



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

**Compostos bioativos de duas espécies de *Libidibia*
ferrea: caracterização e propriedades biológicas**

CARLOS EDUARDO SALES DA SILVA

RECIFE – 2015

CARLOS EDUARDO SALES DA SILVA

Compostos bioativos de duas espécies de *Libidibia ferrea*: caracterização e propriedades biológicas

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco para o cumprimento parcial das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pernambuco.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Tereza dos Santos Correia

2015

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Silva, Carlos Eduardo Sales da
Compostos bioativos de duas espécies de *Libidia férrea*: caracterização e propriedades biológicas / Carlos Eduardo Sales da Silva- Recife: O Autor, 2015.

114 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Maria Tereza dos Santos Correia

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Ciências Biológicas, 2015.

Inclui referências e anexos

1. Lectinas 2. Água- purificação 3. Química vegetal I.
Correia, Maria Tereza dos Santos (orientadora) II. Título

572.6

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017-066

Compostos bioativos de duas espécies de *Libidibia ferrea*: caracterização e propriedades biológicas

CARLOS EDUARDO SALES DA SILVA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco para o cumprimento parcial das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pernambuco.

Banca examinadora:

Prof^a. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia – Presidente

Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão – 1º examinador

Prof^a. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva – 2º examinador

Prof^a. Dra. Márcia Vanusa da Silva – 3º examinador

Prof. Dr. Emmanuel Viana Pontual – 4º examinador

Resultado: Aprovado

Data: 26/02/2015

*Ao meu pai (em memoria), a minha
mãe, aos meus filhos, minha esposa
e minha irmã que mesmo em
momentos difíceis me fizeram
acreditar que mesmo depois de
uma tempestade, o sol sempre
nasce.*

Ofereço

A Deus

Dedico

AGRADECIMENTOS

Primeiramente sou grato a Deus, por ter-me dado o privilégio de existir, por estar ao meu lado em todos os momentos de minha vida dando condições para que eu chegasse até aqui, pelas vitórias, pelas alegrias, pelas pedras no caminho e pela saúde.

Ao meu Pai que durante toda sua vida me ensinou a sonhar e a batalhar pelo que é meu. Meu eterno e sinceros agradecimentos.

A minha mãe, Linda, e a minha irmã, Andréa, por terem sido a base sólida na qual eu sempre pude me apoiar na subida de todos os degraus de minha vida, pelo carinho e confiança a mim dedicados.

A minha querida família, Nathalie, João Gabriel e Pedrinho pelo carinho, apoio e paciência nas horas difíceis desta reta final da minha caminhada, jájá vamos recuperar o tempo perdido.

Quero agradecer de coração a Prof.^a Maria Teresa dos Santos Correia, que desde a graduação, me founou, me apresentou o mundo da pesquisa como nenhum professor havia me proposto anteriormente, sempre com boa vontade, me apoiando e incentivando; por sua orientação e mais ainda pela paciência, permitido que meu sonho se tornasse realidade.

Aos meus amigos e companheiros de trabalho, João Neto e Maria Eduarda, pela ajuda nos experimentos, paciência, pelos altos e baixos, pelos almoços no chinês... kkkkkkkk... mais acima de tudo pela sinceridade da amizade que foram essenciais para a concretização deste trabalho.

Aos Meus amigos desde o curso de extensão em bioquímica: Luis e Douglas, pela convivencia, cumplicidade e mesmo na distância por fazerem parte da minha vida.

A todos os amigos que fazem parte do Laboratório de Bioquímica de Proteínas do Departamento de Bioquímica da UFPE, pela convivência, ajuda, amizade e apoio: Lidiane, Francis, Felipe, Nataly, Fernando, “Mano”, a dupla: Rose e Carina, Larissa, Poly, Thâmarah, Thamara, os IC's (Caio, Leydiane, Sueden, Carol), os Caras (David, Cláudio, Bernardo), Ana Paty, Mãe Livia, Aline (pelo seu jeito descontraído), por Ray e Mychely e muitos outros que esqueci no momento, porque nossa família é muito grande.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Bioquímica da UFPE, em especial a Prof^a Marcia, Miron, Djalma, Katia, João Virgílio e Maria Reis (inspiração) pelo apoio e ajuda constante.

Aos meus chefes Thiago Herique e Patrícia Paiva, pela vivência, pela paciência, pela compreensão e por sempre estarem disponíveis para o trabalho, muito obrigado, me sinto muito acolhido em nosso laboratório.

Aos meus amigos “Joselitos de Biomedicina”: Camilla, Jônatas, John, Matheus, Gabriella, Paulo e Thiago pela amizade durante graduação, pelo incentivo, companheirismo durante boa parte desta jornada.

RESUMO

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não imunológica, que aglutinam células e precipitam carboidratos e seus derivados sem alterar suas estruturas covalentes. Neste trabalho foram extraídas 2 lectinas de *Libidibia ferrea*, planta com ampla distribuição no Brasil e conhecida vulgarmente como pau-ferro, uma lectina foi extraída da vagem de *Libidibia ferrea* var. *ferrea* (LifeFPL) e outra da entrecasca da *Libidibia ferrea* var. *leiostachya* Benth (LifeLBL). O processo de obtenção das lectinas puras incluem: a extração das farinhas (vagens ou entrecascas) em NaCl 0,15 M, fracionamento salino com sulfato de amônio, e cromatografia de afinidade em quitina. Para a LifeFPL, que já foi previamente purificada e caracterizada, foi determinada a presença de uma atividade coagulante de partículas em água. Quando incubada com o Caolin, LifeFPL apresentou atividade semelhante ao controle positivo, sulfato de alumínio, apresentando uma melhora significativa desta atividade quando o pH do meio encontra-se básico e diminuindo sua atividade coagulante na presença de íons. LifeLBL (lectina da entrecasca de *Libidibia ferrea* var. *leiostachya*) foi caracterizada parcialmente através de ensaios da inibição da atividade hemaglutinante, eletroforese (PAGE-SDS e 2D) e estudos de fluorescência, além disso, realizou-se o perfil fitoquímico de preparações da planta e determinou-se a atividade antioxidante dessas preparações e a afinidade a ácidos húmicos (AHu). Houve uma diminuição significativa da AH de LifeLBL na presença de ácido húmico. A LifeLBL continuou ativa após aquecimento à 100 °C e apresentou duas bandas por SDS-PAGE e cromatografia em gel filtração em Superdex 75-30 revelou dois picos proteicos com 19 e 15 kDa. Na eletroforese 2D a massa molecular estimada foi de 20 e 15 kDa e o pI de 4,53 e 5,14. A AH de LifeLBL foi inibida parcialmente por N-acetil-D-glicosamina e totalmente por albumina bovina serica. Em relação aos AHu, a LifeLBL teve sua afinidade por ácido húmico aumentada quando alcalinizado o meio e reduzida na presença de íons metálicos, provavelmente por modificação estrutural do AHu. Os testes fitoquímicos revelaram que as amostras lectínicas da entrecasca de *L. ferrea* var. *leiostachya* Benth apresentaram: proantocianidinas condensadas, taninos hidrossolúveis e flavanóide, sendo que a amostra purificada por cromatografia de afinidade em quitina foi isenta de componentes do metabolismo secundário. Em conclusão, uma lectina, termoestável (LifeLBL) foi parcialmente inibida por N-acetil-D-glicosamina e ácido húmico, sendo obtida da entrecasca de *L. ferrea* por cromatografia de afinidade em quitina. LifeLPL foi capaz de coagular partículas de caolin em suspensão em água. Os resultados obtidos neste trabalho reforçam a importância de se caracterizar proteínas e ensaiar suas propriedades biológicas.

Palavras-chave: *Libidibia férrea*. Lectina. Caracterização parcial. Ácidos húmicos. Tratamento de água.

ABSTRACT

Lectins are proteins or glycoproteins of non-immunological origin, which bind cells and precipitate carbohydrates and their derivatives without changing their covalent structures. In this work two lectins were extracted from *Libidibia ferrea*, a plant widely distributed in Brazil and commonly known as ironwood, a lectin was extracted from the *Libidibia ferrea* var. *Ferrea* (LifeFPL) and another of the bark of *Libidibia ferrea* var. *Leiostachya* Benth (LifeLBL). The process of obtaining pure lectins includes: extraction of flours (pods or skim) in 0.15 M NaCl, saline fractionation with ammonium sulfate, and chitin affinity chromatography. For LifeFPL, which was previously purified and characterized, the presence of a coagulant activity of particles in water was determined. When incubated with Caolin, LifeFPL presented similar activity to the positive control, aluminum sulfate, showing a significant improvement of this activity when the pH of the medium is basic and decreasing its coagulant activity in the presence of ions. LifeLBL (*Libidibia ferrea* var. *Leiostachya*) lectin was partially characterized by inhibition of hemagglutinating activity, electrophoresis (PAGE-SDS and 2D) and fluorescence studies, and the phytochemical profile of plant preparations. And the antioxidant activity of these preparations and the affinity to humic acids (HuA) were determined. There was a significant decrease in LifeLBL AH in the presence of humic acid. LifeLBL continued active after heating to 100 ° C and presented two bands by SDS-PAGE and gel filtration chromatography on Superdex 75-30 revealed two 19 and 15 kDa protein peaks. In 2D electrophoresis the estimated molecular weight was 20 and 15 kDa and the pI was 4.53 and 5.14. LifeLBL AH was partially inhibited by N-acetyl-D-glucosamine and entirely by serine bovine albumin. In relation to HuA, LifeLBL had its affinity for increased humic acid when alkalized the medium and reduced in the presence of metallic ions, probably due to structural modification of HuA. The phytochemical tests revealed that the lectin samples from *L. caste* var. *Leiostachya* Benth presented: condensed proanthocyanidins, water soluble tannins and flavonoids, and the sample purified by chitin affinity chromatography was free of components of secondary metabolism. In conclusion, a thermostable lectin (LifeLBL) was partially inhibited by N-acetyl-D-glucosamine and humic acid, and was obtained from *L. ferrea* binders by chitin affinity chromatography. LifeLPL was able to coagulate kaolin particles in suspension in water. The results obtained in this work reinforce the importance of characterizing proteins and assaying their biological properties.

Key words: *Libidibia ferrea*. Lectin. Partial characterization. Humic acid. Water treatment.

LISTA DE ABREVIATURAS

AGE	Equivalente de ácido gálico	HPLC	Do inglês <i>high-performance liquid chromatography</i> , cromatografia líquida de alta performance.
AH	Atividade Hemaglutinante		
AHAc	Ácidos haloacéticos		
AHu	Ácido húmico	LifeFPL	Lectina da vagem de <i>Libidibia ferrea</i> var. <i>ferrea</i>
BIL	Lectina extraída do veneno de cobra de <i>Bothrops leucurus</i>	LifeLBL	Lectina da entrecasca de <i>Libidibia ferrea</i> var. <i>leiostachya</i> Benth
BSA	Do inglês <i>bovine serum albumin</i> , albumina bovina sérica.	MBL	Lectina ligadora de manose
CEL-III	Lectina de <i>Cucumaria echinata</i>	MOD	Matéria orgânica dissolvida
cMoL -	Lectina coagulante de <i>Moringa oleífera</i>	PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo
COT	Carbono orgânico total	pH	Potencial de hidrogênio
Cramoll 1	A isolectina 1 da semente de <i>Cratylia mollis</i>	QE	Equivalentes de quercertina
CSE	Carboidratos da superfície celular dos eritrócitos		
DBPs	Do inglês <i>disinfection by-products</i> , subprodutos decorrentes do processo de desinfecção	RNM	Ressonância Nuclear Magnética
DNA	Ácido desoxiribonucleico	SH	Substâncias húmicas
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil.	SHA	Atividade hemaglutinante específica
EB	Extrato Bruto	SPF ou FPS	Fator de proteção solar
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético	THMs	Trihalometanos
EM	Extrato metanólico		
F0-80	Fração proteica		

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema do ensaio de atividade hemaglutinante (AH) e inibição da AH	16
Figura 2: Isolamento de lectina através de cromatografia de afinidade.	19
Figura 3: Exemplos de aplicações biotecnológicas das lectinas	22
Figura 4: aspecto morfológico da <i>Libidibia ferrea</i> var. <i>ferrea</i>	24
Figura 5: <i>Libidibia ferrea</i> var. <i>leiostachya</i> Benth.	25
Figura 6: etapas do tratamento convencional de água.	30
Figura 7: Mecanismo de Coagulação.	31

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo geral	13
2.2 Objetivos específicos	13
CAPITULO 1: FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
1. Lectinas: Pequeno Histórico, Definição e Classificação	15
1.1 Extração, Isolamento e Caracterização Estrutural de Lectinas	18
1.2 Aplicações Biológicas das lectinas	22
2. Libidibia ferrea	23
3. Antioxidantes	26
3.1 Métodos de Determinação da Atividade Antioxidante	28
4. Tratamento da água	29
4.1 Substâncias Húmicas: Contaminantes de Água	32
5. Ensaio hemolítico	35
REFERÊNCIAS	36
CAPITULO 2: Artigo a ser submetido ao periódico Phytochemistry	52
CAPITULO 3: Artigo a ser submetido ao periódico Food And Bioproducts Processing	82
CAPITULO 4: Artigo a ser submetido ao periódico. Bioresource Technology	99
3 CONCLUSÕES	114

INTRODUÇÃO

O fornecimento de água potável e tratamento de águas residuais tornaram-se grandes desafios em muitas partes do mundo (KOKABIAN & GUDE, 2013), pois as retiradas de água para usos diversos têm aumentado cerca de 2 a 3 vezes em comparação ao crescimento populacional, principalmente associadas com elevados padrões de vida e altas taxas de urbanização (GUDE, 2015). Além disso, a saúde humana pode ser afetada pelo acesso inadequado à água potável, especialmente em países de baixa e média renda (KAYSER et al., 2015). A cada ano, milhões de crianças vão a óbito nesses países, vítimas de infecções causadas por água contaminada; é necessário, então, para se adequar ao consumo humano, que a água seja tratada, o que ocorre em etapas sucessivas (coagulação, floculação, sedimentação, filtração e cloração) em estações de tratamento (PATERNIANI et al., 2009).

A matéria orgânica natural (MON) é geralmente composta por uma variedade de compostos orgânicos de diferentes pesos moleculares, sendo responsável por odor, sabor e cor na água potável e têm elevado potencial para formar subprodutos durante o processo de desinfecção (DBPs, do inglês *disinfection by-products*) (YU & GREGORY, 2013; ZHU et al. 2014). A MON é subdividida em dois grupos: o primeiro é chamado de **substâncias não húmicas** (proteínas, aminoácidos, carboidratos, ácidos graxos, entre outros compostos orgânicos com características físico-químicas bem definidas) e o segundo é chamado de **substâncias húmicas** (ácidos húmicos, ácidos flúvicos e húmina). O ácido húmico (AHu) é constituído por macromoléculas policíclicas aromáticas com uma variedade de grupos funcionais de elevada massa molecular e é responsável por cerca de 50-90% da matéria orgânica total de água doce, além de ser reconhecido como o principal gerador de DBPs (SHI et al., 2007). Assim, a remoção eficaz de AHu presente na água tornou-se cada vez mais importante durante o tratamento de água. Coagulação e floculação são os processos mais utilizados para remover AH e partículas coloidais em água potável, água do mar e águas residuais (CHEKLI et al. 2015).

Os coagulantes mais utilizados em estações de tratamento são: sulfato de alumínio e cloreto de polialumínio. Contudo, estudos têm mostrado que o alumínio pode induzir a doença de Alzheimer (FERREIRA et al., 2008), aumentando o interesse por coagulantes naturais de origem vegetal, por esses geralmente apresentarem baixa toxicidade, serem biodegradáveis, possuírem

baixo índice de produção de lodos residuais e apresentarem baixo custo (CARVALHO, 2008; PATERNIANI et al., 2009).

O Laboratório de Bioquímica de Proteínas do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) vem investigando as potencialidades biológicas de lectinas isoladas de plantas da região da Caatinga em Pernambuco. Uma das plantas encontrada neste bioma é a *Libidibia (Caesalpinia) ferrea*, que pertence à família Fabaceae-Caesalpinioideae (Caesalpinaceae), sendo conhecida popularmente por pau-ferro ou jucá (LORENZI, 2008). No Nordeste, encontramos quatro subespécies de *L. ferrea*, sendo três da Caatinga (*L. ferrea* (Mart. ex Tul.) var. *ferrea* L.P.Queiroz, *L. ferrea* var. *glabrescens* (Benth.) L.P.Queiroz, comb. nov. e *L. ferrea* var. *parvifolia* (Benth.) e uma da Mata Atlântica (*L. ferrea* var. *leiostachya* Benth.) (QUEIROZ, 2009). O pau-ferro é bastante utilizado pela medicina popular, sendo suas diferentes partes utilizadas no tratamento de várias doenças e sintomas.

As lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não imunológica, que aglutinam células e precipitam carboidratos e seus derivados sem alterar suas estruturas covalentes (PEUMANS & VAN DAMME, 1995; ARREGUÍN-ESPINOSA & ARREGUÍN-LOZANO, 1997; ASHRAF & KHAN, 2003; WU et al., 2009, WANG et al., 2011). As lectinas apresentam diferentes especificidades de reconhecimento de carboidratos. Quando devidamente caracterizadas, podem servir aos mais diferentes propósitos. Santos et al (2009, 2012) e Ferreira et al (2011) realizaram experimentos de coagulação com lectinas purificadas de sementes de *Moringa oleifera* e observaram que elas apresentam um bom potencial coagulante, podendo ser utilizadas no tratamento da água com elevada turbidez.

Sendo assim, a proposta deste estudo foi purificar e caracterizar lectina extraídas da entrecasca de *L. ferrea* var. *leiostachya* e avaliar sua afinidade por substâncias húmicas, bem como purificar uma lectina da vagem de *L. ferrea* var. *ferrea* e avaliar sua atividade coagulante em água turva.

OBJETIVOS

Objetivos Gerais

- Purificação e caracterização parcial de uma lectina extraída da entrecasca de *Libidibia ferrea* var. *leiostachya* Benth e aplicações biológicas de uma lectina purificada da vagem de *L. ferrea* var. *ferrea* L.P. Queiroz.

Objetivos Específicos

- Purificar a lectina da vagem de *L. ferrea* var. *ferrea* L.P. Queiroz (LifeFPL) e uma lectina da entrecasca de *L. ferrea* var. *leiostachya* Benth (LifeLBL) através de cromatografia de afinidade;
- Avaliar a composição fitoquímica de extrato metanólico (EM) da entrecasca de *L. ferrea* var. *leiostachya* Benth, como de preparação lectínicas (extrato salino, fração proteica e amostra cromatografada).
- Avaliar a atividade hemaglutinante da LifeLBL em presença de diferentes eritrócitos, íons, valores de pH e temperaturas;
- Caracterizar LifeLBL por eletroforese unidimensional e bidimensional em condições desnaturantes (SDS-PAGE) e espectroscopia de fluorescência;
- Avaliar a inibição da Atividade Hemaglutinante de LifeLBL na presença de diferentes carboidratos;
- Avaliar a inibição da Atividade Hemaglutinante da lectina da entrecasca de *Libidibia ferrea* var. *leiostachya* Benth na presença de ácidos húmicos;

- Avaliar o efeito de íons metálicos e diferentes valores de pH sobre a ação dos ácidos húmicos na AH de LifeLBL;
- Pesquisar a presença de atividade antioxidante de LifeLBL, bem como das preparações da entrecasca de *L. ferrea* var. *leiostachya* Benth;
- Averiguar a presença de fator de proteção solar (FPS) nas preparações da entrecasca de *L. ferrea* var. *leiostachya* Benth;
- Quantificar a fenóis totais e flavanóides das preparações da entrecasca de *L. ferrea* var. *leiostachya* Benth;
- Determinar a atividade coagulante de LifeFPL na presença de Caolin.
- Determinar graus de hemólise *in vitro* em eritrócitos humanos do tipo O, tratados com LifeFPL.

CAPITULO 1

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1. Lectinas: Pequeno Histórico, Definição e Classificação

Desde meados do século 19, é conhecida a ocorrência na natureza de proteínas aglutinantes de eritrócitos. Nos anos 60, notou-se que essas proteínas (as lectinas) poderiam aglutinar outros tipos de células e que algumas delas eram específicas para determinados tipos de carboidratos. A partir da década de 70 essas proteínas ganharam maior importância, pois foi demonstrado que elas eram ferramentas extremamente úteis para a investigação de carboidratos em superfícies celulares (em particular as alterações de carboidratos que sofrem as células ao se tornarem malignas), assim como eram eficientes para isolamento e caracterização de glicoproteínas. Nos anos seguintes, numerosas lectinas foram isoladas de plantas, microrganismos e animais, sendo descritas diversas atividades biológicas e aplicações dessas proteínas (SHARON & LINS, 2004).

Podemos definir lectinas como proteínas de origem não-imune que possuem pelo menos um domínio não catalítico, que se liga especificamente e reversivelmente a diferentes tipos de mono ou oligossacarídeos, sem alterar as suas estruturas covalentes, podendo ou não conter sítios catalíticos (RÜDIGER & GABIUS, 2001; ZHANG et al., 2009; WANG et al., 2011). Devido à sua habilidade de interagir com carboidratos, essas lectinas podem interagir com componentes glicídicos presentes na superfície de células e tecidos provenientes dos mais diversos seres vivos (GUZMÁN-PARTIDA et al., 2004). As lectinas são o tipo de fatores anti-nutricionais mais predominantes em leguminosas e cereais (HE et al., 2014).

Comumente, a presença de lectinas em materiais biológicos é avaliada através de suas capacidades de aglutinar eritrócitos. O processo denominado de aglutinação se deve ao fato das lectinas promoverem a formação de ligações cruzadas entre células adjacentes quando interagem com glicoconjugados da superfície de células diferentes, formando a rede de aglutinação (FIGURA 1 A) (PEUMANS & VAN-DAMME, 1995; ALONSO et al., 2001; SANTOS et al., 2013).

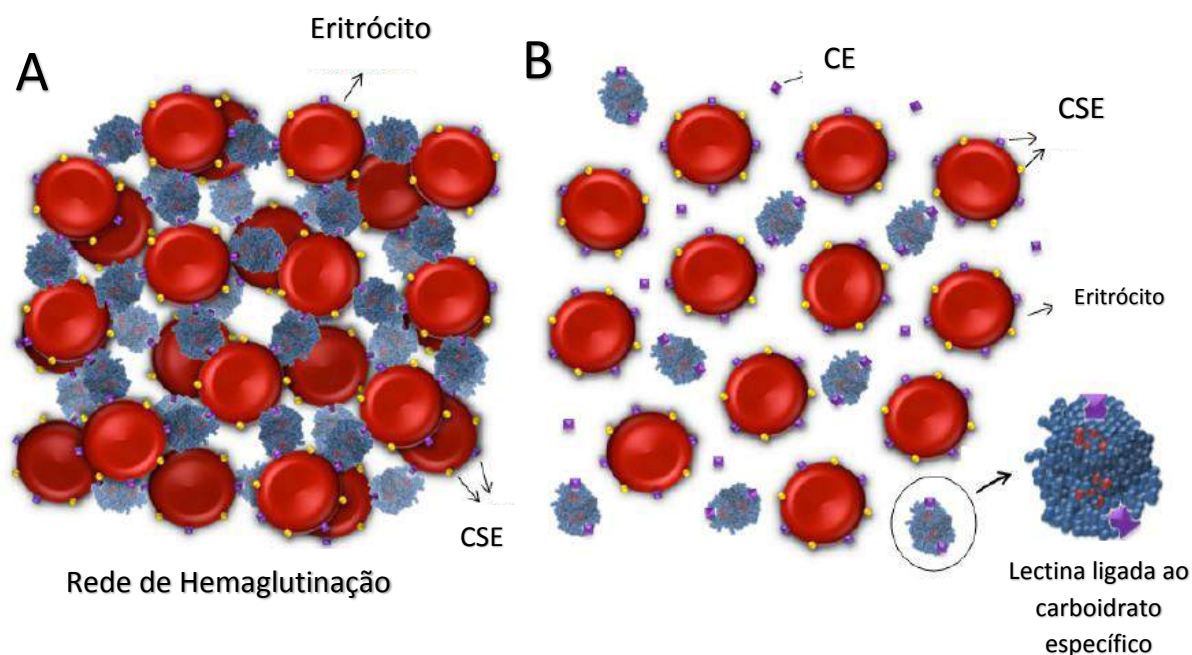


Figura 1: Esquema do ensaio de atividade hemaglutinante (AH) e inibição da AH. (A) a amostra lectínica induz hemaglutinação através da ligação aos carboidratos da superfície celular dos eritrócitos (CSE). (B) A inibição da AH ocorre quando uma amostra lectínica é incubada com carboidratos previamente à adição dos eritrócitos; a ligação aos carboidratos específicos (CE) à lectina impede a formação da rede de hemaglutinação. **FONTE: SANTOS et al. (2013).**

Todavia, para comprovar que o agente hemaglutinante é uma lectina, se fazem necessários ensaios de inibição da atividade hemaglutinante (FIGURA 1 B). O ensaio de inibição da AH, utilizando diferentes carboidratos, serve para a análise da especificidade de uma lectina (CAVADA et al., 2000; KAWAGISHI et al., 2001). Os açúcares simples, glicoconjugados ou polissacarídeos livres competem com os carboidratos presentes na superfície dos eritrócitos pela ligação a lectina (GABOR et al., 2001; NG & YU, 2001).

Baseado nas suas especificidades de ligação por monossacarídeos, as lectinas podem ser divididas nos grupos ligadores de: (a) glicose e manose, (b) manose, (c) D-galactose, (d) N-acetilglicosamina ou (e) ácido siálico (WONG & NG, 2006). A classificação das lectinas de acordo com sua especificidade por carboidratos é baseada no monossacarídeo que causa a maior inibição da aglutinação de eritrócitos induzida pela lectina, ou na precipitação de polímeros que contêm carboidratos (HAJTÓ et al., 2005). Contudo, a classificação das lectinas por afinidade de ligação a carboidratos varia bastante na literatura. Esta especificidade pode ser relacionada também aos

demais monossacarídeos como fucose e também aos oligossacarídeos complexos, além da especificidade por glicoproteínas (GUZMÁN-PARTIDA et al., 2004).

De acordo com Peumans e Van Damme (1995) podemos classificar as lectinas de acordo com sua estrutura geral, propriedades de aglutinação e precipitação, em três grupos: **merolectinas**, **hololectinas** e **quimerolectinas**. As **merolectinas** são proteínas que apresentam um único domínio de ligação a carboidrato (monovalentes), e portanto, são incapazes de precipitar glicoconjugados ou aglutinar células. As **hololectinas** são exclusivamente formadas por domínios de ligação a carboidratos, porém apresentam dois ou mais desses domínios, idênticos ou homólogos. Esse é o grupo ao qual pertencem as maiores das lectinas, as quais possuem múltiplos sítios de ligação e por isso são capazes de aglutinar células e precipitar carboidratos. **Quimerolectinas** são proteínas de fusão que possuem domínio(s) de ligação a carboidrato arranjado(s) com um domínio não relacionado, podendo ter atividade catalítica bem definida ou outra atividade biológica, atuando independentemente do domínio de ligação a carboidrato.

Posteriormente, Peumans e Van Damme (1998a) introduziram um novo termo nesta classificação: as **superlectinas**, que são proteínas com dois sítios de ligação específicos a carboidratos estruturalmente diferentes, ou seja, capazes de reconhecer dois carboidratos diferentes. Um exemplo de superlectina é a encontrada no bulbo da tulipa, a qual possui dois sítios, um específico para manose e o outro específico para N-acetilgalactosamina (PEUMANS & VAN DAMME, 1998).

Lectinas são amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em microrganismos, plantas, animais e humanos, atuando como mediadores de vários eventos biológicos cruciais de reconhecimento proteína-carboidratos, assim como na comunicação celular, interação parasita-hospedeiro, metástase, inflamação, etc (CAVADA et al., 2001; SHARON, 2007).

Muitas lectinas de sementes são proteínas secretadas, o que significa que elas entram no sistema secretor e, posteriormente, acumulam-se em vacúolos, na parede da célula ou em espaços intercelulares. Por exemplo, as lectinas concanavalina A, aglutinina de soja, fitohemaglutinina, lectina de ervilha e favina estão todas presentes em níveis bastante elevados, acumuladas em vacúolos nos cotilédones (8-10% da proteína total), e em níveis mais baixos nos eixos embrionários das sementes. Estas lectinas são sintetizadas durante o desenvolvimento da semente em conjunto com as mais abundantes proteínas de armazenamento (NASI et al., 2009). As lectinas podem desempenhar um papel importante nos mecanismos de defesa das plantas contra o ataque de fungos e insetos, principalmente as lectinas que se ligam à quitina, um polissacarídeo de N-

acetilglicosamina, que constitui um elemento estrutural importante na parede celular de muitos fungos fitopatogênicos, bem como do exoesqueleto e do trato digestivo dos insetos (BUUL et al., 2014).

A maioria das lectinas que foram investigadas profundamente têm sido isoladas de plantas, particularmente de membros da família Fabaceae (*Leguminosae*). Lectinas de legumes são um grupo amplo de proteínas que compartilham um alto grau de semelhança estrutural com especificidades aos carboidratos distintos (TEIXEIRA et al., 2012). A família Fabaceae é subdividida em 3 subfamílias: Faboidae (Papilionoideae), Caesalpinoidae (ou Caesalpinaceae) e Mimosoideae (ou Mimosaceae). As leguminosas são de enorme importância para a alimentação humana, sendo culturas cruciais para a agricultura sustentável, além de fornecerem celulose para produção de papel e madeira para produção de carvão, constituírem fontes de produtos químicos e medicamentos, sendo, também, cultivadas como ornamentais, usadas como cercas vivas e aceiros (MOREL et al., 2012).

1.1. Extração, Isolamento e Caracterização Estrutural de Lectinas

As proteínas de plantas são geralmente extraídas em soluções e tampões aquosos, obtendo-se assim o extrato bruto que é, então, clarificado por centrifugação; As proteínas presentes no extrato são fracionadas por meio de precipitação como, por exemplo, utilizando saturação por sulfato de amônio. A purificação de proteínas se faz através de técnicas cromatográficas de acordo com a massa molecular (cromatografia de filtração em gel), carga iônica (cromatografia de troca iônica) ou afinidade de ligação (cromatografia de afinidade) (NELSON & COX, 2011).

