

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

YASMIN BRUNA DE SIQUEIRA BEZERRA

PURIFICAÇÃO DE PROTEASES E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL INSETICIDA
DE LECTINAS DE SEMENTES DE *Cratylia mollis*

Recife

2019

YASMIN BRUNA DE SIQUEIRA BEZERRA

**PURIFICAÇÃO DE PROTEASES E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL INSETICIDA
DE LECTINAS DE SEMENTES DE *Cratylia mollis***

Tese apresentada para o cumprimento parcial das exigências para obtenção de título de Doutor em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco.

Área de Concentração: Purificação de proteínas

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva

Co-orientadora: Dra. Thâmarah de Albuquerque Lima

Recife

2019

Catálogo na fonte:

Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia - CRB-4/1788

Bezerra, Yasmim Bruna de Siqueira

Purificação de proteases e avaliação do potencial inseticida de lectinas de sementes de *Cratylia mollis* / Yasmim Bruna de Siqueira Bezerra. - 2018

96 f. : il.

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

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Thâmarah de Albuquerque Lima.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia, Recife, 2018.

Inclui referências.

1. Proteínas. 2. Lectinas. 3. Enzimas proteolíticas. I. Paiva, Maria Guedes Patrícia (Orientadora). II. Lima, Thâmarah de Albuquerque (Coorientadora). III. Título.

572.6

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2019 - 015

YASMIN BRUNA DE SIQUEIRA BEZERRA

**PURIFICAÇÃO DE PROTEASES E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL INSETICIDA
DE LECTINAS DE SEMENTES DE *Cratylia mollis***

Tese apresentada para o cumprimento
parcial das exigências para obtenção de
título de Doutor em Bioquímica e Fisiologia
pela Universidade Federal de Pernambuco

Aprovada em : 06/09/2018

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva (Orientadora)
Departamento de Bioquímica - Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão (Membro interno)
Departamento de Bioquímica –Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho (Membro interno)
Departamento de Bioquímica –Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Ana Patrícia Silva de Oliveira (Membro interno)
Departamento de Bioquímica –Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Francis Soares Gomes (Membro externo)
Universidade Federal de Alagoas - UFAL

Ao meu pai Joaquim (*in memoriam*), à minha mãe Aurilúcia e a minha irmã Yulianne,
por todo amor, carinho e dedicação. Amo vocês!

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida, pela coragem e por me guiar durante esta caminhada.

À minha mãe, Aurilúcia, e minha irmã, Yulianne, pelo apoio incondicional de sempre, pelo amor e cumplicidade, por vocês cheguei até aqui, amo muito vocês e, enquanto houver vocês de um lado... aqui do outro eu consigo me orientar.

O meu muito obrigada a minha orientadora, profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva, que me acolheu desde o primeiro instante. Agradeço de coração pela confiança, dedicação e por todos os ensinamentos ao longo desses quatro anos. Obrigada por me inspirar através do seu amor à ciência, dedicação e competência no que se propõe a fazer, a sermos bons profissionais e educadores.

A Dra. Thâmarah Albuquerque, minha co-orientadora, por nunca hesitar em me ajudar. Obrigada pela força, motivação, pelo dia a dia no laboratório, por acompanhar e participar comigo dos experimentos, pelo incentivo, por toda dedicação e por acreditar em mim.

Ao professor Thiago Napoleão, pela ajuda, disponibilidade e importante contribuição no desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores e amigos Carlos Romero e Cláudia Helena, da UAST- UFRPE em Serra Talhada-PE, pelo espaço cedido do Laboratório NEA (Núcleo de Ecologia de Artrópodes) para uma parte dos experimentos e pela colaboração de sempre. Obrigada por estarem comigo desde o começo, por me acompanharem da Iniciação Científica ao doutorado, à vocês devo meu amor pela pesquisa. Minha admiração por vocês como professores, pesquisadores e pessoas só aumenta cada vez mais.

Aos amigos do BIOPROT: Caio, pela companhia, conversas e pelo apoio do dia a dia; Livia, Polly, Dayvid, Carlos Bob, Poli, Robson, Jainaldo, Cláudio, Thamara, Leyde, Nataly, Ana Paty, Stelinha, Bia, Juh, Marcelle, Leo, Bruninha, Danilo, Suellen, Leilane, Berna e Benny, por toda a alegria, conversas, por deixarem o laboratório um ambiente leve, alegre, de boa convivência, obrigada pela oportunidade de poder conhecer e conviver com cada um de vocês.

As minhas amigas Cilene e Clécia, que estão comigo nesta caminhada desde lá atrás, na graduação, mestrado e agora doutorado, uma sempre dando força a outra, juntas compartilhamos alegrias, anseios, medos e planos para o futuro, juntas, chegamos até aqui meninas!

A todos os funcionários do Departamento de Bioquímica.

A UFPE, CNPQ e em especial a CAPES pelo apoio financeiro e oportunidade de realizar esta pesquisa.

Só se vê bem com o coração, o essencial é invisível aos olhos.

(DE SAINT-EXUPÉRY, A., 1943, p. 27).

RESUMO

Lectinas, são proteínas hemaglutinantes que ligam reversivelmente a carboidratos enquanto que as proteases constituem um grupo de enzimas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas. Estas duas classes de proteínas apresentam diversas propriedades biológicas, incluindo as atividades inseticida e antimicrobiana. Insetos-praga provocam prejuízos a economia dos países e dentre estes destacam-se as espécies *Tetranychus bastosi* (Tetranychidae) e *Nasutitermes corniger* (Termitidae). Bactérias e fungos provocam doenças em plantas e animais e a busca por novos agentes antimicrobianos amplia as alternativas para tratamento ou prevenção. Este trabalho investigou atividades biológicas de duas preparações de sementes de *Cratylia mollis*, uma contendo as lectinas 1, 2 e 3 (denominada Cramoll 1,2,3) e outra contendo atividade proteolítica (denominada CmSP, do inglês *C. mollis seed protease*). Foi avaliada a atividade acaricida de Cramoll 1,2,3 (0,02, 0,05, 0,1 e 0,2 mg/mL) contra *T. Bastosi* e para a atividade termiticida foi avaliado a resistência á degradação proteolítica da Cramoll 1,2,3, às proteases de cupins operários, bem como o efeito na sobrevivência de soldados e operários de *N. corniger*; além disso foi avaliado também os efeitos na atividade de enzimas digestivas de operários. A atividade antimicrobiana de Cramoll 1,2,3 e CmSP foi investigada contra bactérias e fungos. Cramoll 1,2,3 induziu a mortalidade dos ácaros promovendo mortalidade maior que 50% nas concentrações de 0,1 e 0,2 mg/mL. Cramoll 1,2,3 foi um agente ovicida para *T. bastosi* diminuindo a taxa de eclosão. A população de *T. bastosi* esteve em estado ascendente (ri positiva) em todas as concentrações testadas. Cramoll 1,2,3 não foi resistente á degradação proteolítica do intestino de *N. coringer*, no entanto os peptídeos resultantes promoveram mortalidade de operários (CL₅₀ de 78,72 mg/mL) e soldados (CL₅₀199,27 mg/mL); não apresentou atividade repelente. Peptídeos resultantes da hidrólise de Cramoll 1,2,3 modulou atividades de enzimas de digestivas de operários. Cramoll 1,2,3 inibiu o crescimento de *C. albicans*, *C. tropicallis* e *C. krusei* com concentração mínima inibitória (CMI) de 100, 200 e 400µg/mL, respectivamente, mas não foi ativa sobre *C. Glabrata* e todas as bactérias testadas. CmSP apresentou atividade antifúngica contra todos os fungos testados com valores de CMI variando de 55 a 400 µg/mL e concentração mínima fungicida (CMF) variando de 110 a 1.760 µg/mL. CmSP apresentou atividade bacteriostática para todas as espécies testadas com valores de CMI variando de 55 a 1.760 µg/mL. Em conclusão, as sementes de *C. mollis* são fontes de lectinas e proteases ativas contra insetos e microrganismos.

Palavras-chave: *Cratylia mollis*. Lectinas. Proteases. Acaricida. Inseticida.

ABSTRACT

Lectins are hemagglutinating proteins that reversibly bind to carbohydrates; proteases are a group of enzymes that catalyze the hydrolysis of peptide bonds. These two classes of proteins have several biological properties, including insecticide and antimicrobial activities. Pest insects damage the economies of the countries, and among these the species *Tetranychus bastosi* (Tetranychidae) and *Nasutitermes corniger* (Termitidae). Bacteria and fungi cause diseases in plants and animals. The search for new antimicrobial agents increases the alternatives for treatment or prevention. This work investigated the biological activities of two preparations from *Cratylia mollis* seeds, the one containing lectins 1, 2 and 3 (known as Cramoll 1,2,3) and another containing proteolytic activity (called *C. mollis* seed protease). It was evaluated acaricidal activity of Cramoll 1,2,3 (0.02, 0.05, 0.1 and 0.2 mg/mL) against *T. bastosi* and for the termiticidal activity the resistance to proteolytic degradation of Cramoll 1,2,3 was evaluated, to the termite proteases workers, as well as the effect on the survival of soldiers and workers of *N. corniger*; In addition, the effects on the digestive enzymes activity of workers were also evaluated. The antimicrobial activity of Cramoll 1,2,3 and CmSP was investigated against the bacteria and fungi. Cramoll 1,2,3 induced mortality of mites by promoting mortality greater than 50% at concentrations of 0.1 and 0.2 mg/mL. Cramoll 1,2,3 was an ovicidal agent for *T. bastosi* decreasing the hatch rate. The population of *T. bastosi* was in an ascending state at all concentrations tested. Cramoll 1,2,3 was not resistant to proteolytic degradation of *N. corniger's* gut; however, the resulting peptides promoted mortality of workers (LC50 of 78.72 mg/mL) and soldiers (LC50 199.27 mg/mL); did not present repellent activity. Peptides resulting from the hydrolysis of Cramoll 1,2,3 modulated activities of digestive enzymes of workers. Cramoll 1,2,3 inhibited the growth of *C. albicans*, *C. tropicallis* and *C. krusei* with minimum inhibitory concentration (MIC) of 100, 200 and 400 µg/mL, respectively, but was not active on *C. glabrata* and all bacteria tested. CmSP showed antifungal activity against all fungi tested with MIC values ranging from 55 to 400 µg / mL and minimal fungicidal concentration (CMF) ranging from 110 to 1760 µg / mL. CmSP presented bacteriostatic activity for all species tested with MIC values varying from 55 to 1760 µg/mL. In conclusion, *C. mollis* seeds are sources of active lectins and proteases against insects and microorganisms.

Key-words: *Cratylia mollis*. Lectins. Proteases. Acaricide. Insecticide.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
1.1 OBJETIVOS	12
1.1.1 Objetivo Geral.....	12
1.1.2 Objetivos Específicos.....	12
2 FUNDAMNETAÇÃO TEÓRICA.....	13
2.1 PROTEASES.....	13
2.1.1 Proteases Vegetais.....	16
2.2 LECTINAS.....	17
2.2.1 Lectinas de Leguminosas	20
2.2.2 Potencial Inseticida e Antimicrobiano de Lectinas	21
2.3 PURIFICAÇÃO	22
2.4 <i>CRATYLIA MOLLIS</i>	24
2.5 <i>NASUTITERMES CORNIGER</i>	25
2.6 <i>TETRANYCHUS BASTOSI</i>	28
3 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ACARICIDA DE CRAMOLL 1,2,3 SOBRE O ÁCARO VERMELHO <i>TETRANYCHUS BASTOSI</i>.....	41
4 ATIVIDADE TERMITICIDA DA LECTINA CRAMOLL 1,2,3 SOBRE <i>NASUTITERMES CORNIGER</i> E SEUS MECANISMOS DE AÇÃO	58
5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE LECTINAS E PROTEASES DE SEMENTES DE <i>CRATYLIA MOLLIS</i>.....	76
6 CONCLUSÃO GERAL.....	94
REFERÊNCIAS.....	95

1 INTRODUÇÃO

Cratylia mollis, conhecido popularmente como feijão camaratu, é uma forrageira leguminosa nativa do Nordeste do Brasil. Suas sementes são ricas em proteínas e podem ser fontes de proteases e lectinas bioativas.

Proteases constituem um grande grupo de enzimas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas de proteínas gerando peptídeos, representando um dos mais importantes grupos de enzimas comerciais, industriais e farmacêuticos (AGUILAR & SATO et al., 2018; SUN et al., 2018; SILVA et al., 2017). As proteases também possuem um grande potencial para as atividades antimicrobianas. Essas enzimas são capazes de inibir o crescimento de várias bactérias, gram-positivas e gram-negativas, e fungos patogênicos.

As lectinas são proteínas com capacidade de reconhecer e ligar reversivelmente a carboidratos ou estruturas glicosídicas complexas e possuem diversas atividades biológicas (BRITO et al., 2017; COELHO et al., 2017). Dentre os grupos de lectinas estudadas, as lectinas vegetais são as mais bem caracterizadas e algumas funções já estabelecidas como atividades inseticidas, antiinflamatória, analgésica e antimicrobianas (TEIXEIRA, 2012; CAMPOS et al., 2016; MARQUES et al., 2018; SILVA et al., 2018).

Ácaros são organismos cosmopolitas e polífagos. São pertencentes ao Filo Arachnida e ao Subfilo Chelicerata, tendo a espécie *Tetranychus bastosi* Tuttle, Baker e Sales, conhecida como ácaro vermelho, pertencente a família Tetranychidae, a qual é constituída por ácaros especificamente fitófagos (BOLLAND; GUTIERREZ; FLECHTMANN, 1998). As espécies do gênero *Tetranychus* são consideradas pragas pois ao se alimentarem causam o rompimento de células das folhas, destruindo suas estruturas fotossintetizantes e órgão de reserva. O efeito da alimentação dos fitófagos sobre as plantas são drásticos a curto e longo prazo e isso causa danos as lavouras em todo o mundo (FRANCO e GABRIEL, 2008; SCHMIDT, 2014).

Cupins são insetos eussociais da ordem Blattaria, infraordem Isoptera, composta atualmente por aproximadamente 3170 espécies (CONSTANTINO, 2016). São insetos que vivem em colônias organizadas em castas diferenciadas, apresentam divisão reprodutiva do trabalho na colônia e cuidado cooperativo com a prole (KORB, 2005; WILSON, 1971). Dentro Isoptera, existem nove famílias, sendo que no Brasil são conhecidas apenas quatro famílias. Dentre elas, temos a família Termitidae, que possui o gênero *Nasutitermes*, mais amplamente distribuído, abrangendo todas as regiões tropicais, e com a maior riqueza de espécies – 260, aproximadamente

Vários trabalhos vêm descrevendo a atividade inseticida de lectinas sobre soldados e operários de *N. corniger*, como as lectinas de *Myracrodruon urundeuva*, MuBL e MuHL e a lectina, MvRL extraída do rizoma *Microgramma vacciniifolia* que mostrou alta toxicidade contra operários e soldados de *N. corniger*. (PAIVA et al., 2011; NAPOLEÃO et al., 2011; ALBUQUERQUE et al., 2012).

O presente trabalho teve como objetivo investigar propriedades antibacteriana e antifúngica de protease (CmSP), atividades termiticidas e possíveis mecanismos de ação contra *N. corniger*, atividades acaricidas contra *T. bastosi* e antimicrobianas contra bactérias e fungos patogênicos da lectina (Cramoll 1,2,3) de sementes de *Cratylia mollis*.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Obter preparações contendo proteases e lectinas de sementes de *Cratylia mollis* e investigar suas propriedades biológicas.

1.1.2 Objetivos Específicos

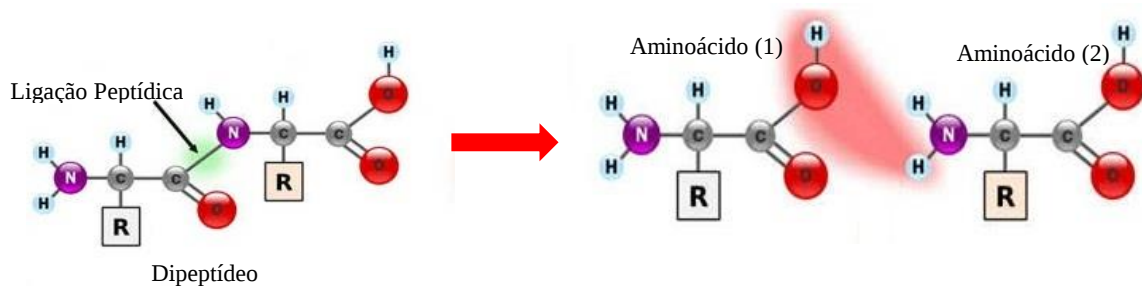
- Obter extrato bruto da farinha de sementes de *C. mollis* rico em proteínas
- Separar proteases e lectinas de proteínas contaminantes por meio de fracionamento salino com sulfato de amônio.
- Identificar a fração rica em proteases, por meio da avaliação de atividade proteolítica total utilizando azocaseína como substrato.
- Identificar a fração lectínica por meio de atividade hemaglutinante
- Definir o processo de purificação de proteases
- Caracterizar o padrão de bandas eletroforéticas da preparação rica em proteases.
- Obter a preparação Cramoll 1,2,3 por meio de cromatografia em coluna de afinidade Sephadex G-100.
- Caracterizar a preparação de Cramoll 1, 2, 3 por meio de eletroforese em condições nativa para proteínas básica.
- Determinar a atividade termiticida de Cramoll 1,2,3 contra *N. Corniger*.
- Avaliar se há modulação de enzimas digestivas de *N. corniger*.
- Avaliar a atividade acaricida e ovicida de Cramoll 1,2,3 contra *T. bastosi*.
- Avaliar a atividade antimicrobiana das proteases e da Cramoll 1,2,3.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 PROTEASES

As proteases constituem um grande grupo de enzimas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas dando origem a peptídeos menores e aminoácidos livres (Figura 1) (KAMAL, REHMAN, & IQBAL, 2017). São classificadas em seis grupos: aspártico, cisteíno, glutamato, metalo, serino e treonino proteases dependendo dos aminoácidos presentes no sítio ativo e envolvidos no processo catalítico, bem como nos mecanismos de clivagem característicos de cada grupo (RAO et al., 2009; LI et al., 2013; SHAH, MIR, & PARAY, 2014).

Figura 1. Ilustração da hidrólise de uma ligação peptídica



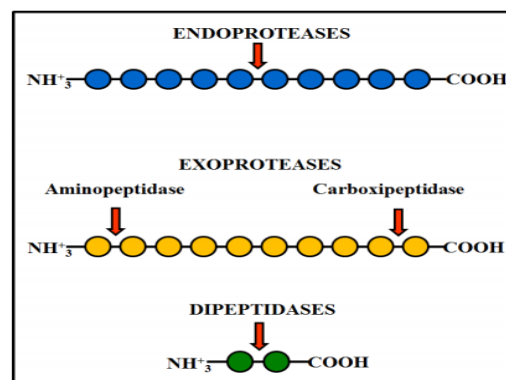
Fonte: (Adaptada de Souza, 2015).

Proteases que apresentam a mesma sequência homóloga são postas na mesma família, enquanto que famílias que compartilham o mesmo ancestral são colocadas no mesmo clã (RAWLINGS et al., 1993; SHAH et al., 2014). As proteases têm uma grande importância biológica por apresentar uma variedade de funções fisiológicas complexas, como a condução com o metabolismo essencial e funções regulatórias; como também tem grande importância biotecnológica, atuando de forma versátil na indústria, como por exemplo na indústria alimentícia e farmacêutica (RAO et al., 1998 ; PARDO et al., 2000; FEIJOO-SIOTA E VILLA, 2011; FERNÁNDEZ-LUCAS et al., 2017).

As proteases são classificadas de acordo com a Enzyme Commission of International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) dentro do grupo 3 (hidrolases) e subgrupo 4 (hidrolases de ligações peptídicas), estando portanto na subclasse 3.4. Esta grande

família (EC 3.4) cliva seus substratos em sítos específicos e assim está dividida em endopeptidases ou proteinases, que clivam ligações peptídicas internas dos terminais do substrato (EC 3.4. 21-99) e exopeptidases (EC 3.4. 11-19) que clivam ligações internas localizadas nas extremidades amino-terminal (N-terminal) ou carboxi-terminal (C-terminal). (BARRETT, 1994; SUMANTHA et al., 2006). As aminopeptidases são aquelas que atuam na região N-terminal com liberação de um único aminoácido (EC 3.4.1.), ou de um dipeptídeo ou um tripeptídeo, neste compreendem a dipeptidil-peptidases e tripeptidil-peptidases (EC 3.4.14.). As carboxipeptidases liberam um único aminoácido (EC 3.4.16-18.) ou um dipeptídeo peptidil-dipeptidase (EC 3.4.15.). Algumas exopeptidases hidrolisam dipeptídeos (dipeptidase, EC 3.4.13.) (TAVANO, 2013).

Figura 2. Representação esquemática da atuação de endoproteases e exoproteases.



Fonte: Adaptado de Barrett, 1994.

Endopeptidases são caracterizadas por atuarem preferencialmente através de ligações peptídicas presentes do interior do polipeptídeo, longe das regiões N e C terminal. As endopeptidases são divididas em quatro subgrupos de acordo com seu grupo reativo no sítio ativo envolvido com a catálise em (1) aspartil-proteases, (2) metalo-proteases, (3) cisteíno-proteases e (4) serino-proteases. As 2 primeiras utilizam uma molécula de água ativada como nucleófilo para atacar a ligação peptídica do substrato, já as outras 2 o nucleófilo é um resíduo de aminoácido (cisteína e serina, respectivamente) localizados no sítio ativo, que é de onde derivam as nomenclaturas (LÓPEZ-OTÍN & BOND, 2008).

As serino-proteases são as enzimas mais estudadas, e são encontradas em vírus, bactérias e em eucariotos, o que indica uma participação vital no metabolismo desses organismos. Esse grupo é caracterizado por apresentar um conjunto de proteínas com alto grau de homologia de sequências e de similaridade estrutural, resíduos dos aminoácidos serina,

histidina e ácido aspártico no seu sítio catalítico, apresentam atividade máxima em pH neutro a alcalino (entre 7 e 11), possuem massa molecular entre 18 e 35 kDa, e ponto isoelétrico entre 4 e 7. Sua identificação é feita através de ensaios utilizando como um dos inibidores específicos o PMSF (RAO *et al*, 1998; CHAUHAN *et al.*, 2013).

