/mannose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart (Camaratu beans). Appl Biochem Biotech 1995; 55: 261-73.
- [22] Lowry DH, Rosebrough NJ, Farr AL. Protein measurement with the folin phenol reagent. The Journal of Biological Chemistry. 1951. v. 193, n. 1; p. 265-275.
- [23] Reisfeld RA, Lewis UJ, Williams DE. Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. Nature;1962;195: 281-283.
- [24] Laemmli UK. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T 4. Nature 1970; 227(5259): 680-85.
- [25] Plumer DT. An introduction to Practical Biochemistry. 2 ed. London: McGraw-Hill,.1978. Cap 3; p. 47-98.
- [26] Lewis, GP. Legumes of Bahia; Kew Botanic Garden; 1987; pp. 369.
- [27] Francis JK, Liogier HA. Naturalized exotic tree species in Puerto Rico. Gen Tech Rep. SO-82 New Orleans: USDA Forest Service Experimental Station. 1991; 12p.
- [28] Silva KL Da, Cechinel Filho V. Plantas do gênero *Bauhinia*: Composição Química e Potencial Farmacológico. Química. nova, 2002; 25(3):449-54.
- [29] Karshikoff, A.; Ladestein, R. Protein from thermophilic and mesophilic organisms essentially do not differ in packing. Prot Eng 1998; 11: 867-872.
- [30] Pace CN, Treviño S, Prabhakaran E, Scholtz M. Protein structure, stability and solubility in water and other solvents. Phil Trans R Soc Lond B: Biol Sc 2004; 359(1448):1225-1235.
- [31] Lodaze, VV, Ermolenko, DN, Makhatadze GI. Thermodynamic consequences of burial of polar and non-polar amino acid residues in the protein interior. J Mol Biol 2002; 320: 343-57.
- [32] Takano K, Scholtz, JM.; Sacchetini JC. Pace CN.; The Contribution of Polar Group Burial to Protein Stability Is Strongly Context-dependent. J Biol Chem. 2003; 34: 31790-95.
- [33] Karthikeyan G, Andal NM, Anbalagan K. Adsorption studies of iron (III) on chitin. J Chem Sci, 2005;117(6): 663-72.
- [34] Minic Z, Leproust-Lecoester L, Laporte J, Kouckovsky Y, Brown SC. Proteins isolate from Lucerne roots by affinity chromatography with sugars analogous to Nod factors moieties. Biochem J. 2000; 345: 255–262.
- [35] Longhiotti E, Pozza F, Furlan L, Sanchez MNM, Klug M, Laranjeira MCM, Fávere VT. Adsorption of Anionic Dyes on the Biopolymer Chitin. Journal of the Brazilian Chemical Society, 1998; v.9; n.5 .p. 435-440.
- [36] Giles, CH, Hassan ASA. J. Soc. Dyers Col 1958; 74: 846

- [37] Trindade, MB, Lopes, JL, Sores-Costa, A, Monteiro-Moreira, AC, Moreira, RA, Oliva, ML, Beltramini, LM. Structural Characterization of novel chitin-binding, lectins from the genus *Artocarpus* and their antifungal activity. *Biochem. Biophys. Acta.*, 2006, v. 1764, n. 1. p. 146-52.
- [38] Ambroisi N, Cameron NR, Davis BG. Lectins: tools for the molecular understanding of the glycode. *Org Biomol Chem.* 2005; 3:1593-608.
- [39] Weis WI, Drickamer K. Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. *Ann Rev Biochem.* 1996; 65:441-73.
- [40] Davis, BG. Recent Developments in Glycoconjugates. *J chem Soc. Perkin Trans* 1999; 1: 3215 – 37
- [41] Rini JM. Lectin structure. *Annu Rev Biophys. Biomol Struct* 1995; 24: 551-77.
- [42] Lis, H, Sharon N. Carbohydrate specific proteins that mediate cellular recognition; *Chem Rev* 1998; 98(2): 637-74.
- [43] Toone, EJ. Structure and energetic of protein-carbohydrate complexes. *Curr Opin Struct Biol.* 1994; 4: 719-28.
- [44] Goldenberg, DP. In *Protein Structure, a Practical Approach*. 1989. Creight, T. E. edition pp 225-250 . IRL/Oxford University Press. Oxford
- [45] Di Ciero L, Oliva MLV, Torquato R, Köhler P, Weder JKP, Novello JC, Sampaio CAM, Oliveira B, Marangoni S. The Complete Amino Acid Sequence of a Trypsin Inhibitor from *Bauhinia variegata* var. *candida* Seeds. *Journal of Protein Chemistry*; 1998; 17(8): 827-834;

CAPÍTULO IV - CONCLUSÃO

1.0 CONCLUSÕES

1- NaCl 0,15 M permite a estabilidade da lectina durante o processo de purificação e na estocagem.