Aproveitando-se da afinidade específica para carboidratos (ou glicoproteínas), as lectinas de plantas são mais facilmente isoladas por cromatografia de afinidade, utilizando-se fases estacionárias contendo derivados de açúcares ou açúcares imobilizados (COELHO et al., 2012). O esquema apresentado na **figura 2** ilustra o princípio desse método, onde dentre várias substâncias presentes no extrato ou fração proteica, apenas a lectina deve se ligar à matriz (suporte). As moléculas que possuem nenhuma ou baixa afinidade com a matriz passam pela coluna sem serem retidas. Após a ligação ao suporte, as lectinas são eluídas por deslocamento competitivo da coluna

por um tampão contendo uma alta concentração de açúcar competidor ou mesmo por alteração do pH e/ou força iônica do meio, tornando o complexo lectina-matriz menos estável, que leva à sua dissociação (COLLINS et al., 2006).

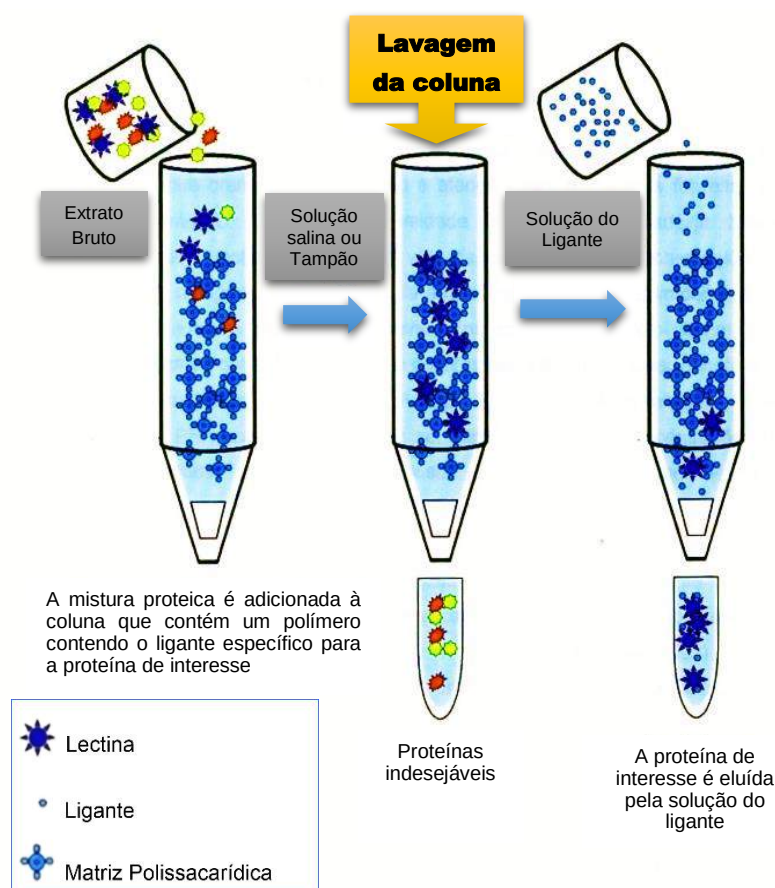


Figura 2. Isolamento de lectina através de cromatografia de afinidade. As proteínas que se ligam especificamente ao suporte polissacarídico são as lectinas. As proteínas não-adsorvidas são lavadas da coluna e a lectina é eluída por uma solução contendo o ligante livre. **FONTE: AUTOR.**

Lectinas específicas para glicose/manose e seus derivados podem ser purificadas com o uso de géis de dextranas, comercialmente disponíveis como Sephadex (KOSHTE et al., 1990). Aquelas com especificidade para galactose, podem ser isoladas usando suportes comercializados como Sepharose (ZHOU et al., 2014) e goma guar (SILVA et al., 2012). As lectinas específicas para N-acetil-D-glicosamina e seus oligossacarídeos, podem ser isoladas empregando-se como suporte de afinidade a quitina (CARVALHO et al., 2015).

Um refinamento de métodos de cromatografia é a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *high-performance liquid chromatography*), onde são utilizadas bombas de alta

pressão que aceleram o movimento das moléculas de proteína através da coluna, reduzindo o tempo de trânsito. O HPLC pode limitar o espalhamento difusional das bandas de proteínas e assim aumentar significativamente a resolução (NELSON & COX, 2011).

Em todas as etapas de purificação das lectinas deve-se realizar tanto a AH (para verificar se a molécula continua ativa - teste qualitativo) quanto a dosagem proteica (para demonstrar a eficiência do método utilizado para purificação – teste quantitativo). São utilizados vários métodos fotolorimétricos para quantificar proteínas, dentre eles, podemos citar: método de biureto (GORNALL et al., 1949), método de Lowry (LOWRY et al., 1951), o método de Bradford (BRADFORD, 1976), método de Smith (SMITH et al., 1985), e medição da absorção de ultravioleta por proteínas (STOSCHECK, 1990; ZAIA et al., 1998).

Após o isolamento, realiza-se a caracterização por meio da determinação de diferentes propriedades físico-químicas da lectina, o que envolve métodos diversos como avaliação da AH com eritrócitos de diferentes espécies animais (coelho, galinha, sistema sanguíneo ABO), bem como em presença de íons e após incubação em diferentes valores de pH e temperatura (COELHO & SILVA, 2000; OLIVEIRA et al., 2008). Os ensaios hemaglutinantes modificando-se o pH do meio são necessários para caracterizar a especificação da ligação a carboidratos e/ ou glicoconjugados. Ensaios realizados com a presença ou ausência de diferentes íons são necessários para a determinação da dependência ou não das lectinas por íons para exercerem suas atividades biológicas. Algumas lectinas de leguminosas contêm Mn^{2+} e Ca^{2+} como elementos essenciais para sua atividade. Como exemplo, a lectina de *E. speciosa* é uma metaloproteína que contém Mn^{2+} e Ca^{2+} e, quando tratada com agente quelante sua AH é totalmente abolida sendo a mesma restaurada após adição desses íons (KONOZY et al., 2003).

A estabilidade térmica das lectinas é bastante variável e pode ser testada através da determinação da determinação da AH de uma lectina após aquecimento ou resfriamento em diferentes temperaturas. Lectinas de diversas fontes mostraram-se estáveis após serem mantidas congeladas por meses ou anos, após sucessivos congelamentos e descongelamentos (CORREIA & COELHO, 1995) ou mantidas por poucos dias em temperatura ambiente (RAY et al., 1992). Algumas lectinas apresentam estabilidade de atividade hemaglutinante mesmo em elevadas temperaturas como é o caso da lectina coagulante de *Moringa oleífera* (cMoL) que foi capaz de aglutinar eritrócitos mesmo após ter sido aquecida a 100°C por 7 horas (SANTOS et al., 2009).

Conforme mencionado anteriormente, a AH de uma lectina pode ser inibida por um carboidrato específico. O teste é chamado de ensaio de inibição da atividade e é importante para a

determinação da especificidade de uma lectina (MARQUES & BARRACCO, 2000; HAMID et al., 2013). O teste é realizado com monossacarídeos simples ou carboidratos complexos. Muitas lectinas não se ligam a mono ou dissacarídeos, mas requerem glicanos complexos ou glicoconjugados para inibição da AH (PEUMANS & VANDAMME, 1998a,b).

Para a caracterização físico-química de lectinas puras, pode ser realizada eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) contendo SDS, que sob condições redutoras, revela o grau de pureza, a composição e a massa molecular de subunidades (REYNOSO-CAMACHO et al., 2003). A eletroforese bidimensional (2D-PAGE) pode ser uma ferramenta útil na caracterização físico-química de lectinas, através dela pode-se determinar o ponto isoelétrico de uma proteína, bem como a massa molecular. A caracterização físico-química de lectinas é importante para explicar suas funções em diferentes processos biológicos (CORREIA et al., 2008).

Uma outra forma de caracterização de lectinas é a caracterização estrutural, onde se pode determinar a estrutura tridimensional da molécula proteica. Assim como para as demais proteínas, essa estrutura pode ser obtida por meio da cristalografia por raios-X, microscopia crioeletrônica e espectroscopia por RNM. A estrutura primária pode ser obtida por degradação de Edman. A cristalografia por raios-X fornece as estruturas mais detalhadas, mas requer a cristalização da proteína, o que muitas vezes não é possível. A microscopia eletrônica é mais utilizada para grandes complexos proteicos difíceis de cristalizar. Apenas proteínas relativamente pequenas são adequadas para análise por RMN (LODISH, 2005; FERREIRA et al., 2013).

Pesquisas em estruturas de biomoléculas são potencialmente úteis para resolver problemas bioquímicos e para eventuais desenvolvimentos de novos agentes terapêuticos (SILVA-LUCCA et al., 2006). As interações carboidrato-lectina, bem como sua afinidade, têm sido elucidadas e discutidas com bastante precisão graças ao arsenal de técnicas como modelagem, RNM, micro calorimetria e mapeamento químico de complexos de um ligante com diferentes lectinas; ainda, microarrays contendo diferentes carboidratos podem ser utilizados além de eletroquímica (RÜDIGER et al., 2000; HAYASHIDA et al., 2003; NEUMANN et al., 2004, OLIVEIRA et al., 2008; ZHANG et al., 2013).

1.2. Aplicações Biológicas das lectinas

No laboratório, as lectinas são usadas para obter conhecimentos em processos biológicos essenciais, incluindo a proliferação celular, apoptose, metástase de células neoplásicas, tráfego e migração de leucócitos, e especialmente infecção microbiana (BUUL et al., 2014). As lectinas são amplamente utilizadas para o estudo de glicoconjugados em solução e na superfície de células (SHARON, 2008), bem como são utilizadas como ferramentas para novas técnicas, tais como microarrays para a análise de glicanos e glicoproteínas (HU et al., 2012), e em novas técnicas para armazenamento de dados, em que os hidratos de carbono são utilizados como hardware para codificação de informações (GABIUS et al., 2011).

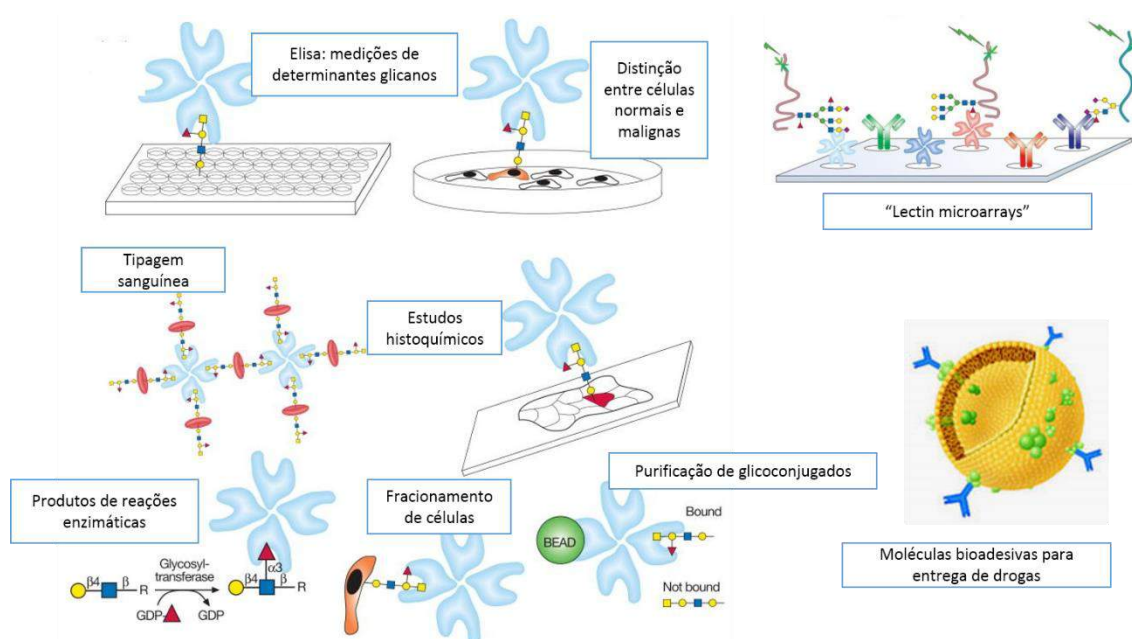


Figura 3: Exemplos de aplicações biotecnológicas das lectinas: aglutinação de células e tipagem sanguínea, fracionamento de células, identificação e seleção de células mutantes com glicosilação alterada, células tumorais, caracterização histoquímica, purificação e caracterização de glico-conjugados, moléculas para produção de lipossomas furtivos, entre outras. **Adaptado:** CUMMINGS & ETZLER (2009).

Também são usadas como uma ferramenta bioinseticida (OLIVEIRA et al., 2011), para a identificação de antígenos ocultos de *Fasciola hepatica* (MCALLISTER et al., 2011), para a indução de apoptose de células T (SAKAI et al., 2011) e para o diagnóstico de infecções por

microrganismos (GEMEINER et al., 2009). Além disso, devido às suas propriedades de ligação a carboidratos, as lectinas têm sido amplamente utilizadas para a purificação de glicoconjugados (CUMMINGS, 2008), investigação e monitoramento de mecanismos moleculares (HIRABAYASHI et al., 2013) e a entrega ou direcionamento de drogas (JAIN et al., 2012) (Figura 3).

Na literatura, são descritas utilizações terapêuticas para as lectinas para diversas doenças, tais como agentes antivirais contra o vírus da imunodeficiência humana (ZIOŁKOWSKA & WLODAWER, 2006), da hepatite C (TULLIS et al., 2009), do cancro (LEGNANI, 2008) e da influenza A (CHANG et al., 2011). Assim, várias aplicações práticas tem sido encontradas para as lectinas a partir de suas características biológicas específicas.

2. Libidibia ferrea

Libidibia (Caesalpineae) ferrea, planta que pertence à família Fabaceae, da sub-família Caesalpinioideae, é conhecida popularmente como “pau-ferro” ou “jucá” (BRAGANÇA et al., 1996; LORENZI, 2008). *Libidibia ferrea* pertence a um grupo de espécies muito semelhantes que se distribui principalmente em florestas secas do Neotrópico. *L. ferrea*, particularmente, apresenta uma variação intraespecífica extremamente complexa e difícil de interpretar, com muitos intermediários entre ela e outras espécies afins. O conceito atual é, praticamente, o mesmo apresentado por Benthams (1870) que incluiu em *L. ferrea* os espécimes do leste do Brasil, com quatro variedades (FORD 1995, como *Caesalpinia*). Segundo Queiroz (2009), três destas variedades ocorrem na Caatinga (*Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) var. *ferrea* L.P.Queiroz, *Libidibia ferrea* var. *glabrescens* (Benth.) L.P.Queiroz, comb. nov. e *Libidibia ferrea* var. *parvifolia* (Benth.) L.P.Queiroz, comb. nov.) e a quarta (*Libidibia ferrea* var. *leiostachya* Benth.) é mais característica da Mata Atlântica.

A variedade *ferrea* está morfológicamente representada na Figura 4. Esta planta apresenta-se com 10 a 15 metros de altura, com tronco fenestrado e curto, revestido por casca em placas finas e ramos pouco lenticelados. As folhas são alternas espiraladas, compostas e bipinadas. As flores são amarelas, dialipétalas, dispostas em panículas apicais e axiliares. O fruto é uma vagem indeiscente, muito dura, marrom, contendo poucas sementes por fruto. É uma árvore bastante ornamental, principalmente por sua copa arredondada, baixa e rala e pelo florescimento

exuberante; pode ser empregada na arborização de ruas e avenidas. Apresenta ampla dispersão, porém geralmente em baixa densidade populacional (LORENZI, 2008).

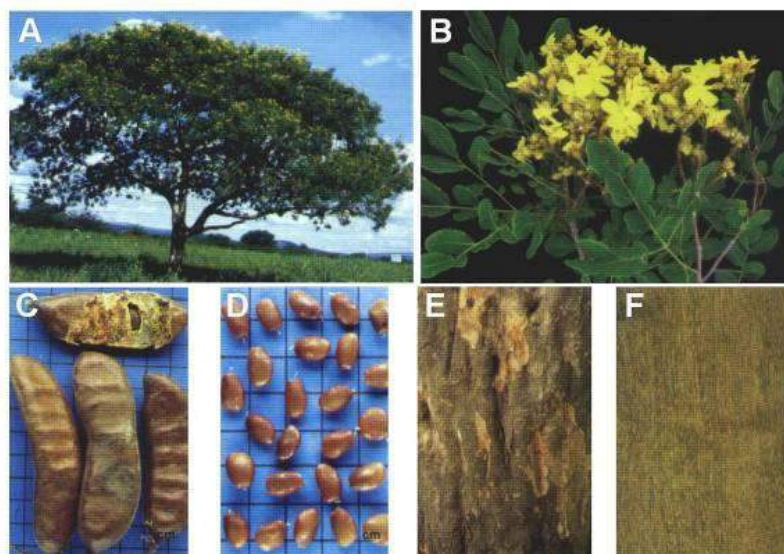


Figura 4: Aspecto morfológico da *Libidibia (Caesalpineia) ferrea* var. *ferrea*; árvore (A); flores e folhas (B); vagem (C); sementes (D); tronco visão externa (E); tronco visão interna (F) fonte: Lorenzi (2008)

A Figura 5 representa o aspecto morfológico da variedade *leiostachya*. Apresenta-se com 20-30 m de altura, com tronco pouco fenestrado, liso e marmorizado, revestido por uma casca com ritidoma laminado. Os ramos novos são letincelados e as folhas compostas bipinadas. As flores são encontradas em panículas terminais e são amarelas. O fruto é uma vagem lustrosa e indeiscente. Devido à facilidade com que seus ramos são quebrados pelo vento, o plantio dessa árvore deve ser evitado em locais de grande movimentação. Ocorre preferencialmente em várzeas e fundo de vales onde o solo é fresco e úmido. Apresenta dispersão irregular, quase sempre em baixa densidade populacional (LORENZI, 2008).

As variedades da *L. ferrea* apresentam uma multiplicidade de usos: ornamental, podendo ser aproveitada para plantios em áreas degradadas; podem ser utilizadas na construção civil (como vigas, esteios, estacas), por ter madeira de cerne muito duro, de fibras reversas, o que dá origem ao nome popular da espécie; são utilizadas como lenha e na carpintaria (PENNA, 1946; PIO CORRÊA, 1984; LORENZI, 2008). Na medicina popular encontram-se vários usos para *L. ferrea*, sendo suas diferentes partes utilizadas no tratamento de várias doenças e sintomas. Em face de sua importância etnomédica, o Ministério da Saúde brasileiro incluiu esta espécie na Lista Nacional de Plantas Medicinais importantes para o Sistema de Saúde (VASCONCELOS et al., 2004).

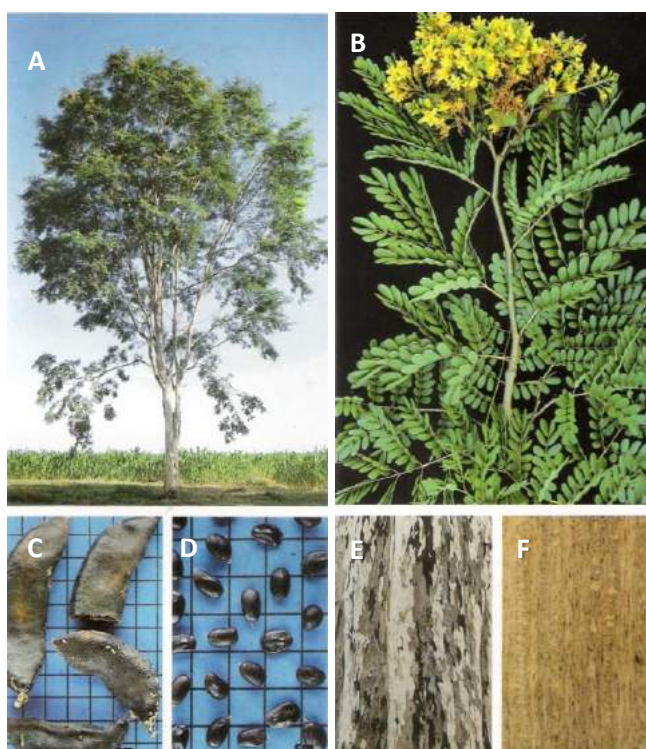


Figura 5: *Libidibia (Caesalpineia) ferrea* var. *leiostachya*.
 (A) Aspecto geral. (B) Folhas. (C) Vagem. (D) Sementes. (E) Entrecasca. (F) Madeira. **Fonte: LORENZI, 2008.**

Um estudo fitoquímico preliminar realizado González et al. (2004) identificou no extrato hidroalcoólico do caule da planta a presença de flavonóides, taninos, cumarinas, esteróides e derivados antracênicos. O paufferrol A, um derivado de chalcona isolado da casca de *L. ferrea*, apresentou importante inibição da DNA-topoisomerase II e indução da apoptose de células leucêmicas (NOZAKI et al., 2007). Em 2014, Araújo et al. encontraram ácido gálico e catequinas nos extratos aquosos da entrecasca de *L. ferrea* (Mart.) var. *ferrea*; além disso, observaram atividade antimicrobiana de amplo espectro para bactérias gram positivas e gram negativas, bem como, atividade antiinflamatória e analgésica. Menezes et al. (2007) demonstraram que o extrato aquoso da casca de *L. ferrea* promoveu vasodilatação da artéria mesentérica de ratos. A casca de *L. ferrea* apresentou atividade cicatrizante em lesões cutâneas de caprinos (OLIVEIRA et al., 2010) e apresentou atividade hipoglicêmica em ratos Wistar (VASCONCELOS et al., 2011). Extratos e frações polissacarídicas de vagens de *L. ferrea* exibiram potente atividade anti-inflamatória (PEREIRA et al., 2012).

Além disso, tem sido demonstrado que extratos aquosos de sementes da planta possuem atividades enzimáticas (celulase e amilase), atividades anticoagulantes e potencial atividade contra

larvas de *Aedes aegypti* (CAVALHEIRO et al., 2009). Extratos etanólicos da vagem de *L. ferrea* apresentaram atividade antiinflamatória e analgésica em camundongos (LIMA et al., 2012). Extratos hidroalcoólicos da vagem de *L. ferrea* apresentaram atividade antioxidante e capacidade de proteção de DNA contra danos induzidos por radicais hidroxilas (DA SILVA et al., 2011). Foram isolados parcialmente inibidores de tripsina de extratos aquosos de sementes de *L. ferrea*, com atividade antifúngica contra fungos fitopatógenos (BARIANI et al., 2012). Extratos aquosos da entrecasca e vagem de *L. ferrea* apresentaram atividade antioxidante e hepatoprotetora, e estudos cromatográficos demonstraram a presença de compostos fenólicos, principalmente o ácido gálico e epicatequina (BARROS et al., 2014).

A utilização e a comercialização de extratos aquosos e alcoólicos, farinha de diversos tecidos e da vagem de *C. ferrea* para aplicações na medicina popular desperta o interesse desta planta para estudos biotecnológicos (XIMENES, 2004). Lectinas com atividades antimicrobianas dos diferentes tecidos (vagem, folha e entrecasca) de *L. ferrea* foram purificadas no Laboratório de Bioquímica de Proteínas – CCB/UFPE. A lectina purificada da vagem de *L. ferrea* (LifePL) mostrou-se pura após cromatografia, não sendo observados contaminantes do metabolismo secundário, além de apresentar atividade antifúngica, antibacteriana e inseticida (XIMENES, 2009). Extratos e fração proteica da vagem de *L. ferrea* exibiram atividade anti-inflamatória, antinociceptiva, artemicida e moluscicida, antibacteriana e antifúngica de amplo espectro (FREITAS et al., 2012).

3. Antioxidantes

As reações oxidativas e o processo respiratório, que ocorrem nas células aeróbicas, levam à formação de radicais livres, que são danosas ao organismo e contribuem para o aparecimento de muitas efermidades, tais como: inflamações, tumores malignos, mal de Alzheimer e doenças cardiovasculares, além de acelerarem o processo de envelhecimento (SIKORA et al., 2008). Por isso, para alcançar uma proteção eficiente, o organismo humano desenvolveu sistemas de defesa para lidar com o estresse oxidativo. Essa defesa inclui sistemas enzimáticos (superóxido dismutase, catalases, glutathione peroxidase e sistemas tio redox) e sistemas não-enzimáticos

(glutathione, a bilirrubina, os hormônios sexuais estrogênicos, o ácido úrico, a coenzima Q, a melanina, a melatonina, o α -tocoferol e o ácido lipóico) (McLEAN et al., 2005).

Os antioxidantes são substâncias que em baixas concentrações, através de um ou mais mecanismos retardam ou previnem a velocidade da oxidação, prevenindo o desenvolvimento de muitas doenças e contribuindo para uma maior longevidade (MORAES, 2013).

Os principais antioxidantes encontradas nos alimentos vegetais são as vitaminas C e E, os carotenóides e os compostos fenólicos, especialmente os flavonóides. Esses antioxidantes absorvem radicais livres e inibem a cadeia de iniciação ou interrompem a cadeia de propagação das reações oxidativas promovidas pelos radicais (PODSEDEK, 2007). Além da ingestão de frutas e vegetais, que são recomendados como fontes de compostos antioxidantes, acredita-se que a suplementação da dieta com ervas, contendo altas concentrações de compostos capazes de desativar radicais livres, tenha também efeitos benéficos (CAPECKA; MARECZEK; LEJA, 2004). Estudos epidemiológicos mostraram haver uma estreita correlação entre o consumo de frutas e uma redução no risco de doenças crônicas. Acredita-se que a combinação de vitaminas, minerais, compostos fenólicos antioxidantes e fibra seja responsável pelo efeito desejado. (VASCO; RUALES; KAMAL-ELDIN, 2008).

As substâncias antioxidantes podem agir em diversas etapas do processo oxidativo e são classificadas, segundo seu mecanismo de ação, em duas categorias principais: antioxidantes primários e secundários. São considerados primários os compostos de ação antioxidante capazes de inibir ou retardar a oxidação por inativação de radicais livres, através da doação de átomos de hidrogênio ou de elétrons, estabilizando os radicais. Os antioxidantes secundários apresentam uma grande variedade de modos de ação: ligação de íons metálicos (alteração de valência); inativação de espécies reativas de oxigênio (ERO), conversão de hidroperóxidos em espécies não-radicalares ou absorção de radiação UV (MAISUTHISAKUL; SUTTAJIT; PONGSAWATMANIT, 2007).

A busca por antioxidantes naturais para produtos alimentícios, cosméticos e farmacêuticos vem representando um importante desafio para a pesquisa industrial (LAGUERRE; LECOMTE; VILLENEUVE, 2007). Os vegetais possuem dois tipos de metabólitos: primários e secundários. Enquanto os metabólitos primários respondem pela sobrevivência do vegetal, exercendo função ativa nos processos de fotossíntese, respiração e assimilação de nutrientes; os metabólitos secundários estão intimamente associados à estratégias de defesa das plantas (NASS, 2007). Além disso, por apresentarem atividade biológica contra herbívoros e microrganismos, por ex., muitos

desses metabólitos são utilizados como inseticidas, fungicidas, etc. (TAYS; ZEIGER, 2004). Os principais metabólitos secundários são distribuídos em três grupos de acordo com sua rota biosintética: terpenos, compostos fenólicos e compostos contendo nitrogênio (TAYZ; ZEIGER, 2004).

Os compostos fenólicos existentes nas plantas atuam protegendo-as contra injúrias em seus tecidos, contra a ação de subprodutos provenientes da fotossíntese que podem causar danos e também contra plantas herbívoras. Muitos desses compostos têm similaridades quanto à estrutura molecular básica, em que todos possuem pelo menos um anel aromático com um grupo hidroxila ligado a ele, incluindo, principalmente, os ácidos fenólicos e flavonoides, que conferem defesa contra o ataque de radicais livres (SUCUPIRA et al., 2012). Possuem estrutura variável e existem cerca de cinco mil fenóis, dentre eles, destacam-se os flavonóides, ácidos fenólicos, fenóis simples, cumarinas, taninos, ligninas e tocoferóis (SHAHIDI & NACZK, 1995). Os fenólicos englobam desde moléculas simples até moléculas com alto grau de polimerização. Estão presentes nos vegetais na forma livre ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas (BRAVO, 1998).

Substancias antioxidantes naturais provenientes de frutas e vegetais ganharam um interesse crescente entre os consumidores e a comunidade científica, pois estudos epidemiológicos indicaram que o consumo frequente de recursos naturais antioxidantes está associado com um menor risco de desenvolvimento diversas doenças (THAIPONG et al., 2006; TEMPLE, 2000).

3.1. Métodos de Determinação da Atividade Antioxidante

Os métodos que determinam a atividade antioxidante são classificados em dois grupos: o primeiro se baseia na captura de radicais livres (indireto); o segundo, na determinação da oxidação de uma molécula alvo (direto) (Sucupira et al., 2012). A capacidade antioxidante pode ser expressa por meio de vários parâmetros, incluindo a remoção de um radical: ORAC (*oxygen radical absorbance capacity*), TRAP (*total reactive antioxidant potential*); a capacidade de redução de metal: FRAP (*ferric reducing antioxidant Power*) e CUPRAC (*cupric ion reducing antioxidant capacity*); a capacidade de remoção de radical orgânico: ABTS – (2,20-azino-bis (acid 3-ethylbenzthiazoline-6-sulfônica)) e DPPH (2,2-difenil-1-picrylhydrazil); e a quantificação de produtos formados durante a peroxidação de lipídeos: TBARS, a oxidação do LDL, co-oxidação do β -caroteno (SUCUPIRA et al., 2012; SANCHEZ-MORENO et al., 1998).

As metodologias para a determinação da capacidade antioxidante são numerosas e podem estar sujeitas a interferências, além de se basearem em fundamentos diversos. Dessa forma, levando-se em conta os pontos fortes, pontos fracos e aplicabilidade de cada tipo de ensaio, atualmente preconiza-se a utilização de duas ou mais técnicas, já que nenhum ensaio usado isoladamente para determinar a capacidade antioxidante irá refletir exatamente a “capacidade antioxidante total” de uma amostra (DE OLIVEIRA et al., 2009; PRIOR et al., 1999; SANCHEZ-MORENO et al., 1998). Nesse sentido, observa-se que os métodos de análises de atividade antioxidante *in vitro* têm se tornado relevantes, uma vez que auxiliam na busca por substâncias bioativas, bem como na seleção de matéria-prima para estudo.

4. Tratamento da água

A água é uma substância natural essencial para a vida, sendo constituinte mais abundante na maioria dos organismos. Todos os seres vivos necessitam de água doce para sua sobrevivência, entretanto, água doce corresponde menos de 3% de água da superfície terrestre e apenas uma pequena percentagem (0,01%) desta água está disponível para uso humano (HINRICHSSEN & TACIO, 2002).