As cisteíno-proteases são amplamente distribuídas entre os organismos vivos, encontrados tanto em procariotos como eucariotos. São enzimas proteolíticas que possuem no seu sítio ativo um resíduo de cisteína, de asparagina e um de histidina na tríade catalítica, sendo o mecanismo de ação destas enzimas muito semelhante ao das serino-proteases. Geralmente só são ativas na presença de condições redutoras e necessitam de pH levemente ácido (3,0 a 6,5) para atividade catalítica máxima (Rao *et al.*, 1998; MUTHU *et al.*, 2017).

As aspartil-proteases também são conhecidas como proteases ácidas, por exercerem atividade catalítica máxima em pH ácido entre 3,5 e 5,0, caracterizam-se por empregarem uma molécula de água, ativada por dois resíduos de aspartato, como nucleófilo no ataque à ligação peptídica. São todas endopeptidases e são encontradas em organismos tão diversos quanto vertebrados, plantas e vírus (SALVADORI, 2006; JAMES, 2004; RAWLINGS & BARRETT, 2013).

O grupo das metalo-proteases estão distribuídas em todos os organismos vivos. É o grupo de proteases nas quais o ataque nucleofílico a uma ligação peptídica é mediado por uma molécula de água, possui resíduos de histidina, ácido glutâmico e tirosina no seu sítio ativo, além da exigência de um íon metálico (normalmente Zn^{2+} ou Mn^{2+}) bivalente em seu sítio catalítico (RAO *et al.*, 1998; RAWLINGS & BARRETT, 2013).

Proteases são encontradas em todos os organismos com importantes funções metabólicas, como em animais ocorrendo em tecidos específicos, como as proteases gástricas (pepsina e renina), e as pancreáticas (tripsina e quimiotripsina); em microrganismos, como vírus, bactérias, protozoários, leveduras e fungos; e em vegetais. As proteases podem ser extracelulares e/ou intracelulares, ligadas ou não a membrana (SAID & PIETRO, 2002).

As proteases têm uma grande variedade de aplicações, principalmente nas indústrias de detergentes e alimentos, além de participarem do tratamento de couro e processos de biorremediação. Estão entre as mais importantes enzimas industriais, representando cerca de 60% das enzimas comercializadas (FEIJOO-SIOTA & VILLA, 2011; NOVOZYMES, 2012; JEONG *et al.*, 2018). Na indústria alimentícia são amplamente utilizadas em laticínios, massas, produção de molhos, para amaciar carnes e na produção de hidrolisados protéicos. Na indústria farmacêutica, as proteases atuam em formulações como auxiliares digestivos, combinações com antibióticos e para tratamentos de lesões. Essas enzimas também são utilizadas na indústria

panificadora por atuarem hidrolisando o glúten facilitando a preparação da massa (MO et al., 2016; SUN, et al., 2018;).

As proteases também possuem um grande potencial para as atividades antimicrobianas. Essas enzimas são capazes de inibir o crescimento de várias bactérias e fungos patogênicos. Proteases purificada a partir das folhas de *Wrightia tinctoria* e do caule de *Cissus quadrangularis* mostraram possuir uma alta atividade contra bactérias gram-positivas e gram-negativas (MUTHU et al., 2017; MUTHU et al., 2017a); (rP6281), protease aspártica recombinante, secretada pelo fungo *Trichoderma harzianum* e expressa em *Pichia pastoris* demonstrou atividade antifúngica contra *B. Cinerea*, *Mucor circinelloides*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus fumigates*, assim como, quitinases e lisosimas também já demonstraram atividades antibacterianas (WANG et al., 2012; HAN et al., 2016; DENG et al., 2018). Proteases semelhantes á catepsina tem mostrado serem antimicrobianos, a VTDC (do inglês: Vitellin Degrading Cysteine Endopeptidase) mostrou ter sequencia de aminoácidos semelhante á peptídeos antimicrobianos (OLDIGES et al., 2012); uma outra protease semelhante a catepsina-L, purificada a partir do lisado de M4B, região adjacente do intestino medio, do inseto *Riptortus pedestris* mostrou forte atividade antibacteriana contra *Burkholderia* simbiótica (BYEON et al., 2015).

2.1.1 Proteases Vegetais

Nas últimas décadas, o interesse por proteases vegetais e seus produtos naturais tem crescido rapidamente. As proteases, apresentam as mais importantes enzimas devido a suas diversas propriedades na indústria alimentícia, farmacêutica, indústria do detergente, bem como na preparação do couro e da lã (FEIJOO-SIOTA E VILLA, 2011; FERNÁNDEZ-LUCAS et al., 2017).

As proteases derivadas de plantas apresentam um caminho promissor nas indústrias de alimentos e biotecnologia devido à sua ampla especificidade de substrato, boa solubilidade e atividade em uma ampla faixa de pH e temperatura. Nas plantas, as proteases estão em todos os tecidos pois participam de quase todos os aspectos do ciclo de vida. As proteases presentes nas folhas são as mais fáceis de se obter devido aos baixos níveis de substâncias interferentes, resultando em uma diminuição nas etapas de purificação levando a um bom rendimento (MUTHU et al., 2017).

Proteases provenientes de *C. Papaya* (mamoeiro) e *Ficus spp.* (abacaxizeiro) chamadas de papaína e bromelina, respectivamente, são as proteases vegetais mais frequentemente

utilizadas como aditivos na indústria alimentícia para processos como fermentação, precipitação do leite, alisamento de carne, e preparação de hidrolisados proteicos altamente solúveis e aromáticos para a indústria de queijo e bebidas (ALICI & ARABACI, 2018). Estudos que utilizaram a papaína, clivando proteínas de diferentes tipos de leite (vaca, cabra e soja), mostraram que o seu efeito na produção de queijo cheddar, e queijo semisoft melhoraram a capacidade de fusão e extensibilidade (ABE, 2015; ARLENE et al., 2015). A suplementação do alimento de *Ctenopharyngodon idella*, peixe conhecido popularmente como carpa capim, com papaína e bromelina resultou em um aumento na taxa de crescimento, no acúmulo de lipídios e na imunidade (CHOI et al., 2016). Na indústria farmacêutica a papaína é utilizada em géis para reparação tecidual de úlceras venosas (RIBEIRO et al., 2015). Esses estudos mostram a grande importância biotecnológica das proteases vegetais incentivando a investigação de novas fontes de proteases.

2.2 LECTINAS

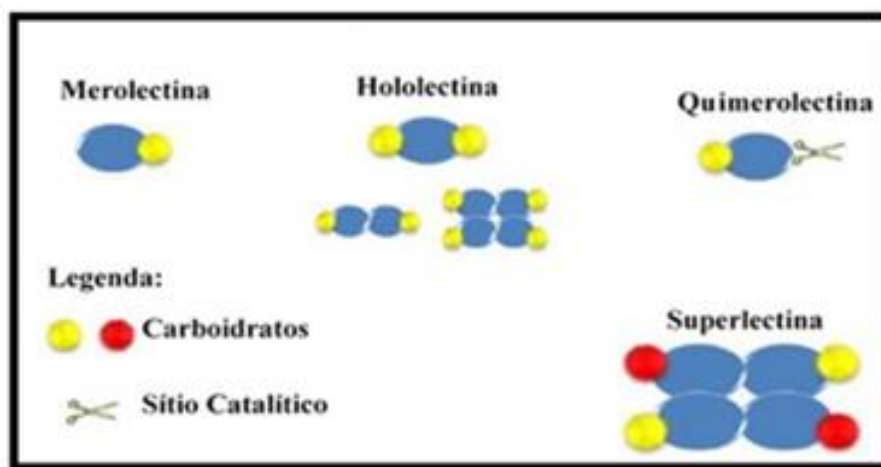
As lectinas constituem uma classe de proteínas, que são capazes de reconhecer e se ligar de forma reversível aos carboidratos e a gliconjugados, incluindo glicoproteínas ou glicolipídeos presentes nas superfícies celulares, sem alterar a estrutura de seus ligantes. A ligação lectina-carboidrato é feita por ligações não-covalentes como pontes de hidrogênio, interações de van der Waals e hidrofóbicas (PEUMANS; VAN DAMME, 1995; SHARON, 2008). Embora estejam isolados principalmente de materiais vegetais (especialmente de sementes), essas proteínas são encontradas de forma ubíqua e ocorrem em uma ampla variedade de estruturas e tamanhos (COELHO et al., 2017; NAPOLEÃO et al., 2015).

Dentre os grupos de lectinas estudadas, as lectinas vegetais são as mais bem caracterizadas e algumas funções já estabelecidas são: proteção contra patógenos e insetos, transporte e armazenamento de carboidratos, reconhecimento celular (dentro da célula, entre células ou entre organismos), proteínas de reserva ou reguladoras de crescimento, mediadoras de interações célula-célula e parasito-hospedeiro (AUDFRAY et al., 2012, CARVALHO et al., 2012, TEIXEIRA, 2012) e atividades antiinflamatórias, antifúngicas e analgésicas (CAMPOS et al., 2016; MARQUES et al., 2018; SILVA et al., 2018).

As lectinas representam um grupo de proteínas heterogêneas que apresentam grande variabilidade do ponto de vista estrutural, no seu tamanho e na organização molecular e são classificadas quanto à quantidade e natureza dos sítios ligantes em: Merolectinas, que apresentam apenas um grupo ligante para carboidrato, sendo pequenas, incapazes de aglutinar

células, devido à natureza monovalente; Hololectinas, as que apresentam dois ou mais ligantes homólogos para carboidratos ou derivados e, portanto, são capazes de aglutinar células e precipitar glicoconjugados; Quimerolectinas, que possuem um ou mais sítios de ligação a carboidratos, além de possuir outro sítio não lectínico com atividade biológica; e as Superlectinas, aquelas lectinas que apresentam dois ou mais sítios lectínicos, porém com especificidades a carboidratos diferentes (GRUBHOFFER ET AL., 1997; LIS; SHARON, 1998; MONTEIRO-MOREIRA, 2002; PEUMANS & VAN DAMME, 1998).

Figura 3. Estrutura das lectinas de vegetais em relação ao domínio reconhecedor de carboidrato



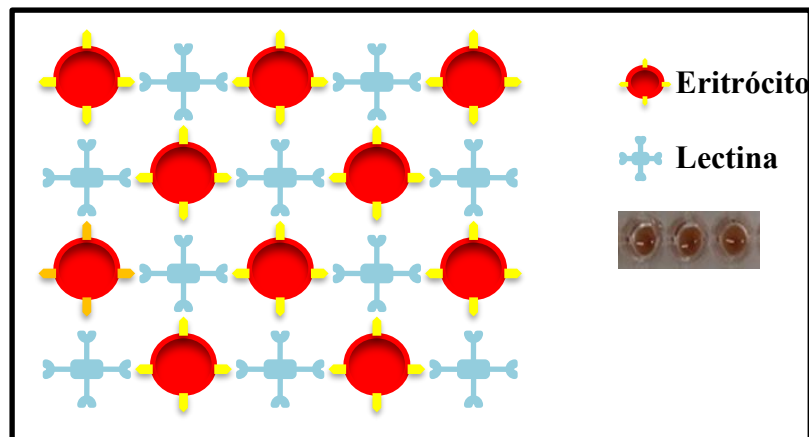
Fonte: Peumans & Van Damme (1995), atualizada por Van Damme et al. (1998) e adaptada por Simões (2011).

Quanto à especificidade por monossacarídeos as lectinas podem ser classificadas em grupos dos tipos ligadoras de: manose/glicose, D galactose, N-acetilglicosamina, N-acetilgalactosamina, L-fucose, ácido N-acetilneuramínico e grupos glicanos complexos. Algumas lectinas ainda podem ter afinidade por diferentes carboidratos, não sendo portanto específicas (PEUMANS; VAN DAMME, 1998; RÜDIGER, 2000; TAKAHASHI et al., 2008).

Para detectar a presença de lectinas em uma amostra, é feito ensaios de aglutinação, nos quais elas interagem com carboidratos da superfície celular através de seus sítios, formando diversas ligações cruzadas reversíveis entre células distintas (Figura 4) (PAIVA & COELHO, 1992). As lectinas podem aglutinar diversos tipos de células (VEGA & PÉREZ., 2006). O ensaio mais comumente utilizado é o de hemaglutinação (Figura 4), o qual é realizado através de uma diluição seriada da amostra contendo lectina e posterior incubação com eritrócitos; a rede formada entre os eritrócitos constitui o fenômeno de hemaglutinação e é quantificada como

o inverso da maior diluição em que se observa a hemaglutinação (título), esse resultado corresponde à atividade hemaglutinante (AH) (SANTOS et al., 2005).

Figura 4. Representação esquemática da aglutinação de eritrócitos por lectina e aspecto da rede de aglutinação em placa de microtitulação.



Fonte: Bezerra et al., 2018.

Por apresentarem propriedades características como a habilidade em ligar-se a glicoconjugados de forma específica, as lectinas mostram ser importantes ferramentas nos estudos, envolvendo diversas áreas da ciência como a química, biológica e farmacêutica (GADHAWALA et al., 2012; KOHARUDIN & GRONENBORN, 2013). As lectinas são bem distribuídas na natureza, podendo ser encontradas em abundância nas mais diversas partes das plantas, entretanto apesar de estarem distribuídas amplamente nas plantas, na última década elas mostraram que também estão distribuídas em animais e microorganismos, já que foram isoladas de diversas classes e famílias de seres vivos, inclusive em vírus.

Em vírus, a lectina está envolvida no processo de adesão à célula hospedeira, já que para que possa ocorrer a infecção de células animais, são necessárias interações das lectinas virais com glicanos específicos presentes na membrana celular (HU et al., 2012; LIU, et al., 2016; LIU, et al., 2017). Em protozoários, a lectina do germe do trigo (WGA) está envolvida na captura de oocistos de *Toxoplasma gondii*, no desempenho do reconhecimento celular e no aumento da aderência à célula hospedeira durante os estágios iniciais (VIEIRA et al., 2012; HARITO et al., 2017). Nos invertebrados, as lectinas são encontradas na hemolinfa, como exemplo em *Botryllus schlosseri*, e em espécies de caranguejos, camarões, e ouriços do mar; estando envolvidas em vias de sinalização, na formação de nódulos, aglutinação, encapsulação

e ativação de propenoloxidade e organização imune de insetos (WANG e WANG, 2013; PEES et al., 2017; XIA et al., 2018). Nos vertebrados, as lectinas possuem várias funções biológicas, entre elas, defesa contra patógenos, participação no ciclo celular, inibição celular por contato, apoptose, desenvolvimento de órgãos e atividades antimicrobianas (PIRES et al., 2017; SULCA et al., 2017).

Nas plantas elas são encontradas em diferentes partes, podendo ser isoladas de sementes (OLIVEIRA et al., 2011), folhas (NAPOLEÃO et al., 2011), cascas (SÁ et al., 2009), flores e raízes (SOUZA et al., 2011). Diversas propriedades biológicas tem sido descritas para lectinas de origem vegetal incluindo a atividade antimicrobiana da lectina de folíolos de folhas de *Calliandra surinamensis* (NUNES et al., 2012; MARQUES et al., 2018; PROCÓPIO et al., 2018), atividade antitumoral das lectinas de sementes *Phaseolus lunatus* L. var. Cascavel e de *Canavalia villosa* (SOUZA et al., 2016; LACERDA et al., 2017) e atividade inseticida das lectinas das folhas e da entrecasca de *Myracrodruon urundeuva* e das sementes de *Olneya tesota* e *Moringa oleifera* (NAPOLEÃO et al., 2012; LAGARDA-DIAZ et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2017; LIMA et al., 2018).

2.2.1 Lectinas de Leguminosas

Entre as plantas, as leguminosas (Leguminosae ou Fabaceae) representam uma família que vem recebendo uma maior atenção, primeiro por serem uma família que possuem uma alta similaridade de estruturas primária, secundária, terciária e propriedades físico-químicas, e também devido a suas sementes serem ricas em lectinas e possuírem relativa facilidade de purificação (SANTIAGO et al., 2014). Devido a esses fatos, um grande número de lectinas de leguminosas foram purificadas e caracterizadas (ALMEIDA et al., 2014; NASCIMENTO et al., 2016).

A família Fabaceae é constituída de plantas que possuem hábitos variados, podem apresentar-se desde grandes árvores das matas tropicais a arbustos, subarbustos, ervas anuais ou perenes e muitas trepadeiras. Pertencem à divisão da Angiospermae, classe Dicotiledônea e ordem Rosales, possuindo cerca de 19.325 espécies distribuídas entre 727 gêneros e constituindo a segunda maior família botânica em importância econômica, ficando atrás apenas de Poaceae (LEWIS et al., 2005; WOJCIECHOWSKI et al., 2004).

As leguminosas são encontradas na caatinga, devido alguns grupos de plantas desta família apresentarem grande resistência à seca. Dentre estas, pode-se destacar *Cratylia mollis* (camaratuba), *Poecil antheulei* (carrancudo), *Piptadenia viridiflora* (surucucu), *Mimosa*

tenuiflora (jurema-preta) e *Desmanthus virgatus* (desmanto), que são as mais freqüentes (REZENDE., 2006).

As lectinas de leguminosas formam o grupo de lectinas vegetais mais bem estudado e caracterizado por suas bases moleculares das interações proteínas-carboidratos durante várias décadas (DAMODARAN et al., 2008), correspondendo de 2 a 10% de proteínas solúveis das sementes maduras, além de possuírem uma enorme diversidade na oligomerização dos monômeros em dímeros e tetrâmeros (SHARON., 2007; CHANDRA et al., 2001; CHEVREUIL., 2007; SRINIVAS et al., 2001).

2.2.2 Potencial Inseticida e antimicrobiano de Lectinas

Muitas lectinas de plantas vem apresentando ação inseticida contra espécies de diferentes ordens como Coleoptera, Diptera, Homoptera e Lepidoptera (LAM & NG., 2011). A ação inseticida das lectinas foi observado em diversos trabalhos dentre eles, a avaliação da lectina isolada de bulbos híbridos de *Hippeastrum Amaryllis* inibiu o crescimento larval e causou redução do peso de larvas da lagarta da folha do algodoeiro *Spodoptera littoralis* (CACCIA et al., 2012); a lectina da *Dioclea violacea* (DVL) também afetou no desenvolvimento larval e causou diminuição da massa de *Anagasta kuehniella* (OLIVEIRA et al., 2015); WSMoL, uma lectina solúvel em água obtida a partir de sementes de *Moringa oleifera* prejudicou o desenvolvimento e o ganho de peso de *Anagasta kuehniella* (OLIVEIRA et al., 2017); assim como PF2, uma lectina purificada das sementes de *Olneya tesota*, apresentou efeito inseticida contra *Zabrotes subfasciatus* (LAGARDA-DIAZ et al., 2016).

O mecanismo de ação inseticida de lectinas se dá por meio da ligação a estruturas presentes no intestino do inseto, com a quitina constituinte da matriz peritrófica; glicoconjugados na superfície das células epiteliais e da matriz peritrófica; proteínas glicosiladas, tais como enzimas ou proteínas de transporte; e também podem atuar ativando a morte celular programada por apoptose provocando diversos danos estruturais e funcionais (VASCONCELOS & OLIVEIRA., 2004; MACEDO et al., 2007; PAIVA et al., 2011; LIMA et al., 2016; LIMA et al., 2018).

A atividade antimicrobiana de lectinas é amplamente investigada. Uma lectina isolada do folíolos de folhas de *Calliandra surinamensis* (Casul) e PgTel, lectina encontrada nas sementes de *Punica granatum* demonstram atividades antimicrobiana (PROCÓPIO et al 2017; SILVA et al., 2018); lectinas das sementes comestíveis de *Phaseolus lunatis* billb, Lunatina, apresentou atividade antifúngicas contra várias espécies de fungos como *Sclerotium rolfsii*,

Physalospora piricola, *Fusarium oxysporum* e *Botrytis cinerea* (ALBUQUERQUE et al., 2014; WU et al., 2016); lectinas isoladas das sementes de *Araucária angustifolia* foi eficiente contra bactérias gram positivas e gram negativas (SAINT-GADELHA et al., 2006); e lectinas de sementes de *Pisum Sativum* inibiram o crescimento do fungo *F. oxysporum* (SITOHY et al., 2007).

Sabe-se que o mecanismo de ação antimicrobiano de lectinas está relacionado à capacidade de interagir com carboidratos na superfície das células como componentes da parede celular bacteriana, tais como N- acetilglucosamina, ácido N-acetilmurâmico (MurNAc), tetrapeptídeos ligados a MurNAc e lipopolissacarídeos (GOMES et al., 2013; CARVALHO et al., 2015). Enquanto que a atividade antifúngica está ligado ao fato das lectinas interferirem no crescimento e desenvolvimento de fungos, causando um desequilíbrio na síntese e/ou deposição de quitina na parede celular, ligando-se às hifas, ocorrendo então numa má absorção de nutrientes.

2.3 PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

A purificação constitui uma etapa complexa, uma vez que as características do meio e das biomoléculas são variáveis (PESSOA JÚNIOR; KILIKIAN, 2005). Dessa maneira, foram desenvolvidos inúmeros métodos de purificação (MORAES et al., 2013). Para a purificação de proteínas, como lectinas e proteases, podem ser utilizadas várias técnicas gerais de purificação, tais como cromatografias de afinidade, troca iônica, interação hidrofóbica, e gel filtração, entre outras (LAM & NG, 2011).

A primeira etapa para a purificação de proteínas é a obtenção de extratos brutos que podem ser feitos a partir de uma solução salina que e em concentrações reduzidas aumentam a solubilidade das proteínas (*Salting in*) (HEU et al., 1995), e submetidos à extração sob determinado período de tempo e condições de temperatura estabelecidas, em agitação constante. A partir do extrato bruto, inicia-se a purificação parcial da proteína de interesse através do fracionamento salino que separa as moléculas de acordo com suas diferenças de solubilidade, quando mais sais são adicionados é causado uma redução da solubilidade das proteínas e estas podem ser precipitadas (*Salting out*), (HEU et al., 1995). O sal comumente utilizado é o sulfato de amônio, um sal altamente hidrofílico que remove a camada de solvatação das proteínas fazendo com que as mesmas se precipitem (KONOZY et al., 2003; DELATORRE et al., 2006). As proteínas parcialmente purificadas pela precipitação salina são geralmente submetidas ao processo de diálise exaustivo (PLUMER, 1978), que é um método

de separação por membranas semi-permeáveis, baseado na separação de moléculas por diferenças de peso molecular, onde as proteínas ficam retidas dentro da membrana enquanto moléculas menores, presentes na amostra como carboidratos ou sais, passam para a solução solvente (THAKUR et al., 2007).