2-Purificação por cromatografia de afinidade em coluna de quitina apresentou um rendimento em lectina de 6,6 %.

3-Atividade hemaglutinante foi fortemente inibida por D(+)-galactose e glicoproteínas de soro fetal bovino.

4-Eletroforese contendo SDS revelou uma única banda protéica com um peso molecular aparente de 14,4 kDa.

5-BvaLL aglutinou eritrócitos de coelho e manteve estabilidade térmica em 75% da atividade original até a temperatura a 90 °C e teve uma temperatura de desnaturação de 120 °C

ANEXOS – BIOLOGICALS: GUIDE FOR AUTHORS

<http://www.elsevier.com/wps/find/authorshome.authors/languagepolishing>
Guide for Authors

Submission checklist

It is hoped that this list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal's Editor for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

- ;One Author designated as corresponding Author
- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers
- All necessary files have been uploaded
- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations:

- Manuscript has been "spellchecked"
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Colour figures are clearly marked as being intended for colour reproduction on the Web (free of charge) and in print or to be reproduced in colour on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only colour on the Web is required, black and white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please contact the Author Support Department at authorsupport@elsevier.com

Submission of articles

It is essential to give a fax number and e-mail address when submitting a manuscript. Articles must be written in good English.

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

Upon acceptance of an article, Authors will be asked to transfer copyright (for more information on copyright see <http://authors.elsevier.com>). This transfer will ensure the widest possible dissemination of information. A letter will be sent to the corresponding Author confirming receipt of the manuscript. A form facilitating transfer of copyright will be provided.

If excerpts from other copyrighted works are included, the Author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by Authors in these cases: contact Elsevier's Rights Department, Oxford, UK: phone (+44) 1865 843830, fax (+44) 1865 853333, e-mail permissions@elsevier.com. Requests may also be completed on-line via the Elsevier homepage (<http://www.elsevier.com/locate/permissions>).

US National Institutes of Health (NIH) voluntary posting (" Public Access") policy

Elsevier facilitates author posting in connection with the voluntary posting request of the NIH (referred to as the NIH "Public Access Policy", see <http://www.nih.gov/about/publicaccess/index.htm>) by posting the peer-reviewed author's manuscript directly to PubMed Central on request from the author, after formal publication. Upon notification from Elsevier of acceptance, we will ask you to confirm via e-mail (by e-mailing us at NIHauthorrequest@elsevier.com) that your work has received NIH funding (with the NIH award number, as well as the name and e-mail address of the Principal Investigator) and that you intend to respond to the NIH request. Upon such confirmation, Elsevier will submit to PubMed Central on your behalf a version of your manuscript that will include peer-review comments, for posting 12 months after the formal publication date. This will ensure that you will have responded fully to the NIH request policy. There will be no need for you to post your manuscript directly to PubMed Central, and any such posting is prohibited. Individual modifications to this general policy may apply to some Elsevier journals and its society publishing partners.

Authors' rights As an author you (or your employer or institution) may do the following: - make copies (print or electronic) of the article for your own personal use, including for your own classroom teaching use - make copies and distribute such copies (including through e-mail) of the article to research colleagues, for the personal use by such colleagues (but not commercially or systematically, e.g., via an e-mail list or list server) - post a pre-print version of the article on Internet websites including electronic pre-print servers, and to retain indefinitely such version on such servers or sites - post a revised personal version of the final text of the article (to reflect changes made in the peer review and editing process) on your personal or institutional website or server, with a link to the journal homepage (on <http://www.elsevier.com>) - present the article at a meeting or conference and to distribute copies of the article to the delegates attending such a meeting - for your employer, if the article is a 'work for hire', made within the scope of your employment, your employer may use all or part of the information in the article for other intra-company use (e.g., training) - retain patent and trademark rights and rights to any processes or procedure described in the article - include the article in full or in part in a thesis or dissertation (provided that this is not to be published commercially) - use the article or any part thereof in a printed compilation of your works, such as collected writings or lecture notes (subsequent to publication of your article in the journal) - prepare other derivative works, to extend the article into book-length form, or to otherwise re-use portions or excerpts in other works,

with full acknowledgement of its original publication in the journal

Should Authors be requested by the Editor to revise the text, the revised version should be submitted within 8 weeks. After this period, the article will be regarded as a new submission.