Devido às suas características físico-químicas, a água não se encontra em estado puro na natureza. Como contaminantes de água temos: microrganismos patógenos (bactérias, vírus e protozoários), óleos, íons (nitratos, fosfatos, sulfatos, Ca^{+2} , Mg^{+2} e F^-), poluentes inorgânicos (ácidos, sais e metais tóxicos), produtos tóxicos (pesticidas, desinfetantes, produtos farmacêuticos, reagentes químicos, elementos radioativos) que são provenientes de diversas fontes (AZIZULLAH et al., 2011, ZHICONG et al., 2011, JEAN et al., 2012). Para que possa ser consumida, sem apresentar riscos à saúde, ou seja, tornar-se potável, a água tem que ser tratada, limpa e descontaminada.

A coagulação, floculação, decantação, filtração e desinfecção são algumas etapas do tratamento convencional da água (Figura 6). Como primeira etapa deste processo de tratamento, a coagulação é a etapa onde a água bruta recebe, logo ao entrar na estação de tratamento, uma dosagem de um composto coagulante, que pode ser tanto um coagulante inorgânico (sulfato de alumínio e cloreto de polialumínio), um polímero orgânico sintético (derivados de poliacrilamida

e polietileno imina) ou coagulantes naturais (quitosana e coagulantes microbianos). A coagulação tem sido utilizada para diminuir a turbidez, a cor e eliminar agentes patogênicos (MATILAINEN et al., 2010).

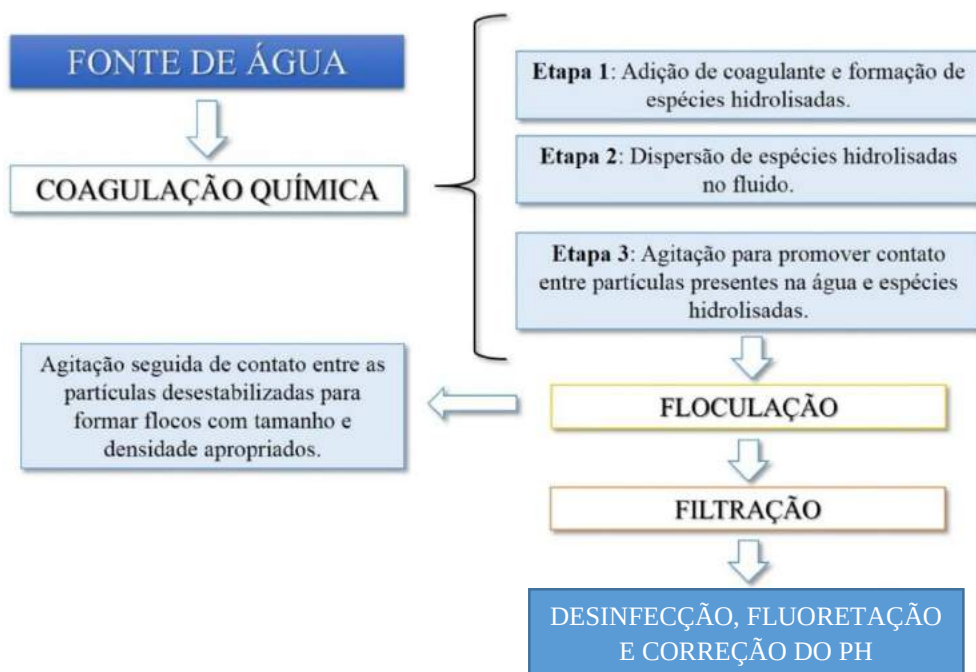


Figura 6: Etapas do tratamento convencional de água. A água bruta recebe um coagulante, que tem a função de aglomerar as partículas suspensas ou coloidais que promovem a turbidez da água, durante a floculação os aglomerados ficam maiores e decantam em forma de flocos, podendo ser removidos por filtração ou decantação. Posteriormente o processo se encerra, com desinfecção, fluoretação e correção do pH. **Fonte: SANTOS et al. (2014).**

Apesar de eficiente, o uso de sulfato de alumínio representa um risco, visto que estudos comprovaram que o alumínio pode induzir a doença de Alzheimer (FERREIRA et al., 2008; NISHI et al., 2012). Além disso, monômeros de alguns polímeros orgânicos sintéticos que podem também ser utilizados para tratamento de água, como acrilamida, possuem neurotoxicidade e fortes propriedades carcinogênicas (OKUDA et al., 1999). Tudo isso aumenta o interesse por coagulantes naturais de origem vegetal, tanto por serem seguros para a saúde, quanto por serem biodegradáveis (OKUDA et al., 2001; BINA et al., 2009). Recentemente, vários estudos têm sido publicados avaliando os efeitos de propriedades coagulantes de compostos de plantas, principalmente com as sementes de *Moringa oleifera* (NDABIGENGESERE et al., 1995; OKUDA et al., 2000; GHEBREMICHAEL et al., 2005; SANTOS et al., 2009, FERREIRA et al., 2011).

A desinfecção é onde são inativados ou destruídos microrganismos patogênicos ou indesejáveis. O cloro é um dos desinfetantes mais utilizados devido à sua alta eficácia de desinfecção, facilidade de uso e seu baixo custo (MA et al., 2013). Além disso, a presença de cloro residual pode inativar bactérias patogênicas de modo eficaz por um longo tempo (ZHANG et al., 2002; WU et al., 2010). No entanto, o cloro livre pode reagir com a matéria orgânica dissolvida (MOD), partículas, nitrogênio amoniacal, bromo e iodo e formar uma série de subprodutos de desinfecção (DBPs), como trihalometanos (THMs), ácidos haloacéticos (AHAc) e haletos de cianogênio (TIAN et al., 2013; LIU et al., 2014). Um dos primeiros DBPs relatados foram os THMs, que são formados por desinfecção em cloro ou cloramina de por meio de reações de ácido hipocloroso (HClO) com a MOD (WANG et al., 2013). Estudos revelaram que THMs são prejudiciais para a saúde humana, por indução de dano ao DNA e câncer (JI et al., 2008; BULL et al., 2011).

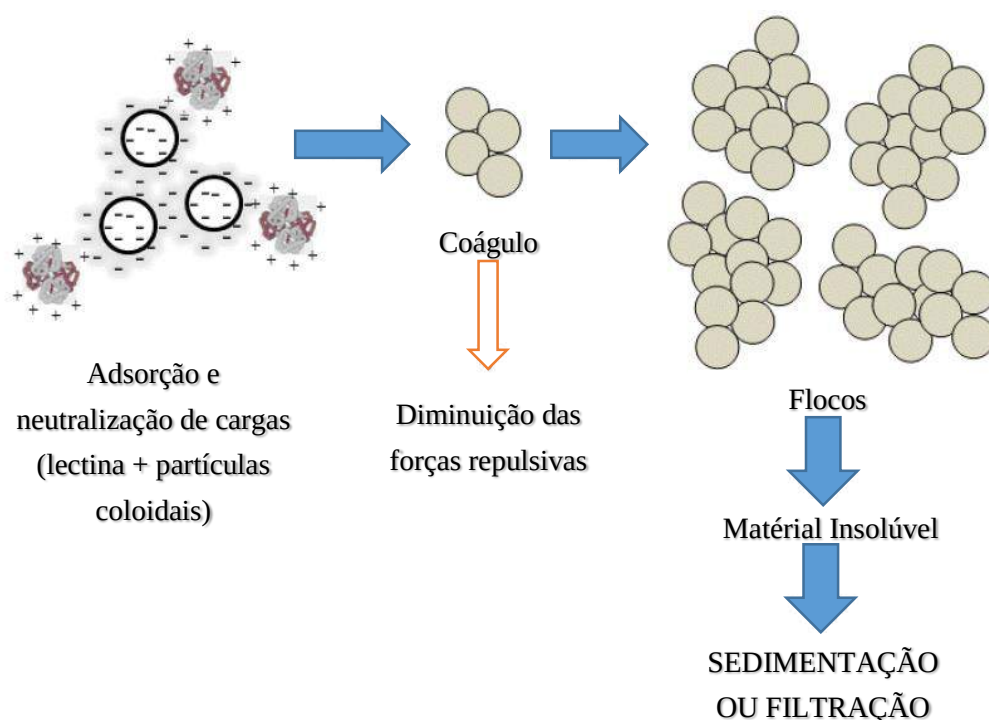


Figura 7: Mecanismo de Coagulação de cMoL. A diminuição de forças repulsivas leva à formação de agregados, que se tornam cada vez maiores e mais densos formando um material insolúvel subsequentemente removido por sedimentação ou filtração. **Fonte: SANTOS et al. (2014).**

O processo de coagulação ocorre devido a propriedades desses compostos coagulantes de desestabilizarem os materiais em suspensão dissolvidos, agregando-os em grandes flocos (floculação) que são facilmente separados da água por subseqüentes processos de sedimentação e filtração (CHEN et al., 2006). O mecanismo de coagulação de partículas em água para a lectina

coagulante de semente de *Moringa oleifera* (cMoL) está representado na **figura 7**. cMoL é uma proteína básica carregada positivamente, que interage com partículas como o caolin tendo como resultado a redução da turbidez da água (SANTOS et al., 2009; SANTOS et al., 2014).

4.1. Substâncias Húmicas: Contaminantes de Água

A matéria orgânica natural (MON) do solo e de águas naturais pode ser vista como uma mistura de produtos vegetais e animais em vários estágios de decomposição e pode ser subdividida em matéria orgânica dissolvida (MOD) e matéria orgânica particulada (MOP). A MOD é operacionalmente definida como a fração que atravessa filtros com poros de 0,45 µm, e essa fração constitui a maior parte da matéria orgânica presente em águas naturais (aproximadamente 80%) (SLOBODA et al., 2009). A MOD presente em águas naturais é subdividida em substâncias não húmicas (ácidos carboxílicos, carboidratos e proteínas) e em substâncias húmicas (SHs) (compostos com características não bem definidas), as quais correspondem cerca de 50 a 70% da MOD. (MATILAINEN et al., 2010; SANTOS et al., 2011). A MOP corresponde a aproximadamente 17% da MON presente em águas naturais e é usualmente removida pelos métodos convencionais de tratamento de água, como coagulação e filtração (SLOBODA et al., 2009).

Humificação se refere a um processo natural pelo qual a biomassa dos resíduos mortos de animais e vegetais é convertido via degradação química e enzimática em SHs (GRASSI & ROSA, 2014). As SHs podem ser classificadas, quimicamente, substâncias orgânicas biogênicas, polieletrólíticas com propriedades similares às de biocolóides, de coloração escura, de natureza heterogênea, possuindo elevada massa molecular e estrutura complexa (STEVENSON, 1994). As substâncias húmicas aquáticas (SHA) podem ser formadas diretamente no meio aquático por decomposição de plantas e pela atividade de microrganismos e as SH encontradas em solos e sedimentos podem ser transportadas para as águas naturais por processos de escoamento superficial (ROCHA & ROSA, 2003). A concentração de matéria orgânica natural (MON) em águas superficiais varia tipicamente entre 0,1 mg/L a 20 mg/L sendo basicamente composta por substâncias húmicas (VOLK, 2001). A proporção de substâncias húmicas no teor de carbono

orgânico total das águas subterrâneas e de superfície pode chegar a até 71,4-82,5% (SZPAKOWSKA et al., 1994).

As substâncias húmicas podem ser classificadas de acordo com a solubilidade em meio aquoso (Tabela 1): ácido húmico, insolúvel em meio ácido e solúvel em meio alcalino; ácido fúlvico, solúvel em meio alcalino e em meio ácido; e humina, insolúvel em ambos os meios (NICHOLS et al., 2005; PICCOLO et al., 2001). Todos são biomoléculas estruturalmente heterogêneas, cuja cor varia do amarelo ao preto e possuem peso molecular de elevado a moderado (SANTOS et al., 2007). Dentre essas frações, o ácido húmicos (AHus) estão presentes em maior quantidade.

Tabela 1: Classificação das Substâncias Húmicas.

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

(Adaptada de STEVENSON, 1994)

Geralmente, ácidos húmicos (AHus) presentes em águas superficiais apresentam uma carga elétrica negativa (potencial zeta), associado a dissociação de grupos carboxílicos e fenólicos-OH (WEBER, 1988; WARWICK et al., 2001). Em presença de cátions bivalentes, como o cálcio, AHus formam agregados intramolecular e intermolecular devido neutralização de cargas e formação de pontes entre os grupos funcionais (ANĐELKOVIĆ et al., 2004). O carbono orgânico total (COT) e a absorbância de luz ultravioleta a 254 nm (UV254) são utilizados como parâmetros para representar a concentração de SHs em água (NAJM et al., 1994; EATON, 1995).

Os AHus são onipresentes, ocorrem em solos e sedimentos, turfa, lagoas, água do mar, rios e em esqueletos de corais, sendo importantes precursores ou componentes de querogênio, betume,

petróleo e carvão (STEVENSON, 1994). A sua estrutura química e origem é mal compreendida e sempre contestada (SUSIC, 2003). Mesmo assim, todos apresentam propriedades semelhantes, as quais estão relacionadas aos seus grupos funcionais, primariamente grupos COOH e OH fenólicos (SCHNITZER et al., 1972; SCHULTEN et al., 1993).

Eles aumentam a fertilidade do solo, aceleram a fotodegradação dos pesticidas e diminuem a toxicidade de metais pesados. Os ácidos húmicos são muito importantes para a fertilidade dos solos. No entanto a sua presença no meio ambiente, pode tornar-se um fator complicador na remoção de íons metálicos pesados, devido à formação do complexo AHus-íon metálico (STUMM & MORGAN 1981). Outro problema consiste da resistência do AHus ao ataque de microorganismos, afetando a eficiência do tratamento biológico empregado em lixívia de aterro sanitário. Porém, uma das maiores preocupações quanto ao risco ambiental causado pelo AHus consiste na presença de ácido húmico nas águas para consumo humano. Esta substância altera a qualidade da água devido à sua coloração escura, tornando-a indesejável para o consumo, além da formação de produtos carcinogênicos decorrentes do tratamento com cloro, como os trialometanos (THMs), clorofórmio, diclorobromometano, dibromoclorometano e bromofórmio (ROOK et al., 1974; BELLAR et al., 1974; DAIFULLAH et al., 2004; MORIGUCHI et al., 2005) e outros compostos orgânicos halogenados, como ácidos dicloroacético e tricloroacético (DAIFULLAH et al., 2004; GOPAL et al., 2007). O limite de THMs na água potável foi definido em 100 ppb pela Organização Mundial de Saúde (BAIRD, 2002). No Brasil, a Portaria 518 de março de 2004 estabelece o valor máximo permissível de THMs igual a 0,1 mg/L, e não cita outros compostos organo halogenados.

Processos tradicionais como a coagulação química, ou técnicas avançadas como adsorção em carbono ativado e nanofiltração são usadas para remover tais compostos da água (OWEN et al., 1995; MATILAINEN et al., 2006). Em 2006, foi demonstrado por MORIGUCHI et al., que a remoção das substâncias húmicas do meio aquoso pode ser feita em adsorventes de sílica modificada com Fe^{2+} , Mg^+ e Ca^{2+} .

A lectina coagulante de *M. oleifera* (cMoL) mostrou atividade coagulante em águas turvas, semelhante ao sulfato de alumínio, o coagulante mais amplamente utilizado no tratamento de água (SANTOS et al., 2009). O uso de um bom coagulante pode ser uma solução eficaz para a remoção partículas e matéria orgânica natural (MON) (LI et al., 2015). Santos et al. (2012) demonstrou que um extrato salino de sementes de *M. oleifera* com atividade lectínica foi capaz de remover ácidos

orgânicos da água; esta preparação agiu melhor que o sulfato de alumínio e pode ser uma alternativa interessante natural para remover ácidos húmicos.

5. Ensaio hemolítico

As plantas constituem uma excelente fonte de substâncias para compostos ativos farmacologicamente, tendo em vista que a diversidade molecular dos produtos naturais é muito superior àquela derivada dos processos de síntese química (SILVA et al., 2010). Todavia, para que um nova substancia venha ser utilizado *in vivo*, o mesmo não pode ser tóxico; se faz necessário, então, o uso de testes de toxicidade como a avaliação de citotoxicidade às células sanguíneas (leucócitos e eritrócitos). Neste contexto temos o ensaio hemolítico. Testes *in vitro* para a ação hemolítica, tem sido utilizados como um dos métodos de triagem para diferentes agentes tóxicos (OLIVEIRA et al., 2009). O ensaio hemolítico é utilizado também para a determinação do funcionamento do sistema complemento humano, baseando-se na quantificação de MBL (lectina ligadora de manose) funcional (KUIPERS et al., 2002, HERPERS et al., 2009).

Lectinas hemolíticas foram constatadas em diversos organismos, como sementes de planta *Croton tiglum* (BANERJEE & SEM, 1981) como equinodermos *Cucumaria echinata* (CEL-III) (HATAKEYAMA, et al. 1994), cogumelo *Laetiporus sulfureus* (KONSKA, et al. 1994) e *Pleurotus nebrodensis* (HUI-LV et al., 2009) e em mosquito *Armigeres subalbatus* (SASAKI et al., 2010). Algumas lectinas como a BIL extraída do veneno de cobra de *Bothrops leucurus*, apresentam atividade citotóxica em células tumorais mas não apresentam atividade hemolítica (NUNES et al., 2012). As propriedades hemolíticas de algumas lectinas, modo de ação, estudos de interação e propriedades funcionais vem sendo elucidadas (HATAKEYAMA, et al. 1996).

Uma lectina hemolítica (CEL-III) foi usada como estratégia antimalárica, onde produziu-se em laboratório mosquitos geneticamente modificados que expressam a CEL-III. Um mosquito transgênico expressando a CELL-III causou lise de eritrócitos em seu intestino após a ingestão de sangue infeccioso, o que prejudica severamente o desenvolvimento do parasita (YOSHIDA, et al., 2007). E mais recentemente foi demonstrada a ação lítica sobre coágulo sanguíneo de uma lectina hemolítica do molusco *Cyprinoides Villorita*, com atividade superior a estreptoquinase comercial (proteína ativadora de plasminogênio humano) (SUDHAKAR & VINCENT, 2014). Desta forma, o ensaio hemolítico além de ser um teste de toxicidade tem se mostrado promissor, para se agregar valor biotecnológico e ampliando o background de aplicações biológicas das lectinas.

REFERÊNCIAS

ALONSO, R.; RUBIO, L. A.; MUZQUIZ, M.; MARZO, F. The effect of extrusion cooking on mineral bioavailability in pea and kidney bean seed meals. *Animal Feed Science and Technology*, v. 94, n. 1-2, p.1-13, 2001.

ANĐELKOVIĆ, T.; PEROVIĆ, J.M.; PURENOVIĆ, M.M.; ANĐELKOVIĆ, D. Destabilization and aggregation of aqueous humic acids solution by metal ions. *acta universitatis - series: Physics, Chemistry and Technology*. Volume 3, Issue 1, Pages: 79-85. 2004.

ARAÚJO, T.A.S.; ALENCAR, N.L.; AMORIM, E.L.C. A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. *Journal of Ethnopharmacology*, 120, pp. 72-80, 2008.

ARREGUÍN-ESPINOSSA, R. & ARREGUÍN-LOZANO, B. Biochemical properties of hemagglutinins in the mollusk *Pomacea flagellata*. *Biochemistry and Molecular Biology International*, Marrickville, v.43, n.6, p.1241-1251, 1997.

ASHRAF, T. & KHAN, R.H. Mitogeniclectins. *Medical Science Monitor*, [S.l.], v.9, n.11, p.RA265-269, 2003.

AZIZULLAH, A., KHATTAK, M.N.K., RICHTER, P., HÄDER, D. Water pollution in Pakistan and its impact on public health - A review. *Environ. Int.*, 37, 2479-2497, 2011.

BAIRD, C. *Química Ambiental*, 2 ed., Porto Alegre, Bookman, 2002.

BALDOTTO, L.E.B. et al. Aclimatização de orquídea (*Cymbidium* sp.) em resposta à aplicação de ácidos húmicos. *Cienc. Rural* [online]. vol.44, n.5. 2014.

BANERJEE, K.K. & SEN, A. Purification and Properties of a Lectin from the Seeds of *Croton tiglium* with Hemolytic Activity toward Rabbit Red Cells. *ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS*. Vol. 212, No. 2, pp. 740-753. 1981.

BARIANI, A.; GONÇALVES, J.F.C.; CHEVREUIL, L.R.; CAVALLAZZI, J.R.P.; DE SOUZA, L.A.G.; BENTES, J.L.S.; PANDO, S.C. Purificação parcial de inibidores de tripsina de sementes de *Caesalpinia ferrea* e *Swartzia polyphylla* e o efeito dos extratos protéicos sobre fungos fitopatogênicos. *Summa phytopathol.* vol.38 no.2. 2012.

BARROS, A.O.; DE SOUZA, R.S.; ARANHA, E.S.P.; DA COSTA, L.M.; DE SOUZA, T.P.; DE VASCONCELLOS, M.C.; LIMA, E.S. Antioxidant and hepatoprotective activities of *Libidibia ferrea* bark and fruit extracts. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. Vol 6, Issue 11, 2014.

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

BENTHAM, G. Leguminosae, Swartzieae, Caesalpinieae, Mimoseae. In K. F. Ph. von Martius (ed.), *Flora Brasiliensis*, vol. 15, part 2. 1870-1876.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. ; *Anal. Biochem.* 1976, 72, 248.

BRAGANÇA, L. A. R. Plantas Medicinais Antidiabéticas. Niterói: EDUFF Press, 172, 1996.

BRASIL. LEIS ETC. Normas e padrão de potabilidade das águas destinadas ao consumo humano. Portaria nº 518, Brasília, 2004.

Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. *Nutr Rev* 1998;56 (11): 317-33

BULL, R.J.; RECKHOW, D.A.; LI, X.; HUMPAGE, A.R.; JOLL, C.; HRUDEY, S.E. Potential carcinogenic hazards of non-regulated disinfection by-products: haloquinones, halo-cyclopentene and cyclohexene derivatives, N-halamines, halonitriles, and heterocyclic amines, *Toxicology* 286, 1–19. 2011.

BUUL, V.J.V.; BROUNS, F.J.P.H. Health effects of wheat lectins: A review. *Journal of Cereal Science* 59, 112-117. 2014.

CAPECKA, E.; MARECZEK, A.; LEJA, M. Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some Lamiaceae species. *Food Chemistry*, London, v. 93, p. 223-226, 2005.

CARVALHO, A.S., SILVA, M.V.; GOMES, F.S., PAIVA, P.M.G.; MALAFAIA, C.B.; SILVA, T.D.; VAZ, A.F.M.; SILVA, A.G.; ARRUDA, I.R.S.; NAPOLEÃO, T.H.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G.; CORREIA, M.T.S. Purification, characterization and antibacterial potential of a lectin isolated from *Apuleia leiocarpa* seeds. *International Journal of Biological Macromolecules* 75: 402–408. 2015.

CARVALHO, M.J. H. Uso de coagulantes naturais no processo de obtenção de água potável. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Maringá, p. 23. 2008.

CAVADA, B.S.; BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; GRANGEIRO, T.B.; BARRAL-NETTO, M. Revisiting *proteus*: do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins. *Curr Protein Pept Sci.* 2: 123-135. 2001.

CAVALHEIRO, M.G.; FARIAS D.F.; FERNANDES, G.S.; NUNES, E.P.; CAVALCANTI, F.S.; VASCONCELOS, I.M.; MELO, V.M.M.; CARVALHO, A.F.U. Atividades biológicas e enzimáticas do extrato aquoso de sementes de *Caesalpinia ferrea* Mart., Leguminosae. *Rev. bras. farmacogn.* vol.19 no.2b. 2009.

CHANG, W-C.; HARTSHORN, K.L.; WHITE, M.R.; MOYO, P.; MICHELOW, I.C.; KOZIEL, H.; KINANE, B.T.; SCHMIDT, E.V.; FUJITA, T.; TAKAHASHI, K. Recombinant chimeric lectins consisting of mannose-binding lectin and L-ficolin are potent inhibitors of influenza A virus compared with mannose-binding lectin, *Biochem. Pharm.* 81, 388–395. 2011.

CHEKLI, L.; GALLOUX, J.; ZHAO, Y.X.; GAO, B.Y.; SHON, H.K. Coagulation performance and floc characteristics of polytitanium tetrachloride (PTC) compared with titanium tetrachloride (TiCl₄) and iron salts in humic acid–kaolin synthetic water treatment, *Separation and Purification Technology*, Volume 142, Pages 155-161, [http://dx.doi.org/10.1016/j.seppur](http://dx.doi.org/10.1016/j.seppur.2015). 2015.

CHEN, Z.; FAN, B.; PENG, X.; ZHANG, Z.; FAN, J.; LUAN, Z. Evaluation of Al₃O polynuclear species in polyaluminum solutions as coagulant for water treatment. *Chemosphere*, v. 64, p. 912-918, 2006.

COELHO, L.C.B.B.; SANTOS, A.F.S.; NAPOLEÃO, T.H.; CORREIA, M.T.S.; PAIVA, P.M.G. Protein Purification by Affinity Chromatography, *Protein Purification*, Dr. Rizwan Ahmad (Ed.), ISBN: 978-953-307-831-1, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/protein-purification/proteinpurification-by-affinity-chromatography>. 2012.

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

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. Fundamentos de cromatografia – editora unicamp. 453p. 2006.

CORREIA, M.T.S. & COELHO, L.C.B.B. Purification of a glucose/manose specific Lectin, isoforma 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.55, p.261-73. 1995.

CORREIA, M.T.S.; COELHO, L.C.B.B. & PAIVA, P.M.G. Lectins, carbohydrate recognition molecules: Are they toxic?, In: *Recent Trends in Toxicology*, Vol. 37, pp. 47-59. 2008.

CUMMINGS R.D., ETZLER M.E. Antibodies and Lectins in Glycan Analysis. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. *Essentials of Glycobiology*. 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; Chapter 45. 2009.

CUMMINGS, R.D. Lectins as Tools for Glycoconjugate Purification and Characterization *Glycosciences*. Wiley-VCH Verlag GmbH, pp. 191–199. 2008.

DA SILVA, L.C.N.; JÚNIOR, C.A.S.; DE SOUZA, R.M.; MACEDO, A.J.; DA SILVA, M.V.; CORREIA, M.T.S. Comparative analysis of the antioxidant and DNA protection capacities of *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea* and *Pityrocarpa moniliformis* fruits. *Food and Chemical Toxicology* 49, 2222–2228. 2011.

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

DE OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. (2009) Fontes vegetais naturais de antioxidantes. *Quim. Nova*, 32 (3): 689-702.

FERREIRA, P.C.; PIAI, K.A.; TAKAYANAGUI, A.M.M.; SEGURA-MUÑOZ, S.I. Alumínio como fator de risco para a doença de Alzheimer. *Rev Latino-am Enfermagem*; 16(1) www.eerp.usp.br/rlae. 2008.

FERREIRA, R.S.; NAPOLEÃO, T.H.; SANTOS, A.F.S.; SÁ R.A.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G.; MORAIS, M.M.; SILVA-LUCCA, R.A.; OLIVA, M.L.; COELHO, L.C.; PAIVA, P.M. Coagulant and antibacterial activities of the water-soluble seed lectin from *Moringa oleifera*. *Lett Appl Microbiol.*; 53(2):186-92. 2011.

FERREIRA, R.S.; ZHOU, D.; FERREIRA, J.G.; SILVA, M.C.S.; SILVA-LUCCA, R.A.; MENTELE, R.; PAREDES-GAMERO, E.J.; BERTOLINO, T.C.; CORREIA, M.T.S.; PAIVA, P.M.G.; GUSTCHINA, A.; WLODAWER, A.; OLIVA, M.L.V. Crystal Structure of *Crataeva tapia* Bark Protein (CrataBL) and Its Effect in Human Prostate Cancer Cell Lines. *PLOS ONE* 8-6: e64426. 2013.

FORD, C. *A preliminary revision of the Libidibia group of the genus Caesalpinia (Caesalpinioideae: Leguminosae)*. Univ. Bradford, final diss. 1995.

FREITAS, A. C. C.; XIMENES, N. C. A.; AGUIAR, J. S.; NASCIMENTO, S. C.; LINS, T. U. L.; MAGALHÃES, L. R.; COELHO, L. C. B. B.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G.; GONÇALVES-SILVA, T.; CORREIA, M. T. S. Biological Activities of *Libidibia (Caesalpinia) ferrea* var. *parvifolia* (Mart. Ex Tul.) L. P. Queiroz Pod Preparations. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2012, Article ID 514134, doi:10.1155/2012/514134, 7 pages, 2012.

GABIUS, H.J., ANDRÉ, S., JIMÉNEZ-BARBERO, J., ROMERO, A., SOLÍS, D. From lectin structure to functional glycomics: principles of the sugar code. *Trends Biochem Sci.* 36, 298-313. 2011.

GABOR, F.; KLAUSEGGER, U.; WIRTH, M. The interaction between wheat germ agglutinin and other plant lectins with prostate cancer cells Du-145. *International Journal of Pharmaceutics*, 221:35-47, 2001.

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

GEMEINERA, P.; MISLOVIČOVÁ, D.; TKÁČA, J.; ŠVITELB, J.; PÄTOPRSTÝC, V.; HRABÁROVÁ, E.; KOGAND, G.; KOŽÁRE, T. Lectinomics II: A highway to biomedical/clinical diagnostics, *Biotechnol. Adv.* 27 1–15. 2009.

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

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

GONZALEZ, F.G.; BARROS, S.B.M.; BACCHI, E.M. Atividade antioxidante e perfil fitoquímico de *Caesalpinia ferrea* Mart. In: IX Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia da FCF-USP, 2004, São Paulo. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, v. 40, p. 79. 2004.

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

GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M. M.; Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.* 177, 751. 1949.

GRASSI, M. & ROSA, M. Humic acids of different origin as modifiers of cadmium-ion chemistry: A spectroscopic approach to structural properties and reactivity, *Inorganica Chimica Acta*, Volume 363, Issue 3, Pages 495-503. 2010.

GUDE, V.G. Energy storage for desalination processes powered by renewable energy and waste heat sources. *Appl Energy*, 137. pp. 877–898. 2015.

GUZMÁN-PARTIDA, A. M.; ROBLES-BURGUEÑO, M. R.; ORTEGA-NIEBLAS, M.; VÁZQUEZ-MORENO, I. Purification and characterization of complex carbohydrate specific isolectins from wild legume seeds: *Acacia constricta* is (vinorama) highly homologous to *Phaseolus vulgaris* lectins. *Biochimie*, v. 86, p. 335-342, 2004.