As proteínas podem ser isoladas e purificadas através de técnicas de cromatografias utilizadas para separá-las dos demais metabólitos. Podem ser isoladas por cromatografia de afinidade, na qual utiliza-se uma matriz formada por um alvo ao qual a proteína se liga, cromatografia de troca iônica, que envolve a separação de moléculas ionizáveis baseada na sua carga total, ou cromatografia de gel filtração que permite a separação de moléculas pela massa molecular (MOURA et al., 2006; SANTI-GADELHA et al., 2006; SUN et al., 2007).

A cromatografia de afinidade é um método cromatográfico único que, ao utilizar um ligante específico, permite analisar e purificar biomoléculas com base na sua função fisiológica ou na estrutura química individual. Esse método tem por base o ligante que é imobilizado em um suporte insolúvel, que será chamada de matriz de afinidade; a proteína de interesse terá a capacidade de se ligar ao ligante e será adsorvido á matriz, enquanto que as demais moléculas serão eluídas. Para que o componente adsorvido possa ser eluído, é necessário utilizar uma solução que diminua as interações entre os dois componentes (ligante e a proteína de interesse). Baseado neste princípio, torna-se possível separar uma proteína a partir de uma mistura biológica complexa, com base no reconhecimento e na ligação da molécula-alvo á estruturas específicas. As interações que ocorrem entre os ligantes e a biomolécula de interesse podem resultar de interações hidrofóbicas, interações eletrostáticas, forças de van der Waals e/ou pontes de hidrogênio (SOUZA et al., 2011; COELHO et al., 2012).

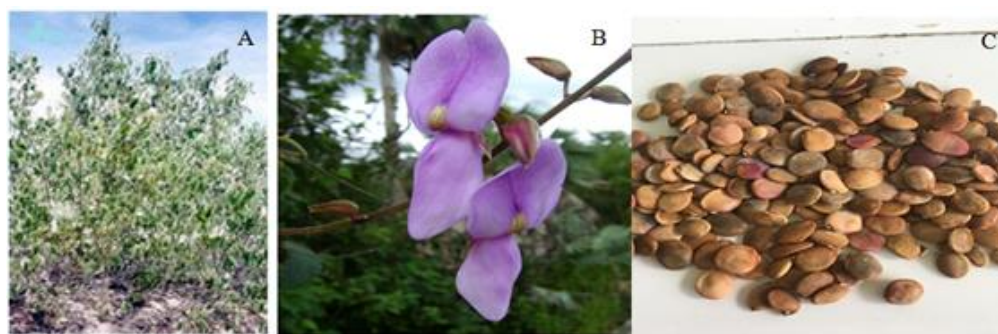
A troca iônica baseia-se na ligação da proteína com os grupos de sinais opostos imobilizados na matriz. A coluna é lavada com solução tampão e os solutos com pouco ou nenhuma interação com o trocador de íons são excluídos. Os solutos adsorvidos são subsequentemente eluídos após serem trocados por outros íons, com mesmo tipo de carga, porém com maior afinidade pela fase estacionária.

A cromatografia de gel filtração ou de exclusão molecular baseia-se na separação de biomoléculas de acordo com seu tamanho. As moléculas que apresentam maior tamanho são eluídas primeiro, pois não penetram nos poros do gel da coluna, enquanto que as de menor tamanho vão descendo lentamente por serem capazes de penetrarem no gel, de modo que a separação é de ordem decrescente de massa molar. (HEU et al., 1995; PESSOA JÚNIOR; KILIKIAN, 2005; MONZO et al., 2007).

2.4 CRATYLIA MOLLIS

Cratylia mollis Mart., popularmente conhecida como feijão Camaratu ou Camaratuba é uma espécie nativa da Região Semi-Árida do Estado de Pernambuco. É uma planta perene, arbustiva, tolerante à seca com potencial para adubação verde, além de ser usada como alimento para o gado (Figura 6), (SOUZA et al., 2003; ARAÚJO et al., 2011).

Figura 5. A) Aspecto de *C. mollis* em seu ambiente natural. B) Flores de *C. mollis*. C) Sementes de *C. mollis*.



Fonte: A) Amanda Lucena Rosendo de Lima; B) Rubens Teixeira de Queiroz; C) Do autor.

Paiva & Coelho (1992) e Correia & Coelho (1995) descreveram a purificação de lectinas de sementes de *Cratylia mollis* que foram denominadas Cramoll 1, Cramoll 2, Cramoll 3 e Cramoll 4, com diferentes especificidades para carboidratos. A classificação das isolectinas foi feita de acordo com a migração eletroforética em gel para proteínas básicas nativas. As isoformas 1, 2 e 4 são específicas para glicose/manose, enquanto a Cramoll 3 é específica da galactose. Elas podem ser separadas do extrato de sementes através de precipitação com sulfato de amônio e etapas cromatográficas. A preparação de Cramoll 1,4 obtida a partir do precipitado de 40-60% de sulfato de amônio por cromatografia de afinidade; as isoformas 1 e 4 podem ainda ser separadas por cromatografia de troca iônica. A Cramoll 2 foi isolada também desta mesma fração precipitada mas utilizando cromatografia de filtração em gel. A Cramoll 3 é purificada do precipitado de 0-40% através de cromatografia de troca iônica (PAIVA E COELHO, 1992; CORREIA E COELHO, 1995). Alternativamente, uma preparação contendo as isoformas 1, 2 e 3 (Cramoll 1,2,3) pode ser obtida usando o sobrenadante resultante da

precipitação de 60% de sulfato de amônio e cromatografia de filtração em gel (NAPOLEÃO et al., 2013).

Paiva et al (2003), isolaram um inibidor de tripsina de sementes de *Echinodorus paniculatus* a partir da cromatografia de afinidade utilizando as isoformas Cramoll 1, 2, 3 imobilizadas em Sepharose (CraIso 1,2,3-Sepharose). Foi possível o isolamento do inibidor de tripsina com rendimento de 32%, devido aos sítios de ligação a carboidratos disponíveis destas isolectinas, onde cerca de 90% ligaram-se efetivamente a Sepharose 4B. Assim, a matriz produzida pode ser utilizada para caracterização do sítio glicosilado do inibidor. Observou-se também que as isolectinas mantiveram sua atividade mesmo após a imobilização, o que indica a utilidade desta matriz de afinidade para a purificação de moléculas glicosiladas (PAIVA et al., 2003).

A isoformas da Cramoll 1,2,3-Sepharose foi empregada para o isolamento de glicoproteínas de soro fetal bovino, ovo branco de galinha, colostro humano e plasma de sangue humano. A matriz formada por Cramoll 1,2,3-Sepharose foi avaliada como suporte para purificação de glicoproteínas encontradas no soro bovino, tendo-se uma proteína eluída similar ao padrão da fetuína bovina comercial no SDS-PAGE. O isolamento das glicoproteínas das misturas complexas foi alcançado devido à presença de resíduos de carboidratos como manose, hexosaminas e ácido siálicos (NAPOLEÃO et al., 2013).

2.5 TÉRMITAS E *NASUTITERMES CORNIGER*

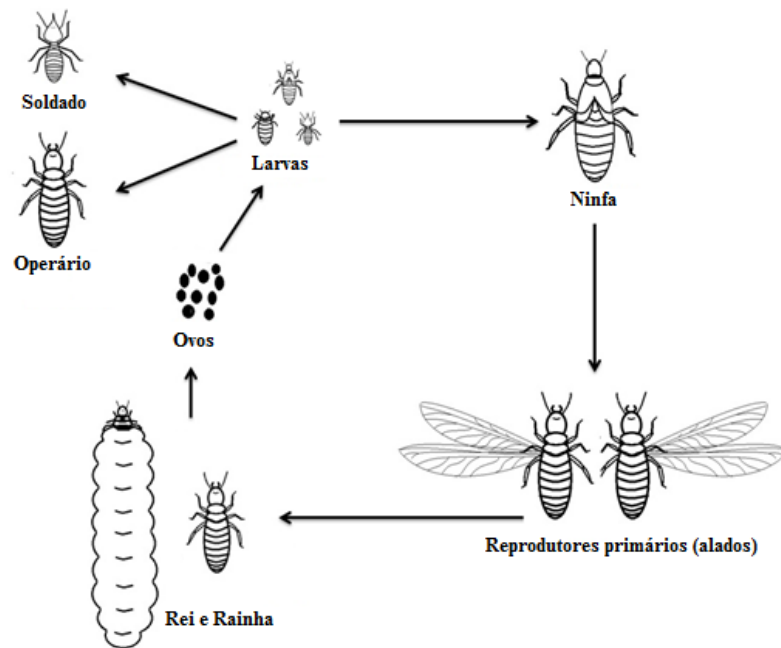
Cupins são insetos eussociais da ordem Blattaria, infraordem Isoptera, composta atualmente por aproximadamente 3170 espécies (CONSTANTINO, 2016). Dentro de Isoptera, a classificação atualmente que é mais aceita é composta por nove famílias: Mastotermitidae, Hodotermitidae, Archotermopsidae, Hodotermitidae, Stolotermitidae, Kalotermitidae, Stylotermitidae, Rhinotermitidae, Serritermitidae e Termitidae (ENGEL; GRIMALDI; KRISHNA, 2009; KRISHNA et al., 2013).

No Brasil, encontram-se apenas quatro famílias, Kalotermitidae, Rhinotermitidae, Serritermitidae e Termitidae (CONSTANTINO, 1999a), composta por cerca de 300 espécies, entretanto, é certo que esse número é subestimado, uma vez que há ausência de levantamentos em várias regiões brasileiras, principalmente no norte e nordeste (CONSTANTINO, 2002; MARICONI et al., 1999, COSTA-LEONARDO, 2002).

Quanto aos aspectos da biologia dos cupins, são indivíduos que vivem em colônias organizadas em castas diferenciadas, apresentam divisão reprodutiva do trabalho na colônia e cuidado cooperativo com a prole (KORB, 2005; WILSON, 1971), além de comportamentos de grupo complexos e coordenados para construção de ninho e forrageamento (LEGENDRE et al., 2008). Os cupins apresentam três castas principais, que são os reprodutores, os operários e os soldados, todos diplóides, podendo os dois últimos pertencer a um ou outro sexo, ou até ambos os sexos numa mesma colônia (GRASSÉ, 1982). Os reprodutores estão representados pela rainha e pelo rei, cuja principal função é a produção de ovos para suprir a demanda dos indivíduos na colônia. Nesta ordem de insetos, o rei constitui par permanente com a rainha, com a qual copula diversas vezes ao longo da vida. (WILSON, 1971). Os operários formam a casta mais numerosa e ocupam todas as funções rotineiras tais como obtenção de alimento, construção e reparação do ninho e túneis, cuidados com a prole e fornecimento de alimento às outras castas e os soldados são os responsáveis pela guarda do ninho e pela proteção dos operários durante o forrageamento (KRISHNA, 1969).

O casal real (rei e rainha) podem ou não, dependendo da espécie, movimentar-se pelo ninho ou permanecer preso em uma câmara real. O desenvolvimento dos novos cupins, apresenta metamorfose incompleta. Embora cada espécie possua características de desenvolvimento diferentes, basicamente podemos resumir o ciclo de vida destes insetos nas seguintes fases: ovos, formas jovens (ou ninfas), adultos (figura 7). As ninfas se diferenciam em operários, soldados e em ninfas aladas que darão origem aos adultos férteis. Os ninhos podem apresentar ainda reprodutores secundários, indivíduos com a função de substituir o casal real no caso de algum deles adoecer ou morrer, ou até mesmo complementar a postura de ovos na colônia. Os reprodutores secundários são produzidos em colônias mais maduras e, como não tem a necessidade de sair da colônia, eles desenvolveram asas. É importante frisar que podem ocorrer muitas variações nesses passos de acordo com a espécie, mas este é o padrão mais geral (SU et al., 2000).

Figura 6. Ciclo de vida dos cupins e diferentes castas encontradas em um cupinzeiro.



Fonte: Lima *et al.* (2015)

Para a defesa de possíveis predadores e parasitas os cupins apresentam estratégias ativas e passivas. (ŠOBOTNÍK; JIROŠOVÁ; HANUS, 2010). As estratégias ativas estão relacionadas as modificações morfológicas e químicas na casta dos soldados e a sinalização de alarme liberada para a colônia. A cooperação dos operários na reconstrução do ninho também é uma importante estratégia ativa de defesa. O forrageamento a partir de túneis protege os cupins de possíveis predadores, compondo a estratégia de defesa passiva. (NOIROT; DARLIGTON, 2000; HANUS, 2010; CRISTALDO *et al.*, 2015).

Os cupins são capazes de se alimentar de matéria vegetal viva ou morta, sendo a sua principal fonte de energia a celulose, como madeira, papel, plantas vivas e de matéria orgânica em decomposição. A capacidade de aproveitar a celulose como fonte energética se deve à presença de uma comunidade simbiótica de microrganismos encontrada no trato intestinal dos cupins (FRÖHLICH *et al.*, 2007; VASCONCELLOS *et al.*, 2015). Devido a esse hábito alimentar, os cupins desempenham uma função importante nos ecossistemas terrestres como a criação de núcleos de vegetação e decomposição da madeira em ambientes naturais (BONACHELA *et al.*, 2015; ULYSHEN, 2016). Além do que, pela sua eficiente digestão da celulose, eles também são utilizados como modelos enzimáticos para hidrólise desses recursos (LUCENA *et al.*, 2011).

A importância ecológica dos cupins é um dos mais importantes, principalmente quando consideradas as modificações que podem causar no ambiente, desde alterações de paisagem até modificações nas propriedades físicas e químicas do solo, efeitos no processo de decomposição, ciclagem de nutrientes, entre outros (LEE e WOOD, 1971). Mas também podem ser considerados pragas devido a sua alimentação. No Brasil, cerca de 80 espécies de cupins já foram consideradas pragas de zonas rurais e urbanas. *Coptotermes gestroi*, *Heterotermes tenuis*, (cupins de solo), *Cryptotermes brevis*, *C. havilandi* (cupins de madeira seca) e *Nasutitermes corniger* (cupim arbóreo) estão entre as espécies causadoras dos maiores estragos de madeira estrutural, agricultura e de florestas, estão as dos gêneros (FONTES, 2002).

Dentro de Termitidae, *Nasutitermes* é o gênero mais amplamente distribuído, abrangendo todas as regiões tropicais, e com a maior riqueza de espécies – 260, aproximadamente. Dessas, 49 se distribuem no Brasil em ambientes de caatingas, matas tropicais, cerrados, planícies e pastagens (CONSTANTINO, 2015). A grande maioria das espécies pertencentes ao gênero *Nasutitermes* é endêmica, principalmente na região neotropical. Muitas constroem ninhos arbóreos, que estão sempre em comunicação com o solo, por meio de túneis que descem pelo tronco da árvore onde seu ninho foi construído (CONSTANTINO, 1999; FONTES, 2002).

Vários trabalhos vem descrevendo a atividade inseticida de lectinas sobre soldados e operários de *N. corniger*. Napoleão et al (2011), observaram que as lectinas de *Myracrodruon urundeuva*, MuBL (LC₅₀ de 0.974 mg ml⁻¹ em operários e 0,787 mg ml⁻¹ em soldados) e MuHL (LC₅₀ de 0.374 mg ml⁻¹ em operários e 0,432 mg ml⁻¹ em soldados) mostraram atividade termiticida contra operários. Lectinas isoladas das... de *ClaveLL* apresentou efeito tóxico para operários e soldados após 10 dias de ensaio apresentando LC₅₀ de 0,196 e 0,5 mg ml⁻¹, respectivamente. A lectina da ...MvRL mostrou alta toxicidade contra *N. corniger* com CL₅₀ de 0,130 para operários e 0,085 mg ml⁻¹ para soldados durante 3 dias. MvRL inibiu a atividade tripsina-like e estimulou a atividade da endoglucanase do extrato de intestino do operário que atuou por meio de mecanismos termiticidas que podem incluir modulação enzimática. *Opuntia ficus indica* cladodes, e *Crataeva tapia* bark também mostrou atividade termiticida sobre *N. Corniger* (SILVA et al., 2009; PAIVA et al., 2011; ALBUQUERQUE et al., 2012; ARAÚJO et al., 2012).

2.6 TETRANYCHUS BASTOSI

Ácaros são organismos cosmopolitas e polífagos. São encontrados em habitats aquáticos e terrestres. Várias espécies de ácaros vivem sobre as plantas, alimentando-se do seu conteúdo

celular, porém são relativamente poucas aquelas consideradas sérias pragas agrícolas. No entanto, algumas espécies apresentam importância, por atacar diversas espécies de plantas cultivadas (MORAES; FLECHTMANN, 2008).

Os ácaros pertencem ao Filo Arachnida e ao Subfilo Chelicerata. *Tetranychus bastosi* Tuttle, Baker e Sales, conhecido como ácaro vermelho, pertence a família Tetranychidae, a qual é constituída por ácaros especificamente fitófagos (BOLLAND; GUTIERREZ; FLECHTMANN, 1998). As espécies do gênero *Tetranychus* são consideradas pragas e ao se alimentarem, preferem a face inferior das folhas. A alimentação dos ácaros nas folhas causam o rompimento da células, destroem suas estruturas fotossintetizantes, órgão de reserva e, isso leva a disfunções nas plantas como o aumento da transpiração resultando em déficit hídrico e bloqueio da síntese do amido, o que favorece ainda mais o desenvolvimento dos ácaros (FRANCO e GABRIEL, 2008; SCHMIDT, 2014.). *Tetranychus bastosi* é originário da America do Sul, ea infestação por essa praga inicia-se na face inferior das folhas, inicialmente ao longo da nervura principal e, com o aumento do número de indivíduos, distribuindo-se por todo o limbo. *T. bastosi* produz uma espécie de teia nas folhas, e alimentam-se do conteúdo celular extravasado das células perfuradas pelas quelíceras em forma de estiletes. Ataca folhas velhas, provocando manchas branco acinzentadas e prateadas na face abaxial da lâmina, além de ondulações por todo o limbo e encarquilhamento (FRANCO & GABRIEL, 2008; DE MORAES e FLECHTMANN; SANTOS et al., 2009; SANTOS; SILVA-MANN; BOARI, 2010).

T. bastosi já foi encontrado em diversas culturas como *Carica papaya* L. (mamão), *Jatropha curcas* L. (pinhão manso), *J. gossypii folia* (pinhão roxo), *J. mollissima* (Pohl) Baill (pinhão bravo), *Manihot esculenta* Crantz (mandioca). A maior ocorrência de ácaros da família Tetranychidae no Brasil encontra-se na região sudeste e *T. bastosi* está associado geralmente a culturas economicamente importantes (MENDONÇA et al., 2010). Essas infestações causaram grandes injúrias às plantas, contribuindo para que *T. bastosi* fosse considerado uma praga potencial e grande ameaça para a produção econômica de diversas culturas (BOLLAND; GUTIERREZ; FLECHTMANN, 1998; VERONA, 2010; BARROS, 2013).

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, L.P.; SANTANA, G.M.S.; PONTUAL, E.V.; NAPOLEÃO, T.H.; COELHO, L.C.B.B.; PAIVA, P.M.G. Effect of *Microgrammavaccinifoliar* rhizome lectin on survival and digestive enzymes of *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae). **Int. Biodeter. Biodegr.** 75 , 158–166, 2012.
- ALICI, E. H., ARABACI, G. A novel serine protease from strawberry (*Fragaria ananassa*): purification and biochemical characterization. **International journal of biological macromolecules**, v. 114, p. 1295-1304, 2018.
- ALMEIDA, A. C.; OSTERNE, V. J.S.; SANTIAGO, M. Q.; PINTO-JUNIOR, V. R.; SILVA FILHO, J. C.; LOSSIO, C. F.; NASCIMENTO, F.L.F.; ALMEIDA, R.P.H.; TEIXEIRA, C.S.; LEAL, R.B.; DELATORRE, P.; ROCHA, B.A.M.; ASSREUY, A.M.S.; NASCIMENTO, K.S.; CAVADA, B.S. Structural analysis of Centrol obium to mentosum seed lectin with inflammatory activity. **Archives of biochemistry and Biophysics**, v. 596, p. 73-83. 2016.
- ARAÚJO, S.N.; MATRANGOLO, W.J.R.; MIRANDA, G.A.; NETTO, D.A.M.; DA SILVA, I.H.S. Análises das sementes de *Cratylia argentea*: cultura potencial para adubação verde e forragem/ Sete Lagoas : **Embrapa Milho e Sorgo**, 18 p. : il. -- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1679-0154; 36), 2011.
- ARAÚJO, R.M.S.; FERREIRA, R.S.; NAPOLEÃO, T.H.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G.; COELHO, L.C.B.B.; CORREIA, M.T.S.; OLIVA, M.L.V.; PAIVA, P.M.G. *Crataeva tapia* bark lectin is an affinity adsorbent and insecticidal agent. **Plant Science** , v.183, p. 20 e 26, 2012.
- AUDFRAY, A.; CLAUDINON, J.; ABOUNIT, S.; RUVOËN-CLOUET, N.; LARSON, G.; SMITH, D.F. et al. Fucose-binding Lectin from Opportunistic Pathogen Burkholderia ambifaria Binds to Both Plant and Human Oligosaccharidic Epitopes. **J Biol Chem**, v. 287, p. 4335-47, 2012.
- BARRETT, A. J. Classification of Peptidases. In: Meth. *Enzymol.* **Academic Press, Inc** , v244, p. 1-15, 1994.
- BARROS, A.M.F. Aspectos bioecológicos e populacionais de *Tetranychus bastosi* (ACARI: TETRANYCHIDAE) em pinhão-mansão no semiárido pernambucano. 2013. 46 p. **Dissertação (Mestrado em Produção Agrícola)**. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Garanhuns.
- BOLLAND, H. R.; GUTERREZ, J.; FLECHTMANN, C. H. W. World Catalogue of the spider mite family (Acari: Tetranychidae) Brill. **Leiden. Boston. Köln**, p. 392, 1998.
- BONACHELA, J. A. et al. Termite mounds can increase the robustness of dryland ecosystems to climatic change. **Science** , v. 347, n. 6222, p. 651–5, 2015.