Online submission to the journal prior to acceptance

Submission to this journal proceeds totally online. Use the following guidelines to prepare your article. Via the "Author Gateway" page of this journal (<http://authors.elsevier.com/>) you will be guided stepwise through the creation and uploading of the various files. The system automatically converts source files to a single Adobe Acrobat PDF version of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail and via the Author's homepage, removing the need for a hard-copy paper trail.

The above represents a very brief outline of this form of submission. It can be advantageous to print this "Guide for Authors" section from the site for reference in the subsequent stages of article preparation.

General points

We accept most wordprocessing formats, but Word, WordPerfect Always keep a backup copy of the electronic file for reference and safety. Save your files using the default extension of the program used.

Wordprocessor documents

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. Do not embed "graphically designed" equations or tables, but prepare these using the wordprocessor's facility. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Author Gateway's Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/locate/issn/10451016>). Do not import the figures into the text file but, instead, indicate their approximate locations directly in the electronic text and on the manuscript. See also the section on Preparation of electronic illustrations.

To avoid unnecessary errors, you are strongly advised to use the "spellchecker" function of your wordprocessor.

Presentation of manuscript

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Italics are not to be used for expressions of Latin origin, for example, *in vivo*, *et al.*, *per se*. Use decimal points (not commas); use a space for thousands (10 000 and

above).

Language Polishing

For authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit

<http://www.elsevier.com/wps/find/authorshome.authors/languagepolishing> or contact authorsupport@elsevier.com for more information. Please note Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our Terms & Conditions:

http://www.elsevier.com/wps/find/termsconditions.cws_home/termsconditions

General Presentation

Provide the following data on the title page (in the order given).

Title

Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

Author names and affiliations

Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the Authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the Author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each Author.

Corresponding Author

Clearly indicate who is willing to handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.**

Present/permanent address

If an Author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent address") may be indicated as a footnote to that Author's name. The address at which the Author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

Abstract.

A concise and factual abstract is required (maximum length 200 words). The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separate from the article, so it must be able to stand alone.

References should therefore be avoided, but if essential, they must be cited in full, without

reference to the reference list.

Non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 5 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field at their first occurrence in the article: in the abstract but also in the main text after it. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Arrangement of the article

Subdivision of the article

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ?), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to "the text". Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Materials and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them.

Acknowledgements

Place acknowledgements, including information on grants received, before the references, in a separate section, and not as a footnote on the title page.

References

See separate section, below.

Figure captions, tables, figures, schemes.

Present these, in this order, at the end of the article. They are described in more detail below. High-resolution graphics files must always be provided separate from the main text file (see Preparation of illustrations).

Text graphics.

Present incidental graphics not suitable for mention as figures, plates or schemes at the end of the article and number them "Graphic 1", etc. Their precise position in the text can then be indicated. See further under the section, Preparation of illustrations. Ensure that high-resolution graphics files are provided, even if the graphic appears as part of your normal wordprocessed text file.

Tables.

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

Nomenclature and units.

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult:

IUPAC: Nomenclature of Organic Chemistry: <http://www.iupac.org/>

IUPAC: Nomenclature of Inorganic Chemistry: <http://www.iupac.org/>

IUB: Biochemical Nomenclature and Related Documents:

<http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/>

- Proprietary substances - on first mention provide the name and address of the manufacturer.
- Concentrations of solutions - preferably defined in terms of normality (N) or molarity (M). The term % must be restricted to the sense g/100g. For ml/100ml the terms % (v/v) and % (w/v) must be used except for concentration up to 1% or where the context makes the usage obvious, e.g. 5% serum.
- Viruses - refer to by their vernacular names but the use of a hallmark, such as a cryptogram or other reference label, is encouraged. Descriptions of newly isolated or newly recognized viruses should include, where possible, biochemical, morphological and cultural information which will enable other or related strains of the virus to be recognized by other workers.
- Bacteria - on first mention refer by generic and specific names, the former capitalized and both underlined (*Bacillus anthracis*); subsequently the generic name may be abbreviated to a capital letter and a stop (B. anthracis) if the context makes the meaning clear. When generic names are used as vernacular names ('tests were made to distinguish the various bacillus species'); the generic name is used with a lower case initial letter and is not underlined.
- Abbreviations - The following are acceptable without definition, although care should be exercised in their use in the title of an article.