HAJTÓ, T.; HOSTANSKA, K.; BERKI, T.; PÁLINKAS, L.; BOLDIZSÁR, F.; NÉMETH, P. Oncopharmacological perspectives of a plant lectin (*Viscum album* Agglutinin-I): overview of recent results from *in vitro* experiments and *in vivo* animal models, and their possible relevance for clinical applications. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2, n. 1, p. 59-67, 2005.

HAMID, R.; MASOOD, A.; WANI, I.H.; RAFIQ, S. Lectins: Proteins with Diverse applications. *Jornal of App. Pharma. Science*. Vol 3, pp 93-103. 2013.

HATAKEYAMA, T.; FURUKAWA, M.; NAGATOMO, H.; YAMASAKI, N.; MORI, T. Oligomerization of the hemolytic lectin CEL-III from the marine invertebrate *Cucumaria*. 1996.

HATAKEYAMA, T.; KOHZAKI, H.; NAGATOMO, H.; YAMASAKI, N. Purification and characterization of four Ca^{2+} - dependent lectins from the marine invertebrate, *Cucumaria echinata*. *J Biochem (Tokyo)* 116(1):209e14. 1994.

HAYASHIDA M., FUKUNAGA A., AND HANAOKA K. Detection of Acute Tolerance to the Analgesic and Nonanalgesic Effects of Remifentanil Infusion in a Rabbit Model *Anesth. Analg.* v. 97, p.1347-1352, 2003.

- HE, S.; SHI, J.; MA, Y.; XUE, S.J.; ZHANG, H.; ZHAO, S. Kinetics for the thermal stability of lectin from black turtle bean. *Journal of Food Engineering* 142. 2014.
- HERPERS, B.L.; DE JONG, B.A.W.; DEKKER, B.; AERTS, P.C.; DIJK, H.V.; RIJKERS, G.T.; VELZEN-BLAD, H.V. Hemolytic assay for the measurement of functional human mannose-binding lectin: A modification to avoid interference from classical pathway activation, *Journal of Immunological Methods*, Volume 343, Issue 1, Pages 61-63, 2009.
- HINRICHSSEN, D., TACIO, H. The coming freshwater crisis is already here. The linkages between population and water. Washington, DC: Woodrow Wilson International Center for Scholars, pp. 1-26, 2002.
- HIRABAYASHI, J., YAMADA, M., KUNO, A., TATENO, H. Lectin microarrays: concept, principle and applications. *Chem. Soc. Rev.* 42 (10), 4443–4458. 2013.
- HU, D., TATENO, H., KUNO, A., YABE, R., HIRABAYASHI, J., Directed evolution of lectins with sugar-binding specificity for 6-sulfo-galactose. *J. Biol. Chem.* 287, 20313-20320. 2012.
- JAIN, K.; KESHARWANI, P.; GUPTA, U.; JAIN, N.K. A review of glycosylated carriers for drug delivery. *Biomaterials* 33 (16), 4166–4186. 2012.
- JEAN, J.; PERRODIN, Y.; PIVOTC, C.; TREPO, D.; PERRAUD, M.; DROGUET, J.; TISSOT-GUERRAZ, F.; LOCHER, F. Identification and prioritization of bioaccumulable pharmaceutical substances discharged in hospital effluents. *J. Environ. Manage.* 103, 113-121, 2012.
- JI, Q.; LIU, H.; HU, C.; QU, J.; WANG, D.; LI, J. Removal of disinfection by-products precursors by polyaluminum chloride coagulation coupled with chlorination, *Sep. Purif. Technol.* 62, 464–469. 2008.
- KAWAGISHI, H.; TAKAGI, J.; TAIRA, T.; MURATA, T.; USUI, T. Purification and characterization of a lectin from the mushroom *Mycophytonoides aitchisonii*. *Phytochemistry*, v. 56, pp. 53-58. 2001.
- KAYSER, G. L.; AMJAD, U., DALCANALE, F.; BARTRAM, J.; BENTLEY, M. E. Drinking water quality governance: A comparative case study of Brazil, Ecuador, and Malawi, *Environmental Science & Policy*, Volume 48, 186-195. 2015.
- KOKABIAN, B.; GUDE, V.G. Photosynthetic microbial desalination cells (PMDCs) for energy, water and biomass production. *Environ Sci Process Impacts*, 15 (12) pp. 2178–2185. 2013.
- KONOZY, E.H.E.; 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 spenciosa*. *Arch. Biochem. Biophys.* 410, 222-2229. 2003.
- KONSKA, G.; GUILLOT, J.; DUSSER, M.; DAMEZ, M.B.; BOTTON, B. Isolation and characterization of an N-acetyllactosamine-binding lectin from the mushroom *Laetiporus sulfureus*. *J Biol Chem*;116:519e23. 1994.

KOSHTE, V.L.; VAN DIJK, W.; VAN DER, M.E.; AALBERSE, R.C. Isolation and characterization of BanLec-I, a mannoside-binding lectin from *Musa paradisiac* (banana). *Biochemical journal*, v. 272, p. 721-726, 1990.

KUIPERS, S.; AERTS, P.C.; SJÖHOLM, A.G.; HARMSSEN, T.; DIJK, H.V. A hemolytic assay for the estimation of functional mannoside-binding lectin levels in human serum, *Journal of Immunological Methods*, Volume 268, Issue 2, Pages 149-157. 2002.

LAGUERRE, M.; LECOMTE, J., VILLENEUVE, P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. Review. *Progress in Lipid Research*, v. 46, p. 244-282, 2007.

LEGNANI, W. Mistletoe in conventional oncological practice: exemplary cases, *Integr. Cancer Ther.* 7, 162–171. 2008.

LI, R.; GAO, B.; MA, D.; RONG, H.; SUN, S.; WANG, F.; YUE, Q.; WANG, Y. Effects of chlorination operating conditions on trihalomethane formation potential in polyaluminum chloride-polymer coagulated effluent. *Journal of Hazardous Materials* 285, 103–108. 2015.

LIMA, S.M.A.; ARAÚJO, L.C.C.; SITÔNIO, M.M.; FREITAS, A.C.C.; MOURA, S.L.; CORREIA, M.T.S.; MALTA, D.J.N.; GONÇALVES-SILVA, T. Anti-inflammatory and analgesic potential of *Caesalpinia ferrea* *Revista Brasileira de Farmacognosia*; 22(1): 169-175, Jan./Feb. 2012.

LIU, J.L.; LI, X.Y.; XIE, Y.F.; TANG, H. Characterization of soluble microbial products as precursors of disinfection byproducts in drinking water supply, *Sci. Total Environ.* 472, 818–824. 2014.

LODISH, H., BERK, A., MATSUDAIRA, P., et al. **Molecular Cell Biology**. 5ed: W H Freeman & Co. 2005.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 4. ed., v. 1. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 162 pg. 2008.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J.; Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265. 1951.

LV, H.; KONG, Y.; YAO, Q.; ZHANG, B.; LENG, F.W.; BIAN, H.J.; BALZARINI, J.; VAN DAMME, E.; BAO, J.K. Nebrodeolysin, a novel hemolytic protein from mushroom *Pleurotus nebrodensis* with apoptosis-inducing and anti-HIV-1 effects, *Phytomedicine*, Volume 16, Issues 2–3, Pages 198-205. 2009.

MA, D.; GAO, B.; HOU, D.; WANG, Y.; YUE, Q.; LI, Q. Evaluation of a submerged membrane bioreactor (SMBR) coupled with chlorine disinfection for municipal wastewater treatment and reuse, *Desalination* 313. 134–139. 2013.

MAISUTHISAKUL, P.; SUTTAJIT, M.; PONGSAWATMANIT, R. Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. *Food Chemistry*, London, v. 100, p. 1409-1418, 2007.

MARQUES, M.R.F.; BARRACCO, M.A. Lectins, as non-self-recognition factors, in crustaceans. *Aquaculture*, v. 191,23-44, 2000.

MATILAINEN, A., VEPSÄLÄINEN, M., SILLANPÄÄ, M. Natural organic matter removal by coagulation during drinking water treatment: A review. *Adv.Colloid Interfac.* 159, 189-197. 2010.

MCALLISTER, H.C.; NISBET, A.J.; SKUCE, P.J.; KNOX, D.P. Using lectins to identify hidden antigens in *Fasciola hepatica*, *J. Helminthol.* 1–7. 2011.

McLEAN, J. A.; KARADAS, F.; SURAI, P.; McDEVITTI, R.; SPEAKE, B. Lipid-soluble and water-soluble antioxidant activities of the avian intestinal mucosa at different sites along the intestinal tract. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 141, n. B, p. 366- 372, 2005.

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

MENEZES, I.A.C.; MOREIRA, I.J.A.; CARVALHO, A.A.; ANTONIOLLI, A.R.; SANTOS, M.R.V. Cardiovascular effects of the aqueous extract from *Caesalpinia ferrea*: involvement of ATP-sensitive potassium channels. *Vascular Pharmacology*, 47, pp. 41-47, 2007.

MORAES, M. O. B. (2013) Caracterização química e determinação da atividade antioxidante em massa da graviola (*Annona muricata* L.). Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB - Itapetinga-BA – 61 páginas.

MOREL, M.A.; BRAÑA, V.; CASTRO-SOWINSKI, S. Legume Crops, Importance and Use of Bacterial Inoculation to Increase Production, Crop Plant, Dr Aakash Goyal (Ed.), InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/crop-plant/legume-crops-importance-and-use-ofbacterial-inoculation-to-increase-production>. 2012.

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

NASI, A.; PICARIELLOB, G.; FERRANTIA. P. Proteomic approaches to study structure, functions and toxicity of legume seeds lectins. Perspectives for the assessment of food quality and safety, *Jornalo proteomics*, v. 72, 2009.

NASS, L. L. Recursos genéticos vegetais. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos Vegetais e Biotecnologia, 2007.

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

NELSON & COX, M.M. In: *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. Ed: Artmed. 1304 pág. 2011.

NEUMANN, D.; LEHR, C. M.; LENHOF, H. P.; KOHLBACHER, O. Computational modeling of the sugar-lectin interaction. *Adv. Drug Delivery. Rev.* 56, 437-457, 2004.

NG, T. B.; YU, Y. L. Isolation of a novel heterodimeric agglutinin from rhizomes of *Smilax glabra*, the Chinese medicinal material tufuling. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 33:269-277, 2001.

NICHOLS, K.A.; WRIGHT, S.F. Comparison of glomalin and humic acid in eight native u.s. soils. *Soil Science*. v.170, p.985-997, 2005.

NISHI, L.; VIEIRA, A.M.S.; VIEIRA, M.F.; BONGIOVANI, M.; CAMACHO, F.P.; BERGAMASCO, R. Hybrid process of coagulation/flocculation with *Moringa oleifera* followed by ultrafiltration to remove *Microcystis* sp. cells from water supply, *Procedia Engineering*, Volume 42, Pages 865-872. 2012.

NOZAKI, H.; HAYASHI, K. I.; KIDO, A. M.; KAKUMOTO, B. K.; IKEDA, S.; MATSUURA A. N.; TANI, C. H.; TAKAOKA, B. D.; IINUMAE, M.; AKAO, Y. Pauferrol A, a novel chalcone trimer with a cyclobutane ring from *Caesalpinia ferrea* Mart. exhibiting DNA topoisomerase II inhibition and apoptosis-inducing activity. *Tetrahedron Letters*, v.48, n. 47, p. 8290–8292, 2007.

NUNES, E.S.; SOUZA, M.A.A.; VAZ, A.F.M.; SILVA, T.G.; AGUIAR, J. S.; BATISTA, A.M. ; GUERRA, M.M.P.; GUARNIERI, M.C.; COELHO, L.C.B.; CORREIA, M. T. S. Cytotoxic Effect and Apoptosis Induction by Bothrops Leucurus Venom Lectin on Tumor Cell Lines. *Toxicon* (Oxford), v. 59, p. 667-671, 2012.

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

OKUDA, T.; BAES, A.U.; NISHIJIMA, W.; OKADA, M. Coagulation mechanism of salt solution-extracted active component in *Moringa Oleifera* seeds. *Water Research*, v.35, p. 830-834, 2001.

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

OKUDA, T.; BAES, A.U.; NISHIJIMA, W.; OKADA, M. Isolation and characterization of coagulant extracted from *Moringa oleifera* seed by salt solution. *Water Research*, v. 35, p. 405-410, 2000.

OLIVEIRA, A.F.; BATISTA, J.S.; PAIVA, E.S.; SILVA, A.E.; FARIAS, Y.J.M.D.; DAMASCENO, C.A.R.; BRITO, P.D.; QUEIROZ, S.A.C.; RODRIGUES, C.M.F.; FREITAS, C.I.A. Avaliação da atividade cicatrizante do jucá (*Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. var. *ferrea*) em lesões cutâneas de caprinos. *Rev. bras. plantas med.* vol.12 no.3. 2010.

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

OLIVEIRA, M.D.L.; ANDRADE, C.A.S.; MAGALHÃES, N.S.S.; COELHO, L.C.B.B.; TEIXEIRA, J.A.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G.; CORREIA, M.T.S. Purification of a lectin from *Eugenia uniflora* L. seeds and its potential antibacterial activity. *Letters in Applied Microbiology*, v. 46, p. 371-376, 2008.

OLIVEIRA, V. M. A. et al. In vitro screening of Amazonian plants for hemolytic activity and inhibition of platelet aggregation in human blood. *Acta Amaz.* Vol.39, n.4, pp. 973-980, 2009.

PATERNIANI, J.E.S.; MANTOVANI, M.C.; SANT'ANNA, M.R. Uso de sementes de *Moringa oleifera* para tratamento de águas superficiais. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* v.13, n.6, p.765–771. 2009.

PENNA, M. Dicionário brasileiro de plantas medicinais. 3. ed. Rio de Janeiro: Kosmos, 409 p. 1946.

PEREIRA, L.P.; DA SILVA, R.O.; BRINGEL, P.H.S.F.; DA SILVA, K.E.S.; ASSREUY, A.M.S.; PEREIRA, M.G. Polysaccharide fractions of *Caesalpinia ferrea* pods: Potential anti-inflammatory usage, *Journal of Ethnopharmacology*, Volume 139, Issue 2, Pages 642-648, 2012.

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

PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J.M. Plant Lectins: Specific tools for the Identification, Isolation, and Characterization of O-linked Glycans. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, v. 33(3), p. 209-258, 1998a.

PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J.M. Plant Lectins: Versatile Proteins with Important Perspectives in Biotechnology. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. Vol. 15, 1998b.

PICCOLO, A.; CONTE, P.; COZZOLINO A.; Chromatographic and spectrophotometric properties of dissolved humic substances compared with macromolecular polymers. *Soil Science*. V. 166, p. 174-178, 2001.

PIO CORRÊA, M. Dicionário das plantas úteis do Brasil. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, p. 687. 1984.

PODSEDEK, A. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT-Food Sci. Technol*, v. 40, p. 1-11, 2007.

PRABU, S. L.; SURIYAPRAKASH, T. N. K.; KUMAR, J. A. Wastewater Treatment Technologies: A Review. *Pharma Times*. 43, 09-13. 2011.

PRIOR, R. L.; CAO, G. (1999) In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radic Biol Med*, 27 (11/12): 1173-81.

QUEIROZ, L.P. Leguminosas da Caatinga. Feira de Santana, Associação Plantas do Nordeste. 443p. 2009.

RAY, S.; AHMED, H.; BASU, S.; CHATTERJEE, B.P. Purification, characterization, and carbohydrate specificity of the lectin of *Ficus cunia*. Carbohydr. Res., v.242, p.247-63, 1992.

REYNOSO-CAMACHO, R.; DE-MEJIA, E. G.; LOARCAPINA, G. Purification and acute toxicity of a lectin extracted from tepary bean (*Phaseolus acutifolius*). Food and Chemical Toxicology, Oxford, v. 41, n. 1, p. 21-27. 2003.

ROCHA, J.C.; ROSA, A.H. Substâncias húmicas aquáticas: interações com espécies metálicas, UNESP: São Paulo, 2003.

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

RUDIGER, H. & GABIUS, H.J. Plant lectins: Occurrence, biochemistry, functions and applications. Glycoconj. J., 18(8): 589-613. 2001.

RÜDIGER, H.; SIEBERT, H.-C.; SOLIS, D.; JIMÉNEZ-BARBERO, J.; ROMERO, A.; VON DER LIETH, C.-W.; DIAZ-MAURIÑO, T.; GABIUS, H.-J. Medicinal chemistry based on the sugar code: fundamentals of lectinology and experimental strategies with lectins as targets. Curr. Med. Chem., v. 7, p. 389-416, 2000.

SAKAI, K.; KAWATA, E.; ASHIHARA, E.; NAKAGAWA, Y.; YAMAUCHI, A.; YAO, H.; NAGAO, R.; TANAKA, R.; YOKOTA, A.; TAKEUCHI, M.; HIRAI, H.; KIMURA, S.; HIRASHIMA, M.; YOSHIMURA, N. MAEKAWA, T. Galectin-9 ameliorates acute GVH disease through the induction of t-cell apoptosis. Eur. J. Immunol. 41, 67–75. 2011

SANCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F.(1998) A procedure to measure the antiradical efficiency of poly phenols. *J Sci Food Agric*, 76: 270-6.

SANTOS, A. F. S., ARGOLO, A. C. C., PAIVA, P.M.G., COELHO, L.C.B.B. Antioxidant activity of *Moringa oleifera* tissue extracts. Phytotherapy Resource, 26, 1366–1370, 2012.

SANTOS, A.F.S.; COELHO, L.C.B.B.; PAIVA, P.M.G. Moléculas Bioativas de *Moringa oleifera*: Detecção, Isolamento e Caracterização. Recife, PE [Tese de doutorado, Universidade Federal de Pernambuco], 2007.

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

SANTOS, A.F.S.; LUZ, L.A.; NAPOLEÃO, T. H.; PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C.B.B. Coagulation, flocculation, agglutination and hemagglutination: similar properties?. In James C. Taylor, Advances in Chemistry Research, Vol. 20, Nova Science Publishers, 2014.

SANTOS, A.F.S.; NAPOLEÃO, T.H.; BEZERRA, R.F.; CARVALHO, E.V.M.M.; CORREIA, M.T.S.; PAIVA, P.M.G.; COELHO, L.C.B.B. Strategies to obtain lectins from distinct sources. Adv. In Med. And Bio. Vol63. 2013.

SANTOS, A.F.S.; PAIVA, P.M.G.; TEIXEIRA, J.A.; BRITO, A.G.; COELHO, L.C.B.B.; NOGUEIRA, R. Coagulant properties of *Moringa oleifera* protein preparations: application to humic acid removal. *Environmental Technology*. Volume 33, Issue 1, pages 69-75. 2012.

SANTOS, A.F.S.; SANTOS, M.; CARNEIRO-DA-CUNHA, J.; TEIXEIRA, J.A.; PAIVA, P.M.G.; COELHO, L.C.B.B.; NOGUEIRA, R. Interaction of *Moringa oleifera* seed lectin with humic acid. *Chemical Papers* 65 (4) 406–411. 2011.

SASAKI, T.; HIRAOKA, T.; KOBAYASHI, M. Hemolytic activity is mediated by the endogenous lectin in the mosquito hemolymph serum, *Journal of Insect Physiology*, Volume 56, Issue 9, Pages 1032-1039. 2010.

SCHNITZER, M., KHAN, S. U.; *Developments in Soil Science: Soil Organic Matter*. Amsterdam. Elsevier Scientific Publishing Company, 1978.

SCHULTEN, H, R., SCHNITZER, M.; A State of the Art Structural Concept for Humic Substances. *Naturwissenschaften.*, 80, 29-30, 1993.

Shahidi F, Naczki M. Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications. Lancaster: Technomic; 1995.

SHARON, N. & LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*, v.14, p. 53–62, 2004.

SHARON, N. Carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. *J Biol Chem*. 282: 2753-2764. 2007.

SHARON, N., Lectins: past, present and future. *Biochem Soc. Trans.* 36, 1457e 1460. 2008.

SHI, B.; WEI, Q.; WANG, D. et al., Coagulation of humic acid: the performance of preformed and non-preformed Al species, *Colloids Surf., A* 296 141– 148. 2007.

SIKORA, E.; CIESLIK, E.; LESZCZYŃSKA, T.; FILIPIAK-FLORKIWUACZ, A.; PISULEWSKI, P. M. The antioxidant activity of selected cruciferous vegetables subjected to aquathermal processing. *Food Chemistry*, London, v. 107, p. 50-55, 2008.

SILVA, H.C.; NAGANO, C.S.; SOUZA, L.A.G.; NASCIMENTO, K.S.; ISÍDRO, R.; DELATORRE, P.; ROCHA, B.A.M.; SAMPAIO, A.H.; ASSREUY, A.M.S.; ALANA F. PIRES, DAMASCENO, L.E.A.; MARQUES-DOMINGOS, G.F.O.; CAVADA, B.S. Purification and primary structure determination of a galactose-specific lectin from *Vatairea guianensis* Aublet seeds that exhibits vasorelaxant effect, *Process Biochemistry*, Volume 47, Issue 12, Pages 2347-2355. 2012.

SILVA, M.C.C.; SANTANA, L. A.; MENTELE, R.; FERREIRA, R. S.; MIRANDA, A.; SILVA-LUCCA, R.A.; SAMPAIO, M. U.; CORREIA, M.T.S.; OLIVA, M.L.V. Purification, primary structure and potential functions of a novel lectin from *Bauhinia forficata* seeds. *Process Biochemistry*, 47, 1049–1059, 2012.

SILVA, V.A. et al. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana do extrato da *Lippia sidoides* Cham. sobre isolados biológicos de *Staphylococcus aureus*. Rev. bras. Plantas med. vol.12, n.4, pp. 452-455. 2010.

SILVA-LUCCA, R.A.; HANSEN, D.; OLIVA, M.L.V. Estudos espectroscópicos de inibidores de serinoproteinases isolados de sementes de *Bauhinia bauhinoides*: estimativa de estrutura secundária e estudos de pH. Revista Varia Scientia 5 97–112. 2006.

SLOBODA, E.; VIEIRA, E.M.; DANTAS, A. Di-B.; DI BERNARDO, L. Influência das características das substâncias húmicas aquáticas na eficiência da coagulação com o cloreto férrico. Quím. Nova [online]. vol.32, n.4. 2009.

SMITH, P. K.; KROHN, R. I.; HERMANSON, G. T.; MALLIA, A. K.; GARTNER, F. H.; PROVENZANO, M. D.; FUJIMOTO, E. K.; GOEKE, N. M.; OLSON, B. J.; KLENK, D. C.; Measurement of protein using bicinchoninic acid Anal. Biochem. 150, 76. 1985.

STEVENSON, F.J. Humus Chemistry. Wiley, New York, 1982; 1994.

STOSCHECK, C. M.; In Methods in Enzymology; Deutscher, M. P., Ed.; Academic Press Inc.; New York, 1990.

STUMM, W. & MORGAN, J.J. Aquatic chemistry: an introduction emphasizing chemical equilibria in natural waters equilibria. John Wiley, 780 p., 1981.

SUCUPIRA, N. R.; SILVA, A. B.; PEREIRA, G.; COSTA, J. N. (2012) Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos. UNOPAR Cien Ciênc Biol Saúde, 14 (4): 263-9.

SUDHAKAR, G.R. L. & VINCENT, S.G.P. Purification and characterization of a novel C-type hemolytic lectin for clot lysis from the fresh water clam *Villorita cyprinoides*: A possible natural thrombolytic agent against myocardial infarction. Fish & Shellfish Immunology 36 - 367e373. 2014.

SUSIC, M. Structure and origin of humic acids and their relationship to kerogen, bitumen, petroleum and coal. Research Scientist. 2003.

SZPAKOWSKA B., ŻYCZYŃSKA –BAŁONIAK I., STRIGUCKI W. P., MARYGANOWA W. W., PARMON S. W. Physico-chemical parameters of humic substances dissolved in water of agricultural landscape. Polish J. Soil Sci., Soil Chemistry, 27 (2), 103, 1994.

TAYZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TEIXEIRA, E.H.; ARRUDA, F.V.S.; NASCIMENTO, K.S.; CARNEIRO, V.A.; NAGANO, C.S.; SILVA, B.R.; SAMPAIO, A.H., CAVADA, B.S. Biological Applications of Plants and Algae Lectins: An Overview. Carbohydrates – Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology. 23: 533-558. 2012.

- TEMPLE, N.J. (2000). Antioxidants and disease: more questions than answers. *Nutrition Research*, 20: 449–459
- THAIPONG, K.; BOONPRAKOB, U.; CROSBY, K; CISNEROSZEVALLOS, L.; BYRNE, D.H. (2006) Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19: 669-675.
- TIAN, R.; LIU, H.; LIU, J.; QU. Disinfection by-products formation and precursors transformation during chlorination and chloramination of highly-polluted source water: significance of ammonia, *Water Res.* 47, 5901–5910. 2013.
- TULLIS, R.H.; DUFFIN, R.P.; HANDLEY, H.H.; SODHI, P.; MENON, J.; JOYCE, J.A.; KHER, V. Reduction of hepatitis C virus using lectin affinity plasmapheresis in dialysis patients, *Blood Purif.* 27, 64–69. 2009.
- VASCO, C.; RUALES, J.; KAMAL-ELDIN, A. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chemistry*, London, v. 111, p. 816-823, 2008.
- VASCONCELOS, C.F.; MARANHÃO, H.M.; BATISTA, T.M.; CARNEIRO, E.M.; FERREIRA, F.; COSTA, J.; SOARES, L.A.; SA, M.D.; SOUZA, T.P., WANDERLEY, A.G. Hypoglycaemic activity and molecular mechanisms of *Caesalpinia ferrea* Martius bark extract on streptozotocin-induced diabetes in Wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology* 137, 1533–1541. 2011.
- VASCONCELOS, C.F.B.; MARANHÃO, H.M.L.; BATISTA, T.M.; CARNEIRO, E.M.; FERREIRA, F.; COSTA, J.; SOARES, L.A.L.; SÁ, M.D.C.; SOUZA, T.P.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; DEMARCO, R. Genoma contra a Esquistossomose. *Scientific American Brasil*, 28, pp. 54-61, 2004.
- VOLK, C.J. in *Methods in Enzymology, Microbial growth in biofilms.* ed. R. J. DOYLE, Academic Press, New York, NY. 337, 144. 2001.
- WANG, C.C.; NIU, Z.G.; ZHANG, Y. Health risk assessment of inhalation exposure of irrigation workers and the public to trihalomethanes from reclaimed water in landscape irrigation in Tianjin, North China, *J. Hazard. Mater.* 262, 179–188. 2013.
- WANG, S.Y.; YU, Q.J.; BAO, J.K.; LIU, B. Polygonatum cyrtonema lectin, a potential antineoplastic drug targeting programmed cell death pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 406 (4), 497–500. 2011.
- WANG, X.W.; ZHANG, H.W.; LI, X.; ZHAO, X.F.; WANG, J.X. Characterization of a C-type lectin (PcLec2) as an upstream detector in the prophenoloxidase activating system of red swamp crayfish. *Fish & Shellfish Immunology*, 30(1), 241–247. 2011.
- WARWICK, P.; HALL, A.; PASHLEY, V.; BRYAN, N. *Chemosphere*, 45, 303. 2001.
- WEBER, J.H. in *Humic substances and their role in the environment*, ED: FRIMMEL, F.H.; RUSSELL F.; CHRISTMAN, J. M.; BRACEWELL. 41, 165. 1988.

WONG, J.H. & NG, T.B. Isolation and characterization of a glucose/mannose-specific lectin with stimulatory effect on nitric oxide production by macrophages from the emperor banana. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 38, p. 234-243, 2006.

WU, A. M.; LISOWSKA, E.; DUK, M.; YANG, Z. Lectins as tools in glycoconjugate research. *Glycoconjugate Journal*, 26, pp. 899-913, 2009.

WU, Q.-Y.; HU, H.-Y.; ZHAO, X.; LI, Y. Effects of chlorination on the properties of dissolved organic matter and its genotoxicity in secondary sewage effluent under two different ammonium concentrations, *Chemosphere* 80, 941–946. 2010.

XIMENES, N. C. A. Caracterização e Avaliação de Atividades Biológicas da Lectina da Vagem de *Caesalpinia ferrea* (CfePL). (Tese de doutoramento apresentada para o cumprimento parcial das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pernambuco.), 121 p. Recife: UFPE, 2009.

XIMENES, N. C. A. Purificação e Caracterização da Lectina da Vagem de *Caesalpinia ferrea* (CfePL): Aplicação Biológica. (Dissertação para obtenção do título de Mestre em Bioquímica – Departamento de Bioquímica – Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco), 53 p. Recife: UFPE, 2004.

YOSHIDA, S.; SHIMADA, Y.; KONDOH, D.; KOUZUMA, Y.; GHOSH, A. K.; JACOBS-LORENA, M.; SINDEN, R.E. Hemolytic C-Type Lectin CEL-III from Sea Cucumber Expressed in Transgenic Mosquitoes Impairs Malaria Parasite Development. Vol.3 (12), e192. *PLoS Pathogens*. 2007.

YU, W.Z.; GREGORY, J.; LI, G.B.; QU, J.H. Effect of humic acid on coagulation performance during aggregation at low temperature *Chem. Eng. J.*, 223, pp. 412–417. 2013.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, L. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. *Química nova*, 21(6). 1998.

ZHANG, F.; WALCOTT, B.; ZHOU, D.; GUSTCHINA, A.; LASANAJAK, Y.; SMITH, D.F.; FERREIRA, R.S.F.; CORREIA, M.T.S.; PAIVA, P.M.G.; BOVIN, N.V.; WLODAWER, A.; OLIVA, M.L.V.; LINHARDT, R.J. Structural Studies of the Interaction of *Crataeva tapia* Bark Protein with Heparin and Other Glycosaminoglycans. *Biochemistry (Easton)*. v. 52, p. 2148-2156, 2013.

ZHANG, J.S.; SHI, J.; ILIC, S.; XUE, S.J.; KAKUDA, Y. Biological properties and characterization of lectin from red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*). *Food Rev. Int.* 25 (1), 12–27. 2009.

ZHANG, W.; DIGIANO, F.A. Comparison of bacterial regrowth in distribution systems using free chlorine and chloramine: a statistical study of causative factors, *Water Res.* 36, 1469–1482. 2002.

ZHICONG, Y.; XINWEI, W.; TIEGANG, L.; MEIXIA, L.; YI, Z.; YUFEL, L.; ZHIAI, D.; BIAO, D.; CONG, H.; HUIYING, L.; MING, W. Epidemiological survey and analysis on an outbreak of gastroenteritis due to water contamination. *Biomed. Environ. Sci.*, 24, 275-283, 2011.