CACCIA, S., VAN DAMME, E. J. M., DE VOS, W. H., SMAGGHE, G. Mechanism of entomotoxicity of the plant lectin from *Hippeastrum hybrid (Amaryllis)* in *Spodoptera littoralis* larvae. **Journal of Insect Physiology**, v.58, p. 1177-1183, 2012.

CARVALHO, E.V.M.M.; BEZERRA, R.F.; DE SOUZA BEZERRA, R.; DE ARAÚJO, J.M.; GUERRA SANTOS, A.J.; DOS SANTOS CORREIA, M.T. et al. Detection of the first lectin with antimicrobial activity present in serum of the Amazonian fish tambaqui *Colossoma macropomum*. **Fisheries science**, v. 78, p. 879-88, 2012.

CAMPOS, J.K.L., Araújo, C. S. F., Araújo, T. F. S., Santos, A. F.S., Teixeira, J. A., Lima, V. L.M., Coelho, L. C. B. B. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of Bauhinia monandra leaf lectin. **Biochimie Open**. v.2, p. 62-68, 2016.

CHANDRA, N. R. et al. Structural similarity and functional diversity in proteins containing the legume lectin fold. **Protein Engineering**, v. 14, n. 11, p. 857-866, 2001.

CHAUHAN, S.P., SHETH, N.R., RATHOD, I.S., SUHAGIA, B.N., MARADIA, R.B., 2013. Analysis of betalains from fruits of Opuntia species. **Phytochem**, v. 12, p. 35-45, 2013.

COELHO, L.C.B.B. et al. Chapter 3: Protein Purification by Affinity Chromatography. Biochemistry, **Genetics and Molecular Biology** » "Protein Purification", book edited by Rizwan Ahmad, v. 20, 2012.

CONSTANTINO, R. The pest termites of South America: taxonomy, distribution and status. **Journal of Applied Entomology**, v. 126, n. 7-8, p. 355–365, set. 2002.

CONSTANTINO, R. On-line termite data base. Disponível em: < <http://www.termitologia.unb.br/>>, 2016.

CORREIA, M.T. Lectins, Interconnecting Proteins with Biotechnological/Pharmacological and Therapeutic Applications. Evid Based **Complement Alternat Med**, v.159, p.40 – 74, 2017.

CRISTALDO, P. F. et al. The nature of alarm communication in *Constrictotermes cyphergaster* (Blattodea: Termitoidea: Termitidae): the integration of chemical and vibro acoustic signals. **Biology Open**, v. 4, n. 12, p. 1649–1659, 15 dez. 2015.

DAMODARAN, D., JEYAKANI, J., CHAUHAN, A., KUMAR, N., CHANDRA, N.R., SUROLIA, A., Cancer Lectin DB: a database of lectins relevant to cancer. **Glycoconj. J.**, v.25, p. 191–198, 2008.

DELATORRE, P. et al. Crystal structure of a lectin from Canavaliamaritima (ConM) bin complex with trehalose and maltose reveals relevant mutation in ConA-like lectins. **Journal of Structural Biology**, v. 154, p. 280 286, 2006.

DE MORAES G.J.; FLECHTMANN H.W. (2009) Manual de Acarologia: acarologia basica e acaros de plantas cultivadas no Brasil. Ed Holos, Ribeirao preto, SP, Brasil.

DENG, J. J., HUANG, W. Q., LIA, Z. W., LUA, D., ZHANG, Y., LUOA, X. C. Biocontrol activity of recombinant aspartic protease from *Trichoderma harzianum* against pathogenic fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, v.112, p. 35–42, 2018.

DIAS, R. O.; MACHADO, L. S., MIGLIOLO, L., FRANCO, O. L. Insights into Animal and Plant Lectins with Antimicrobial Activities. **Molecules(Basel, Switzerland)**, v.20, n. 1, p. 519-541, 2015.

FADINI M.A.M.; LEMOS W.P.; PALLINI A.; VENZON M.; MOURÃO A.S. Does herbivory of Tetranychusurticae Koch (Acari: Tetranychidae) induce direct defense in strawberry? **Neotrop. Entomol**, v.33, p. 293-297, 2004.

FERNÁNDEZ-LUCAS, J., CASTAÑEDA,D., HORMIGO, D. New trends for a classical enzyme: Papain, a biotechnological success story in the food industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 68, p. 91-101, 2017.

FEIJOO-SIOTA, L., VILLA, T.G., 2011. Native and biotechnologically engineered plant proteases with industrial applications. **Food Bioprocess Technol.** v. 4, p. 1066-1088, 2011.

FRANCO, D. A. de S.; GABRIEL, D. Aspectos Fitossanitários na Cultura do Pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) **para Produção de Biodiesel. Biológico.** São Paulo, v.70, n.2, p.63-64, jul-dez, 2008.

GADHAWALA, Z. M. et al. New Approach In Targeted Drug Delivery System. **Journal of Pharmacy Research** (New Journal BioMed), v. 5, n. 8, 2012.

GULLAN, P. J. & CRANSTON, P. S. 2008. Os insetos: um resumo de entomologia. **Editora Roca**, São Paulo, 440.

HARITO, J. B., CAMPBELL, A. T., TYSNES, K. R., DUBEY, J. P., ROBERTSON, L. J. Lectin-magnetic separation (LMS) for isolation of *Toxoplasma gondii* oocysts from concentrated water samples prior to detection by microscopy or qPCR. **Water Research**, v. 114, p.228 – 236, 2017.

HAN, P., YANG, C., LIANG, X., LI, L. Identification and characterization of a novel chitinase with antifungal activity from ‘Baozhu’ pear (*Pyrus ussuriensis* Maxim.). **Food Chemistry.** v.196, p. 808–814, 2016.

HEU, M. S., KIM, H. R., PYEUN, J. H. Comparison of trypsin and chymotrypsin from the viscera of anchovy, *Engraulis japonica*. **Comparative Biochemistry an Phisyology**, v. 112, p. 557-567, 1995.

HU, L. et al. Cell attachment protein VP8* of a human rotavirus specifically interacts with Atypehisto-blood group antigen. **Nature**, v. 485, n. 7397, p. 256 – 9, 2012.

IBSP, Instituto Biológico de São Paulo. Disponível em <<http://www.biologico.sp.gov.br/acaros.php>>. Acessoem 20 de outubro de 2017.

JAMES, M. N.G. Catalityc pathway of aspartic peptidases. **In: Handbook of Proteolytic Enzymes**, v.2, p. 12-19, 2004.

JEONG, Y. J., BAEK, S. C., KIM, H. Cloning and characterization of a novel intracellular serine protease (IspK) from *Bacillus megaterium* with a potential additive for detergents. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.108, p. 808-816, 2018.

KOHARUDIN, L. M. I., GRONENBORN, A. M. Structures of Novel HIV Inactivating Lectins. **Biophysics and Structure to Counter Threats and Challenges**, p. 59- 67, 2013.

KONOZY, E. H. E. et al. Isolation, purification, and physicochemical characterization of a Dgalactose-binding lectin from seeds of *Erythrina speciosa*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 410, p. 222-229, 2003.

KRISHNA, K., WEESNER, F. M. Introduction. In: Krishna, K. & WEESNER, F. M. (Eds.), **Biology of termites**. New York: Academic Press, v. 1, pp. 1-17, 1969.

LAGARDA-DIAZ, I., GUZMAN-PARTIDA, A.M., HUERTA-OCAMPO, J.A., WINZERLING, J., VAZQUEZ-MORENO, L. Identification of membrane proteins of the midgut of *Zabrotes subfasciatus* larvae associated with the insecticidal mechanism of PF2 lectin. **J. Asia-Pacif. Entomol**, v.19, p. 677–682, 2016.

LAM, S.K.; NG, T.B. Lectins: production and practical applications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 89, p. 45-5, 2011.

LI, X.; DANG, S.; YAN, C.; GONG, X.; WANG, J.; SHI, Y. Structure of a presenilin LIMA, T. A. et al. Termiticidal lectins from *Myracrodruon urundeuva* (Anacardiaceae) cause midgut damage when ingested by *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae) workers. **Pest Manag Sci**, v. 73, 2016 family intramembrane aspartate protease. **Nature**, v. 493, p. 56-61, 2013.

LIMA, L. DA S. Estudo fitoquímico das folhas de *Cratylia mollis*: isolamento e elucidação estrutural de bis-norsesquiterpeno, terpenos e pterocarpana. 2005. 69f. Dissertação de Mestrado - **Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador**.

LIMA, T. A. et al. Termiticidal lectins from *Myracrodruon urundeuva* (Anacardiaceae) cause midgut damage when ingested by *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae) workers. **Pest Manag Sci**, v. 73, 2016 .

LIMA, T. A., DORNELLES, L. P., OLIVEIRA, A. P. S., CAIO C.S. GUEDES, C. S., SOUZA, S. O., SÁ, R. A., ZINGALI, R. B., NAPOLEÃO, T. H., PAIVA, P. M. G. Binding targets of termiticidal lectins from the bark and leaf of *Myracrodruon urundeuva* in the gut of *Nasutitermes corniger* workers. **Pest. Manag. Sci**, v.74, p.1593-1599, 2018.

LIU, Y., RAMELOT, T.A., HUANG, P., LIU, Y., LI, Z., FEIZI, T., ZHONG, W., WU, F.T., TAN, M., KENNEDY, M. A., JIANG, X. Glycan Specificity of P Rotavirus and Comparison with Those of Related P Genotypes. **Journal Virol**, v.21, p. 9983- 9996, 2016.

LIU, Y., XU, S., WOODRUFF, A. L., XIA, M., TAN, M., KENNEDY, M.A., JIANG, X. Structural basis of glycan specificity of P[19] VP8*: **Implications for rotavirus zoonosis and evolution**, v. 13, 2017.

LÓPEZ-OTÍN, C., BOND, J. S. Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283: 30433-30437, (2008).

LORIS, R.; HAMELRYCK, T.; BOUCKAERT, J.; WYNS, L. Legume lectin structure. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1383, n. 1, p. 9-36. 1998.

LUCENA, S. A et al. High throughput screening of hydrolytic enzymes from termites using a natural substrate derived from sugarcane bagasse. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, n. 1, p. 1–9, 2011.

MENDONÇA, R. S.; NAVIA, D.; DINIZ, I. R.; FLECHTMANN, C. H. W. South American spider mites: New hosts and localities. **Journal of Insect Science**, v. 11, p. 18, 2010.

MARQUES, D. N., ALMEIDA, A. S., SOUZA, A. R. O., PEREIRA, R., ANDRADE, A. L., CHAVES, R. P., CARNEIRO, R. F., VASCONCELOS, M. A., NASCIMENTO-NETO, L. G., PINHEIRO, U., VIDEIRA, P. A., TEIXEIRA, E. H., NAGANO, C. S., SAMPAIO, A. H. Antibacterial activity of a new lectin isolated from the marine sponge *Chondrilla caribensis*. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 109, p.1292–1301, 2018.

MICHIELS, K.; VAN DAMME, E.J.M.; SMAGGHE, G. Plant-insect interactions: what can we learn from plant lectins? **Archiv. Insect. Biochem. Physiol**, v.73, p.193-212, 2010.

MONZO, A.; BONN, G.K; GUTTMAN, A. Lectin-immobilization strategies for affinity purification and separation of glycoconjugates. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, p. 423-432, 2007.

MOURA, R.M. et al. CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*: Isolation, characterization and its effects on pathogenic bacteria and *Leishmania* promastigotes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A, Molecular & Integrative Physiology**, v. 145, p. 517-523, 2006.

MORAES, G. J.; FLECHTMANN, C. H. W. Manual de Acarologia: Acarologia Básica e Ácaros de Plantas Cultivadas no Brasil. **Holos Editora**, p. 11- 106, 2008.

MORAES, C. S., et al. Série em biologia celular e molecular - Métodos experimentais no estudo de proteínas. Rio de Janeiro: **Instituto Oswaldo Cruz**, ed. 1, 84 p., 2013.

MUTHU, S., GOPAL, V.B., SOUNDARARAJAN, S., NATTARAYAN, K., NARAYAN, K. S., LAKSHMIKANTHAN, M., MALAIRAJ, S., PERUMAL, P. Antibacterial serine protease from *Wrightia tinctoria*: Purification and characterization. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 112, p. 161-172, 2017.

NAPOLEÃO, T.H., PONTUAL, E.V., DE ALBUQUERQUE LIMA, T., DE LIMA SANTOS, N.D., SÁ, R.A., COELHO, L.C.B.B., DO AMARAL FERRAZ NAVARRO, D.M., PAIVA, P.M.G. Effect of *Myracrodruon urundeuva* leaf lectin on survival and digestive enzymes of *Aedes aegypti* larvae. **Parasitol. Res**, v.110, p. 609–616, 2012.

NAPOLEÃO, T. H., SANTOS-FILHO, T. G., PONTUAL, E. V., FERREIRA, R. S., COELHO, L.C.B.B., PAIVA, P.M.G. Affinity Matrices of *Cratylia mollis* Seed Lectins for Isolation of Glycoproteins from Complex Protein. **Appl. Biochem. Biotechnol**, v. 171, p. 744–755, 2013.

NASCIMENTO, K.S.; NASCIMENTO, F.L.F.; SILVA, M.T.L.; NOBRE, C.B.; MOREIRA, C.G.; BRIZENO, L.A.C.; DA PONTE, E.L.; ASSREUY, A.M.S.; CAVADA, B.S. Purification of a thermostable antinociceptive lectin isolated from *Andira anthelmia*. **JMR. Journal of Molecular Recognition**, v. 29, p. 248-252. 2016.

NICOLA, F., LORIANO, B. Morula cells as key hemocytes of the lectin pathway of complement activation in the colonial tunicate *Botryllus schlosseri*. **Fish & Shellfish Immunology**, v.63, p. 157 – 164, 2017.

NOIROT, C.; DARLIGTON, J. P. E. C. Termites nest: architecture, regulation and defence. In: ABE, T.; BIGNELL, D. E.; HIGASHI, M. (Eds.). *Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology*. London: **Kluwer Academic Publishers**, p. 121–139, 2000.

NUNES, E. S. et al. Inactivation and fragmentation of lectin from *Bothrops leucurus* snake venom by gamma irradiation. **Radiation Physics and Chemistry**, [S.l.], v. 81, n. 4, p. 484 - 487, Apr. 2012.

OLDIGES, D. P., PARIZI, L. F., ZIMMER, K. R., LORENZINI, D. M., ADRIANA SEIXAS, A., MASUDA, A., VAZ JR, I. S., TERMIGNONI, C. A *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* cathepsin with dual peptidase and antimicrobial activity. **International Journal for Parasitology**, v.42, p. 635–645, 2012.

OLIVEIRA, C.T., KUNZ, D., SILVA, C. P., MACEDO, L.M.R. Entomotoxic properties of *Dioclea violacea* lectin and its effects on digestive enzymes of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera). **Journal of Insect Physiology**, v.81, p.81–89, 2015.

OLIVEIRA, C. F. R. et al. A chitin-binding lectin from *Moringa oleifera* seeds (WSMoL) impairs the digestive physiology of the Mediterranean flour larvae, *Anagasta kuehniella*. / **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 2017.

PAIVA, P.M.G.; COELHO, L.C.B.B. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (amarante bean). **App Biochem Biotech**, v. 36, p. 113-8, 1992.

PAIVA, P. M. G.; SOUZA, A. F.; OLIVA, M. L. V; et al. Isolation of a trypsin inhibitor from *Echinodorus paniculatus* seeds by affinity chromatography on immobilized *Cratylia mollis* isolectins. **Bioresource Technology**, v. 88, p. 75–79, 2003.

PAIVA, P.M.G.; SANTANA, G.M.S.; SOUZA, I.F.A.C.; ALBUQUERQUE, L.P.; AGRANETO, A.C.; ALBUQUERQUE, A.C.; LUZ, L.A.; NAPOLEÃO, T.H.; COELHO, L.C.B.B. Effect of lectins from *Opuntia ficus indica* cladodes and *Moringa oleifera* seeds on survival of *Nasutitermes corniger*. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.65, p. 982 - 989, 2011.

PEES, B., YANG, W., ZÁRATEPOTES, A., SCHULENBURG, H., DIERKING, K.. High innate immune 627 specificity through diversified C-type lectin-like domain proteins in invertebrates. **J .Innate Immun**, v. 8, p. 129-142, 2016.

PESSOA JÚNIOR, A.; KILIKIAN, B. V. Purificação de produtos biotecnológicos. Barueri: **Manole**, p. 440, 2005.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Plant lectins: versatile proteins with important perspectives in biotechnology. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 15, p. 199 - 228, 1998

PARDO, M.F; LOPEZ, M.I; CANALS F; ZVILES F.X; NATALUCCI, C.L; CAFFINI, N.O; Purification of balansain I, an endopeptidase from unripe fruits of *Bromelia balansae* Mez (Bromeliaceae). **J Agric Food Chem**, v. 48, p. 3795–800, 2000.

PIRES, W. L., CASTRO, O. B., KAYANO, A. M., SETÚBAL, S. S., PONTES, A. S., NERY, N. M., PALOSCHI, M. V., PEREIRA, S. S., STÁBELI, R. G., FERNANDES, C. F. C., SOARES, A. M., ZULIANI, J. P. 2017. Effect of BjcuL, a lectin isolated from *Bothrops jararacussu*, on human peripheral blood mononuclear cells. **Toxicology in Vitro**, v. 41, p. 30-41.

POLAINA, J., & MACCABE, A. P. Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications. New York: **Springer**, (2007).

PROCÓPIO, T. F., PATRIOTA, L. L. S., MOURA, M. C., SILVA, P. M., OLIVEIRA, A. P. S., CARVALHO, L. V. N., LIMA, T. A., SOARES, T., SILVA, T. D., COELHO, L. C. B. B., PITTA, M. G. R., RÊGO, M. J. B. M., FIGUEIREDO, R. C. B. Q., PAIVA, P. M. G., NAPOLEÃO, T. H. CasuL: A new lectin isolated from *Calliandra surinamensis* leaf pinnulae with cytotoxicity to cancer cells, antimicrobial activity and antibiofilm effect. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, p.419–429, 2017.

RAO, M. APARNA, M. GHATGE, M. DESHPANDE, V. Molecular and Biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 62, p.597-635, 1998.

RAWLINGS, N. D., BARRETT, A. J., & BATEMAN, A. Evolutionary families of peptidases. **The Biochemical Journal**, v.290, p. 205–218, 1993.

RAWLINGS, N.D., BARRETT, A. J. Introduction: Aspartic and Glutamic Peptidases and Their Clans. **Handbook of Proteolytic Enzymes**, v.1, p. 3 - 19, 2013.

RAWLINGS, N.D., BARRETT, A. J. Introduction: Metallopeptidases and Their Clans. **Handbook of Proteolytic Enzymes**. v.1, p. 325- 370, 2013.

RAWLINGS, N.D., WALLER, M., BARRETT, A.J., BATEMAN, A. 2014. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. **Nucleic Acids Res**, v. 42, p. 503 – 509, 2014.

REZENDE, L.C., 2006. 2f. NOVOS FENÓLICOS DO CAULE DE CRATYLIA MOLLIS. Dissertação de mestrado - **Instituto de Química**, Universidade Federal da Bahia, Salvador.

RÜDIGER, H., SIEBERT, H.C., SOLÍS, D., JIMÉNEZ-BARBERO, J., ROMERO, A., VON DER LIETH, C.W., DIAZ-MARIÑO, 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.

SALVADORI, J. D. M. UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E Purificação parcial e caracterização das proteinases digestivas de *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera - Pyrrhocoridae): papel na hidrólise da urease de *Canavalia* *ensiformis*. **Tese de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, setembro 2006.

SANTIAGO, M.Q.; LEITÃO, C.C.; PEREIRA-JUNIOR, F.N.; PINTO-JUNIOR, V.R.; OSTERNE, V.J.; LOSSIO, C.F.; CAJAZEIRAS, J.B.; SILVA, H.C.; ARRUDA, F.V.S.; PEREIRA, L.P.; ASSREUY, A.M.S.; NASCIMENTO, K.S.; NAGANO, C.S.; CAVADA, B.S. Purification, characterization and partial sequence of a pro-inflammatory lectin from seeds of *Canavalia oxyphylla* Standl. & LO Williams. **Journal of Molecular Recognition**, v. 27, p. 117-123, 2014.

.SANTI-GADELHA, T. et al. Purification and biological effects of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) seed lectin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 350, n. 4, p.1050-1055, 2006

SANTOS, A. F. S. et al. Detection of water soluble lectin and antioxidant component from *Moringa oleifera* seeds. **Water Research**, v. 39, p. 975-980, 2005.

SANTOS, H. O.; SILVA-MANN, R.; BOARI, A. J. *Tetranychusbastosi* TUTTLE, BAKER & SALES (Prostigmata: Tetranychidae) mites on *Jatropha curcas* (Linnaeus) in Sergipe State, Brazil. **Comunicata Scientiae**, v. 1, n. 2, p. 153-155, 2010.

SCHMIDT R.A. Leaf structures affect predatory mites (Acari: Phytoseiidae) and biological control: a review. **Exp. Appl. Acarol**, v.62, p.1-17, 2014.

SHARON, N. Lectins: Carbohydrate-specific Reagents and Biological Recognition Molecules. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 5, p. 2753-2764, 2008.

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.

SILVA, P. M., MOURA, M. C., GOMES, F. S., TRENTIN, D. S., OLIVEIRA, A. P. S., MELLO, G. S. V., PITTA, M. G. R., MOACYR JESUS BARRETO DE MELO REGO, M. J. B. M., COELHO, L. C. B. B., MACEDO, A. J., FIGUEIREDO, R. C. B. Q., PAIVA, P. M. G., NAPOLEÃO, T. H. PgTeL, the lectin found in *Punica granatum* juice, is an antifungal agent against *Candida albicans* and *Candida krusei*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108 p.391–400, 2018.