Abbreviations that do not need to be defined

- ATCC American Type Culture Collection
- BCG Bacille Calmette-Guerin
- CCID50 median cell culture infective dose
- CCTD50 median cell culture toxic dose
- CF complement fixation
- cfu colony forming units

- cpe cytopathic effect
- cpm counts per minute
- DEAE-cellulose diethylaminoethyl-cellulose
- DF degrees of freedom
- DNA deoxyribonucleic acid
- eop efficiency of plating
- HA haemagglutination
- HAI haemagglutination inhibition
- IgA immunoglobulin A
- ID50 median infective dose
- IgE immunoglobulin E
- IgG immunoglobulin G
- IgM immunoglobulin M
- ImD50 median immunizing dose
- IU International Unit
- Lf Flocculation unit
- LD50 median lethal dose
- MIC minimum inhibiting concentration
- NCTC National Collection of Type Cultures
- PAGE polyacrylamide gel electrophoresis
- P probability
- PD50 median paralytic dose
- pfu plaque forming unit
- RBC erythrocyte
- RNA ribonucleic acid
- SDS sodium dodecyl sulphate
- SD standard deviation
- SEM Standard error of the mean
- WBC leucocyte

Preparation of supplementary data. Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the Author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data is provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at the Author Gateway at <http://authors.elsevier.com/artwork>.

Policy and ethics.

The work described in your article must have been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans; <http://www.wma.net/e/policy/b3.htm> EC Directive 86/609/EEC for animal experiments; <http://europa.eu.int/scadplus/leg/en/s23000.htm> This must be stated at an appropriate point

in the article.

References

Responsibility for the accuracy of bibliographic citations lies entirely with the Authors.

Citations in the text:

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either "Unpublished results" or "Personal communication" Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication.

Citing and listing of web references

As a minimum, the full URL should be given. Any further information, if known (Author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual Authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Listing of references:

Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. J Sci Commun 2000;163:51-9.

Reference to a book:

[2] Strunk Jr W, White EB. The elements of style. 3rd ed. New York: Macmillan; 1979.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. Introduction to the electronic age, New York: E-Publishing Inc; 1999, p. 281-304

Note shortened form for last page number. e.g., 51-9, and that for more than 6 Authors the first 6 should be listed followed by "et al." For further details you are referred to "Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals" (J Am Med Assoc 1997;277:927-934) (see also http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/terms_cond.html).

Journal names should be abbreviated according to

Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>

The digital object identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by

the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal *Physics Letters B*):

doi:10.1016/j.physletb.2003.10.071

When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, they are guaranteed never to change.

Preparation of electronic illustrations

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Helvetica, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide all illustrations as separate files and as hardcopy printouts on separate sheets.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://authors.elsevier.com/artwork>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please "save as" or convert the images to one of the following formats (Note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below.):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as "graphics".

TIFF: Colour or greyscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (colour or greyscale): a minimum of 500 dpi is required.

DOC, XLS or PPT: If your electronic artwork is created in any of these Microsoft Office applications please supply "as is".

Please do not:

- Supply embedded graphics in your wordprocessor (spreadsheet, presentation) document;
- Supply files that are optimised for screen use (like GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;

- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Line drawings

The lettering and symbols, as well as other details, should have proportionate dimensions, so as not to become illegible or unclear after possible reduction; in general, the figures should be designed for a reduction factor of two to three. The degree of reduction will be determined by the Publisher. Illustrations will not be enlarged. Consider the page format of the journal when designing the illustrations.

Do not use any type of shading on computer-generated illustrations.

Photographs (halftones)

Remove non-essential areas of a photograph. Do not mount photographs unless they form part of a composite figure. Where necessary, insert a scale bar in the illustration (not below it), as opposed to giving a magnification factor in the caption.

Note that photocopies of photographs are not acceptable.

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable colour figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in colour on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. For colour reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for colour in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://authors.elsevier.com/artwork>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting colour figures to "grey scale" (for the printed version should you not opt for colour in print) please submit in addition usable black and white versions of all the colour illustrations.

Proofs

When your manuscript is received by the Publisher it is considered to be in its final form. Proofs are not to be regarded as "drafts".

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding Author, to be checked for typesetting/editing. No changes in, or additions to, the accepted (and subsequently edited) manuscript will be allowed at this stage. Proofreading is solely your responsibility.

One set of page proofs will be sent to the corresponding Author, to be checked for typesetting/editing. No changes in, or additions to, the accepted (and subsequently edited) manuscript will be allowed at this stage. Proofreading is solely your responsibility.

A form with queries from the copyeditor may accompany your proofs. Please answer all queries and make any corrections or additions required.

The Publisher reserves the right to proceed with publication if corrections are not communicated. Return corrections within 5 days of receipt of the proofs. Should there be no corrections, please confirm this.

Elsevier will do everything possible to get your article corrected and published as quickly and accurately as possible. In order to do this we need your help. **When you receive the (PDF) proof of your article for correction, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication. Subsequent corrections will not be possible, so please ensure your first sending is complete. Note that this does not mean you have any less time to make your corrections, just that only one set of corrections will be accepted.**