ZHOU, W.; GAO, Y.; XU, S.; YANG, Z.; XU, T. Purification of a mannose-binding lectin *Pinellia ternata* agglutinin and its induction of apoptosis in Bel-7404 cells, *Protein Expression and Purification*, Volume 93, Pages 11-17. 2014.

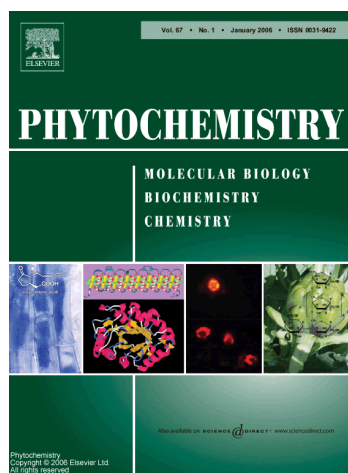
ZHU, M.; WANG, H.T.; KELLER, A.A.; WANG, T.; LI, F.T. The effect of humic acid on the aggregation of titanium dioxide nanoparticles under different pH and ionic strengths *Sci. Total Environ.*, 487, pp. 375–380. 2014.

ZIOŁKOWSKA, N.E.; WLODAWER, A. Structural studies of algal lectins with anti-HIV activity, *Acta Biochim. Pol.* 53, 617–626. 2006.

ZUMSTEIN, J.; BUFFLE, J. “Circulation of pedogenic and aquagenic organic matter in an eutrophic lake”. *Water research* , v. 64, p. 41-59, 1989.

CAPITULO 2: ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO *Phytochemistry*

**LECTIN FROM BARK OF *Libidibia ferrea* var. *leiostachya* Benth:
PURIFICATION, PARTIAL CHARACTERIZATION
AND AFFINITY TO HUMIC ACID.**



Purification and Partial Characterization of a Lectin from bark of *Libidibia ferrea* var.
leiostachya Benth

Silva, C.E.S.^a, Paes-Barreto, R.S.^a, Ximenes, N.C.A.^a, Coelho, L.C.B.B.^a, Paiva, P.M.G.^a;
Napoleão, T.H.^a; Zingali, B.R.^b and Correia, M. T. S.^{a*}

^aDepartamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, 50,670-420, Recife, Brazil. ^bInstituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Av Bauhinia 400, CCS bloco E, 42,21941-590 Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

*Corresponding author:

Tel: +55-81-2126.8540; Fax: +55-81-2126.8576;

E-mail address: mtscorreia@gmail.com

Abstract

Water is an essential resource for life. There are many water contaminants, such as the humic acids (AHus), which constitute 60-90% of the total carbon dissolved in natural waters. AHus, natural organic matter, constitute a problem in water treatment; they react with chlorine forming undesirable disinfection byproducts. In this work the presence of a lectin was evaluated in the bark of *Libidibia ferrea* var. *leiostachya* (LifeLBL) and its affinity to acid humics, plant with wide distribution in Brazil and commonly known as ironwood or jucá. The *L. ferrea* bark crude extract was obtained in 0.15 M NaCl and submitted to ammonium sulphate fractionation in 80% of saturation, to obtain the proteic fraction (F0-80). The F0-80 was chromatographed on a chitin column and LifeLBL was eluted with 1.0 M acetic acid. The LifeLBL hemagglutinating activity (HA) was not altered in presence of ions or at different pH values. LifeLBL maintained its activity after heating to 100 °C; it was partially inhibited by N-acetyl-D-glucosamine and totally by bovine serum albumin (BSA). LifeLBL presented two bands in SDS-PAGE and in Superdex 75 column, showed two polipeptide peaks with 19 and 15 kDa. By two-dimensional electrophoresis, the estimated molecular mass was 20 and 15 kDa and the pI was 4.53 and 5.14. Lectin binding to humic acids was pH dependent, and influenced by calcium. The radial diffusion assay demonstrates the binding of lectin, extract and fraction to the AHus. In conclusion a lectin specific for N-acetyl-D-glucosamine, stable in different temperatures and pH variations, was obtained from *L. ferrea* bark by chitin chromatography and binds humic acid, indicating a possible use of the lectin in water treatment for removing humic acids.

Keywords: *Libidibia ferrea*, Lectin, Lectin Characterization, Lectin Purification, Phytochemical screening

Introduction

Lectins are proteins or glycoproteins of non-immune origin that bind specifically and reversibly to carbohydrate structures (Sharon, 2008). They are widely distributed in nature and can be found in almost all living organisms, including, microorganisms (Nichols, 2014), plants (Albuquerque et al., 2014) as well as in animals (Chikalovets et al., 2015) and humans (Kooyk et al., 2015). The presence of a large number of lectins in nature with different specificities to carbohydrates has resulted in the use of these proteins as tools in the medical and biological researches (Sharon, 2007). In order to characterize a lectin physico-chemically, various methods are

used, such as evaluation of the HA with erythrocytes from different animal species (rabbit, chicken, ABO blood system), in the presence of ions and after incubation at various pH and temperature values (Coelho & Silva 2000; Oliveira et al., 2008). Electrophoresis techniques reveals the degree of purity, molecular mass subunits and the isoelectric point of the molecule (Nelson & Cox, 2011). Lectins show many biological activities, including anti-insect (Araújo et al., 2012), antifungal (Souza et al., 2012), antiviral (Yao et al., 2010), antibacterial (Carvalho et al., 2015), antitumor (Silva et al., 2014), antinociceptive and anti-inflammatory activities (Vanderlei et al., 2010).

Libidibia ferrea var. *leiostachya* Benth is a plant belonging to the Fabaceae (Leguminosae) family, of the sub-family Caesalpinioideae, popularly known as iron-wood or jucá. It is an economically species important for having multiplicity of uses (Lorenzi, 2008; Ferreira & Soares, 2015). Extracts of different *L. ferrea* tissues are popularly used and several works reporting biological activities of crude extracts from the inner bark of *L. ferrea* has been published (Nakamura et al., 2001; Menezes et al., 2007; Nozaki et al., 2007; Sampaio et al., 2009; Oliveira et al., 2010; da Silva et al., 2011; Trentin et al., 2011; Vasconcelos et al., 2011; Dias et al., 2013; Lopes et al., 2013; Ohira et al., 2013; Araújo et al., 2014; Barros et al., 2014). Menezes et al. (2007) demonstrated that the aqueous extract of *L. ferrea* bark promoted vasodilation of the mesenteric artery of rats. The inner bark of *L. ferrea* showed cicatrization activity on cutaneous lesions of caprine animals (Oliveira et al., 2010) and showed hypoglycemic activity in Wistar rats (Vasconcelos et al., 2011). Aqueous extracts of bark and pod of *L. ferrea* showed antioxidant activity and hepatoprotective (Barros et al., 2014).

The humic acid (HA) is constituted by aromatic polycyclic macromolecules with a variety of functional groups of high molecular weight, is responsible for odour, taste and colour in water and it supports bacterial growth, besides being recognized as a major by-product generator during the disinfection process: DBPs (trihalomethanes [THMs], chloroform, dichlorobromomethane, dibromochloromethane, and bromoform) (Yu et al., 2013; Zhu et al. 2014). The World Health Organization set as a limit of THMs in drinking water as 100 ppb (Baird, 2002). For this reason, several strategies for removing humic substances from water have been investigated, such as electrolysis membranes (Kliaugaitė et al., 2013), use of anion exchange resin (AER) (Shuang et al., 2013) iron coated activated alumin, ferric oxihydroxide and granular activated carbon (Khraisheh et al., 2010), coagulation / flocculation using iron (III) chloride or aluminum sulphate, adsorption (Le Clech et al., 2006; Moriguchi et al, 2005), activated carbon filtration (Matilainen et al., 2006), photocatalytic degradation on Ti-modified silica (Moriguchi et al., 2005) and lectin immobilized on inert column (Santos et al., 2011).

In this work, we describe the extraction, purification and partial characterization of a lectin from *Libidibia ferrea* bark (LifeLBL). Additionally, it was tested its affinity to acid humic.

Results and Discussion

This study shows the presence of a lectin in the bark of *L. ferrea* var. *leiostachya*. Freitas et al. (2012) showed that extracts and fractions of *L. ferrea* pod showed anti-inflammatory and antinociceptive activities, which stimulated the purification of lectins from extract from *L. ferrea*.

Bark extracts of *L. ferrea* in 0.15 M NaCl and fraction obtained (F0-80) were evaluated for protein concentration and erythrocyte agglutination ability (table 1). Inhibition assay with carbohydrates indicated that N-acetyl-D-glucosamine inhibited AH of the F0-80, therefore, chitin was selected as choice support for affinity chromatography that presented two main peaks, one obtained in washing step and another adsorbed and eluted with acetic acid (Figure 1). The proteins were quantified by the method of Warburg et al. (1942). The adsorbed protein peak (LifeLBL) showed a specific HA (SHA) of 492,3 with a protein concentration of 0.13 mg/ml. Chitin-binding lectins can be isolated by chitin affinity chromatography, which is a cheap and efficient method, that allows to obtain them purified through a minimum number of stages and with high yield (Coelho et al., 2012).

The HA of LifeLBL was partially inhibited by monosaccharides (Table 2). Hemagglutination inhibition with carbohydrates or glycoconjugates ensures lectin nature of the phenomenon (Kennedy et al., 1995). The inhibition of LifeLBL HA by glucose, mannose, rhamnose, xylose and N-acetyl-D-glucosamine suggests that these carbohydrates should compete with the carbohydrate on the surface of red blood cells by the binding site of the lectin. The HA of LifeLBL was totally inhibited by BSA and partially inhibited by the others tested glycoproteins. Similar result was obtained for *Cladonia verticillaris* lichen lectin which had its HA reduced in the presence of N-acetylglucosamine and abolished in the presence of fetal bovine serum (Silva et al., 2009).

The crude extract, F0-80 and LifeLBL agglutinated rabbit and human (A, B, AB and O) erythrocytes (Figure 2). The crude extract agglutinated preferentially rabbit erythrocytes and the human blood types AB and O. The proteic fraction and LifeLBL did not shown preference to agglutinate erythrocytes. Some lectins demonstrate a preference in agglutinating one or more type of human or animal erythrocytes as the *Sphenostylis stenocarpa* lectin that demonstrated high agglutination of the human blood type O (Machuka et al., 1999); the *Hevea brasiliensis*

lectin, that preferentially agglutinated rabbit erythrocytes (Wititsuwannaku et al., 1998) and *T. esculenta* lectin, that demonstrated preference for the human blood type AB (Freire et al., 2002).

The HA of LifeLBL was weakly affected by pH variation from 2.0 to 11.0. We can only see a little decrease of HA between pH 8.0 and 9.5 (Figure 3) and it was not shown dependence of ions Mg^{++} and Ca^{++} (Figure 4). Also, the lectin remained active after 30 minutes at 100 °C, demonstrating its thermal stability. Differently from LifeLBL, the *T. esculenta* lectin and *Bothrops leucurus* lectin were stimulated by Ca^{++} (Freire et al., 2002; Nunes et al., 2011). Whereas, the isolectin 1 of the lectin from *Cratylia mollis* seeds (Cramoll 1) did not show ion dependence and remained active after heating at 80 °C for 30 minutes or after stock for at least 10 years (Correia and Coelho, 1995).

When LifeLBL was chromatographed on a Superdex 75 column two peaks of proteins were obtained, with 19 and 15 kDa (Figure 5); the fluorimetric analysis showed two proteic peaks with fluorescence correspondent to the two peaks obtained at 280 nm (Figure 5). By SDS-PAGE under denaturing and reducing conditions, LifeLBL showed two polypeptide bands with relative molecular mass of 14 and 20 kDa (Figure 6). The gels obtained by two-dimensional electrophoresis demonstrated the presence of two spots with isoelectric points (pI) of 4.53 and 5.14 and with molecular masses of 20.28 kDa and 15.54 kDa, respectively (Figure 7). The lectin can be formed by subunit(s) of about 35 kDa, composed of two peptides.

In order to evaluate the affinity of lectin humic acids (HAc) were performed the test inhibition of hemagglutinating activity in the presence of HAc and single radial diffusion assay. In the inhibition assay (Figure 8) was observed and a decrease by 57% in LifeLBL SHA, revealing binding of lectins to the humic acid. The HAc, similar to carbohydrates, may compete with the carbohydrates present on the surface of erythrocytes by binding to the lectin (Santos et al., 2011). The single radial diffusion gel showed precipitation bands indicating that the extract, fraction and LifeLBL bound to humic acid present at a concentration of 100 mg L⁻¹. Similar results were obtained for a humic acid concentration of 200 mg L⁻¹ of carbon. These results are in agreement with those obtained in the haemagglutinating activity assay (Figure 9).

The effect of mono- and divalent cations in the specific haemagglutinating activity of LifeLBL in the presence of humic acid is depicted in Figure 10. The experimental results showed that sodium and calcium ions interfere with the interaction between LifeLBL and HAc, since it was observed an increase of SHA, showing a reduction the interaction between lectin and HuA result of the presence of ions (Ca^{2+} and Na^{+}) in the medium. The HA of LifeLBL was not influenced by ions, knowing that, one possible explanation for this result, is that calcium and sodium decrease

the availability of HuA to compete with the carbohydrate on the surface of erythrocytes by binding to LifeLBL; calcium is capable of forming a metal salt bridge or linkage between the carboxyl groups of HuA, which results in the formation of macromolecules hindering the binding of lectin to the humic acid (Zhou et al., 2005). Santos et al. (2011) had similarly resulted, when they reported that calcium decreases the availability of the humic acid to compete with the coagulant lectin from *Moringa oleifera* seeds (cMoL) for the carbohydrates on the surface of the erythrocytes.

The SHA LifeLBL in the presence of humic acid was influenced by the variation of pH. From pH 5.5 up to 6.5 there was no inhibition of hemagglutination activity, it is due a low interaction between lectin-HAc. When the pH reaches 7.0, there was inhibition of hemagglutinating activity. Between pH 7.5 to pH 11, this inhibition increased by 50% compared to the assay performed with the humic acid diluted in NaCl 15 mM. This is because the HAc to be soluble in alkalis (Stevenson, 1994), increased their willingness to compete for binding carbohydrates from the surfaces of erythrocytes.

In this work, a thermostable *L. ferrea* bark lectin (LifeLBL) that recognized chitin was purified in milligram quantities by a single affinity chromatographic with high protein yield with affinity to Humics acids.

Experimental

Collected material

The *L. ferrea* var. *leiostachya* Benth bark was collected in the city of Recife, state of Pernambuco, northeast of Brazil.

Isolation and Partial purification of L. ferrea bark lectin

L. ferrea bark was washed with distilled water, dry at 25°C and triturated to powder in a multiprocessor. A suspension of the triturated material at 10% (p/v) in 0.15 M NaCl was submitted to a moderate shaking by 16 h at 4 C. The mixture was filtered in a gauze, centrifuged (10.000 x g) for 15 minutes and the supernatant retired (crude extract), being stored at -20 C.

The crude extract was submitted to an 80% ammonium sulphate fractionation (F0-80) by adding the salt and agitation (4 h) at 25°C. After centrifugation the precipitate obtained was resuspended with 0.15 M NaCl and dialysed with distilled water (2 h) followed 0.15 M NaCl (2 h) at 4°C.

Hemagglutinating activity and inhibition assays

Sample of human erythrocytes (A, B, AB and O) and rabbit erythrocytes were obtained as described by Bukantz et al. (1946), and treated with glutaraldehyde according to Bing et al. (1967). The hemagglutinating activity (HA) was evaluated in 96-well microtiter plates. At each well 50 µl of 0.15 M NaCl was added, and next, 50 µl of sample were placed in the second well of a horizontal array, being proceeded successive dilutions. After this procedure, 50 µl of treated erythrocytes were added and the HA corresponded to the last sample dilution that showed agglutination (Correia & Coelho, 1995), and the specific HA (SHA) corresponded to the ration between HA and the protein concentration. The protein concentration was accomplished in agreement with the method of Lowry et al. (1951) and Warburg & Christian (1960). Inhibition HA assays were performed using the carbohydrates (100 mM) (glucose, mannose, galactose, fucose, N-acetyl-D-glucosamine, sucrose and lactose), the glycoproteins (0.5 mg/ml) (fetuín, rabbit serum, azocasein, casein, ovoalbumine, fetal serum, thyroglobuline, peroxidase) and humic acid (Sigma Aldrich 53680), in a solution of 10 mg/L of carbon was prepared in NaOH 0.1 M as described by Coelho and Silva (2000).

Lectin purification

A sample of F0-80 (10 mg/ml) was applied on a chitin column (5.0 x 1.5 cm) with a flow rate of 20 ml/h. Proteins in each fraction (2 ml) were measured by absorbance at 280 nm. Unbound proteins were washed with 0.15 M NaCl and adsorbed proteins were eluted with 1.0 M acetic acid. Fractions with HA, eluted with acetic acid were pooled, dialyzed against 0.15 M NaCl (LifeLBL) and stored at -20 °C.

Effect of pH, temperature and metal ions on hemagglutinating activity

The effects of pH and temperature on HA were evaluated by incubating LifeLBL samples (1 ml) at different pH values (2 – 11) for 1 h at 25 °C or at 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 and 100 °C for 30 minutes, respectively. The effect of Mg^{2+} and Ca^{2+} was performed with incubation (15 minutes) of a solution (1 ml) containing $CaCl_2$ and $MgCl_2$ (5, 10 and 20 mM) and 0.15 M NaCl and LifeLBL. An aliquot (50 μ l) of the mixture was distributed in microtiter plate 96-well and the HA assay was proceeded.

Effect of pH and mono- and divalent-cations on the interaction of the LifeLBL with humic acid

The effect of pH in an range of 3.0 to 10.0 on the lectin hemagglutinating activity of the purified protein was assessed in the presence of the humic acid according to the procedure previously described. Humic acid solutions with pH between 3.0 and 6.5 were prepared in a citrate-phosphate buffer (10 mM) and humic acid solutions with pH between 7.0 and 10.0 were prepared in sodium phosphate buffer (10 mM). The effect of mono (Na^+) and divalent (Ca^{2+}) cations on the lectin's hemagglutinating activity was assessed using humic acid solutions in $CaCl_2$ 10 mM or NaCl at 10, 20, 30 and 40 mM.

Single radial diffusion

A diffusion assay was carried out in an agarose gel in a Petri dish. The gel with a concentration of 1% (w/v) was prepared in 0.15 M NaCl. A humic acid (HuA) solution (30 μ L), with a concentration of 100 or 200 mg/L of Carbon, was placed in a central well, while the peripheral wells were occupied with 15 μ L each of the *L. ferrea* extract (33.5mg/mL), F0-80 (10.2mg/mL) or LifeLBL (1 mg/mL). The diffusion experiments were performed in a humid chamber at 4 °C for 48 h. Subsequently the gels were exhaustively washed with 0.15 M NaCl and stained for 2 h with Coomassie Brilliant Blue 0.1% (w/v) prepared in a mixture of ethanol 45 % (v/v) and acetic acid 10 % (v/v). During incubation occurs the diffusion of HuA in agarose gels with the formation of HuA-lectin complexes, which precipitate and it can be visualized after staining with Coomassie Brilliant Blue.

Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

Electrophoresis on a 12,5% (w/v) polyacrylamide gel in the presence of sodium dodecyl sulphate (SDS-PAGE) was performed according to Laemmli (1970). The molecular weight of the purified lectin was defined using protein standard markers (electrophoresis marker LMW-SDS from Amersham - Pharmacia Biotech) that consists of phosphorylase b (97 KDa), bovine serum albumin (66 KDa), ovalbumin (45 KDa), carbonic anhydrase (30 KDa), trypsin (20.1 KDa) and α -lactalbumin (14.4 KDa). After the electrophoresis the gel was stained with 0.02% (w/v) Coomassie Brilliant Blue in 10% (v/v) acetic acid, for 16 h.

Two-dimensional electrophoresis

The preparation of protein samples to be submitted to two dimensional (2D) electrophoresis was performed using a sample of LifeLBL (100 μ g) that was lyophilised and resuspended in 100 μ l of Milli-Q water. LifeLBL was mixed with 250 μ L of rehydration buffer containing 8.0 M urea, 2% (w/v) CHAPS, 20 mM dithiothreitol (DTT), 0.5% IPG buffer (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA), and 0.002% (w/v) bromophenol blue. The samples were loaded on an IPG strip of 13 cm (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) and a linear pH range from 3.0 to 10.0. The isoelectric focusing was performed on Ettan IPGphor III system (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) following the manufacturer's protocol. Before running the second dimension electrophoresis, the strip was equilibrated for 15 min in fresh buffer (6 M urea, 30% (v/v) glycerol, 2% (w/v) SDS, and 100 mM Tris-HCl pH 8.8) with the addition of 100 mM DTT. Next, the strip was treated for 15 min with the same buffer supplemented with 0.25 M iodoacetamide. The equilibrated IPG strip was transferred to 12.5% (w/v) SDS-PAGE gel. The proteins in the gel were visualized by staining with Coomassie Brilliant Blue R-250. Images with scanning resolution of 300 dpi and 16-bit pixel depth were acquired and then analyzed using the software Image Master 2D Platinum 6.0 (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA).

Fluorescence spectroscopy

A LifeLBL sample (2 ml) was excited by radiation of short wavelength and the absorption of the sample fluorimetric measurement was in long wavelengths. Intrinsic fluorescence assay was performed on a spectrofluorometer (JASCO FP-6300, Tokyo, Japan). The fluorescence emission intensity of tryptophan from irradiated LifeLBL solution in phosphate buffer at pH 7.2 was measured at 25°C in a rectangular quartz cuvette with a 1 cm path length. For intrinsic fluorescence measurements, the excitation was at 295 nm and emission was recorded from 305 to 450 nm, using 5 nm band pass filters for both excitation and emission.

References

- Albuquerque, L.P.; Pontual, E.V.; Santana, G.M.S.; Silva, L.R.S.; Aguiar, J.S.; Coelho, L.C.B.B.; Rêgo, M.J.B.M.; Pitta, M.G.R.; Silva, T.G.; Melo, A.M.A.; Napoleão, T.H.; Paiva, P.M.G. Toxic effects of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin on *Artemia salina*, human cells, and the schistosomiasis vector *Biomphalaria glabrata*, *Acta Tropica*, Volume 138, October 2014, Pages 23-27.
- Araújo AA, Soares LAL, Ferreira MRA, Neto MAS, Silva GR, Araújo Jr. RF, Guerra GCB, Melo MCN (2014). Quantification of polyphenols and evaluation of antimicrobial, analgesic and anti-inflammatory activities of aqueous and acetone–water extracts of *Libidibia ferrea*, *Parapiptadenia rigida* and *Psidium guajava*. *J. Ethnopharmacol.* 156:88-96.
- Araújo, R.M.S.; Ferreira, R.S.; Napoleão, T.H.; Carneiro-da-Cunha, M.G., Coelho, L.C.B.B.; Correia, M.T.S.; Oliva, M.L.V.; Paiva, P.M.G. *Crataeva tapia* bark lectin is an affinity adsorbent and insecticidal agent, *Plant Science*, Volume 183, February 2012, Pages 20-26.
- Baird, C. *Química Ambiental*, 2 ed., Porto Alegre, Bookman, 2002.
- Barros, A.O.; De Souza, R.S.; Aranha, E.S.P.; Da Costa, L.M.; De Souza, T.P.; De Vasconcellos, M.C.; Lima, E.S. Antioxidant and hepatoprotective activities of *Libidibia ferrea* bark and fruit extracts. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2014. Vol 6, Issue 11.
- Carvalho, A.S.; Silva, M.V.; Gomes, F.S.; Paiva, P.M.G.; Malafaia, C.B.; Silva, T.G.; Vaz, A.F.M.; Silva, A.G.; Arruda, I.R.S.; Napoleão, T.H.; Carneiro-da-Cunha, M.G. Correia, M.T.S. Purification, characterization and antibacterial potential of a lectin isolated from *Apuleia leiocarpa* seeds, *International Journal of Biological Macromolecules*, Volume 75, April 2015, Pages 402-408.
- Chikalovets, I.V.; Chernikov, O.V.; Pivkin, M.V.; Molchanova, V.I.; Litovchenko, A.P.; Li, W.; Lukyanov, P.A. A lectin with antifungal activity from the mussel *Crenomytilus grayanus*, *Fish & Shellfish Immunology*, Volume 42, Issue 2, February 2015, Pages 503-507.
- Coelho, L.C.B.B., Silva, M. B. R., 2000. Simple method to purify milligram quantities of the galactose – specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. *Phytochemical Analysis*, 11, 295 – 300.
- Coelho, L.C.B.B.; Santos, A.F.S.; Napoleão, T.H.; Correia, M.T.S.; Paiva, P.M.G. Protein Purification by Affinity Chromatography, *Protein Purification*, Dr. Rizwan Ahmad (Ed.), ISBN: 978-953-307-831-1, InTech, 2012. Available from: <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/26596.pdf>.
- Correia, M.T.S., Coelho, L. C. B. B., 1995. Purification of glucose/ mannose specific lectin, Isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart (camaratu bean). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 55, 261 - 273.
- Da Silva, L.C.N.; Júnior, C.A.S.; De Souza, R.M.; Macedo, A.J.; Da Silva, M.V.; Correia, M.T.S. Comparative analysis of the antioxidant and DNA protection capacities of *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea* and *Pityrocarpa moniliformis* fruits. *Food and Chemical Toxicology* 49, 2222–2228. 2011.

Dias, A.M.A.; Rey-Rico, A.; Oliveira, R.A.; Marceneiro, S.; Alvarez-Lorenzo, C.; Concheiro, A.; Júnior, R.N.C.; Braga, M.E.M.; Sousa, H.C. (2013). Wound dressings loaded with an anti-inflammatory jucá (*Libidibia ferrea*) extract using supercritical carbon dioxide technology. *J. Supercrit. Fluids* 74:34-45.

Ferreira, M.R.A. & Soares, L.A.L. *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz: A review of the biological activities and phytochemical composition. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 9(2), pp. 140- 150, 3 February, 2015.

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., 2002. Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40, 61 - 68.

Freitas, A.C.C.; Ximenes, N.C.A.; Aguiar, J.S. et al., “Biological Activities of *Libidibia* (Caesalpinia) *ferrea* var. *parvifolia* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz Pod Preparations,” *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2012, Article ID 514134, 7 pages, 2012.

Kennedy, J. F.; Paiva, P. M. G.; Correia, M. T. S.; Cavalcanti, M. S. M.; Coelho, L. C. B. B., 1995. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. *Carbohydr.Polym.*, v. 26 : 219 – 30.

Khraisheh, M.; Al-Ghouti, M.A.; Stanford, C.A. The application of iron coated activated alumina, ferric oxihydroxide and granular activated carbon in removing humic substances from water and wastewater: Column studies, *Chemical Engineering Journal*, Volume 161, Issues 1–2, 1 July 2010, Pages 114-121.

Kliaugaitė, D.; Yasadi, K.; Euverink, G.; Bijmans, M.F.M.; Racys, V. Electrochemical removal and recovery of humic-like substances from wastewater, *Separation and Purification Technology*, Volume 108, 19 April 2013, Pages 37-44, ISSN 1383-5866.

Lopes N, Faccin-Galhardi LC, Espada SF, Pacheco AC, Ricardo NMPS, Linhares REC, Nozawa C (2013). Sulfated polysaccharide of *Caesalpinia ferrea* inhibits herpes simplex virus and poliovirus. *Int. J. Biol. Macromol.* 60:93-99.

Lorenzi, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 4. ed., v. 1. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 162 pg. 2008.

Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J.; Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951. 193, 265.

Machuka, J. S., Okeola, O.G., Els, J. M. V. D., Chrispeels, M. J., Leuven, F. V., Peumans, W. J., 1999. Isolation and partial characterization of galactose-specific lectins from African yam beans, *Sphenostyles stenocarpa* Harms. *Phytochemistry*, 51, 721 -728.

Menezes, I.A.C.; Moreira, I.J.A.; Carvalho, A.A.; Antonioli, A.R.; Santos, M.R.V. Cardiovascular effects of the aqueous extract from *Caesalpinia ferrea*: involvement of ATP-sensitive potassium channels. *Vascular Pharmacology*, 47, pp. 41-47, 2007.

Moriguchi, T., Yano, K., Tahara, M., & Yaguchi, K. (2005). Metal-modified silica adsorbents for removal of humic substances in water. *Journal of Colloid and Interface Science*, 283, 300-310. DOI: 10.1016/j.jcis.2004.09.019.

Nakamura E.L.S.; Kurosaki, F.; Arisawa, M.; Mukainaka, T.; Takayasu, J.; Okuda M.; Tokuda, H. Nishino, H. Pastore JR, F., 2002. Cancer chemopreventive effects of constituents of *Caesalpinia ferrea* and related compounds. *Cancer Letters*, 177, 119 – 124.

Nelson & Cox, M.M. In: *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. Ed: Artmed. 2011. 1304 págs.

Nichols, G.L. Protozoa: *Entamoeba histolytica*, In *Encyclopedia of Food Safety*, edited by Yasmine Motarjemi, Academic Press, Waltham, 2014, Pages 31-36.

Nunes, E.S.; Souza, M.A.A.; Vaz, A.F.M.; Silva, T.G.; Aguiar, J. S.; Batista, A.M. ; Guerra, M.M.P.; Guarnieri, M.C.; Coelho, L.C.B.; Correia, M.T.S. Cytotoxic Effect and Apoptosis Induction by *Bothrops leucurus* Venom Lectin on Tumor Cell Lines. *Toxicon* (Oxford), 2012. v. 59, p. 667-671.

Oliveira, A.F.; Batista, J.S.; Paiva, E.S.; Silva, A.E.; Farias, Y.J.M.D.; Damasceno, C.A.R.; Brito, P.D.; Queiroz, S.A.C.; Rodrigues, C.M.F.; Freitas, C.I.A. Avaliação da atividade cicatrizante do jucá (*Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. var. *ferrea*) em lesões cutâneas de caprinos. *Rev. bras. plantas med.* 2010. vol.12 no.3.

Sampaio, F.C.; Pereira, M.S.V.; Dias, C.S.; Costa, V.C.O.; Conde, N.C.O.; Buzalaf, M.A.R. (2009). In vitro antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. *J. Ethnopharmacol.* 124:289- 294.

Santos, A.F.S.; Carneiro-da-Cunha, M.G.; Teixeira, J.A.; Paiva, P.M.G.; Coelho, L.C.B.B.; Nogueira, R. Interaction of *Moringa oleifera* seed lectin with humic acid. *Chemical Papers* 65 (4) 406–411, 2011.