SIMÕES, R. C. Caracterização de lectinas de leguminosas por espectrometria de massa. 2011, 91 f. **Dissertação (Mestrado em Bioquímica)** - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

ŠOBOTNÍK, J.; JIROŠOVÁ, A.; HANUS, R. Chemical warfare in termites. **Journal of Insect Physiology**, v. 56, n. 9, p. 1012–1021, 2010.

SOUZA, G.A.; OLIVEIRA, P.S.L.; TRAPANI, S.; SANTOS, A.C.O.; ROSA, J.C.; LAURE, H.J.; FACA, V.M.; CORREIA, M.T.S.; TAVARES, G.A.; OLIVA, G.; COELHO, L.C.B.B.; GREENE, L.J. "Amino acid sequence and tertiary structure of *Cratylamollis* seed lectin." *Glycobiology*. 13:961-972, 2003.

SOUSA, F., PRAZERES, D. M., QUEIROZ, J. A. Affinity chromatography approaches to overcome the challenges of purifying plasmid DNA. **Trends Biotechnol**, v.26, p. 518-25, 2008.

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

SOUZA, P.M. 2015. Purificação de proteases por fungos filamentosos isolados do cerrado do Centro Oeste brasileiro. **Tese (Doutorado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo**. Departamento de Tecnologia Farmacêutico-Bioquímico.

SOUSA, B. L. et al. High-resolution structure of a new Tn antigen-binding lectin from Vatairea macrocarpa and a comparative analysis of Tn-binding legume lectins. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 59, n. 1, p. 103–110, 2015.

SRINIVAS, V. R. et al. Legume lectin family, the ‘natural mutants of the quaternary state’, provide insights into the relationship between protein stability and oligomerization. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1527, n. 3, p. 102-111, 2001

SU, N.Y.; BAN, P. M.; SCHEFFRAHN, R. H. Control of subterranean termite populations at San Cristobal and El Morro, San Juan National Historic Site. **Journal of Cultural Heritage**, p.217-225, 2000

SULCA, M. A., REMUZGO, C., CÁRDENAS, J., SKIYOTA, S., CHENG, E., BEMQUERER, M. P., MACHINI, M.T. 2017. Venom of the Peruvian snake *Bothriopsis oligolepis*: Detection of antibacterial activity and involvement of proteolytic enzymes and C-type lectins in growth inhibition of *Staphylococcus aureus*. **Toxicon**, v. 134, p. 30 – 40, 2017.

SULTAN, N.A.M.; KAVITHA, M.; SWAMY, M.J. Purification and physicochemical characterization of two galactose-specific isolectins from the seeds of *Trichosanthes cordata*. **IUBMB life**, v. 61, p. 457-69, 2009.

SUMANTHA, A., LARROCHE, C., & PANDEY, A. (2006). Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: A perspective. **Food Technology and Biotechnology**, 44(2), 211–220.

SUN, J. et al. Purification and characterisation of a natural lectin from the serum of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 23, n. 2, p. 292-299, 2007.

TAKAHASHI, K.G., KURODA, T., MUROGA, K. Purification and antibacterial characterization of a novel isoform of the Manila clam lectin (MCL-4) from the plasma of the

Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. **Comparative Biochemistry and Physiology B Biochem Mol Biol**, v. 150, p. 45-52, 2008.

TAVANO, O. L. Protein hydrolysis using proteases: **An important tool for food biotechnology**. v. 90, p. 1- 11, 2013.

TEIXEIRA, C.S., 2012. Determinação da estrutura de uma lectina da semente de *Camptosema pedicellatum* Benth por cristalografia de raios X. **Dissertação de Mestrado**.

THAKUR, A. et al. Purification and characterization of lectin from fruiting body of *Ganoderma lucidum*: Lectin from *Ganoderma lucidum*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1770, n. 9, p. 1404-1412, 2007.

ULYSHEN, M. D. Wood decomposition as influenced by invertebrates. **Biological Reviews**, v. 91, n. 1, p. 70–85, 2016.

VANDENBORRE, G.; VAN DAMME, E.J.M.; SMAGGHE, G. Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects. **Phytochemistry**, v. 72, p. 1538–1550, 2011.

VASCONCELLOS, A.; MOURA, F.M.S.M.; ERNESTO, M. V. “Térmitas em ecossistemas Neotropicais: amostragens qualitativas e quantitativas”. In: LIMA, M.S.C.S; CARVALHO, L.S.; PREZOTO, F. **Métodos em Ecologia e Comportamento Animal**. Teresina: EDUFPI, 2015.

VET, L.E.M Evolutionary aspects of plant-carnivore interactions. Em: Insect-plant interactions and induced plant defense (D.J. Chadwick & J.A. Goode, eds). **Novartis Foundation, Chichester**, p. 3-20, 1999

VERONA, R. L. C. Ácaros Associados à *Jatropha* spp. (Euphorbiaceae) no Brasil. **Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências**, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto, SP, 2010.

VIEIRA, P. B. et al. Mecanismos específicos de patogenicidade de protozoários de Mucosa: *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* e *Trichomonas vaginalis*. **Revista do Hospital de Clínicas de Porto Alegre**, v. 32, n. 1, p. 58 - 70, 2012.

XIA, X., YOU, M., RAO, X., YU, X. Insect C-type lectins in innate immunity. **Developmental & Comparative Immunology**. v.83, p. 70-79, 2018

WANG, X.W., WANG, J.X., 2013. Diversity and multiple functions of lectins in shrimp immunity. **Dev Comp Immunol**, 39, 27-38.

WILLIAMS, A.; WESTHEAD, D. Sequence relationships in the legume lectin fold and other jelly rolls. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 15, p.771-774, 2002. 9996, 2016.

WILSON, E. O. The insects societies. **University Press Harvard, Cambridge and Massachusetts**, 1971.

WORRALL D.; HOLROYD G.H.; MOORE J.P.; GLOWACZ M.; CROFT P.; TAYLOR J.E.; PAUL N.D.; ROBERTS M.R. Treating seeds with activators of plant defence generates long-lasting priming of resistance to pests and pathogens. **New Phytologist**, v.193, p.770–778, 2012.

ZHANG Y.; LUBBERSTEDT T.; XU M. The genetic and molecular basis of plant resistance to pathogens. **J. Genet Genomics**, v.40, p.23-35, 2013.

3 ARTIGO 1

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ACARICIDA DE LECTINAS DE SEMENTES DE *CRATYLIA MOLLIS* (CRAMOLL 1,2,3) SOBRE O ÁCARO VERMELHO *TETRANYCHUS BASTOSI*

Yasmin Bruna de Siqueira Bezerra^a, Carlos Romero Ferreira de Oliveira^b, Cláudia Helena Cysneiros Matos de Oliveira^b, Gabriel Alves dos Santos^b, Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho^a, Thiago Henrique Napoleão^a, Thâmarah de Albuquerque Lima^a, Patrícia Maria Guedes Paiva^{a*}.

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

^b*Universidade Federal Rural de Pernambuco/Unidade Acadêmica de Serra Talhada, Serra Talhada, Pernambuco, Brazil.*

*Corresponding author. E-mail address: ppaivaufpe@yahoo.com.br

1 INTRODUÇÃO

Lectinas são proteínas hemaglutinantes que se ligam reversivelmente a carboidratos simples e complexos. Elas são amplamente distribuídos na natureza e apresentam várias propriedades biológicas, como antimicrobiana (NUNES et al., 2011; HUNG et al., 2018; PROCÓPIO et al., 2017; MARQUES et al., 2018;), antitumoral (SOUZA et al. , 2016; LACERDA et al., 2017) e inseticidas (NAPOLEÃO et al., 2012; LAGARDA-DIAZ et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2017; LIMA et al., 2018).

Cratylia mollis (feijão camaratu) é uma leguminosa nativa do nordeste brasileiro cujas sementes contêm quatro isoformas de lectina denominadas Cramoll 1, 2, 3 e 4. As isoformas 1, 2 e 4 são ligadas à glicose/manose, enquanto a Cramoll 3 é específica da galactose. Elas podem ser separadas do extrato de sementes através de precipitação com sulfato de amônio e etapas cromatográficas. A preparação de Cramoll 1,4 é obtida a partir do precipitado de 40-60% de sulfato de amônio por cromatografia de afinidade; as isoformas 1 e 4 podem ainda ser separadas por cromatografia de troca iônica. A Cramoll 2 foi isolada também desta mesma fração precipitada mas utilizando cromatografia de filtração em gel. A Cramoll 3 é purificada do precipitado de 0-40% através de cromatografia de troca iônica (PAIVA E COELHO, 1992; CORREIA E COELHO, 1995). Alternativamente, uma preparação contendo as isoformas 1, 2 e 3 (Cramoll 1,2,3) pode ser obtida usando o sobrenadante resultante da precipitação de 60% de sulfato de amônio e cromatografia de filtração em gel (NAPOLEÃO et al., 2013).

Algumas espécies de ácaros são de interesse agrícola porque agem como pragas, causando danos e grandes perdas de colheitas, afetando a produtividade e, portanto, exigindo milhões de dólares para seu controle. O ácaro-vermelho *Tetranychus bastosi* (Família Tetranychidae) é uma espécie cosmopolita que ocorre em regiões temperadas e tropicais, sendo considerado uma praga de diversas culturas de importância nutricional ou ornamental (GALLO et al., 2002; SEEMAN E BEARD, 2011; FERRAZ ET al., 2017; ROSADO et al., 2015). Em muitos casos, os acaricidas (por exemplo, piretróides, abamectina e difecol) representam o método único para o controle dos ácaros; entretanto, resultados insatisfatórios são frequentemente obtidos, uma vez que esses compostos podem eliminar inimigos naturais, levando ao aumento da população de pragas (SOARES et al., 2009; VAN LEEUWEN et al., 2010; MOSCARDINI et al., 2014). O uso de acaricidas ainda pode induzir ao surgimento de resistência, que ocorre rapidamente no caso dos ácaros, devido ao curto ciclo de vida, à

abundante progênie e à reprodução arrenocelular (MANIANIA et al., 2008; VAN POTTELBERGE et al., 2009).

Neste sentido, o uso de produtos naturais extraídos de plantas, como extratos de plantas e metabólitos secundários (timol, carvacrol, 1-8 cineol, n-hexanol, monoterpenos e sesquiterpenos) são considerados alternativas aos acaricidas sintéticos para uso em manejo integrado de pragas (MIP). Entre os efeitos sobre ácaros relatados para produtos naturais, destacam-se atividade repelente, efeito inibitório na oviposição e crescimento, alterações morfogênicas, alterações do sistema hormonal, alterações no comportamento sexual e mortalidade nas fases imaturas ou adultas (KOC, 2013; GOMES et al., 2014; SIQUEIRA et al., 2014; PAVELA, 2016; FERRAZ, 2017; FERRAZ et al., 2017; ROSADO-AGUILAR et al., 2017; PAVELA et al., 2018).

Estudos com *Tetranychus urticae* mostraram que os óleos essenciais apresentam atividades fumigantes e repelentes (TAK & ISMAN., 2017; SOUZA et al., 2015). Para *T. bastosi*, foi detectada atividade carrapaticida de extratos aquosos das folhas de *Myracrodruon urundeuva*, (folhas) *Croton blanchetianus* e *Ziziphus joazeiro*, sendo o *Z. joazeiro* o mais ativo. O extrato aquoso de folhas de *Prosopis juliflora* também foi tóxico para *T. bastosi* e promoveu redução da oviposição (XAVIER et al., 2015; NASCIMENTO, 2017).

Até onde sabemos, a atividade acaricida das lectinas sobre *T. bastosi* não foi relatada até o momento. Assim, para ampliar o potencial dessas proteínas bioativas para o controle de ácaros, o presente trabalho descreve os efeitos da preparação Cramoll 1,2,3 sobre a sobrevivência de fêmeas e ovos de *T. bastosi* e sobre a taxa de crescimento populacional.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 COLETA DO MATERIAL

As sementes de *C. mollis* foram coletadas na cidade de Ibimirim, Estado de Pernambuco, no Nordeste do Brasil. Essas sementes foram colocadas para secagem à temperatura de 26°C. Após devidamente secas, foi confeccionada uma farinha das sementes com utilização de um multiprocessador e em seguida a farinha foi armazenada em um freezer à temperatura de +/- 20°C.

2.2 OBTENÇÃO DA PREPARAÇÃO CRAMOLL 1,2,3

A preparação de Cramoll 1,2,3 foi obtida conforme descrito por Napoleão et al. (2013). A farinha de sementes (10g) foi homogeneizada com NaCl 0,15 M (100 mL) sob agitação magnética a 26 °C por 16 h. A mistura foi filtrada através de gaze e centrifugada (8000g, 15 min, 4°C), e o sobrenadante correspondeu ao extrato de semente. O extrato foi tratado com sulfato de amônio (60% de saturação) de acordo com Green e Hughes (1955). Após a centrifugação (8.000 g, 15 min, 4°C), o sobrenadante foi coletado e dialisado (membrana de exclusão de 7-kDa; Sigma-Aldrich, EUA) contra NaCl 0,15 M por 24 h (três mudanças de líquido) a 4°C. Em seguida, o sobrenadante dialisado foi carregado (50 mg de proteína) numa coluna de Sephadex G-100 (6,0 x 1,6 cm) previamente equilibrada com NaCl 0,15 M a um caudal de 36 ml/h. O pico proteico não adsorvido correspondeu à preparação de Cramoll 1,2,3.

A concentração de proteína foi estimada de acordo com Lowry et al. (1951) usando uma curva padrão de albumina de soro bovino (31,25-500 µg/mL). A atividade da lectina foi monitorada pelo ensaio de hemaglutinação (PAIVA E COELHO, 1992) utilizando eritrócitos de coelho tratados com glutaraldeído (BING et al., 1967). Os eritrócitos foram coletados conforme aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pernambuco (processo 23076.033782 / 2015-70). O número de unidades de atividade hemaglutinante (AH) foi determinado como o inverso da maior diluição da amostra que promoveu a aglutinação completa. A AH específica foi definida como a razão entre a AH e a concentração de proteína (mg/mL).

A preparação de Cramoll 1,2,3 (500 µg de proteína) foi avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) para proteínas básicas nativas de acordo com Reisfeld et al. (1962).

As bandas polipepticas foram visualizadas através de coloração com negro de amido em ácido acético 10% (v/v).

2.3 CRIAÇÃO DE *TETRANYCHUS BASTOSI*

Os ácaros foram criados em laboratório em placas tipo Gerbox, que continham arenas, cada uma com uma folha de *Canavalia ensiformis* (Fabaceae) com a face abaxial voltada para cima, sobrepostas a discos de espuma de polietileno de 4 cm de espessura umedecidos constantemente com água destilada. A margem da folha (trocada semanalmente) foi contornada com algodão hidrófilo umedecido em água destilada para evitar a fuga dos ácaros e a arena foi mantida em câmara climática do tipo B.O.D. à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$ UR e fotofase de 12 h.

2.4 TOXICIDADE EM FÊMEAS ADULTAS DE *T. BASTOSI*

A toxicidade de Cramoll 1,2,3 para fêmeas de *T. bastosi* foi avaliada usando uma adaptação dos métodos descritos por Matos (2006) e Ferraz (2011). Discos (5,0 cm de diâmetro) de folhas de *C. ensiformis* foram imersos por 5s em Cramoll 1,2,3 a 0,02, 0,05, 0,1 ou 0,2 mg/mL de proteína ou em água destilada (controle). Os discos foram transferidos para placas de petri contendo de agar 1% (p/v) e em seguida 10 fêmeas adultas foram colocadas em cada disco. A mortalidade foi avaliada 48 horas após a infestação. Os ácaros que não se moviam quando tocados com uma escova de cabelo fino eram considerados mortos. Os experimentos individuais foram conduzidos em delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e cinco repetições. As concentrações letais necessárias para matar 50% e 90% (LC50 e LC90) dos insetos foram avaliadas pelo teste de Tukey ($P < 5\%$).

2.5 TOXICIDADE EM OVOS DE *T. BASTOSI*

Discos foliares de *Canavalia ensiformis* (5,0 cm de diâmetro) foram infestados com 12 fêmeas adultas de *T. bastosi* por 24 h para oviposição. Após esse período, as fêmeas foram removidas e os ovos separados. Outros discos foram imersos individualmente por 10 s em 0,02, 0,05, 0,1 ou 0,2 mg/mL de proteína ou em água destilada (controle), secos por 30 min a 26°C

e então 30 ovos foram colocados em cada disco, os quais foram transferidos individualmente a placas de Petri contendo Agar 1% (p/v) e depois incubadas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$ de umidade relativa e 12 horas de fotofase. A viabilidade dos ovos foi avaliada após 96 h de aplicação contando o número de larvas eclodidas. Os experimentos individuais foram conduzidos em delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e cinco repetições. As concentrações letais (CL50) foram calculadas através do programa POLO-PC (LeOra Software 1987).

2.6 DETERMINAÇÃO DO EFEITO DE CRAMOLL 1,2,3 NO CRESCIMENTO POPULACIONAL DE *TETRANYCHUS BASTOSI*

Discos foliares de *Canavalia ensiformis* (5,0 cm de diâmetro) foram imersos por 5s em Cramoll 1,2,3 (0,02, 0,05, 0,1 ou 0,2 mg/mL de proteína) ou água destilada (controle) e secos por 30 min a 26°C . Os discos foram colocados em placas de Petri contendo agar 1% (p/v) com abertura na cobertura fixada com tecido do tipo voile, e cinco fêmeas adultas foram colocadas em cada disco. As placas foram condicionadas em uma câmara BOD a $30 \pm 1^\circ\text{C}$, $75 \pm 10\%$ de umidade relativa e 12 horas de fotofase. Experimentos individuais foram realizados para cada concentração de Cramoll 1,2,3 em delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e cinco repetições. A avaliação do crescimento populacional foi realizada dez dias após a montagem do bioensaio.

A partir dos dados obtidos, calculou-se a taxa de crescimento instantâneo (r_i), de acordo com a equação $r_i = \ln(N_f / N_0) / \Delta t$, onde N_f é o número de ovos, imaturos e adultos presentes em cada disco na avaliação final; N_0 , o número inicial de fêmeas é transferido para cada disco; e Δt é a duração do bioensaio, que foi de dez dias (WALTHALL; STARK, 1997). Se $r_i = 0$, o crescimento populacional está em equilíbrio; se $r_i > 0$, o crescimento populacional permanece em um estado ascendente; e se $r_i < 0$, a população está sofrendo um declínio, o que pode levar à extinção, quando $N_f = 0$ (STARK; BANKS, 2003). Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises foram feitas através do software SAS versão 8.02 (SAS Institute, 2001).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato de sementes de *Cratylia mollis* mostrou AH específica de 8,2, o que aumentou na fração sobrenadante obtida após o tratamento com sulfato de amônio (Tabela 1). Cramoll 1,2,3 foi obtida com o pico não adsorvido da cromatografia em Sephadex G-100 (Figura 1A) com AH específica de 32,8, correspondendo a um fator de purificação de 4,0 (Tabela 1). O perfil de eletroforese em PAGE para proteínas básicas (Figura 1B) foi semelhante ao descrito por Napoleão et al. (2013).

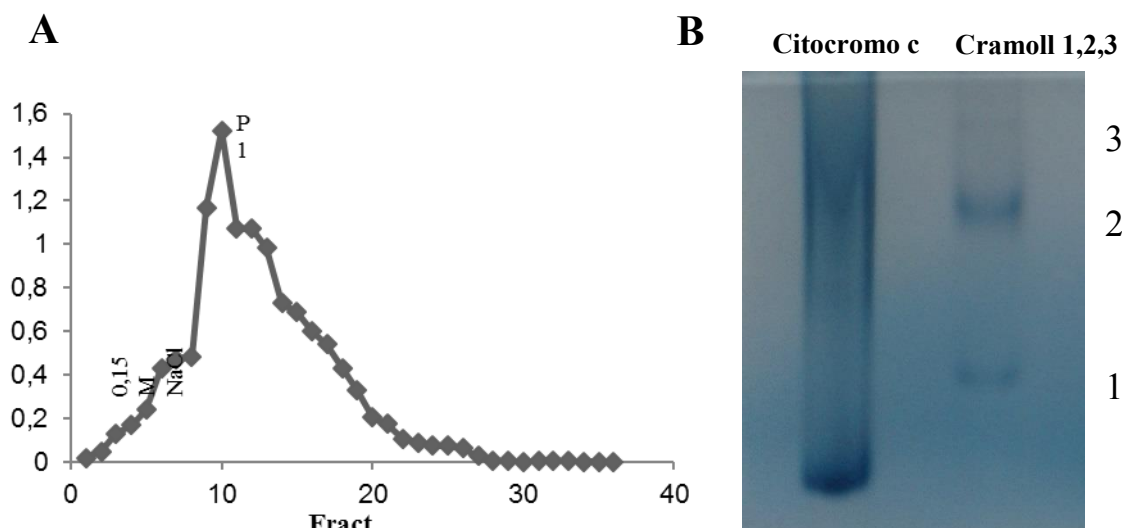
Lectinas isoladas de outras leguminosas, como *Canavalia ensiformis*, *Pisum sativum*, *Phaseolus vulgaris*, *Glechoma hederacea* e *Griffonia simplicifolia*, apresentaram atividade inseticida (LAGARDA-DIAZ et al., 2009, 2017; SPRAWKA et al., 2014). Estas lectinas foram ativas contra insetos de várias ordens, incluindo Coleoptera, Diptera, Lepidoptera, Hymenoptera, Isoptera, Neuroptera e Homoptera, afetando diferentes estágios (larvas e adultos) e causando mortalidade, retardando o desenvolvimento e/ou surgimento de adultos e reduzindo a fertilidade (MICHIELS, 2010; VANDEBORRE et al., 2011; LAGARDA-DIAZ et al., 2017;). No presente trabalho, avaliamos os efeitos de lectinas da leguminosa *C. mollis* em um representante de outra classe de artrópodes, os ácaros.

Tabela 1. Etapas do isolamento de Cramoll 1,2,3 de sementes de *C. mollis*.

Amostra	Concentração da proteína (mg/mL)	Atividade Hemaglutinante	Atividade Hemaglutinante Específica ^a	Fator de Purificação ^b
Extrato de semente	3,9	32	8,2	1,0
FS 0-60%	2,5	64	16,4	2,0
Cramoll 1,2,3	2,1	128	32,8	4,0

^aA Atividade hemaglutinante específica corresponde à razão entre o número de unidades e a concentração de proteína (mg/mL). ^bO fator de purificação foi calculado pela razão entre a atividade hemaglutinante específica da amostra e a atividade hemaglutinante específica do extrato. ^c Fração sobrenadante 0-60.

Figura 1. (A) Cromatograma da fração sobrenadante 0-60% (FS60) (8 mg de proteínas) em coluna Sephadex G-100 equilibrada com NaCl 0,15M e as frações eluídas com NaCl 1M. (B) Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições nativas para proteínas básica (15% p/v) de Cramoll 1,2,3 (500 µg), foi feita de acordo com Reisfeld et al (1962). Bandas polipeptídicas foram coradas com solução a 1% de negro de amido em ácido acético 10%.

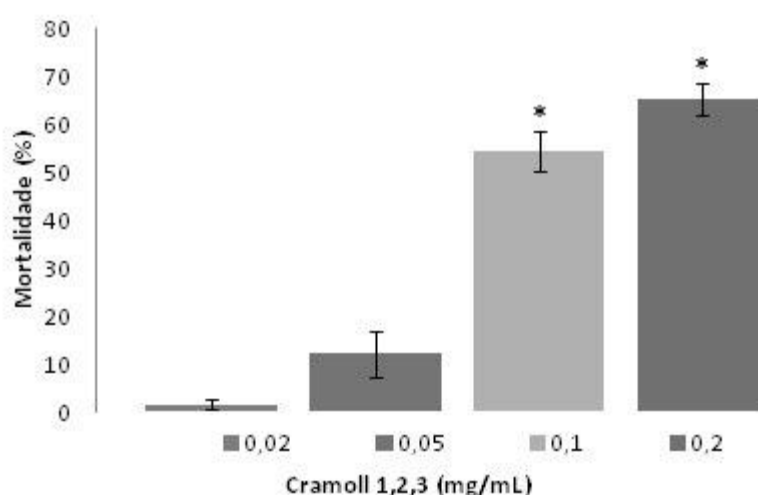


A Figura 2 mostra a mortalidade média de fêmeas de *T. bastosi* expostas a discos foliares tratados com Cramoll 1,2,3. Estes dados ajustaram-se ao modelo de regressão linear e apresentaram coeficientes de determinação superiores a 0,95, indicando a homogeneidade dos resultados. Houve um efeito dependente da dose de Cramoll 1,2,3 sob a sobrevivência das fêmeas e o LC_{50} foi de 0,14 mg/mL.

A atividade acaricida das lectinas não foi amplamente estudada; por outro lado, os efeitos dessas proteínas sobre outros artrópodes, como os insetos, são bem conhecidos. A ação inseticida das lectinas vegetais tem sido associada à capacidade dessas proteínas resistirem ao ambiente hostil no trato digestivo do inseto, causando anormalidades na formação e função da matriz peritrofica; alterando o metabolismo do inseto através da interação com enzimas e proteínas ligadas ao transporte e assimilação; causando a morte de células digestivas, proliferativas e enteroendócrinas, bem como a ruptura de microvilosidades; cruzando a barreira intestinal, atingindo a hemolinfa, túbulos de Malpighi, ovários e corpo adiposo (POWELL, 1998; FITCHES et al., 2001; VANDENBORRE et al., 2011; ALBUQUERQUE et al., 2012; WALSKI et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2015; DIAZ et al., 2017; LIMA et al., 2017, 2018). A toxicidade por ingestão de Cramoll 1,2,3 em fêmeas de *T. bastosi* pode envolver alguns desses

mecanismos relatados contra insetos. Lima et al. (2005) mostrou que a lectina da alga vermelha *Gracilaria cornea* (GCL) apresentou atividade acaricida contra carrapatos *Boophilus microplus*, quando estes foram ingurgitados com frações de lectinas GCL a 0.1 mg mL⁻¹, causou uma redução de 20% no peso das fêmeas após o período de oviposição, além de diminuir o peso da massa de ovos, o período de eclosão e o tempo médio de sobrevivência larval.

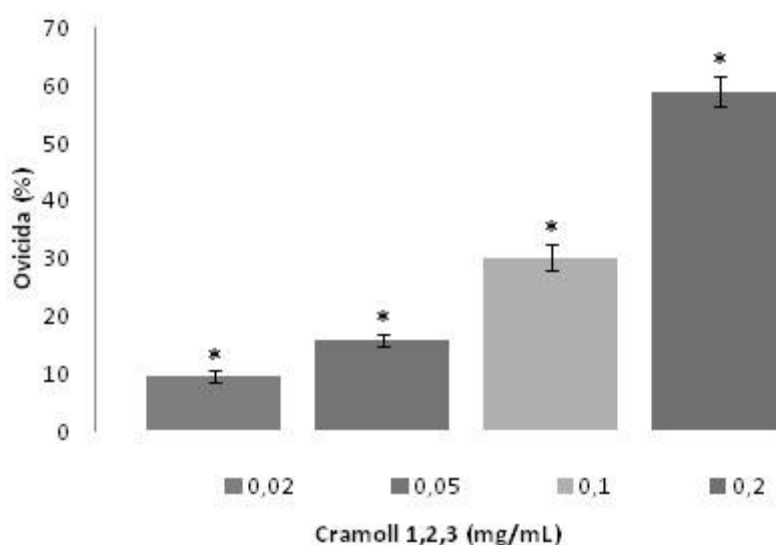
Figura 2. Mortalidade de adultos fêmeas *T. bastosi* após 48 horas em discos de folha de *Canavalia ensiformes*, submetidos a diferentes concentrações da Cramoll 1,2,3 Temp.: 27 ± 1 °C, 75 ± 10% de U.R. e fotofase de 12h. Foi feita a correção de mortalidade pela fórmula de Abbott e cada barra corresponde á media ± DP de 5 repetições, onde o * corresponde a existência de diferença significativa (p <0,005) entre controle e tratamentos pelo teste T.



Cramoll 1,2,3 foi um agente ovicida para *T. bastosi* desde que uma diminuição na taxa de eclosão foi detectada em todas as concentrações testadas. Cramoll 1,2,3 foi eficiente no controle da eclosão de ovos de maneira dose-dependente (Figura 3) e a CL₅₀ determinada foi de 0,16 mg/mL. Segundo Esteves Filho et al. (2008) o efeito ovicida é uma propriedade relevante de um acaricida para uso em programas de manejo, pois quando a fase inicial de desenvolvimento da praga é inviável, consequentemente há uma redução das lesões e danos causados às plantas. Cruz et al. (2016) avaliaram a atividade acaricida contra *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) e *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) do extrato metanólico de partes aéreas (folhas, caule e flores) de *Acmella oleracea* e observaram que houve uma redução de 55% e 100% em viabilidade de ovos em tratamentos nas concentrações de 50 e 200 mg /

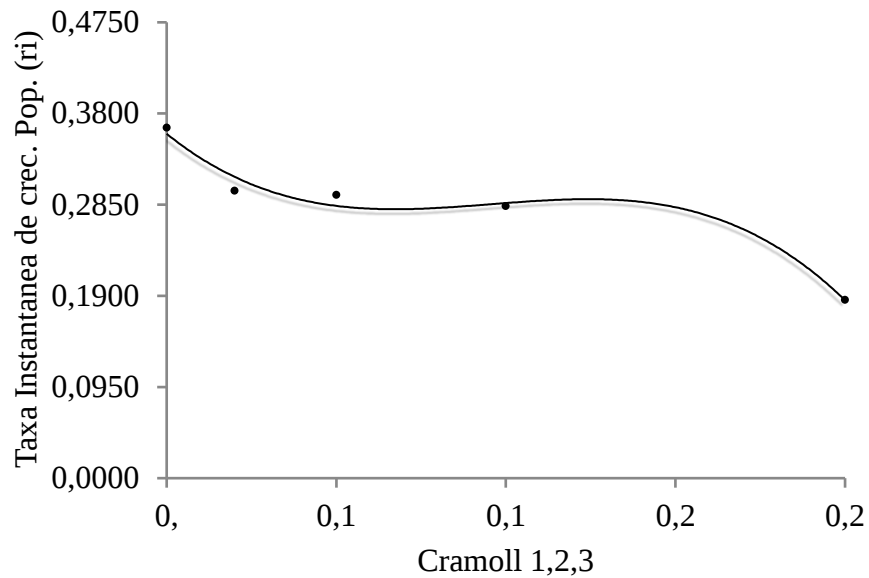
mL, respectivamente. Castro et al. (2014) utilizando o extrato hexânico de partes aéreas (folhas, caule e flores) contra *R. microplus* o mesmo extrato a 50 e 200 mg/mL relatou percentuais de ovos inviáveis de 89,3% e 97%, respectivamente.

Figura 3. Atividade ovicida de *T. bastosi* após 96 horas em discos de folha de *Canavalia ensiformes*, submetidos a diferentes concentrações da Cramoll 1,2,3 Temp.: 27 ± 1 °C, $75 \pm 10\%$ de U.R. e fotofase de 12h. Foi feita a correção de mortalidade pela fórmula de Abbott e cada barra corresponde á media $\pm$ DP de 5 repetições, onde o * corresponde a existência de diferença significativa ($p < 0,0$) entre controle e tratamentos pelo teste T



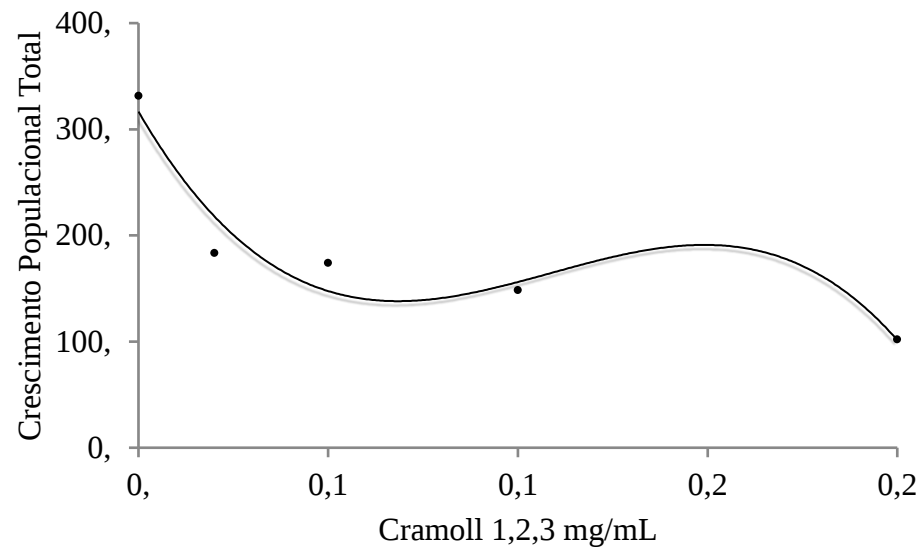
A Figura 4 mostra os valores de r_i no controle e tratamentos com Cramoll 1,2,3. Pode-se observar que os valores de r_i para todos os tratamentos de Cramoll 1,2,3 indicou que a população está em estado ascendente. Estes resultados indicam que Cramoll 1,2,3 não promoveu um declínio na população de *T. bastosi*; no entanto, observa-se que o crescimento populacional em tratamentos com Cramoll 1,2,3 ocorreu a uma taxa menor em relação ao controle. Esta queda pode ser devido a uma redução da alimentação pelos ácaros, causando uma diminuição na sua fecundidade ou interferindo no desenvolvimento.

Figura 4. Taxa instantânea de crescimento (r_i) de *Tetranychus bastosii* em discos de folha de feijão de porco (*Canavalia ensiformis*) submetidos à Cramoll 1,2,3 (temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$, $75 \pm 10\%$ de umidade relativa e fotofase de 12h).



A contagem das populações finais de *T. bastosii* (ovos, formas imaturas e adultos) nos tratamentos controle e Cramoll 1,2,3 é mostrada na Figura 5. Observou-se que a população final foi menor com o aumento da concentração de Cramoll 1, 2,3. O r_i tem sido amplamente utilizado em estudos toxicológicos, uma vez que permite avaliar os efeitos letais e subletais de inseticidas e acaricidas em uma população, após um tempo pré determinado, integrando efeitos sobre a sobrevivência, fecundidade, comportamento alimentar e longevidade (STARK & BANKS 2003).

Figura 5. População final de *Tetranychus bastosi*, após dez dias, em discos de folha de feijão de porco (*Canavalia ensiformes*) submetidos a Cramoll 1,2,3. Temp.: 27 ± 1 °C, $75 \pm 10\%$ de U.R. e fotofase de 12h.



4 CONCLUSÃO

A preparação de lectina Cramoll 1,2,3 exerceu atividade adulticida e ovicida sobre o ácaro praga *T. bastosi* e reduziu a taxa de crescimento da população de ácaros quando comparado ao controle. Cramoll 1,2,3 pode ser uma estratégia promissora para ser usada em programas de MIP como uma alternativa aos acaricidas sintéticos. Vale ressaltar que este estudo é pioneiro, por avaliar as práticas acaricidas da Cramoll 1,2,3 como um inseticida natural e que este trabalho serve como ponto de partida para novos estudos.

REFERÊNCIAS

- ADANGO, E., A. ONZO, R. HANNA, P. ATACHI, B. JAMES. 2006. Inventaire de la faune des acariens sur *Amaranthus cruentus* (Amaranthaceae), *Solanum macrocarpon* et *Solanum aethiopicum* (Solanaceae) dans le Sud Bénin. **Int. J. Trop. Insect Sci.** 26: 155-165.
- ASSIS, C. P. O., GONDIM JR, M. G.C., SIQUEIRA, H. A.A. Synergism to acaricides in resistant *Neoseiulus californicus* (Acari: Phytoseiidae), a predator of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). **Crop Protection**, v. 106, p. 139–145, 2018.
- ATTIA, S. et al. 2010. Effective concentrations of garlic distillate (*Allium sativum*) for the control of *Tetranychus urticae* (Tetranychidae). **Journal of Applied Entomology**, v. 136, n. 4, p. 302- 312.
- BOAVENTURA, V. J. SANTOS, A. S., RINGENBERG, R., LEDO, C. A. S., BOGORN, P. C. Efeito de produtos a base de nim sobre a duração das fases de desenvolvimento do ácaro verde da mandioca (*Mononychellus tanajoa*). Disponível em: <HTTP: //www.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/53654/1/EFEITO-DE – PRODUTOS – Resumo-n. – 143 – Veronica – Jesusposter.PDF> Acesso em 10/11/2017.
- CASTRO, K.N.C., LIMA, D.F., VASCONCELOS, L.C., LEITE, J.R.S.A., SANTOS, R.C., PAZ NETO, A.A., COSTA-JÚNIOR, L.M., Acaricide activity in vitro of *Acmella oleracea* against *Rhipicephalus microplus*. **Parasitol. Res**, v.113, p.3697–3701, 2014.
- CAVALCANTI, S.C.H., E.S. NICULAU, A.F. BLANK, C.A.G. CÂMARA, I.N. ARAÚJO & P.B. ALVES. 2010. Composition and acaricidal activity of *Lippia sidoides* essential oil against two spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch). **Bioresour. Technol**, 101: 829-832.
- 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. 261-273, 1995.
- CRUZ, P. B., BARBOSA, A. F., ZERINGÓTA, V., MELO, D., NOVATO T5, FIDELIS, Q. C., FABRI, R. L., DE CARVALHO, M.G., OLIVEIRA SABAA-SRUR, A. U., DAEMON, E., MONTEIRO, C. M. O. Acaricidal activity of methanol extract of *Acmella oleracea* L. (Asteraceae) and spilanthol on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) and *Derma centornitens* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, 228, p. 137–143, 2016.
- FERRAZ, C. S. Efeito dos tricomas de *Gosypium hirsutum* (Mavaceae) sobre ácaros fitófagos. 2011. 49f. **Monografia (Trabalho de conclusão de curso) – Universidade Federal Rural de Pernambuco**, Unidade Acadêmica de Serra Talhada, Serra Talhada, 2011.
- FERRAZ, J. C. B., MATOS, C. H. C., OLIVEIRA, C. R. F., SÁ, M. G. R., CONCEIÇÃO, A. G. C. Extrato de folhas de juazeiro com atividade acaricida sobre o ácaro-vermelho em algodoeiro. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.52, n.7, p.493-499, 2017.
- GADHAWALA, Zakir M. et al. New Approach In Targeted Drug Delivery System. **Journal of Pharmacy Research** (New Journal BioMedRx), v. 5, n. 8, 2012.

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

GOMES, G.A., MONTEIRO, C.M., JULIÃO, L. DE S., MATURANO, R., SOUZA, T.O., ZERINGÓTA, V., CALMON, F., DA SILVA, R., DAEMON E., DE CARVALHO, M.G. Acaricidal activity of essential oil from *Lipia sidoides* on unengorged larvae and nymph of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) and *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Exp. Parasitol**, v.137, p. 41-45, 2014.

HAMED, N., Y. FATHIPOUR & M. SABER. Sublethal effects of fenpyroximate on life table parameters of the predatory mite *Phytoseius plumifer*. **Bio Control**, v. 55, p. 271–278, 2010.

HAMED, N., Y. FATHIPOUR & M. SABER. Sublethal effects of abamectin on the biological performance of the predatory mite, *Phytoseius plumifer* (Acari: Phytoseiidae). **Exp. Appl. Acarol**, v. 53, p. 29-40, 2011.

HUNG, L. D., LY, B. M., HAO, V. T., TRUNG, D. T., TRANG, V. T. D., TRINH, P. T. H., NGOC, N. T. D., QUANG, T. M. Purification, characterization and biological effect of lectin from the marine sponge *Stylissa flexibilis* (Lévi, 1961). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 216, p. 32-38, 2018.

KOC, S., OZ, E., CINBILGEL, I., AYDIN, L., CETIN, H., 2013. Acaricidal activity of *Origanum bilgeri* P.H. Dais (Lamiaceae) essential oil and its major component, carvacrol against adults *Rhipicephalus turanicus* (Acari: Ixodidae). **Vet. Parasitol**, v.193, p.316-319, 2013.

LACERDA, R. R., NASCIMENTO, E. S., LACERDA, J. T. J. G., PINTO, L. S., RIZZI, C., BEZERRA, M. M., PINTO, I. R., FILHO, S. M. P., PINTO, V. P. T., FILHO, G. C., GADELHA, C. A. A., GADELHA, T. S. Lectin from seeds of a Brazilian lima bean variety (*Phaseolus lunatus* L.var. cascavel) presents antioxidant, antitumour and gastroprotective activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.95, p.1072–1081, 2017.

LAGARDA-DIAZ, I.; GUZMAN-PARTIDA, A.M.; URBANO-HERNANDEZ, G.; ORTEGA-NEBLAS, M.M.; ROBLES-BURGUENO, M.R.; WINZERLING, J.; VAZQUEZ-MORENO, L. Insecticidal action of PF2 lectin from *Olneya tesota* (palofierro) against *Zabrotes subfasciatus* larvae and midgut glycoconjugate binding. **J. Agric. Food Chem.**, v.57, p. 689–694, 2009.

LAGARDA-DIAZ, I.; GUZMAN-PARTIDA, A.M.; HUERTA-OCAMPO, J.A.; WINZERLING, J.; VAZQUEZ-MORENO, L. Identification of membrane proteins of the midgut of *Zabrotes subfasciatus* larvae associated with the insecticidal mechanism of PF2 lectin. **J. Asia-Pacif. Entomol**, v.19, p. 677–682, 2016

LAGARDA-DIAZ, I.; GUZMAN-PARTIDA, A.M.; VAZQUEZ-MORENO, L. 2017. Legume Lectins: Proteins with Diverse Applications. **Int. J. Mol. Sci**, v. 18, p. 1242- 1247, 2017.

LIMA, D. B., MELO, J. W. S., GONDIM JR, M. G. C., GUEDES, R. N. C., OLIVEIRA, J. E. M. Population-level effects of abamectin, azadirachtin and fenpyroximate on the predatory mite *Neoseiulus baraki*. **Exp. Appl. Acarol**, v.70, p. 165-77, 2016.

MANIANIA, N. K., D. M. BUGEME, V. W. WEKESA, I. DELALIBERA JR, M. KNAPP. 2008. Role of entomopathogenic fungi in the control of *Tetranychus evansi* and *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae), pests of horticultural crops. **Exp. Appl. Acarol**, v.46, p. 259-274, 2008.

MATOS, C.H.C. Mecanismos de defesa constitutiva em espécies de pimenta *Capsicum* e sua implicação no manejo do ácaro branco *Polyphagotarsonemus latus* (Acari: Tarsonemidae). 2006. 59 f. **Tese (Doutorado em Entomologia), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.** 2006.

MICHIELS, K.; VAN DAMME, E.J.; SMAGGHE, G. Plant–insect interactions: What can we learn from plant lectins? **Arch. Insect Biochem. Physiol**, v.73, p.193–212, 2010.

MOSCARDINI, V. F., P. C. GONTIJO, J. P. MICHAUD, G. A. CARVALHO. Sublethal effects of chlorantraniliprole and thiamethoxam seed treatments when *Lysiphlebus testaceipes* feed on sunflower extrafloral nectar. **Biocontrol**, v.59, p. 503- 511, 2014.

NAPOLEÃO, T.H.; PONTUAL, E.V.; DE ALBUQUERQUE LIMA, T.; DE LIMA SANTOS, N.D.; SÁ, R.A.; COELHO, L.C.B.B.; do Amaral Ferraz Navarro, D.M.; Paiva, P.M.G. Effect of *Myracrodruon urundeuva* leaf lectin on survival and digestive enzymes of *Aedes aegypti* larvae. **Parasitol. Res**, v.110, p. 609–616, 2012.

NAPOLEÃO, T. H., SANTOS-FILHO, T. G., PONTUAL, E. V., FERREIRA, R. S., COELHO, L.C.B.B., PAIVA, P.M.G. Affinity Matrices of *Cratylia mollis* Seed Lectins for Isolation of Glycoproteins from Complex Protein. **Appl. Biochem. Biotechnol**, v.171, p.744–755, 2013.