Santos, N.D.; Paixão, K.S.; Napoleão, T.H.; Trindade, P.B.; Pinto, M.R.; Coelho, L.C.; Eiras, Á.E.; Navarro, D.M.; Paiva, P.M.G. Evaluation of *Moringa oleifera* seed lectin in traps for the capture of *Aedes aegypti* eggs and adults under semi-field conditions. *Parasitology Research*, v. 113, p. 1837-1842, 2014.

Sharon, N. Carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. *J Biol Chem.* 282: 2753-2764. 2007.

Sharon, N., Lectins: past, present and future. *Biochem Soc. Trans.* 36, 2008, Pages 1457 - 1460.

Silva, M.C.C.; Paula, C.A.A.; Ferreira, J.G.; Paredes-Gamero, E.J.; Vaz, A.M.S.F.; Sampaio, M.U.; Correia, M.T.S.; Oliva, M.L.V. *Bauhinia forficata* lectin (BfL) induces cell death and inhibits integrin-mediated adhesion on MCF7 human breast cancer cells, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, Volume 1840, Issue 7, July 2014, Pages 2262-2271.

Silva, M.C.C.; Santana, L. A.; Mentele, R.; Ferreira, R. S.; Miranda, A.; Silva-Lucca, R.A.; Sampaio, M. U.; Correia, M.T.S.; Oliva, M.L.V. Purification, primary structure and potential functions of a novel lectin from *Bauhinia forficata* seeds. *Process Biochemistry*, 2012. 47, 1049–1059.

Silva, M.D.C.; Sá, R.A.; Napoleão, T.H.; Gomes, F.S.; Santos, N.D.L.; Albuquerque, A.C.; Xavier, H.S.; Paiva, P.M.G.; Correia, M.T.S.; Coelho, L.C.B.B. Purified *Cladonia verticillaris* lichen lectin: Insecticidal activity on *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae). *International Biodeterioration and Biodegradation* , v. 63, p. 334-340, 2009.

Souza, Jayra D.; Silva, Maria B.R.; Argolo, Adriana C.C.; Napoleão, Thiago H. ; Sá, Roberto A. Correia, Maria T.S.; Paiva, Patrícia M.G.; Silva, Michele D.C.; Coelho, Luana C.B.B. A new *Bauhinia monandra* galactose-specific lectin purified in milligram quantities from secondary roots with antifungal and termiticidal activities, *International Biodeterioration & Biodegradation*, Volume 65, Issue 5, August 2011, Pages 696-702.

Trentin, D.S.; Giordani, R.B.; Zimmer, K.R.; Silva, A.G.; Silva, M.V.; Correia, M.T.S.; Baumvol, I.J.R.; Macedo, A.J. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles, *Journal of Ethnopharmacology*, Volume 137, Issue 1, 1 September 2011, Pages 327-335.

Vanderlei, E.S.O.; Patoilo, K.K.N.R.; Lima, N.A.; Lima, A.P.S.; Rodrigues, J.A.G.; Silva, L.M.C.M.; Lima, M.E.P.; Lima, V.; Benevides, N.M.B. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of lectin from the marine green alga *Caulerpa cupressoides*, *International Immunopharmacology*, Volume 10, Issue 9, September 2010, Pages 1113-1118.

Vasconcelos, C.F.; Maranhao, H.M.; Batista, T.M.; Carneiro, E.M.; Ferreira, F.; Costa, J.; Soares, L.A.; Sa, M.D.; Souza, T.P., Wanderley, A.G. Hypoglycaemic activity and molecular mechanisms of *Caesalpinia ferrea* Martius bark extract on streptozotocin-induced diabetes in Wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 2011. 137, 1533–1541.

Warburg, O.; Christian, W., 1942. Isolierung und kristallisation des gärungsferments enolase *Biochem. Z.*, (310), 384-421.

Wititsuwannakul R, Wititsuwannakul D, Sakulborirug C (1998). A lectina from the bark of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Phytochemistry*, 47: 183-187.

Yao, Q.; Wu, C.; Luo, P.; Xiang, X.; Liu, J.; Mou, L.; Bao, J. A new chitin-binding lectin from rhizome of *Setcreasea purpurea* with antifungal, antiviral and apoptosis-inducing activities, *Process Biochemistry*, Volume 45, Issue 9, September 2010, Pages 1477-1485.

Yu, W.Z.; Gregory, J.; Li, G.B.; Qu, J.H. Effect of humic acid on coagulation performance during aggregation at low temperature *Chem. Eng. J.*, 223, pp. 412–417. 2013.

Yvette van Kooyk, Juan M. Ilarregui, Sandra J. van Vliet, Novel insights into the immunomodulatory role of the dendritic cell and macrophage-expressed C-type lectin MGL, *Immunobiology*, Volume 220, Issue 2, February 2015, Pages 185-192.

Zhang, Q.; Rao, G.; Rogers, J.; Zhao, C.; Liu, L.; Li, Y. Novel anti-fouling Fe₂O₃/TiO₂ nanowire membranes for humic acid removal from water, *Chemical Engineering Journal*, Volume 271, 1 July 2015, Pages 180-187.

Zhu, M.; Wang, H.T.; Keller, A.A.; Wang, T.; Li, F.T. The effect of humic acid on the aggregation of titanium dioxide nanoparticles under different pH and ionic strengths *Sci. Total Environ.*, 487, pp. 375–380. 2014.

List of captions

Table 1 – Summary of purification.

Figure 1 - Elution pattern of F80 on a chitin column. A sample (10 mg of protein) was applied at flow rate of 20 ml/h and 2 ml fractions were collected. Arrows indicated elution with 0.15 M NaCl (1), followed by 1 M acetic acid (2).

Figure 2 - Hemagglutinating activity of LifeLBL in presence of different erythrocytes.

Table 2 – inhibition of hemagglutinating activity of LifeLBL in presence of different carbohydrates.

Figure 3 - Hemagglutinating activity of LifeLBL in presence of pH values

Log HA of LifeLBL in 0.15 M NaCl with rabbit erythrocytes was 2.7.

Figure 4 - Hemagglutinating activity of LifeLBL in presence of metal ions. Log HA of LifeLBL in 0.15 M NaCl with rabbit erythrocytes was 2.7.

Figure 5 - Determination of the molecular weight of LifeLBL by gel filtration on Superdex 75 column. A sample (2 mg of protein) was applied at flow rate of 0.6 ml/min and 3 ml fractions were collected and developed with 0.5 M NaCl.

Figure 6 - SDS-PAGE of purified LifeLBL under denatured and reduced conditions.

Figure 7 – Two-dimensional electrophoresis of purified LifeLBL, showed two spots with isoelectric points (pI) of 4.53 and 5.14 and with molecular masses of 20.28 kDa and 15.54 kDa, respectively

Figure 8 - Comparison of hemagglutination activity (HA) of lectins(Black column) to HA obtained in the presence of humic acid (white column).

Figure 9 – Diffusion radial. Precipitation bands observed in agarose gel corresponding to the interaction between humic acid 200 mg L⁻¹ of carbon (A) and 100 mg L⁻¹ of carbon (B): extract (33,5mg/mL), the fraction (F0-80) (10,2mg/mL) or the purified lectins (1 mg/mL).

Figure 10- Effect of sodium ions (A) calcium and (B) HA LifeLBL front ACh. White bar = control (HA LifeLBL in the presence of AHus); AH = black bar in the presence of AHus CfelBL and ions

Figure 11 - HA LifeLBL forward in the presence of humic acid at different pH values. White bar = control (HA LifeLBL in the presence of AHus); AH = black bar in the presence of ACh LifeLBL, varying the pH.

Table 1

Purification step	Volume (mL)	Protein (mg/mL)	Total Protein (mg)	HA^a	THA^b	SHA^c	Yield	Purif.
Crude extract	78	33,5	2.613	2.048	159.744	61,1	26,13	-
F0-80	19	10,2	193,8	512	9.728	50,1	1,938	0,82
Chitin Elution	12	0,13	98,8	64	768	492,3	0,988	8.0

Purif.: fold purification.

a - Hemagglutinating activity was performed with 2.5% (v/v) suspension of glutaraldehyde-treated rabbit erythrocytes.

b - Total hemagglutinating activity = HA × volume (ml).

c - Specific hemagglutinating activity = HA/protein (mg/ml).

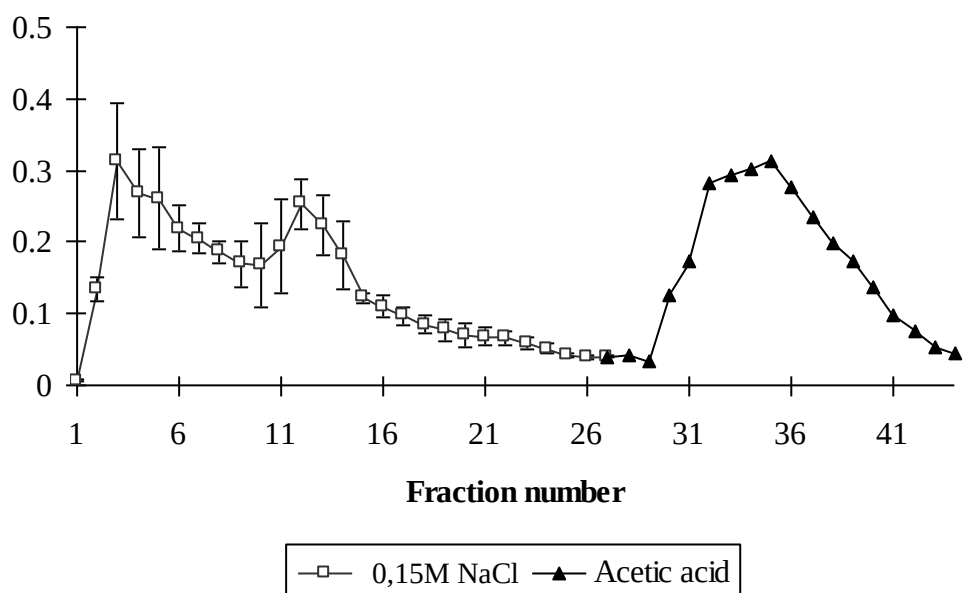
Figure 1**A 280 nm**

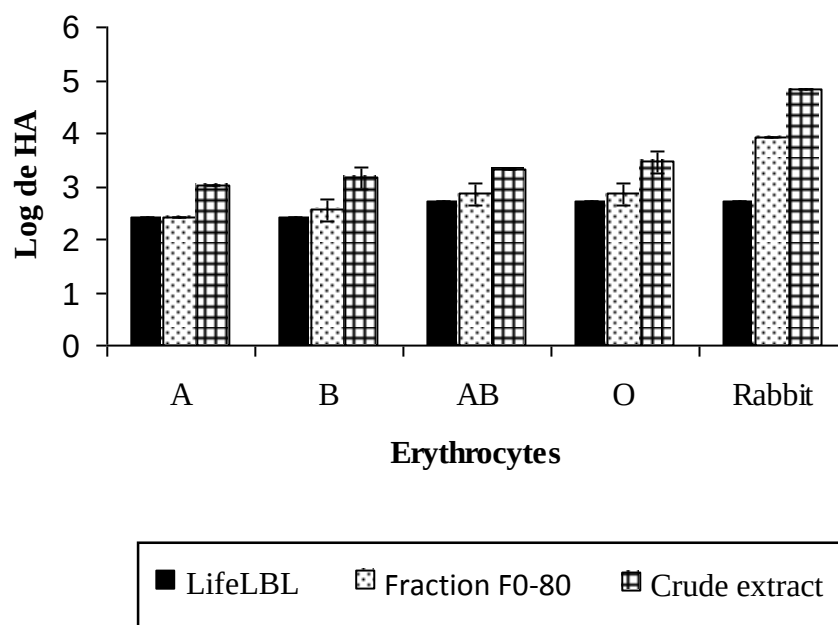
Figure 2

Table 2

	Concentrations (M)			
	0,2	0,1	0,05	0,025
	SHA			
Rhamnose	61,54	61,54	61,54	123,08
Trehalose	N	N	N	N
Fructose	N	N	N	N
Xylose	123,08	123,08	123,08	123,08
N-acetylglucosamine	246,15	246,15	246,15	246,15
Methyl-α -D Mannopiranoside	N	N	N	N
Glucose	123,08	123,08	123,08	123,08
Mannose	123,08	123,08	123,08	123,08
Galactose	246,15	246,15	246,15	246,15
Fetuin	30,77	30,77	61,54	61,54
Ovalbumin	61,54	61,54	61,54	61,54
BSA	0	0	15,38	15,38
Tiroglobulin	61,54	61,54	61,54	61,54

- I. N = No inhibition.
 II. SAH of LifeLBL = 492,3.

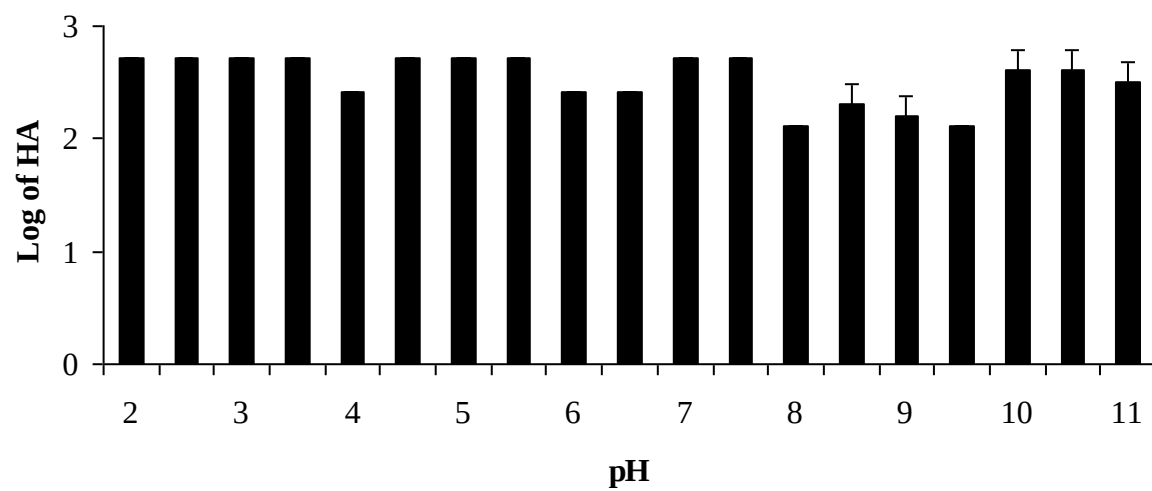
Figure 3

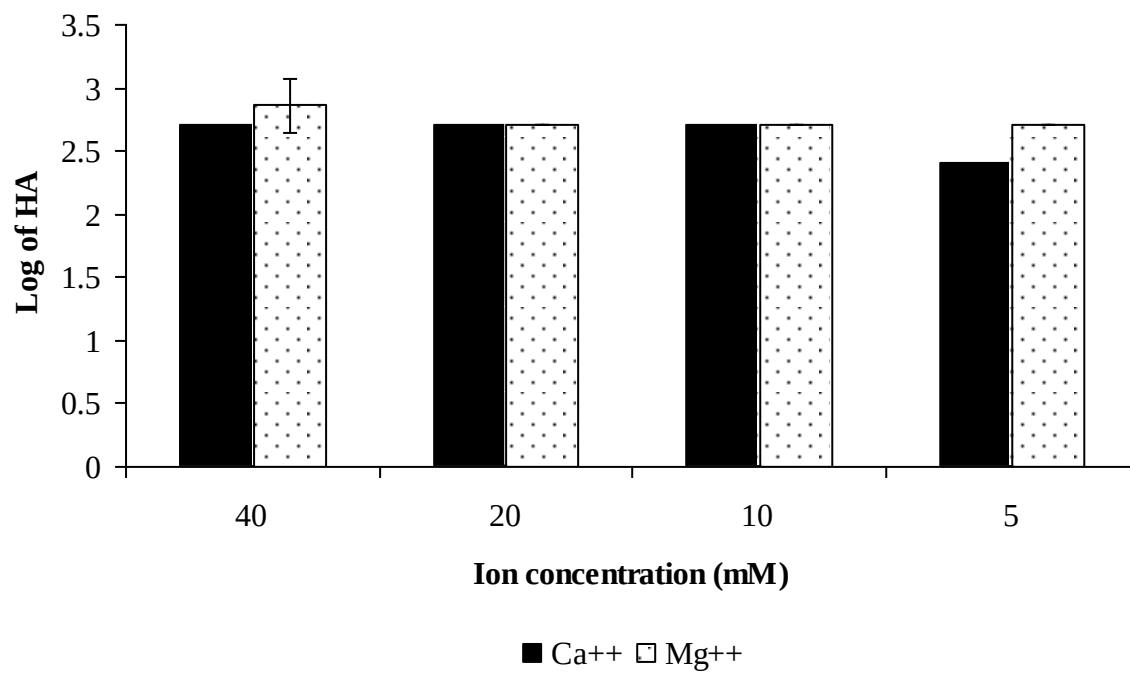
Figure 4

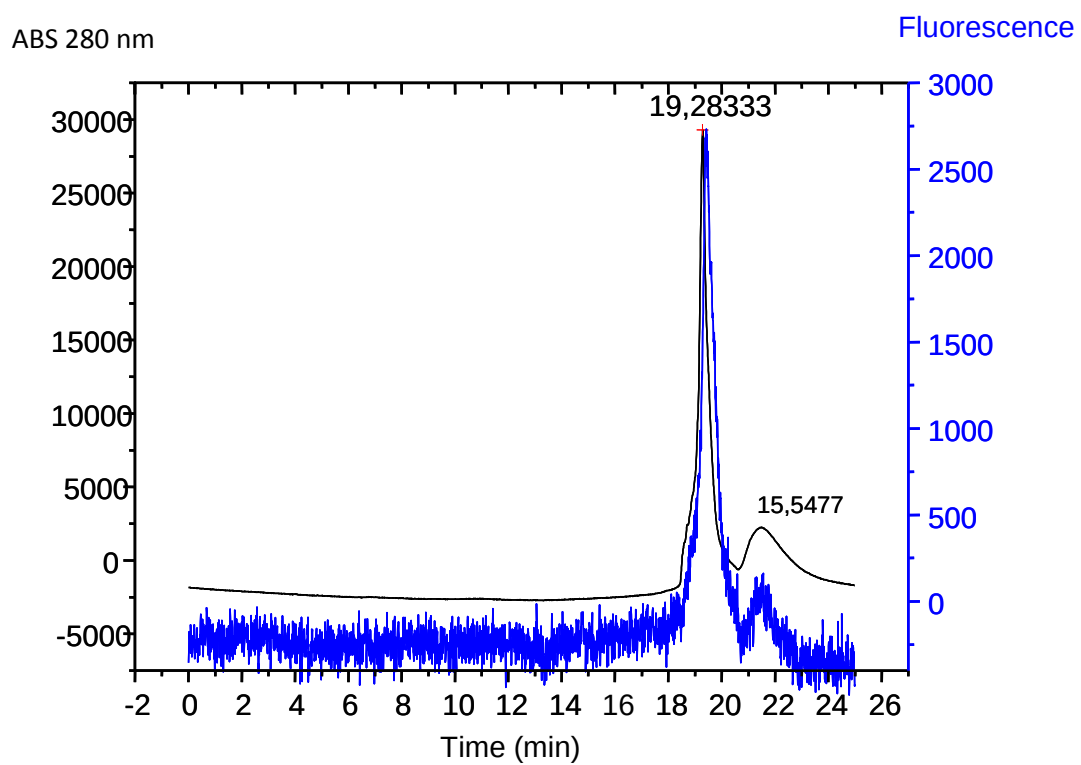
Figure 5

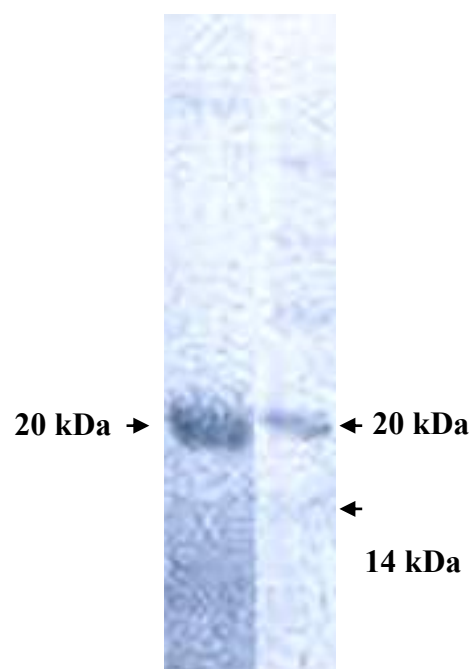
Figure 6

Figure 7

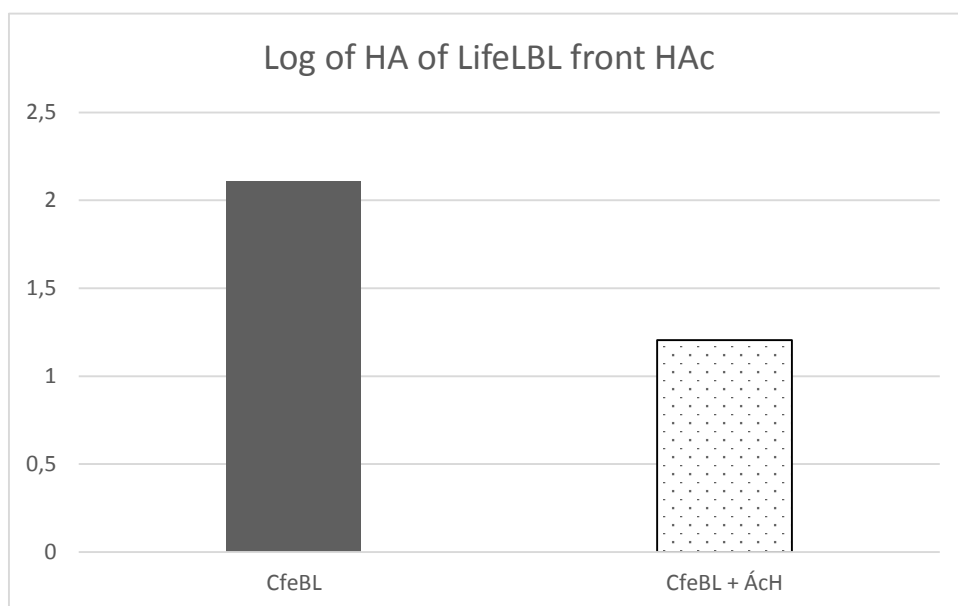
Figure 8

Figure 9 -

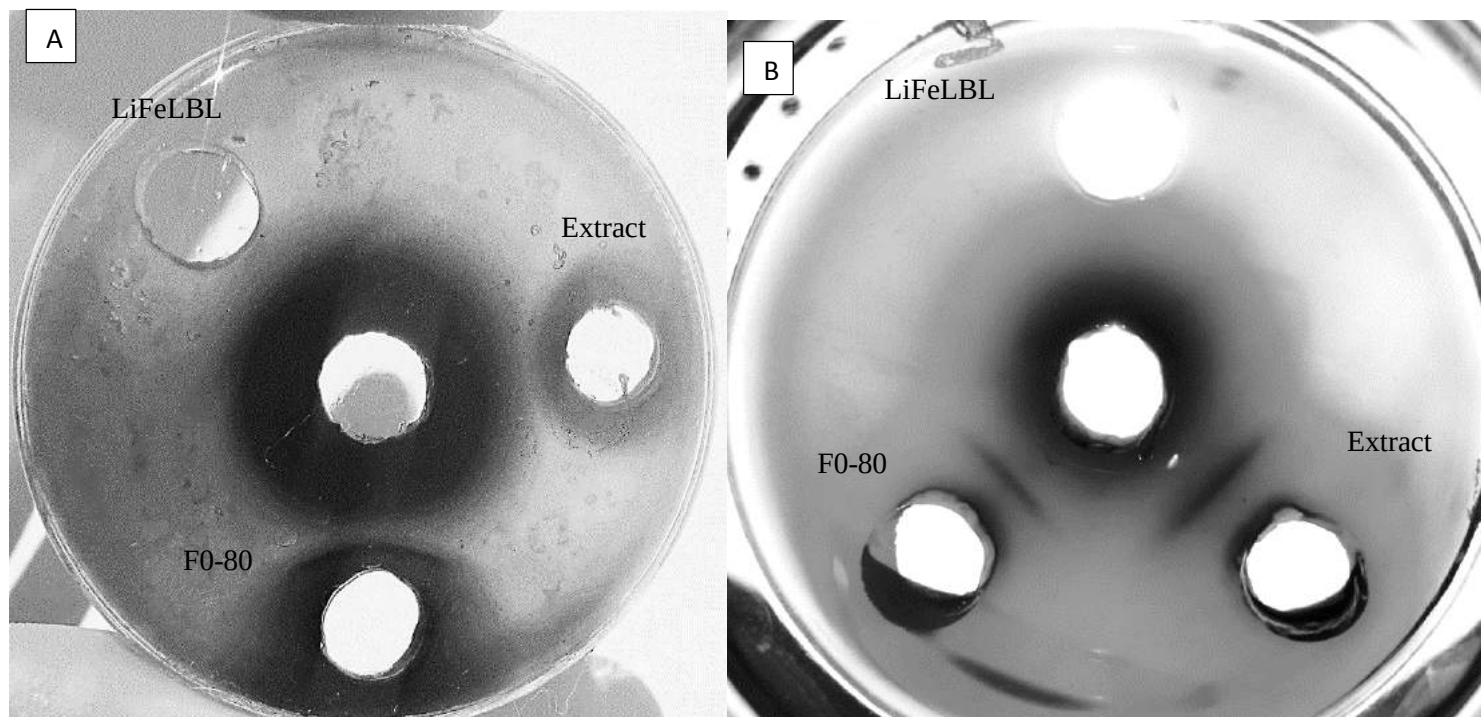


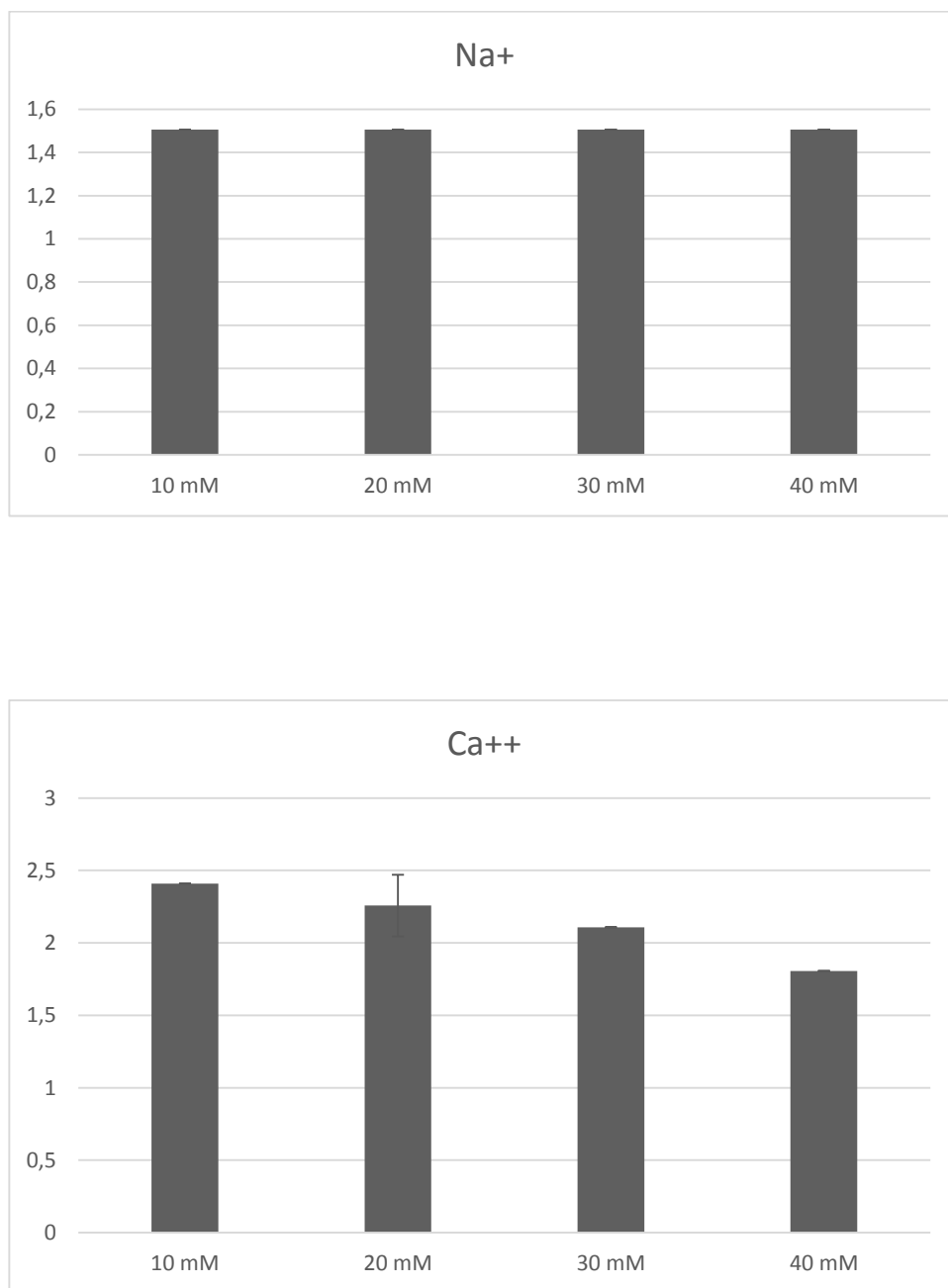
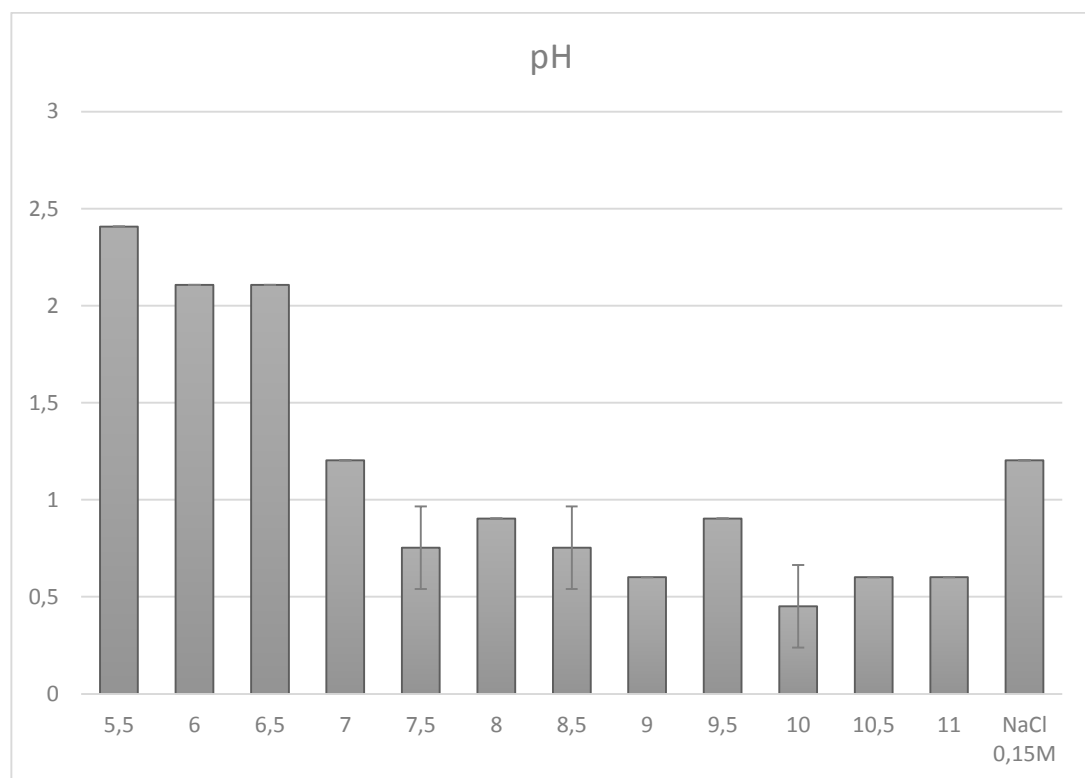
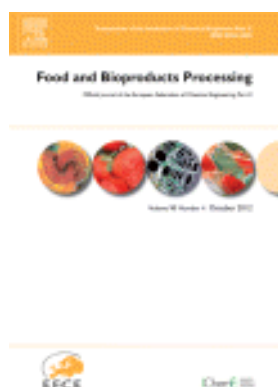
Figure 10 -

Figure 11

**CAPITULO 3: ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO FOOD AND
BIOPRODUCTS PROCESSING**

***Libidibia ferrea* var. *leiostachya*: compounds and proprieties
antioxidants**



Libidibia ferrea var. *leiostachya*: compounds and proprieties antioxidants

Silva, C.E.S.; Ximenes, N.C.A.; Paiva, P.M.G.; Napoleão, T.H. and Correia, M. T. S. *

Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, 50,670-420, Recife, Brasil.