NUNES, E. S., SOUZA, M. A. A., VAZ, A. F. M., SANTANA, G. M. S., GOMES, F. S., COELHO, L. C. B. B., PAIVA, P. M. G., SILVA, R. M. L., SILVA-LUCCA, R. A., OLIVA, M. L. V., GUARNIERI, M. C., CORREIA, M. T. S. Purification of a lectin with antibacterial activity from *Bothrops leucurus* snake venom. **Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol**, v.159, p. 57-63, 2011.

OLIVEIRA, C. F. R., MOURA, M. C. M., NAPOLEÃO, T. H., PAIVA, P. M. G., LUANA COELHO, C. B. B., MACEDO, M. L. R. A chitin-binding lectin from *Moringa oleifera* seeds (WSMoL) impairs the digestive physiology of the Mediterranean flour larvae, *Anagasta kuehniella*. **Pesticide Biochemistry and Physiology** v. 142 , p.67–76, 2017.

PAIVA, P.M.G., & COELHO, L. C. B. B. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.36, p.113–118, 1992.

PAVELA, R. Acaricidal properties of extracts and major furanochromenes from the seeds of *Ammi visnaga* Linn. against *Tetranychus urticae* Koch. **Ind. Crops Prod.**, v.67, p. 108-113, 2015.

PAVELA, R. Acaricidal properties of extracts of some medicinal and culinary plants against *Tetranychus urticae* Koch. **Plant Prot. Sci**, v. 52, p. 54 – 63, 2016.

PAVELA, R., DALL'ACQUA, S., SUT, S., BALDAN, V., KAMTE, S. L. N., NYA, P. C. B., CAPPELLACCI, L., PETRELLI, R., NICOLETTI, M., CANALE, A., MAGGI, F., BENELLI, G. Oviposition inhibitory activity of the Mexican sunflower *Tithonia diversifolia* (Asteraceae) polar extracts against the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* (Tetranychidae). **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.101, p. 85 – 92, 2018.

PROCÓPIO, T. F., PATRIOTA, L. L. S., MOURA, M. C., SILVA, P. M., OLIVEIRA, A. P. S., CARVALHO, L. V. N., LIMA, T. A., SOARES, T., SILVA, T. D., COELHO, L. C. B. B., PITTA, M. G. R., RÊGO, M. J. B. M., FIGUEIREDO, R. C. B. Q., PAIVA, P. M. G., NAPOLEÃO, T. H. CasuL: A new lectin isolated from *Calliandra surinamensis* leaf pinnulae with cytotoxicity to cancer cells, antimicrobial activity and antibiofilm effect. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, p.419–429, 2017.

REISFELD, R.A., LEWIS, U.J., WILLIAMS, D.E. Disk eletrophoresis of basic protein and peptides on polyacrylamide gels. **Nature**, v.195, p. 281e283, 1962.

ROSADO, J.F., PICANÇO, M.C., SARMENTO, R.A., SILVA, R.S., PEDRO-NETO, M., CARVALHO, M. A., ERASMO, E. A. L., SILVA, L. C. Z. R. Seasonal variation in the populations of *Polyphagotarsonemus latus* and *Tetranychus bastosi* in physic nut (*Jatropha curcas*) plantations. **Exp. Appl. Acarol**, 2015. doi: 10.1007/s10493-015-9911-6.

ROSADO-AGUILAR, J.A., ARJONA-CAMBRANESA, K., TORRES-ACOSTAA, J.F.J., RODRÍGUEZ-VIVASA, R.I., BOLIO-GONZÁLEZA, M.E., ORTEGA-PACHECOA, A., ALZINA-LÓPEZA, A. GUTIÉRREZ-RUIZ., E.J., GUTIÉRREZ-BLANCOA, E., AGUILAR-CABALLEROA, A.J. Plant products and secondary metabolites with acaricide activity against ticks. **Veterinary Parasitology**, v.238, p. 66-76, 2017.

SIQUEIRA, F. F.S.; OLIVEIRA, J. V.; FERRAZ, C. S.; OLIVEIRA, C. R. F.; MATOS, C. H. C. 2014. Atividade acaricida de extratos aquosos de plantas de Caatinga sobre o ácaro verde da mandioca. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 27, n. 4, p. 109 – 116.

SAS Institute. 2001. SAS/STAT User's guide, version 8.02, TSlevel2MO. **SAS Institute Inc.**, Cary, NC.

SEEMAN, O. D., J. J. BEARD. Identification of exotic pest and Australian native and naturalised species of *Tetranychus* (Acari: Tetranychidae). **Zootaxa**, v. 2961, p. 1- 72, 2011.

SOARES, M. A., J. C. ZANUNCIO, G. L. D. LEITE, E. D. WERMELINGER, J. E. SERRÃO. Does *Thyrinteina arnobia* (Lepidoptera: Geometridae) use different defense behaviours against predators? **J. Plant Dis. Prot**, v. 116, p. 30-33, 2009.

SOUZA, L.P., ZAGO, H.B., COSTA, A.V., STINGUEL, P., VALBON, W.R. Composição química e atividade acaricida do óleo essencial de erva-de-santa-maria sobre o ácaro-rajado. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 28, p. 160 – 166, 2015.

STARK, J.D. & J.E. BANKS. Population-level effects of pesticides and other toxicants on arthropods. **Annu. Rev. Entomol**, v.48, p. 505-519, 2003.

TSOLAKIS, H. & S. RAGUSA. Effects of a mixture of vegetable and essential oils and fatty acid potassium salts on *Tetranychus urticae* and *Phytoseiulus persimilis*. **Ecotoxicol. Environ. Saf**, v.70, p. 276–282, 2008.

VAN POTTELBERGE, S., T. VAN LEEUWEN, R. NAUEN, L. TIRRY. Resistance mechanisms mitochondrial electron transport inhibitors in a field-collected strain of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). **Bull. Entomol. Res**, v.99, p. 23-31, 2009.

VAN LEEUWEN, T., J. VONTAS, A. TSAGKARAKOU, W. DERMAUW, L. TIRRY. Acaricide resistance mechanisms in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* and other important Acari: a review. **Insect Biochem. Mol. Biol**, v. 40, p. 563-572, 2010.

XAVIER M.V.A., MATOS C.H.C., OLIVEIRA C.R.F., SÁ M.G.R., SAMPAIO G. R. M. Toxicidade e repelência de extratos de plantas da caatinga sobre *Tetranychus bastosi* Tutler, Baker & Sales (Acari: Tetranychidae) em pinhão-mansão. **Revista Brasileira Plantas Medicinais**, v. 17, n. 4, p. 790-797, 2015.

WONG, J.H., NG, T.B., CHEUNG, R.C., YE, X.J., WANG, H.X., LAM, S.K., LIN, P., CHAN, Y.S., FANG, E., NGAI, F., XIA, P.H., YE, L.X., JIANG, X.Y., LIU, Y.F., Proteins with antifungal properties and other medicinal applications from plants and mushrooms. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, v.87, p. 1221–1235, 2010.

4 ARTIGO 2

ATIVIDADE TERMITICIDA DA LECTINA CRAMOLL 1,2,3 SOBRE NASUTITERMES CORNIGER E SEUS MECANISMOS DE AÇÃO

Yasmin Bruna de Siqueira Bezerra^a, Leonado Prezzi Dornelles^a, Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho^a, Thiago Henrique Napoleão^a, Thâmarah de Albuquerque Lima^a, Patrícia Maria Guedes Paiva^{a*}.

^aDepartamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

*Corresponding author. E-mail address: ppaivaufpe@yahoo.com.br

1 INTRODUÇÃO

Térmitas são insetos eussociais pertencentes a ordem Blattaria, infraordem Isoptera, composta atualmente por aproximadamente 3170 espécies descritas (CONSTANTINO, 2016). São morfofisiologicamente especializados, sendo diferenciados em castas: principalmente operários, soldados, reprodutores primários (rei e rainha), formam colônias, onde os indivíduos desempenham funções específicas, apresentam divisão reprodutiva do trabalho na colônia, cuidado cooperativo com a prole e sobreposição de gerações, que é a vivência de todas as castas com indivíduos de todas as idades em um mesmo ninho (WILSON, 1971; KRISHNA et al., 2013; VASCONCELLOS & ERNESTO, 2015).

O gênero *Nasutitermes* tem a maior diversidade entre os Isoptera. *Nasutitermes corniger* (Termitidae: Nasutitermitinae) é uma espécie nativa da América Central e do Sul e uma das mais abundantes (SCHEFFRAHN et al., 2005). Possui hábito alimentar baseado em recursos celulósicos, por esse motivo são relatados como pragas nos ambientes agrícolas e urbanos. Esta mudança de status está associada à substituição dos ambientes naturais por culturas agrícolas, florestais e construções urbanas (CONSTANTINO, 2002). Devido à perda e alteração dos ambientes naturais *N. corniger* tem se tornado uma importante praga, principalmente em ambientes urbanos. Nesses ambientes a espécie é considerada uma praga eficiente pela digestão da celulose, diversidade e abundância de enzimas no aparelho digestivo dos operários e soldados sendo também utilizados como modelos enzimáticos para hidrólise desses recursos (LUCENA et al., 2011; LIMA et al., 2014).

As lectinas são geralmente encontradas em plantas de leguminosas que são e representam uma classe de proteínas ou glicoproteínas capazes de reconhecer e se ligar de forma reversível a carboidratos e aglutinam células reconhecendo açúcares específicos com alto grau de especificidade através de pelo menos um domínio não catalítico (COELHO et al., 2017). As lectinas de plantas apresentam uma enorme variedade de aplicações biotecnológicas. Muitos estudos vem relatando amplamente o potencial inseticida das lectinas contra espécies de diferentes ordens como Coleoptera, Diptera, Homoptera e Lepidoptera (VANDENBORRE et al., 2011; DAN et al., 2016). Vários estudos abordaram a toxicidade da lectina e mostraram que algumas lectinas inseticidas apresentam resistência à digestão pelas proteases presentes no trato digestivo dos insetos, permanecendo ativas depois de ingeridas (MACEDO et al., 2007; NAPOLEÃO et al., 2011; CACCIA et al., 2012). Também vem sendo apresentado em estudos que a modulação de atividade de enzimas digestivas por lectinas. A alteração dessas atividades

enzimáticas pode levar a um desequilíbrio metabólico e isto ocasionar a morte do inseto (MICHIELS et al., 2010). No trato digestivo de insetos as lectinas podem interagir ligando-se a polissacarídeos e glicoconjugados da superfície de estruturas do intestino do inseto e através da interação com moléculas, glicosiladas ou não, como enzimas e proteínas de transporte e assimilação (PAIVA et al., 2013).

Cratylia mollis é uma espécie pertencente à família Fabaceae, nativa da região semiárida do sertão do Estado de Pernambuco, e popularmente conhecida como feijão camaratuba ou feijão camaratú (ARAÚJO et al., 2011). As sementes de *C. mollis* foram avaliadas quanto à presença de lectinas e classificadas em 5 diferentes isoformas de acordo com suas formas moleculares : (Cramoll 1, Cramoll 2, Cramoll 3 , Cramoll 4) As Cramoll 1,4 é uma preparação da Cramoll 1 e Cramoll 4 e a Cramoll 1, 2, 3, uma preparação contendo as isoformas da Cramoll 1, Cramoll 2 e Cramoll 3. Preparações contendo as isoformas (Cramoll-1,4) e isolectinas (Cramoll 1,2,3), foram estudadas para as mais diversas aplicações biotecnológicas. Em 2013, Napoleão e colaboradores isolou glicoproteínas provenientes de soro fetal bovino, colostro humano, ovo de galinha e plasma humano a partir de matrizes contendo lectinas de *C. mollis* imobilizadas (Cramoll 1,2,3-Sepharose e Cramoll 3-Sepharose). Cramoll-1,4, mostraram a atividade antitumoral, ação anti-inflamatória e anti-helmíntica (ANDRADE et al., 2004; FERNANDES, 2010).

Ainda não existem estudos avaliando atividades inseticidas utilizando as isolectinas Cramoll 1, 2, 3. Este trabalho avaliou os efeitos da preparação Cramoll 1,2,3 sobre a sobrevivência de *N. corniger* e a interação da lectina com moléculas presentes no intestino de operários como um etapa importante para entender o mecanismo de ação e o efeito dessas lectinas.

2 MATERIAS E MÉTODOS

2.1 SEMENTES DE *CRATYLIA MOLLIS*

Sementes de *Cratylia mollis* Mart. (feijão camaratu) foram coletados no Estado de Pernambuco (Brasil). As sementes foram colocadas para secar à temperatura de 26°C. Após estarem devidamente secas, foi confeccionada uma farinha das sementes com utilização de um multiprocessador e logo após a farinha foi armazenada em um freezer à temperatura de +/-20°C.

2.2 PURIFICAÇÃO DE CRAMOLL 1,2,3

As sementes foram trituradas originando uma farinha que foi extraída em solução salina (10% p/v em NaCl 0,15M) do qual foi obtido um extrato bruto. O extrato bruto da semente foi fracionado utilizando sulfato de amônio (0-60%, p/v) e centrifugado (9.000 g) durante 15 minutos. A fração sobrenadante obtida foi submetida à cromatografia de afinidade em uma coluna de Sephadex G-100 (6,0×1,6 cm) previamente equilibrada (36 mL/h fluxo) com NaCl 0,15 M. As proteínas não adsorvidas, eluídas com NaCl 0,15M foram coletadas e corresponderam a preparação Cramoll 1,2,3. A concentração de proteínas dos extratos foi determinada de acordo com Lowry et al (1951) utilizando albumina de sérica bovina (31,25-500 µg/mL) como padrão.

2.3 ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE

A capacidade de ligação das lectinas aos carboidratos foi avaliada pelo ensaio de atividade hemaglutinante. Os testes foram realizados de acordo com Paiva e Coelho (1992) utilizando uma suspensão (2,5% v/v) de eritrócitos de coelho tratados com glutaraldeído (Bing et al., 1967). Uma amostra enriquecida de lectina (50 µl) foi diluída duas vezes em NaCl 0,15 M em uma linha de microplacas de 96 poços e depois foram adicionados a cada poço 50 µl da suspensão de eritrócitos. Um controle sem lectina também foi realizado. O número de unidades de atividade hemaglutinante foi determinado como o recíproco da maior diluição da amostra que promoveu a aglutinação completa de eritrócitos. A atividade hemaglutinante específica foi definido como a relação entre as unidades e a concentração de proteína (mg/mL).

2.4 INSETOS

Os ninhos de *Nasutitermes corniger* foram coletados no campus da Universidade Federal Rural de Pernambuco (Recife, Brasil) em um fragmento da Mata Atlântica (8° 00' 45" S, 34° 56' 57" W), sob autorização (36301-2) do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio). Os ninhos dos cupins, selecionados com base na integridade, foram removidos do tronco de uma árvore e transferidos para o laboratório. A colônia foi mantida a 28 ± 2 °C ($70 \pm 5\%$ de umidade relativa) no escuro durante 6 h, durante o período necessário para separação e transferência de operários e soldados para os bioensaios.

2.5 BIOENSAIO TERMITICIDA

A atividade termiticida foi realizada em placas de Petri, contendo uma dieta artificial baseada em celulose, que foram mantidas no escuro a 28°C. A dieta artificial foi preparada adicionando à matriz de celulose Avicel 20% (p/v), diferentes quantidades de Cramoll 1,2,3 que resultaram uma concentração final de 25, 50, 100, 200 mg/mL. A mistura (1 mL) foi colocada em placas de Petri, dispostas em discos dispostos aleatoriamente. As placas foram mantidas na estufa (56°C) durante 24 h para permitir a secagem dos discos. Em seguida, 16 operários e 4 soldados foram transferidos diretamente do ninho para cada placa de Petri. Para o controle, a dieta artificial administrada continha apenas o componente da matriz de celulose. Três ensaios independentes foram realizados em quintuplicata.

2.6 ENSAIOS DE REPELÊNCIA

O teste de repelência foi baseado em Su et al. (1982). Placas de Petri (90 a 15 mm, TPP-Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça) foram preenchidas com solução de ágar (2%). Após a solidificação, Os poços foram perfurados no ágar removendo um núcleo central de 25 mm de diâmetro e 5 núcleos periféricos (6 mm de diâmetro). Em seguida, a dieta artificial (1mL) para controle negativo foi adicionada no centro da placa, a as dietas enriquecidas com Cramoll 1,2,3 (25, 50, 100 e 200 mg/mL) foi colocada em cada poço periférico. As placas foram mantidas na estufa (56°C) durante 24 h para permitir a secagem dos discos. Térmitas (16 operários e 4 soldados) foram então transferidos para o poço central e as placas foram mantidas

a 28°C no escuro. Os ensaios foram realizados em triplicata. A ausência ou presença de cupins em poços periféricos, construção de túneis e galerias, e o fechamento da construção por insetos foram observadas por 15 dias.

2.7 EXTRATOS DE INTESTINO DE CUPINS

Operários de *N. corniger* foram imobilizados no frio a -20 °C por 10-15 minutos. Cada operário foi decapitado usando uma agulha de 0,3 mm (BD Ultra-Fine II II de Becton, Dickinson e Company, NJ, EUA) de 8 mm de comprimento e teve seu intestino removido intacto puxando os últimos segmentos abdominais. Em seguida os intestinos foram armazenados em freezer (-20°C). Os extratos de intestino de operários de *N. corniger* foram obtidos de acordo com Napoleão et al. (2011). Um grupo de 100 intestinos foram colocados em um moedor de tecido de 2 mL e homogeneizado manualmente com 1 mL da solução tampão (acetato de sódio 0,1 M, pH 5,5 ou Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, ambos contendo NaCl 0,15 M). Os homogeneizados foram então centrifugados (9 000 g , 4°C, 15 min). Os sobrenadantes coletados (extratos de intestino de operários) foram utilizados para avaliação de atividades enzimáticas. Os extratos em tampão de acetato de sódio foram utilizados em ensaios para atividades das glicohidrolases, enquanto que os extratos em tampão Tris foram utilizados nos ensaios para atividades de proteases. A concentração de proteínas dos extratos foi determinada de acordo com Lowry et al (1951) utilizando albumina de sérica bovina (31,25-500 µg/mL) como padrão.

2.8 EFEITO DO EXTRATO DE INTESTINO DE *N. CORNIGER* NA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE DA CRAMOLL 1,2,3.

O extrato de intestino de operários (350 µg de proteína) em Tris-HCl 0.1M pH 8.0 foi incubado com Cramoll 1,2,3 durante 30 minutos. Após o período de incubação, extrato de intestino de operários, Cramoll 1,2,3 e a mistura foram avaliadas quanto a atividade hemaglutinante de acordo com o método descrito no item 2.4.

2.9 PROTEÓLISE DE CRAMOLL 1,2,3 POR PROTEASES DE *N. CORNIGER* E OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS.

A proteólise da Cramoll 1,2,3 pelas proteases do intestino de *N. corniger* foi feita utilizando a método de Azeez et al. (2007) com devidas alterações onde a atividade proteolítica

total foi determinada utilizando Cramoll 1,2,3 como substrato. O extrato de intestino de operários (100 μ L, 360 μ g de proteína) foi misturado com 300 μ L de fosfato de sódio 0,1 M pH 7,5 e 50 μ L de Cramoll 1,2,3 (100 μ g). A mistura foi suplementada com 100 μ L de Triton X-100 a 0,1% (v/v) e incubada a 37 °C durante 3 h. A reação foi interrompida após aquecimento a 100°C em banho-maria e a mistura foi incubada a 4 °C durante 30 min. Em seguida, centrifugou-se a 9 000 g durante 10 min e determinou-se a absorbância do sobrenadante a 366 nm. Uma unidade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que deu um aumento de 0,01 em absorbância. O controle negativo da reação foi realizado por aquecimento a 100° C antes da adição de substrato. Os peptídeos obtidos no sobrenadante foram separados para posterior análise de interação enzimática.

2.10 ELETROFORESE EM CONDIÇÕES NATIVA BÁSICA

Cramoll 1,2,3 (200 μ g) foi avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) para proteínas nativas básicas de acordo com Reisfelet al. (1962) e a identificação das bandas polipeptídicas foi realizada através de coloração com negro de amido em ácido acético 10% (peso/volume).

2.11 EFEITO DOS PEPTÍDEOS DE CRAMOLL 1,2,3 NA ATIVIDADE DE ENZIMAS DIGESTIVAS DE *N. CORNIGER*.

O extrato de intestino de operários (350 μ g de proteína) em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,5, ou tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,4, foram incubados (30 min a 27°C) com os peptídeos de Cramoll 1,2,3. Ensaios para atividades de endoglucanase, exoglucanase, xilanase e α -amilase foram realizados de acordo com as adaptações dos métodos descritos por Li et al. (2009), Wood & Bhat (1988) e Bernfeld (1955), respectivamente. A mistura (extrato intestinal + peptídeos de Cramoll 1,2,3) foi incubada com acetato de sódio 0,1 M pH 5,5 contendo NaCl 0,15 M e 400 μ L de CMC 1% (para atividade de endoglucanase), Avicel 1% (para atividade de exoglucanase), 1% de xilana (para atividade de xilanase) e 1% de amido solúvel para amilase. Após a incubação, foram adicionados 500 μ L de DNS e as amostras foram aquecidas (100 ° C, 6 min) e imediatamente resfriadas em gelo (15 min). A absorbância foi então medida a 540 nm. A quantidade de açúcares redutores foi determinada usando glicose como padrão ($Y = 0,1226 X - 0,0157$, em que Y é a absorbância a 540 nm e X é a concentração de glicose em mg / mL).

Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para gerar 1 μmol de glicose por minuto.

A atividade de tripsina foi avaliada pelo substrato sintético BApNA (8 mM). A mistura (extrato intestinal + peptídeos de Cramoll 1,2,3) foi incubada durante 30 minutos a 37 ° C com Tris-HCl 1M pH 8,0 e o substrato (15 μl). A hidrólise do substrato foi seguida por medição de absorbância a 405 nm. Uma unidade enzimática foi definida como o número total de enzimas que hidrolisam 1 μmol de substrato por minuto.