*Corresponding author:

Tel: +55-81-2126.8540; Fax: +55-81-2126.8576;

E-mail address: mtscorreia@gmail.com

Abstract

The objective of this study was verify the presence of antioxidant activity and Sun Protection Factor (SPF) of samples from *L. ferrea* and identify the phytochemical profile of the same samples. The hemagglutination activity of LifeLBL was partially inhibited in presence of humic acids. The antioxidant assay demonstrated that the saline extract achieved 96% activity in concentration of 1mg/mL. To correlate this result, the determination of total phenols and flavonoids was performed, and shows 185.89 ± 9.35 mg AGE / mg of extract and $40.415 \text{ mg} \pm 0.73$ mg QE / mg of extract, respectively. The determination of the Sun Protection Factor (SPF) in vitro was determined by the spectrophotometric method and saline extract presented an SPF of 3.4, in a concentration of 100µg/mL. Phytochemical screening of the samples used in the purification of LifeLBL: Saline Extract (ES), F0-80 and LifeLBL, was carried out. In addition, a methanol extract was made to show the compounds in the bark of *L. ferrea* which was not extracted by the extraction saline. Saline extract showed condensed proanthocyanidins, and traces of flavonoids (yellow). In the methanol extract was found flavonoids, and hydrolysable tannins and condensates proanthocyanidins in higher concentration in the aqueous extract. In F0-80 we found a higher concentration of tannins and flavonoids compared to saline extract. It was not observed secondary metabolite contaminants in the lectins sample.

Key-words: *Libidibia ferrea*, Lectin, LifeLBL, antioxidant, Sun protection factor.

1. Introduction

An antioxidant is defined as a substance, which, at low concentrations, slows or prevents oxidation of the substrate (Halliwell et al., 1995; Sucupira et al., 2012). Phenol compounds in plants act protecting them from injuries in their tissues, against the action of photosynthesis by-products that can cause damage and also against herbivores. Many of these compounds have similarities regarding the basic molecular structure having at least one aromatic ring with a hydroxyl group bonded to it, which confer protection against attack of free radicals (Manach et al., 2004).

Libidibia ferrea is a species that has four varieties: three of them occur in the Caatinga (eg, *Libidibia ferrea* var. *ferrea*) and one (*L. ferrea* var. *leiostachya* Benth) is characteristic of the Atlantic forest. Its wood is very tough (from this comes the “ironwood” name) and

is used for buildings and fences. The seeds are used as medicinal for joint pain and bark for pain relief in general (Queiroz, et al 2009). The objective of this study was to find the constituents of the saline extract from *Libidibia ferrea* bark, as well as investigate the presence of antioxidant activity of the samples.

2. Materials and methods

2.1 Extract and fraction proteic from *L. ferrea* bark

L. ferrea bark was washed with distilled water, dry at 25°C and triturated to powder in a multiprocessor. A suspension of the triturated material at 10% (p/v) in 0.15 M NaCl was submitted to a moderate shaking by 16 h at 4 C. The mixture was filtered in a gauze, centrifuged (10.000 x g) for 15 minutes and the supernatant carefully retired (crude extract), being stored at -20 C.

The crude extract was submitted to an 80% ammonium sulphate fractionation (F80) by adding the salt and agitation (4 h) at 25°C. After centrifugation the precipitate obtained was resuspended with 0.15 M NaCl and dialysed with distilled water (2 h) followed 0.15 M NaCl (2 h) at 4°C.

2.2 Purification of LifeLBL

The F0-80 was applied to a chromatography column (5.0 x 1.5 cm) containing chitin. Fractions of 2 ml were collected and the absorbance read at 280 nm. Non-adsorbed proteins were eluted with 0.15 M NaCl and the adsorbed proteins were eluted with a solution of acetic acid 1.0 M. The chromatographic procedures were performed at room temperature at a flow rate of 20 ml / h. The fractions with the highest absorbance eluted with acetic acid, were pooled and dialyzed against 0.15 M NaCl to give LifeLBL.

2.1 Lectin's hemagglutinating activity assay

The hemagglutinating activity assay (HA) was performed in microtiter plates according to Correia and Coelho (1995). Lectin preparations (50 µL) were two-fold

serially diluted with 0.15 M NaCl before addition of 50 μ L suspension of rabbit erythrocytes previously treated with glutaraldehyde 2.5% (v/v). The titer was expressed as the highest dilution exhibiting hemagglutination. Essays were performed with the saline extract (E), 33,5mg/mL, the protein fraction (0-80 F), 10,2mg/mL and the purified protein, 130 μ g/mL.

2.2 Determination of protein concentration

The protein was estimated according to Lowry et al. (1951). A calibration curve was prepared using bovine serum albumin (BSA) as the standard in a range between 0 and 500 μ g/mL. after purification, was used the method of Warburg and Christian (1942).

2.3 Phytochemical evaluation

First, it was performed a methanol extract (ME) of *L. ferrea* bark (an infusion of 3 g of triturated inner bark in methanol prepared under constant agitation for 30 min). To analyze aqueous samples (SE, F80 and LifeLBL) was added in a test tube in the ratio 1: 1 butyl alcohol was stirred quickly thus forming two phases: the aqueous phase was used for the saponins detection test. Aliquots of ME, SE, F80 and LifeLBL (15 μ L) were subjected to thin layer chromatography (TLC) on silica gel plates (Merck, Germany). The analyses used several systems of development as mobile phase, reagents for adequate revelation and chromatographic standards.

Each sample was investigated for the presence of: (I) alkaloids (EtOAc–HCOOH–AcOH–H₂O [100:11:11:26 v/v] as mobile phase and Dragendorff's reagent for revelation; Wagner and Bladt, 1996); (II) terpenoids and steroids (EtOAc–HCOOH–AcOH–H₂O [100:0.5:0.5:0.5 v/v] and Liebermann–Burchard's reagent; Harborne, 1998); (III) iridoids (EtOAc–HCOOH–AcOH–H₂O [100:11:11:26 v/v] and vanillinsulphuric acid for revelation; Wagner and Bladt, 1996); (IV) coumarins (Et₂O–toluene–AcOH 10% [50:50:50 v/v] and UV 365 nm to detect; Wagner and Bladt, 1996); (V) cinnamic derivatives, phenylpropanoglucosides, flavonoids and phenolic acids (EtOAc–HCOOH–AcOH–H₂O [100:11:11:26 v/v] and Neu's reagent to reveal; Wagner and Bladt, 1996; Markhan, 1982; Neu, 1956); (VI) condensed proanthocyanidins and leucoanthocyanidins (EtOAc–HCOOH–AcOH–H₂O [100:11:11:26 v/v] and vanillin-

chloridric acid to reveal; Roberts et al.,1956); and (VII) hydrolysable tannins (n-BuOH–Me₂CO– phosphate buffer pH 5.0 [40:50:10 v/v] and 1% iron alum to reveal; Stiasny, 1912).

2.4 Determination of total phenol content

The total phenolic content was determined by the Folin-Ciocalteu method described in Da Silva et al. (2011). The amount of total phenol was expressed as mg/g gallic acid equivalents (GAE) using the calibration curve of gallic acid ($y = 1.6221x + 0.0084$, $r^2 = 0.9934$).

2.5 Determination of total flavonoid content

The total content of flavonoids was measured using a method proposed by Kumaran and Karunkaran (2007). The amount of flavonoids in the extract was expressed as quercetin equivalents (QE)/mg plant extract, and calculated by the following formula:

$$\text{Total flavonoid content} = (A_s \times m_c) / (A_c \times m_s)$$

A_s = sample absorbance; A_c = quercetin absorbance; m_s = mass of plant extract; m_c = mass of quercetin.

2.6 DPPH radical scavenging activity (SRL)

The DPPH free radical scavenging activity was based on the scavenging of the stable 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical 250 μ L of DPPH solution in methanol (1 mM) and 40 μ L of different concentrations of saline extract (SE), F0-80 and LifeLBL (62.5; 125; 250; 500 and 1000 μ g/mL of protein) were mixed. After 25 minutes at room temperature in dark, the absorbance was recorded at 517 nm. Gallic acid was the reference compound and the negative control was distilled water. IC₅₀ value denotes the concentration of sample, which is required to scavenge 50% of DPPH free radicals. Radical scavenging activity was calculated by the following formula:

$$\text{SRL (\%)} = \frac{(\text{Absorbance control} - \text{Absorbance sample})}{\text{Absorbance control}} \times 100$$

The measurements were triplicated and their scavenging effects were calculated based on the percentage of DPPH scavenged.

2.7 Determination of the Sun Protection Factor (SPF) in vitro

The extracts were dried and after diluted in absolute ethanol, obtaining concentrations of 100, 50, 25 and 12,5 µg/mL. Subsequently, was performed spectrophotometric scanning at wavelengths between 290 -320 nm, with intervals of 5 nm. The readings were performed using 1 cm quartz cell, and ethanol used as blank. Calculation of SPF was obtained according to the equation developed by Mansur et al. (1986).

3 Results and discussion

It was carried out phytochemical characterization of the samples used in the purification of lectin *L. ferrea*: Saline Extract (SE), Protein Fraction of 80% (F80) and the lectin (LifeLBL). A methanol extract (ME) was also tested, in order to verify and confirm that the bark of *L. ferrea* has secondary metabolites and that these were not present in the samples used to purify LifeLBL. Flavonoids was found in ME, with a similar standard to that found in artichoke extract, called luteolin (canary yellow), and hydrolysable tannins (blue-violet), and catechin tannin (proanthocyanidin condensates) in higher concentration than in the SE. Presence of luteolin in the ME proved the existence of secondary metabolites in *L. ferrea* constitution, which were not extracted using saline solution in the first step to obtain the lectin. Luteolin has been widely studied, as reducing Alzheimer's disease pathologies (Sawmiller et al., 2014), against vascular inflammation (Jia et al., 2015) and anti-inflammatory activity (Francisco et al., 2014). The presence of hydrolyzable tannins and flavonoid and their monomers, have been described the literature for *L. ferrea* extracts from bark, as e.g. the acetone extracts shows chalcones trimers, pauferrol A (Nozaki et al., 2007) and chalcones dimers, the pauferrol B and

pauferrol C (Ohira et al., 2013), all of them are act as potent inhibitors of DNA topoisomerase II.

The foam index test indicates the absence of saponin as described previously by Frasson et al., 2003. Over there, in the SE, we found condensed proanthocyanidins and an increased presence of hydrolysable tannins, cinnamic derivatives, catechin tannins (proanthocyanidins condensed) and traces of flavonoids. After salt fractionation was observed and the concentration of all of constituents present in SE, showing that the salt fractionation could be an alternative to study secondary compounds soluble in aqueous from *L. ferrea*. In addition, the plant constituents vary according to the time of collection, the climate, constitution, soil, plant age, and other factors. The lectin sample showed its purity, since it did not observed any secondary metabolism contaminants. The samples did not show in the conditions used, leucoanthocyanidins, alkaloids, polyphenols (coumarins, glycosides fenilpropanosídeos) terpenoids (monoterpenoids, sesquiterpenoids, diterpenoids, triterpenoids, steroids, iridoids).

The free radicals have different roles in the organism, but its excess producing harmful effects such as damage to DNA, proteins and organelles, such as mitochondria and membranes, causing structural and functional changes in the cells and thus cause various diseases (Alves et al., 2010). The DPPH radical scavenging method evaluates the radical scavenging ability of a compound by its reaction with the stable radical DPPH (Bortolomeazzi et al., 2007). This is the most widely reported method for screening of antioxidant activity of many plant drugs (Onkar et al., 2012).

The protein samples used in the purification process were diluted to obtain a protein concentration of 1 mg/ml, which was given by the Lowry dosage method (1951) for extract and F0-80, and the Warburg and Christian method (1942) for isolated lectin, in order to be evaluated for the presence of antioxidant activity by the method of DPPH radical sequestration. The results are shown in Figure 5, where we observed that LifeLBL showed antioxidant activity of 67.7% for the major concentration (1 mg/ml), the protein fraction had its activity ranging from 27.07% in its lower concentration (62.5µg/ml) ranging to 90.4% in its highest concentration (1 mg/ml). However, the best result was for the saline extract, since its activity ranged from 46.73% in its lower concentration (62.5µg/ml) up to 96.08% when its concentration reaches 1 mg/ml protein. The

antioxidant activity of proteins depend solely on the presence of aromatic rings in its structure, these rings are present more abundantly in polyphenols.

The total phenolic content of the saline extract from *L. ferrea* bark was performed; it showed a concentration of 185.89 ± 9.35 mg AGE / mg of sample. A high level of polyphenols has been previously quantified in an extract of fruits from *L. ferrea* showing a concentration of 460 mg/g in related of acid galic (Da Silva et al., 2011) being mostly composed of acid galic and one of its derivative compounds were identified (Da Silva et al., 2013).

The saline extract has an amount of flavonoid $40.415 \text{ mg} \pm 0.73 \text{ mg QE / mg}$ of sample. According to Souza et al. (2005) the content of flavonoids produced by a plant is considered an important factor for protecting plants against ultraviolet radiation. Thus, the SPF in vitro was determined by the spectrophotometric method developed by Mansur (1986) using the UVB region, which is the considered to be the region of greatest incidence during the day (Dutra et al., 2004). In the table 2 we observe that despite the fact that saline extract present SPF low (about 3.4), thus being a low value for use in formulations.

References

- BRASIL. Resolução – RDC Nº 30 de 1º de junho de 2012. Aprova o Regulamento Técnico Mercosul sobre Protetores Solares em Cosméticos e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 4 jun. 2012.
- Correia, M.T.S.; Coelho, L.C.B.B. Purification of a glucose/mannose specific lectin, Isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart (Camaratu Bean). *Applied Biochemistry and biotechnology*, v. 55, p. 261-273, 1995.
- Da Silva, L.C.N.; Miranda, R.C. M.; Gomes, E. B. Macedo, A.J.; Araújo, A.M.; Figueiredo, R.C.B.Q.; Silva, M.V., Correia, M.T.S. Evaluation of combinatory effects of *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea* and *Pityrocarpa moniliformis* fruits extracts and erythromycin against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medicinal Plants Research*. Vol. 7(32), pp. 2358-2364, 25 August, 2013, ISSN 1996-0875 2013.
- Da Silva, L.C.N.; Silva-Júnior, C.A.; Souza, R.M.; Macedo, A.J.; Silva, M.V.; Correia, M.T.S. (2011). Comparative analysis of the antioxidant and DNA protection capacities of *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea* and *Pityrocarpa moniliformis* fruits. *Food Chem. Toxicol.* 49:2222-2228.
- Dutra EA., Oliveira DAGC., Kedor-Hackmann ERM., Santoro MIRM. Determination of sun protection factor (SPF) of sunscreens by ultraviolet spectrophotometry. *Rev Bras Cienc Farm.* 2004, 40: 381-385.
- Francisco, V.; Figueirinha, A.; Costa, G.; Liberal, J.; Lopes, M.C.; García-Rodríguez, C.; Geraldes, C.F.G.C.; Cruz, M.T.; Batista, M.T. Chemical characterization and anti-inflammatory activity of luteolin glycosides isolated from lemongrass, *Journal of Functional Foods*, Volume 10, September 2014, Pages 436-443, ISSN 1756-4646.
- Green, A. A. & Hughes, W. L. Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solutions of salts and organic and solvents. *Methods Enzymol.*, 1: 67-90, 1955.
- Halliwel, B.; Aeschbach, R.; Loliger, J.; Arouma, O.I. The characterization of antioxidants. *Food Chem Toxicol* 1995;33(7):601-17.
- Hamid, R.; Masood, A.; Wani, I.H.; Rafiq, S. Lectins: Proteins with Diverse Applications. *J App Pharm Sci.* 2013; 3 (4 Suppl 1): S93-S103.
- Jia, Z.; Nallasamy, P.; Liu, D.; Shah, H.; Li, J.Z.; Chitrakar, R.; Si, H.; McCormick, J.; Zhu, H.; Zhen, W.; Li, Y. Luteolin protects against vascular inflammation in mice and TNF-alpha-induced monocyte adhesion to endothelial cells via suppressing IKB α /NF- κ B signaling pathway, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, Volume 26, Issue 3, March 2015, Pages 293-302.
- Kumaran A, Karunakaran RJ (2007). In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. *Food Sci. Technol.* 40:344–352.

- Le-Clech, P., Lee, E.-K., & Chen, V. (2006). Hybrid photocatalysis/membrane treatment for surface waters containing low concentrations of natural organic matters. *Water Research*, 40, 323-330. DOI: 10.1016/j.watres.2005.11.011.
- Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Remesy, C.; Jimenez, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004;79(5):727-47.
- Mansur JS., Breder MVR., Mansur MCA., Azulay RD. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. *An Bras Dermatol*. 1986, 61: 121-124.
- Marques, M.R.F.; Barracco, M.A. Lectins, as non-self-recognition factors, in crustaceans. *Aquaculture*, v. 191,23-44, 2000.
- Matilainen, A., Vieno, N., & Tuhkanen, T. (2006). Efficiency of the activated carbon filtration in the natural organic matter removal. *Environment International*, 32, 324-331. DOI: 10.1016/j.envint.2005.06.003.
- Nozaki, H.; Hayashi, K, I.; Kido, A, M.; Kakumoto, B, K.; Ikeda, S.; Matsuura A, N.; Tani, C, H.; Takaoka, B, D.; Iinuma, M.; Akao, Y. Pauferrol A, a novel chalcone trimer with a cyclobutane ring from *Caesalpinia ferrea* Mart. exhibiting DNA topoisomerase II inhibition and apoptosis-inducing activity. *Tetrahedron Letters*, 2007. v.48, n. 47, p. 8290-8292.
- Ohira S, Takay K, Mitsui T, Kido M, Kakumoto K, Hayashi K-I, Kuboki A, Tani H, Ikeda S, Iinuma M, Akao Y, Nozaki H (2013). New chalcone dimers from *Caesalpinia ferrea* Mart act as potent inhibitors of DNA topoisomerase II. *Tetrahedron Lett*. 54:5052-5055.
- Onkar P., Bangar J., Karodi R. Evaluation of antioxidante activity of traditional formulation Giloy satva and hydroalcoholic extract of the *Curculigo orchoides* Gaertn. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2012, 06: 209-213.
- Queiroz, L.P. Leguminosas da Caatinga. Feira de Santana, Associação Plantas do Nordeste. 443p. 2009.
- Sawmiller, D., Li, S., Shahaduzzaman, M., Smith, A. J., Obregon, D., Giunta, B., ... Tan, J. (2014). Luteolin Reduces Alzheimer's Disease Pathologies Induced by Traumatic Brain Injury. *International Journal of Molecular Sciences*,15(1), 895-904. doi:10.3390/ijms15010895.
- Sharon, N.; Lis, H. The structural basis for carbohydrate recognition by lectins. *The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates-2*. Taiwan; Kuwer Academic/Plenum Publishers, 1 - 19, 2001.
- Shuang, C.; Wang, M.; Zhou, Q.; Zhou, W.; Li, A. Enhanced adsorption and antifouling performance of anion-exchange resin by the effect of incorporated Fe₃O₄ for removing humic acid, *Water Research*, Volume 47, Issue 16, 15 October 2013, Pages 6406-6414, ISSN 0043-1354,
- Souza TM., Santos LE., Moreira RRD., Rangel VLBI. Avaliação da atividade fotoprotetora de *Achillea millefolium* L. (Asteraceae). *Braz J Pharmacogn*. 2005, 15: 36-38.

Sucupira, N.R.; Silva, A.B.; Pereira, G.; Costa, J.N. Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos. Rev. UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde 2012;14(4):263-9.

Violante IMP., Souza IM., Venturini CL., Ramalho AFS., Santos RAN., Ferrari M. Avaliação *in vitro* da atividade fotoprotetora de extratos vegetais do cerrado de Mato Grosso. Braz J Pharmacogn. 2009, 19: 452-457.

Woisky R. and Salatino A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. J. Apic. Res. 1998; 37: 99-105.

List of captions

Figure 1 – Free radical-scavenging activity on DPPH of the LifeLBL, proteic fraction and saline extract of *L. ferrea* bark.

Table 1 – Comparison between Total phenolics (TP), total flavonoids (TF) and antioxidant activity of dried extracts from the leaves of *Libidibia ferrea* var. *leiostachya* Benth. IC₅₀ is defined as the concentration sufficient to obtain 50% of a maximum effect estimate in 100%.

Table 2 - Sun Protection Factor (SPF) in vitro of the dried extracts from *L. ferrea* bark.

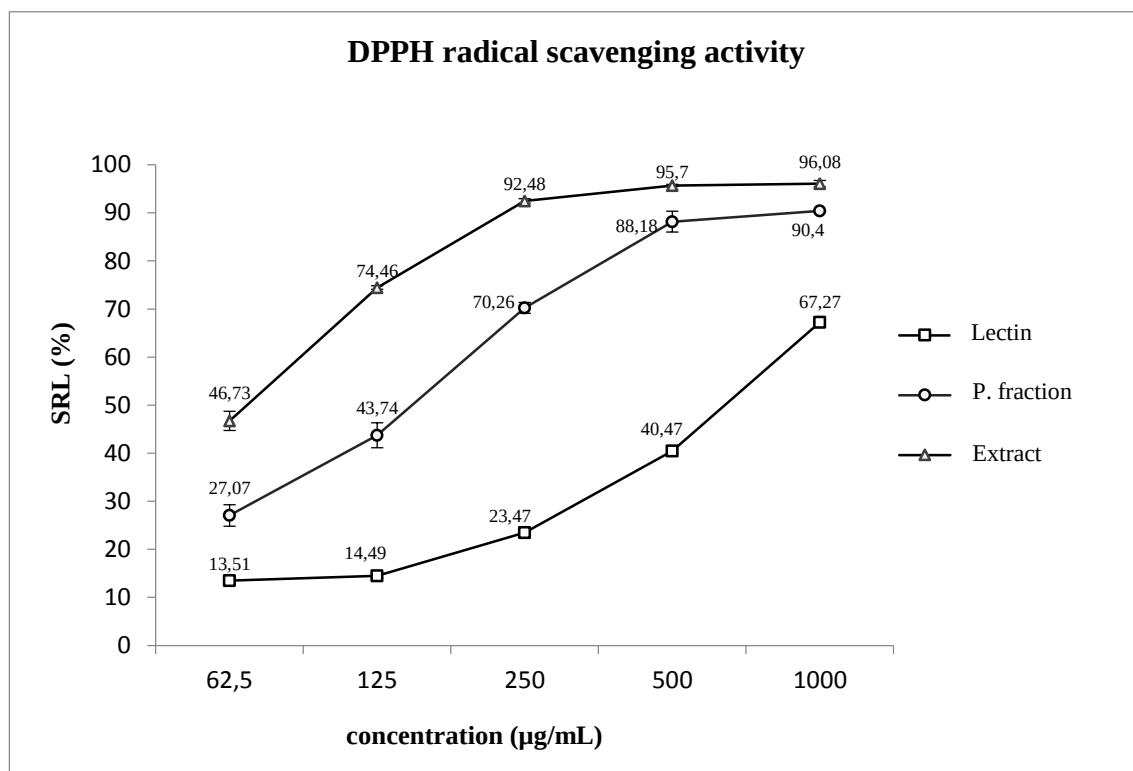
Figure 1

Table 1

Sample	TP (mg EAG/ mg de amostra)	TF (mg EQ/ mg de amostra)	DPPH (IC50, µg/ml)
Extract	185,89 ± 9,35	40,415 ± 0,73	135,2
Fraction	106,89 ± 0,008	1,85 ± 0,07	177,9
LifeLBL	N	N	743,3

- Total phenolics (TP) – in equivalent milligrams of gallic acid
- Total flavonoids (TF) – in equivalent milligrams of quercetin
- N – non tested

Table 2

Samples	100 µg/mL	50 µg/mL	25 µg/mL	12,5 µg/mL
Saline Extract	3,34	1,66	0,97	0,56
Proteic Fration	1,98	0,095	0,052	0,24

CAPITULO 4: ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO BIORESOURCE TECHNOLOGY

Coagulant activity of a lectin extracted *Libidibia ferrea* pod (LifeFPL)



Coagulant activity of a lectin extracted *Libidibia ferrea* pod (LifeFPL)

Silva, C.E.S. ; Silva, A.K.S.F.; Carvalho, M.E.T.; Ximenes, N.C.A.; Napoleão, T.H.;
Paiva, P.M.G. ; and Correia, M. T. S. *

Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes R
ego s/n, Cidade Universitária, 50,670-420, Recife, Brasil.

*Corresponding author:

Tel: +55-81-2126.8540; Fax: +55-81-2126.8576;

E-mail address: mtscorreia@gmail.com

Abstract

Lectins are proteins or glycoproteins, of non-immune origin, that bind carbohydrates specifically and reversibly. *Libidibia ferrea* var. *ferrea* is a plant widely distributed in Brazil and it is used in popular medicine. In this paper was presented the coagulant activity of a lectin purified from *L. ferrea* pod (LifeLPL). The coagulant activity was performed in triplicate, with kaolin clay hydrated. The evaluation tests were carried out in sodium phosphate buffer pH 7.5. LifeFPL had coagulation activity similar to the positive control, aluminum sulfate, showing significant improvement of such activity when the pH of the medium is basic. In conclusion, LifeFPL can be used in treating water by means of a safe technique for the environment, thus contributing to the sustainable use of biodiversity.

Key-words: lectin, water treatment, *Libidibia ferrea*, coagulation

1. Introduction

Libidibia (Caesalpinia) *ferrea*, belongs to the Fabaceae family, sub family Caesalpinieae, being popularly known as ironwood or jucá (Lorenzi, 2008). In the Brazilian Northeast, there are four subspecies of *L. ferrea*, three from the Caatinga and one from the Atlantic Forest (Queiroz, 2009). It is an economically important species due to a variety of uses: it has great medicinal potential; ornamental, and can be used in afforestation and reforestation. The wood has a very tough core; a characteristic that gave the ironwood name can be used in construction and carpentry (Penna, 1946; Pio Corrêa, 1984; Lorenzi, 2008).

The bark, seeds, roots and fruits of *L. ferrea* are used in Brazilian folk medicine, where its pharmacological properties have been investigated: analgesic and anti-inflammatory (Freitas et al., 2012; Araújo et al., 2014), Wound dressings (Dias et al., 2013), inhibition of herpes simplex virus and poliovirus (Lopes et al., 2013), in vitro antimicrobial against oral pathogens (Sampaio, et al. 2009), cancer chemopreventive effects (Nakamura et al., 2001), antioxidant and DNA protection (da Silva et al., 2011). There are several active compounds that can explain the medicinal effects of *L. ferrea* among of them are lectins, which are proteins or glycoproteins of non-immune origin, which agglutinate cells and precipitate carbohydrates and derivatives without changing

their covalent structures (Peumans & Van Damme, 1995; Arreguin-Espinosa & Arreguin-Lozano, 1997; Ashraf Khan & 2003; Wu et al, 2009, Wang et al, 2011).

Turbidity, in general, is a measure of cloudiness in water induced by colloidal substances in suspension and is one of the main criteria for monitoring water treatment plants. Reduced turbidity is often performed using chemical coagulants such as alum (aluminum sulfate). Coagulants are abundantly available in nature and may indeed be considered to resolve the drawbacks associated with the use of chemical coagulants (Choy et al., 2013). As a sustainable alternative to the use of chemical coagulants, we find the coagulants of natural origin. The lectins can serve many different purposes, Santos et al (2009) and Ferreira et al. (2011) carried out experiments with purified coagulation lectins *Moringa oleifera* seeds, and noted that they are presented as a potential good coagulant may be used in the treatment of water with high turbidity. Thus, the purpose of this study is to evaluate the presence of coagulant activity of lectin extracted from pod of *Libidibia ferrea* var. *ferrea*, which is justified by the growing search for coagulants and compounds of natural origin and because they are biodegradable, safety for human health and its low cost.

2. Materials and methods

1.1.Plant material

L. ferrea var. *ferrea* pod were harvested from plants at Ibimirim city, State of Pernambuco, Northeast of Brazil.

1.2. Purification of LifeFPL

The lectin was purified by the protocol established by Ximenes (2004). First, it was made extract using flour from *L. ferrea* pod at 10% (w / v) in 0.15 M NaCl with a moderate stirring for 16 h at 4 °C. Subsequently, the extract was filtered in gauze and centrifuged (10,000 x g) for 15 min and the supernatants carefully collected. The saline extract (ES) was subjected to salt fractionation. Solid ammonium sulfate (80% saturation) was added to the extract and stirred for 4 h at room temperature. After centrifugation, the obtained precipitate was resuspended in 0.15 M NaCl and this fraction (F0-80) was

subjected to column chromatography on chitin to obtain the LifeFPL using 1 M acetic acid as eluent. Finally, the samples were dialyzed, subjected to protein determination (Warburg and Christian, 1942) and evaluated for the hemagglutination activity (Correia & Coelho, 1995). Then LifeFPL was stored at -20 ° C.

1.3.Hemagglutinating Activity Assay

The hemagglutinating activity assay (HA) was performed in microtiter plates according to Correia and Coelho (1995). Lectin preparations (50 µL) were two-fold serially diluted with 0.15 M NaCl before addition of 50 µL suspension of rabbit erythrocytes previously treated with glutaraldehyde 2.5% (v/v). The titer was expressed as the highest dilution exhibiting hemagglutination. Essays were performed with the saline extract (E), the protein fraction (F80) and the purified protein. The specific HA was defined as the ratio between the units and protein concentration (mg/mL).

1.4.Estimative of protein concentration

The protein was estimated according to Lowry et al. (1951). A calibration curve was prepared using bovine serum albumin (BSA) as the standard in a range between 0 and 500 µg /mL. It was also used, the method of Warburg and Christian (1942), after chromatography, since most proteins exhibits absorption in the ultraviolet at 280 nm, due primarily to the presence of tryptophan and tyrosine. Nucleic acids also exhibit strong absorption at 280 nm but less than the absorption at 260 nm, whereas unlike most proteins absorb at 280 than at 260. The protein concentration is given by:

$$\text{Protein concentration in mg / mL} = 1,45 A_{280} - 0,74 A_{260}$$

1.5.Coagulant activity LifeFPL

The coagulation activity assay was based on the method described by Santos et al. (2009). Initially, the water sample was treated with kaolin clay (10 g) to 1 L tap water,

stirred for 30 min and allowed to settle for 24 h to achieve complete hydration. Desired turbidity was obtained by dilution. An aliquot (200 μ L) of SE, F0-80, LifeFPL (1 mg/mL) and positive control (aluminium sulphate 5%) were added to high turbidity clay suspension (1800 μ L) in 2 mL cuvette and homogenized instantly. Samples were allowed to settle for 1 h and absorbance was measured at 500 nm using a UV–Visible spectrophotometer. In order to reduce background effect, a sample volume of 1 mL from the top was transferred to the cuvette for absorbance measurements every 5 min up to 60 min and subsequently to each 10 min up to 140 min. Reduction in absorbance relative to negative control indicates coagulation activity. The assays were performed three times.

1.6.Hemolytic activity

First, a suspension of erythrocyte was prepared, where erythrocytes was washed and suspended in physiological saline solution in a final concentration of 2% (v/v). Hemolytic degree of LifeFPL was assayed by colorimetry, according to the reported method with minor modification (De-Qiang et al., 2011). Second, the LifePL of different concentration in isotonic saline solution were added into tubes (400 μ L), and after was added into this tubes 1.1 μ L of erythrocyte suspension and the mixture was incubated for 2 h, at 37 °C. After incubation, the reaction mixture was centrifuged at 3000 rpm for 10 min and the absorbance at 545 nm of the supernatant was measured by a UV–vis spectrophotometer. Triton was used in place of physiological saline solution, which gave 100% hemolysis (positive control). The negative control was saline solution. Hemolytic degree (HD) of each sample was determined using the formulation as follows: HD (%) = $(\text{AbsE} - \text{AbsN}) / (\text{AbsP} - \text{AbsN}) \times 100$, where AbsE, AbsN and AbsP represent the absorbance of experimental group, negative control and positive control, respectively.

3. Results and discussion

LifeFPL purification was performed according to the protocol outlined by Ximenes (2004). Similar results were obtained and are shown in Table 1, which shows the purification summary LifeFPL. The chitin column chromatography showed two peaks being the first corresponding to non-adsorbed proteins without hemagglutination activity

(HA), and the second peak containing adsorbed proteins with HA (Figure 1). About 48 mg of LifeFPL were obtained from 10 g flour.

In the water treatment process (to make it potable), The first stage is coagulation, when the bulk water receives, upon entering the treatment plant, a dosage of coagulant compound (generally: aluminum sulphate and chloride polyaluminum). However, studies have shown that aluminum can induce Alzheimer's disease monomers and some synthetic organic polymers such as acrylamide and neurotoxicity have carcinogenic properties (OKUDA et al., 1999), increasing the interest in natural vegetable coagulant both they are safe to health, as by being biodegradable (OKUDA et al., 2001).

In the coagulation assay using LifeFPL (Figure 2A), there was a similar result to that obtained for the positive control, aluminum sulfate which is usually used as a coagulant for water treatment compound. However, the same result was not found for extract and the fraction (Figure 2 B, C). This was due possibly to the presence of substances that interfere with lectinbinding to kaolin since the extract and fraction compounds are not pure or could be due a minor concentration of LifeFPL and less SHA than purified lectin. Santos et al. (2009) purified and determined the presence of a strong coagulant power of a lectin extracted from *Moringa oleifera* seed (cMol) demonstrating a new biotechnology area of operation to lectins.

A protein extract from *M. oleifera* seeds can remove humic acids from water reducing total and organic matter as well as aromatic content and colour (Santos et al. 2012). Ferreira et al. (2012) showed that another lectin purified form *Moringa oleifera* seed called WSMoL besides presenting coagulant activity on the turbid water model; it was efficient to reduce the growth of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. WSMoL was also effective in reducing the growth of ambient lake water bacteria, showing that the lectins may be used in both steps of the process water treatment: coagulation and disinfection.

Since LifeFPL demonstrated a good coagulant activity and in order to mimic hard water and even the presence of various ions in fresh water we evaluated the permanence of this activity by changing some variants. Ions were chosen as divalent cations, (Mg^{2+} and Ca^{2+}) and monovalent cations (Mn^{+} and K^{+}), furthermore, the pH of the solution was hydrated Kaolin was changed to pH 7.5 (sodium phosphate 10 mM). The pH and buffer concentration were chosen because in this situation the hemagglutinating activity of the lectin showed a significant increase going from 512 to 2048 (Ximenes, 2004).

Likewise, the concentration of ions (10 mM) was chosen because the AH of the lectin show an increase in those conditions (Ximenes, 2004).

There was no coagulant activity when Kaolin was hydrated with saline solution IN PRESENCE OF IONS (Figures 3 A, B, C and D) and the essay doesn't work, because the positive control, aluminum sulfate, commonly used in water treatment, presented no coagulant activity. One explanation for this would be that kaolin, not lectin, which was incubated with ion, and this may have influenced the change in kaolin structure, thus not allowing coagulation. However, when the Kaolin was hydrated with sodium phosphate pH 7.5, the coagulating power of the lectin was increased (Figure 4). LifeFPL is a basic protein of molecular weight of approximately 14.4 kDa. Thus, under conditions where the pH of the medium is basic (Tested conditions) acquires a positive charge to the protein can then bind to negative particles, similar results found by Santos et al. (2009), which the coagulant mechanism involves adsorption and neutralization of charges.

In relation to the hemolytic test, the results showed that this lectin did not exhibit hemolytic activity due to the fact the erythrocytes didn't evidence hemolysis degree at all tested concentrations (200, 150, 100, 50 $\mu\text{g/mL}$). This activity is a kind of cytotoxic activity that serves to give biological value to the lectin, because may not be useful, especially in pharmacological preparations, if they possess a hemolytic or cytotoxic effect.

4. Conclusion

A lectin was isolated and purified from *Libidibia ferrea* pod by a combination of ammonium sulfate precipitation (F0-80) and chitin affinity chromatography. The protocol used was previously established by Ximenes in 2004 and shown to be effective in the purification of lectins and obtaining the protein with a high purity (LifeFPL). Regarding Kaolin, a substance that mimics turbidity of the polluted water, the lectin had coagulation activity similar to the positive control, aluminum sulphate, with a significant improvement of this activity when the pH of the medium is basic and decreasing its coagulant activity the presence of ions.

References

- Araújo AA, Soares LAL, Ferreira MRA, Neto MAS, Silva GR, Araújo Jr. RF, Guerra GCB, Melo MCN (2014). Quantification of polyphenols and evaluation of antimicrobial, analgesic and anti-inflammatory activities of aqueous and acetone–water extracts of *Libidibia ferrea*, *Parapiptadenia rigida* and *Psidium guajava*. *J. Ethnopharmacol.* 156:88-96.
- Arreguín-Espinosa, R. & Arreguín-Lozano, B. Biochemical properties of hemagglutinins in the mollusk *Pomacea flagellata*. *Biochemistry and Molecular Biology International*, Marrickville, v.43, n.6, p.1241-1251, 1997.
- Ashraf, T. & Khan, R.H. Mitogeniclectins. *Medical Science Monitor*, [S.l.], v.9, n.11, p.RA265-269, 2003.
- Choy S.Y., Prasad K.M.N., Wu T.Y., Ramanan R.N., 2013, A review on common vegetables and legumes as promising plant-based natural coagulants in water clarification, *Int. J. Environ. Sci. Technol.*, DOI: 10.1007/s13762-013-0446-2.
- Correia, M.T.S., Coelho, L. C. B. B., 1995. Purification of glucose/ mannose specific lectin, Isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart (camaratu bean). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 55, 261 - 273.
- Da Silva, L.C.N.; Júnior, C.A.S.; De Souza, R.M.; Macedo, A.J.; Da Silva, M.V.; Correia, M.T.S. Comparative analysis of the antioxidant and DNA protection capacities of *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea* and *Pityrocarpa moniliformis* fruits. *Food and Chemical Toxicology* 49, 2222–2228. 2011.
- Dias, A.M.A.; Rey-Rico, A.; Oliveira, R.A.; Marceneiro, S.; Alvarez-Lorenzo, C.; Concheiro, A.; Júnior, R.N.C.; Braga, M.E.M.; Sousa, H.C. (2013). Wound dressings loaded with an anti-inflammatory jucá (*Libidibia ferrea*) extract using supercritical carbon dioxide technology. *J. Supercrit. Fluids* 74:34-45.
- Ferreira, R. S. Napoleão, T.H.; Santos, A.F.S.; Sá, R.A.; Carneiro-da-Cunha, M.G.; Morais, M. M. C.; Silva-Lucca, R. A.; Coelho, L. C. B. B.; Paiva, P. M. G. Coagulant and antibacterial activities of the water-soluble seed lectin from *Moringa oleifera*. *Letters in Applied Microbiology*, v. 53, p. 186-192, 2011.
- Freitas, A.C.C.; Ximenes, N.C.A.; Aguiar, J.S. et al., “Biological Activities of *Libidibia* (*Caesalpinia*) *ferrea* var.*parvifolia* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz Pod Preparations,” *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2012, Article ID 514134, 7 pages, 2012.
- Lopes N, Faccin-Galhardi LC, Espada SF, Pacheco AC, Ricardo NMPS, Linhares REC, Nozawa C (2013). Sulfated polysaccharide of *Caesalpinia ferrea* inhibits herpes simplex virus and poliovirus. *Int. J. Biol. Macromol.* 60:93-99.
- Lorenzi, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 5. ed., v. 1. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 162 pg. 2008.

- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J.; Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951. 193, 265.
- Nakamura E.L.S.; Kurosaki, F.; Arisawa, M.; Mukainaka, T.; Takayasu, J.; Okuda M.; Tokuda, H. Nishino, H. Pastore JR, F., 2002. Cancer chemopreventive effects of constituents of *Caesalpinia ferrea* and related compounds. *Cancer Letters*, 177, 119 – 124.
- Okuda, T., Baes, A.U., Nishijima, W., Okada, M. Isolation and characterization of coagulant extracted from *Moringa oleifera* seed by salt solution. *Water Res.*, 35, 405-410. 2001.
- Okuda, T.; Baes, A.U.; Nishijima, W.; Okada, M. Coagulation mechanism of salt solution-extracted active component in *Moringa Oleifera* seeds. *Water Research*, v.35, p. 830-834, 2001.
- Penna, M. *Dicionário brasileiro de plantas medicinais*. 3. ed. Rio de Janeiro: Kosmos, 409 p. 1946.
- Peumans, W.J.; Van Damme, E.J.M. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiology*, v. 109, p. 347-352, 1995.
- Pio Corrêa, M. *Dicionário das plantas úteis do Brasil*. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, p. 687. 1984.
- Queiroz, L.P. *Leguminosas da Caatinga*. Feira de Santana, Associação Plantas do Nordeste. 443p. 2009.
- Sampaio, F.C.; Pereira, M.S.V.; Dias, C.S.; Costa, V.C.O.; Conde, N.C.O.; Buzalaf, M.A.R. (2009). In vitro antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. *J. Ethnopharmacol.* 124:289- 294.
- Santos, A.F.S.; Luz, L.A.; Argolo, A.C.C.; Teixeira, J.A.; Paiva, P.M.G. ; Coelho, L.C.B. B. Isolation of a seed coagulant *Moringa oleifera* lectin. *Process Biochemistry*, v. 44, p. 504-508, 2009.
- Santos, A.F.S.; Paiva, P.M.G.; Teixeira, J.A.; Brito, A.G.; Coelho, L.C.B.B. ; Nogueira, R.M.O.B. Coagulant properties of *Moringa oleifera* protein preparations: application to humic acids removal. *Environmental Technology*, v. 33, p. 69-75, 2012.
- Wang, X.W.; Zhang, H.W.; Li, X.; Zhao, X.F.; Wang, J.X. Characterization of a C-type lectin (PcLec2) as an upstream detector in the prophenoloxidase activating system of red swamp crayfish. *Fish & Shellfish Immunology*, 30(1), 241–247. 2011.
- Warburg, O.; Christian, W., 1942. Isolierung und kristallisation des gährungsferments enolase *Biochem. Z.*, (310), 384-421.
- Wu, A. M.; Lisowska, E.; Duk, M.; Yang, Z. Lectins as tools in glycoconjugate research. *Glycoconjugate Journal*, 26, pp. 899-913, 2009.
- Ximenes, N.C.A.; Coelho, L. C. B. B.; Cunha, M.G.; Takaki, G.M.C.; Correia, M. T. S. Purificação e caracterização de duas formas moleculares da lectina de vagem de *Caesalpinia ferrea* Recife, PE [Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Pernambuco], 2004.

List of captions

Chart 1 – purification summary of LifeFPL.

Figure 1 Affinity chromatography F0-80% chitin. F0-80 (9.5 mg) was applied to a column containing 5 ml of chitin, balanced with NaCl containing 0.04 M MgCl₂. Fractions of 2 ml were collected at a flow rate of 20 ml / h. Elution was performed with Acetic Acid 1 M.

Figure 2 – Coagulant activity in water treated with kaolin. The values represent the average of three experiments ($\pm$ standard deviation) Significant differences between groups were determined by $p < 0.05$.

Figure 3 – Coagulant activity in treated water with kaolin in the presence of ions. A - coagulant activity hydrated kaolin with MgCl₂ solution. B - Coagulant activity hydrated kaolin with CaCl₂ solution. C - Coagulant activity hydrated kaolin with MnCl₂ solution. D - coagulant activity hydrated kaolin in KCl solution. The values represent the average of three experiments ($\pm$ standard deviation) Significant differences between groups were determined by $p < 0.05$.

Figure 4 – coagulant activity hydrated kaolin solution with sodium phosphate buffer pH 7.5. The values represent the average of three experiments ($\pm$ standard deviation) Significant differences between groups were determined by $p < 0.05$.

Chart 1

Samples	Volume (mL)	Protein (mg/mL)	Hemagglutinating ac tivity (HA)	Specific hemagglut inating activity (SHA)*	Purification (fold)
Extract	57	43,2	2048	47	1
F 0-80	20	17,4	2048	117	2,5
LifeFPL	12	0,1	512	5120	22

*Specific hemagglutinating activity = HA/protein (mg/ml).

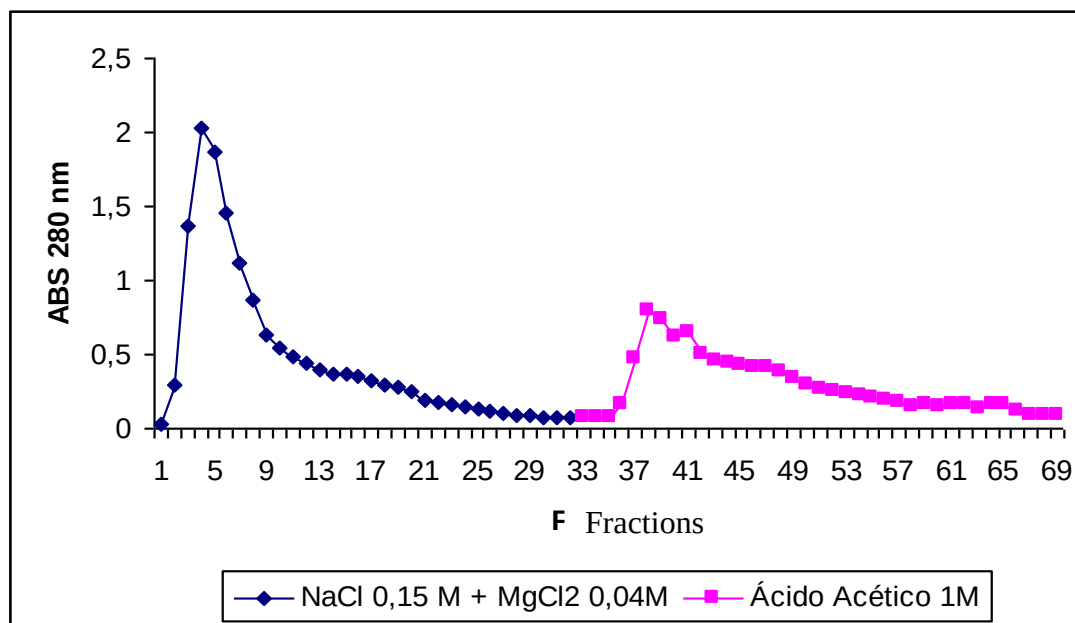
Figure 1

Figure 2

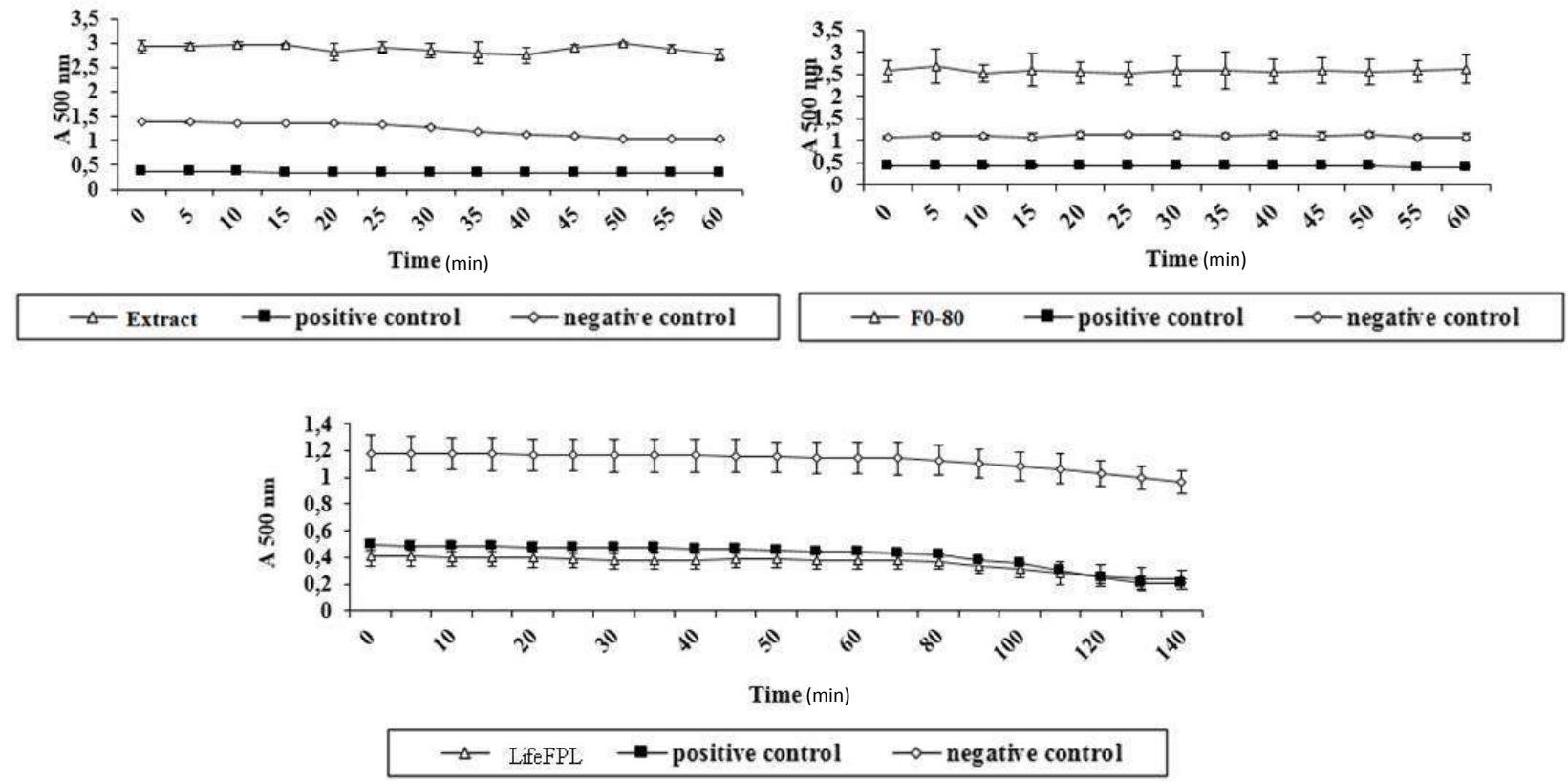


Figure 3

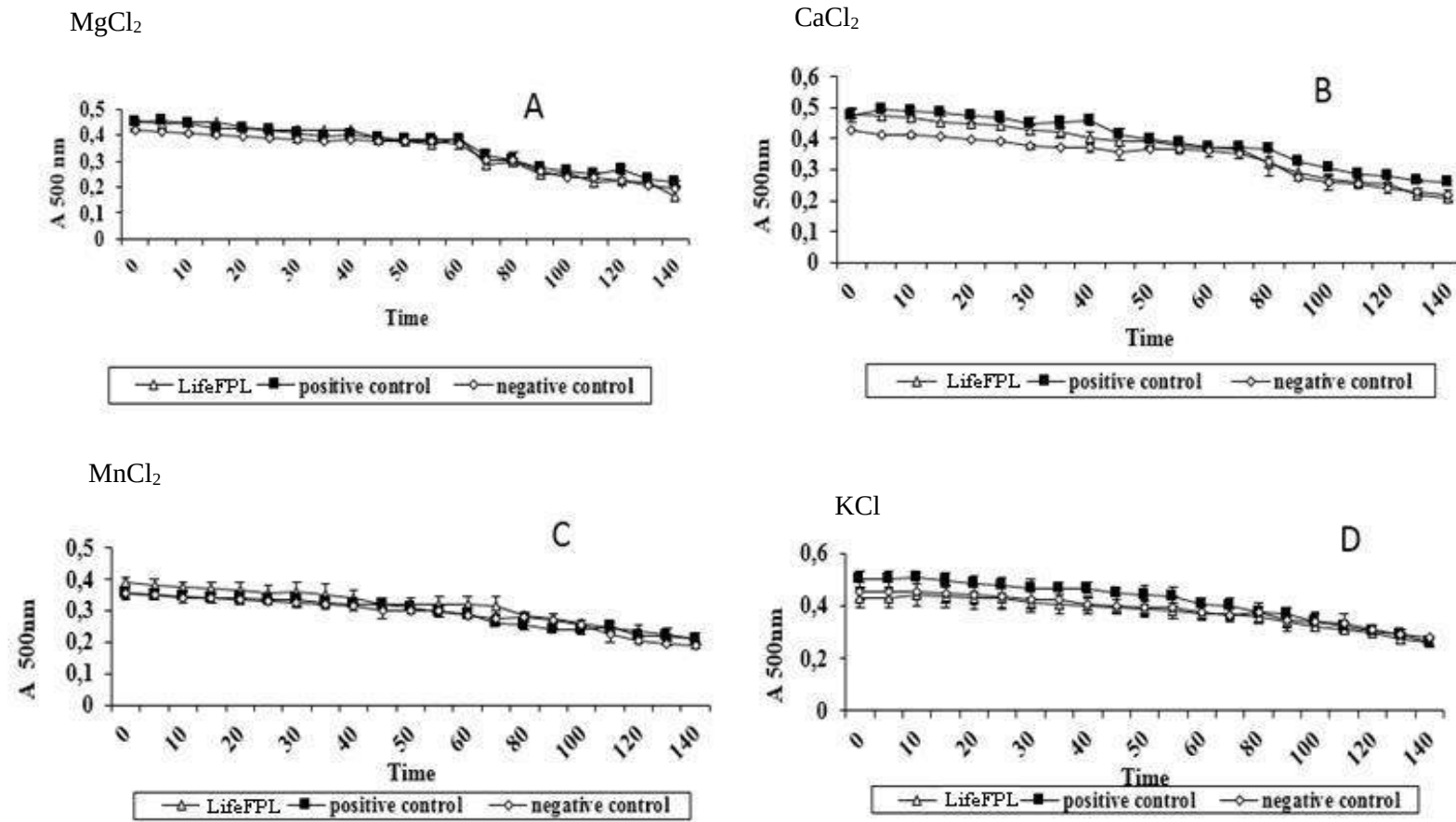
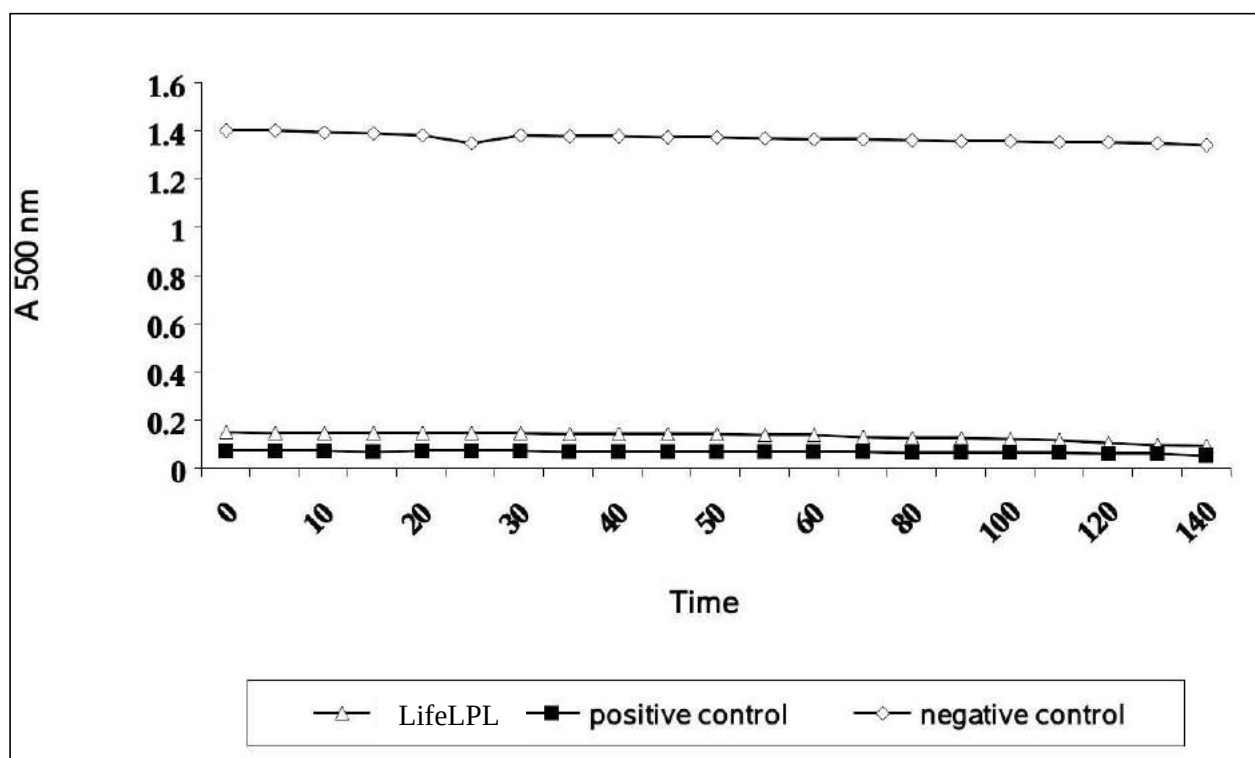


Figure 4



CONCLUSÕES

O extrato salino de a entrecasca de *Libidibia ferrea* var. *leiostachya* Benth mostrou AH, de onde uma lectina ligante de quitina (LifeLBL) foi purificada, com elevada estabilidade térmica e foi livre de contaminantes do metabolismo secundário. A atividade da lectina é totalmente inibida por albumina bovina serica e parcialmente inibida por monossacarídeos: glicose, manose, ramnose, xilose e N-acetil-D-glucosamina.

Através da SDS-PAGE, LifeLBL foi resolvida em dois picos protéicos de massa molecular de 19 e 15 KDa, respectivamente, por gel filtração em coluna de Superdex 75.

A lectina da entrecasca de *Libidibia ferrea* var. *leiostachya* Benth e suas preparações apresentam afinidade à ácido húmico, podendo ser utilizados para o tratamento da água e remoção de substâncias húmicas.

Preparações de *Libidibia ferrea* var. *leiostachya* Benth são fontes potenciais de antioxidantes. O extrato apresentou melhores resultados no teste da atividade antioxidante e de determinação do fator de proteção solar. Mostrando uma perspectiva de uso da planta em formulações farmacêuticas com base nas suas propriedades antioxidantes.

A lectina purificada da vagem de *Libidibia ferrea* var. *ferrea* (LifeFPL) apresentou propriedades coagulantes na água. Resultados similares foram observados com o sulfato de alumínio, o coagulante sintético mais usado no tratamento da água em todo o mundo. LifeFPL pode ser aplicada no tratamento da água para consumo humano.