2.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

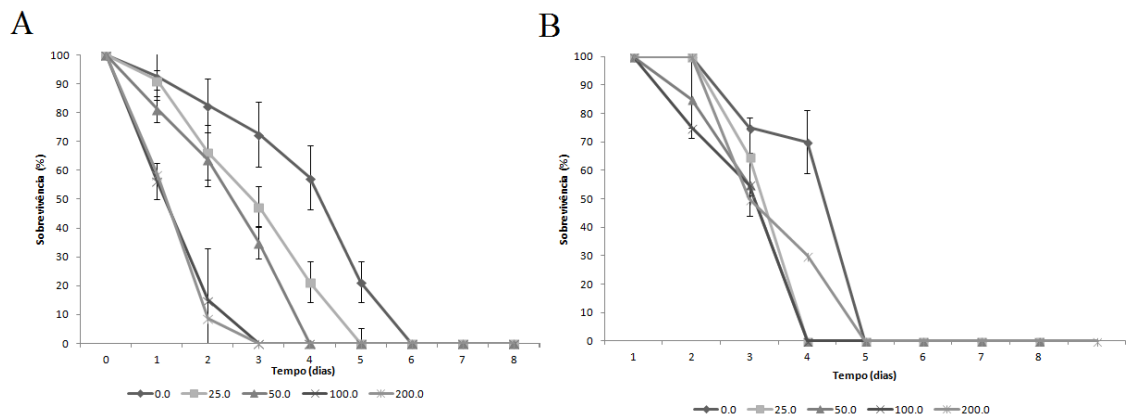
Os ensaios enzimáticos foram realizados em triplicata e três experimentos independentes foram realizados utilizando diferentes extratos intestinais. Os desvios padrão (DV) foram calculados usando o GraphPad Prism versão 4.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA) e os dados foram expressos como réplicas de média $\pm$ DV. Diferenças significativas entre os tratamentos foram analisadas pelo teste t de Student (significância em $p < 0,05$) usando o Origin 6.0.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Cramoll 1,2,3 foi isolada de acordo com os procedimentos previamente estabelecidos (NAPOLEÃO et al., 2013) e mostrou atividade hemaglutinante específica de 32,8. Esses dados asseguram a propriedade ligadora a carboidratos das lectinas, tornando-as aptas para os ensaios subsequentes. Cramoll 1,2,3 apresentou atividade termiticida contra cupins *Nasutitermes corniger* com LC50 de 78,72 e 199,27 (mg/mL) para operários e soldados respectivamente (Figura 1). Esses resultados corroboram com o trabalho realizado por Albuquerque (2012), que avaliando o efeito termiticida da lectina de rizoma *Microgramma vacciniifolia* (MvRL) observou que a mesma apresentou uma alta taxa de toxicidade para *N. corniger* com LC50 0,130mg/ml para operários e LC 50 0,085 mg/ml para soldados, assim como aconteceu com a lectina de sementes de *Opuntia ficus indica* cladodes (OfiL) e de sementes de *Moringa oleifera* (WSMoL e cMoL) que mostrou resultado termiticida contra operários e soldados. Cramoll 1,2,3 apresentou ser menos tóxica que a BmoRoL, uma lectina de raízes secundárias de *Bauhinia monandra*, que mostrou atividade termiticida com CL50 de 0,09 e 0,395 mg ml⁻¹ por 12 dias e a lectina de líquens de *Cladonia verticillaris*, que apresentou uma CL50 de 0.199 mg/ml⁻¹ para operários e 0,5 mg/ml⁻¹ para soldados (SILVA et al., 2009; SOUZA et al., 2011 ; PAIVA et al., 2011).

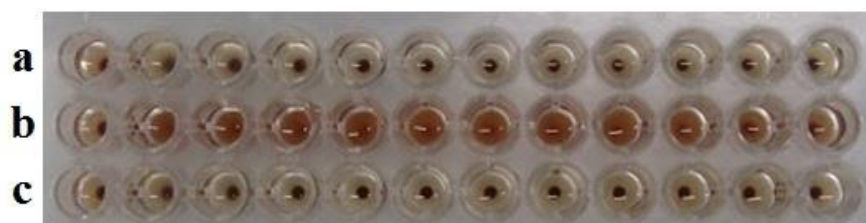
No entanto a Cramoll 1,2,3 não apresentou atividade repelente, como foi visto nos trabalhos realizados com as lectinas de *Microgramma vacciniifolia* (MvRL), *Myracrodruon urundeuva* bark (MuBL), das folhas (MuLL) e da casca de *Crataeva tapia* (CrataBL) (SÁ et al., 2008 ; NAPOLEÃO et al., 2011; SOUZA et al., 2011; PAIVA et al., 2011; ARAÚJO et al., 2012).

Figura 1: Curva de sobrevivência de operários (A) e soldados (B) submetidos a tratamentos com diferentes concentrações de Cramoll 1,2,3.



É bem descrito na literatura que lectinas inseticidas tem como característica principal a resistência ao ambiente hostil e proteólise do intestino de insetos. Napoleão et al. (2011), avaliando o efeito deletério de lectinas de *M. urundeuva*, sugeriu que seu mecanismo de ação termiticida estava relacionada a resistência à degradação por protease no intestino do inseto. A lectina de *Dioclea violácea* (DVL) também mostrou-se resistente à proteólise por proteases de intestino médio em até 24 h e foi tóxica sobre o desenvolvimento de larvas em *Anagasta kuehniella* impedindo o seu desenvolvimento, assim como a lectina da torta de sementes de *M. oleifera* (WSMoLC) que apresentou atividade larvicida sobre *Aedes aegypti* pode estar ligada à resistência da lectina à digestão. No entanto, Cramoll 1,2,3 não apresentou resistência à degradação proteolítica causada pelas proteases do intestino dos cupins, pois foi observado perda completa da atividade hemaglutinante após a interação *in vitro* com o extrato de intestino de operários de *N. corniger*, como pode ser observado na figura 2.

Figura 2. Atividade hemaglutinante em placa de microtitulação, do extrato de intestino de cupins operários (a), Cramoll 1,2,3 (b) e mistura de Cramoll e extrato de cupins operários.



A proteólise da Cramoll 1,2,3 foi constatada por meio da avaliação da atividade proteolítica total do extrato de intestino de operários utilizando a mesma como substrato. Com o resultado do teste, observou-se uma atividade proteásica específica de 9,96 U/mg e, com isso,

sugere-se que Cramoll 1,2,3 foi hidrolisada por enzimas hidrolíticas presentes no intestino desses insetos. Com base no exposto, a atividade termiticida pode estar relacionada à liberação de peptídeos bioativos pela hidrólise da Cramoll 1,2,3 e não pela ação da proteína intacta.

Os peptídeos resultantes foram avaliados quanto à atividade contra as enzimas digestivas de operários de *N. corniger*. Foi observado que houve interação com todas as glicohidrolases testadas, provocando um pequeno aumento na atividade de exoglucanase (8%) e endoglucanase (8%) e pequena inibição da amilase (14%) e xilanase (11%), bem como, houve inibição da atividade de tripsin-like em 56,7% (Tabela 1). Esses resultados evidenciam que Cramoll 1,2,3, ao sofrer proteólise no intestino de cupins, libera peptídeos que agem estimulando ou inibindo enzimas digestivas e causando um desajuste metabólico.

Diversos estudos têm reportado o uso de lectinas na indução de mortalidade em insetos. Napoleão et al (2013) que o gorgulho do milho (*Sitophilus zeamays*) foi sensível ao tratamento com lectina da folha de *Myracrodruon urundeuva*. Foi observada uma significativa redução na atividade de diversas enzimas digestivas desses insetos, tais como a tripsina, fosfatases alcalinas, amilase e endo e exoglucanases.

Albuquerque et al (2012) observaram que a lectina termiticida do rizoma *Microgramma vacciniifolia* (MvRL) estimulou a atividade de endoglucanase em operários de *N. Corniger* e reduziu a atividade de tripsina de operários e β -glicosidase em ambas as castas analisadas (operários e soldados). No entanto, não foi observada alteração nas atividades de exoglucanases e amilases. Além disso, a lectina de *Dioclea violácea*, (DVL) diminuiu as atividades enzimáticas de tripsina e quimotripsina-like em 27 e 29 % , respectivamente, e também reduziu a atividade de α -amilase (OLIVEIRA et al., 2015).

Resultados similares foram observados por Oliveira et al (2017), o qual testou a lectina WSMoL (Water Soluble *Moringa oleifera* Lectin) contra as enzimas digestivas de larvas de *Anagasta Kuehniella*. A lectina foi capaz de reduzir a atividade de glicosidases, amilase e tripsina em comparação ao grupo controle. WSMoL_c (Water Soluble *Moringa oleifera* Cake Lectin) foi avaliada quanto à sua capacidade de modular a atividade de enzimas digestivas de *Aedes aegypti* e foi observado que a lectina foi capaz de aumentar as atividades de protease e amilase, ao passo que a atividade de tripsina foi reduzida (Oliveira et al, 2016).

Lima et al (2018) observaram que a lectina de folha de *Myracrodruon urundeuva* (MuLL) modulou a atividade de enzimas digestivas de térmitas da espécie *Nasutitermes corniger*. A lectina da casca de *M. urundeuva* (MuBL) foi capaz de inibir a atividade de exoglucanase, enquanto MuLL promoveu o aumento da atividade da mesma enzima. Nesse estudo, a atividade de exoglucanase foi estimulada pelos peptídeos liberados, enquanto que a

atividade de tripsina foi reduzida em mais de 50%. Tais resultados estão de acordo com o estudo realizado por Lima et al (2018), onde foi observada uma significativa redução na atividade de tripsina devido à interação da enzima com MuLL e MuBL.

Estudos que objetivam a relação entre peptídeos de proteínas vegetais hidrolisadas e seu efeito sobre as atividades das enzimas digestivas ainda são escassos. Siow & Gan (2016) relataram o efeito inibitório de três peptídeos de semente de cominho sobre a atividade da α -amilase. Além disso, Evaristus et al (2018) extraíram e identificaram peptídeos de *Nephellium lappacheum* e *Nephelium mutabile*, dos quais as proteínas já teriam sido previamente hidrolisadas. Os autores observaram que esses peptídeos também eram capazes de inibir a atividade da α -amilase. Infelizmente, nenhum dos estudos acima foi realizado usando enzimas de insetos.

Esses resultados corroboraram com a hipótese de que a mortalidade induzida por Cramoll 1,2,3 contra *N. corniger* seja devida à interação de peptídeos liberados pela hidrólise de Cramoll com as enzimas digestivas presentes no intestino médio do inseto. Como não foi observada atividade hemaglutinante após a incubação de Cramoll 1,2,3 com o extrato de cupim, podemos concluir que o responsável pela mortalidade não é a proteína na sua estrutura nativa, mas podem ser os peptídeos bioativos liberados pela Cramoll 1,2,3 hidrolisada.

Tabela 1: Efeitos dos peptídeos de Cramoll 1,2,3 nas enzimas digestivas de operários de *N. corniger*

		100% enzimático ^a	Cramoll 1,2,3 + Enzima ^a	%estimulação (+) %Inibição (-)
Glicohidrolases:	Exoglicanase (U/mg)	1,548±0,022	1,666±0,053*	(+) 7,57±2,1
	Endoglicanase (U/mg)	2,635±0,042	2,833±0,115*	(+) 7,52±3,8
	Amilase (U/mg)	2,255±0,040	1,935±0,073*	(-)14,1±4,6
	Xilanase (U/mg)	2,270±0,030	2,025±0,069*	(-)10,7±3,6
Proteases:				
	Tripsina (μU/mg)	0,031±0,003	0,014±0,004*	(-)56,7±6,03

^aOs valores correspondem á atividade enzimática específica, que foi calculada pela razão entre o número de unidade enzimáticas e a quantidade total de proteínas utilizada no ensaio (mg). * Foi realizada análise estatística usando o teste-*t*Student o que indica que houve diferenca significativa entre tratados e controle com $p < 0.05$.

4 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, pode –se concluir que Cramoll 1,2,3 não foi resistente á degradação proteolítica no intestino dos cupins, porém os peptídeos resultantes apresentaram atividade termiticida. O pool de peptídeos apresentou capacidade de interagir com as enzimas digestivas de *N. corniger*, podendo ser esse um dos mecanismos de ação inseticida.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, C.A.S., CORREIA, M.T.S., COELHO, L.C.B.B., NASCIMENTO, S.C., SANTOS-MAGALHÃES, N.S. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, p.435-445, 2004.

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** 183,20 – 26, 2012.

AZEEZ, A., SANE, A.P., BHATNAGAR, D., NATH, P. Enhanced expression of serine proteases during floral senescence in *Gladiolus*. **Phytochemistry**, v. 68, p.1352-1357, 2007.

BERNFELD, P. Amylases, a and b. **Methods in Enzymology**, v. 1, p.149,158, 1955.

BOLOGNESI, R., TERRA, W.R., FERREIRA, C. Peritrophic membrane role in enhancing digestive efficiency: theoretical and experimental models. **J. Insect Physiol**, v.54, p.1413–1422, 2008.

CACCIA, S., VAN DAMME, E.J.M., DE VOS, W.H., SMAGGHE, G. Mechanism of entomotoxicity of the plant lectin from *Hippeastrum hybrid* (Amaryllis) in *Spodoptera littoralis* larvae. **J. Insect Physiol**, v.58, p.1177–1183, 2012.

CONSTANTINO, R. The pest termites of South America: taxonomy, distribution and status. **Journal of Applied Entomology**, v. 126, n. 7-8, p. 355–365, set. 2002.

CONSTANTINO, R. **On-line termite data base**. Disponível em: <<http://www.termitologia.unb.br/>>, 2016.

CORREIA, M. T. Lectins, Interconnecting Proteins with Biotechnological/ Pharmacological and Therapeutic Applications. Evid Based Oliveira, D.E. & Constantino, R. (2016) A taxonomic revision of the neotropical termite genus *Diversitermes* (Isoptera: Termitidae: Nasutitermitinae). **Zootaxa**, v.2, p. 221-245, 2017.

DAN, X., LIU, W., NG, T.B. Development and Applications of Lectins as Biological Tools in Biomedical Research. **Med Res Rev** 36, 221-247, 2016.

DATTA, D., AFTABUDDIN, M., GUPTA, D.K., RAHA, S., SEN, P., 2016. Human Prostate Cancer Hallmarks Map. **Sci Rep** 6, 30691. **Complement Alternat Med** 2017, 1594074.

FERNANDES, M.P., INADA, N.M., CHIARATTI, M.R., ARAÚJO, F.F.B., MEIRELLES, F.V., CORREIA, M.T.S., COELHO, L.C.B.B., ALVES, M.J.M., GADELHA, F.R., VERCESI, A.E. Mechanism of *Trypanosoma cruzi* death induced by *Cratylia mollis* seed lectin. **J Bioenerg Biomembr**, v. 42, p. 69-78, 2010.

HEGEDUS, D., ERLANDSON, M., GILLOTT, C., TOPRAK, U. New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. **Annu. Rev. Entomol**, v.54, p.285–302, 2009.

KRISHNA, K., GRIMALDI, D.A., KRISHNA, V., ENGEL, M.S. Treatise on the Isoptera of the world. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 377, p. 1-2704, 2013.

LIMA, T. D. A. et al. Digestive enzymes from workers and soldiers of termite *Nasutitermes corniger*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 176, n. 1, p. 1–8, 2014.

LUCENA, S. A et al. High throughput screening of hydrolytic enzymes from termites using a natural substrate derived from sugarcane bagasse. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, n. 1, p. 1–9, 2011.

MACEDO, M.L.R., FREIRE, M.G.M., SILVA, M.B., COELHO, L.C. Insecticidal action of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Comp. Biochem. Physiol. A: Mol. Integr. Physiol.**, v.146, p.486–498, 2007.

MICHIELS, K, VAN DAMME, A., SMAGGHE, G. Plant-Insect interactions: What can we learn from plant lectins? **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v.73, p.193-212, 2010.

NAPOLEÃO, T. H., GOMES, F.S., LIMA T.A., SANTOS, N. D. L., SÁ, R. A., ALBUQUERQUE, A. C., COELHO, L. C. B. B., PAIVA, P. M. G. Termiticidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* against *Nasutitermes corniger* and its mechanisms. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, p. 52-59, 2011.

OLIVEIRA, C.T., KUNZ,D., SILVA, C. P., MACEDO, L.M.R. Entomotoxic properties of *Dioclea violacea* lectin and its effects on digestive enzymes of *Anagasta kuehniella*(Lepidoptera). **Journal of Insect Physiology**, v. 81, p. 81–89, 2015.

OLIVEIRA, A.P.S., SILVA, L. L. S., LIMA, T.A., PONTUAL, E. V., SANTOS , N. D. L., COELHO, L.C.B.B., NAVARRO, D. M. A. F., ZINGALI, R.B., NAPOLEÃO, T.H., PAIVA, P.M.G. Biotechnological value of *Moringa oleifera* seed cake as source of insecticidal lectin against *Aedes aegypti*. **Process Biochemistry**, v. 81, p. 1683-1690, 2016.

PAIVA, P.M.G., PONTUAL, E.V., NAPOLEÃO, T.H., COELHO, L.C.B.B. Lectins and trypsin inhibitors from plants: biochemical characteristics and adverse effects on insect larvae. **Nova Science Publishers, Inc.**, New York, 52 p, 2013.

ROY, A.; GUPTA, S.; HESS, D.; DAS, K.P.; DAS, S. Binding of insecticidal lectin *Colocasia esculenta* tuberagglutinin (cea) to midgut receptors of *Bemisia tabaci* and *Lipaphis erysimi* provides clues to its insecticidal potential. **Proteomics**, v.14, p. 1646–1659, 2014.

SÁ, R.A., NAPOLEÃO, T.H., SANTOS, N.D.L., GOMES, F.S., ALBUQUERQUE, A.C., XAVIER, H.S., COELHO, L.C.B.B., BIEBER, L.W., PAIVA, P.M.G. Induction of mortality on *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae) by *Myracrodruon urundeuva* heartwood lectin. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.62, p.460 – 464, 2008.

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

SCHEFFRAHN, R.H., KRECEK, J., SZALANSKI, A.L., AUSTIN, J.W. Synonymy of the neotropical arboreal termites, *Nasutitermes corniger* and *N. costalis* (Isoptera: Termitidae: Nasutitermitinae), with evidence from morphology, genetics, and biogeography. **Ann. Entomol. Soc. Am.**, v. 98, p. 273–281, 2005.

TERRA, W.T., FERREIRA, C. Biochemistry and molecular biology of digestion. In: Gilbert, L. (Ed.), *Insect Molecular Biology and Biochemistry*. **Academic press Elsevier**, London, pp. 365–418, 2012.

VASCONCELLOS, A., ERNESTO, M. V. Térmitas (Isoptera) da REBIO Pedra Talhada. In: STUDER, A.; NUSBAUMER, A.L.; SPICHIGER, R. (Org.). *Biodiversidade da reserva biológica de Pedra Talhada*. **1ed. Alagoas: Boissiera**, v. 68, p. 243-250, 2015.

WILSON, E. O. *The insects societies*. **University Press Harvard, Cambridge and Massachusetts**, 1971.

5 ARTIGO 3

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE LECTINAS E PROTEASES DE SEMENTES DE *CRATYLLIA MOLLIS*

Yasmin Bruna de Siqueira Bezerra^a, Caio César da Silva Guedes^a, Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho^a, Pollyanna Michelle da Silva^a, Thiago Henrique Napoleão^a, Thâmarah de Albuquerque Lima^a, Patrícia Maria Guedes Paiva^{a*}.

^aDepartamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

*Corresponding author. E-mail address: ppaivaufpe@yahoo.com.br

1 INTRODUÇÃO

Cratylia mollis, popularmente conhecida como feijão camaratu, é uma planta pertencente à família Fabaceae nativa do bioma Caatinga (FIGUEIRÔA et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2018). As lectinas são proteínas com capacidade de reconhecer e ligar reversivelmente a carboidratos ou estruturas glicosídicas complexas e possuem diversas atividades biológicas (BRITO et al., 2017; COELHO et al., 2017). As sementes de *C. mollis* contém quatro isoformas de lectinas que são chamadas de Cramoll 1, 2, 3 e 4. As isoformas 1, 2 e 4 são glicose/mannose específicas enquanto que Cramoll 3 é específica para galactose. Elas podem ser purificadas do extrato através de precipitação com sulfato de amônio seguida por algumas etapas de cromatografia. A preparação de Cramoll 1, 4 é obtida a partir da fração precipitada 40-60% de sulfato de amônio submetida a uma cromatografia de afinidade; as isoformas 1 e 4 podem ser separadas por cromatografia de troca iônica. Cramoll 2 foi isolada dessa mesma fração precipitada após ser submetida a uma cromatografia de exclusão molecular. A Cramoll 3 foi purificada do precipitado 0-40% através de uma cromatografia de troca iônica (Paiva and Coelho, 1992; Correia and Coelho, 1995). De modo alternativo, a preparação contendo as isoformas 1, 2, e 3 (Cramoll 1, 2, 3), pode ser obtida usando o sobrenadante resultante do fracionamento 0-60% de sulfato de amônio seguida de cromatografia em gel filtração (Napoleão et al., 2013). As isoformas de Cramoll apresentam diversas propriedades biológicas como atividade mitogênica, atividade antiinflamatória, anti helmíntica, no tratamento de feridas cutâneas e atividade inseticida (MELO et al., 2011; MELO et al., 2011a; OLIVEIRA et al., 2018).

Nas plantas, as lectinas participam de diversas atividades como defesa contra fitopatógenos, atividades antifúngica, antimicrobiana, inseticida e antiviral (LIMA et al., 2016; LACERDA et al., 2017; MARQUES et al., 2017; SILVA et al., 2018). A ação antimicrobiana das lectinas é bem conhecida e estudos mostram que esta atividade está relacionada com a sua capacidade de interagir com carboidratos na superfície das células dos microorganismos (GOMES et al., 2013). Em bactérias essa interação se dá por meio de componentes da parede celular, tais como N- acetilglucosamina, ácido N-acetilmurâmico (MurNAc), tetrapeptídeos ligados a MurNAc e lipopolissacarídeos (GOMES et al., 2013; CARVALHO et al., 2015). Enquanto que em atividades antifúngicas, as lectinas podem afetar o crescimento e germinação de fungos, o que pode estar ligado a perturbação na síntese de quitina ou interação com outros polissacarídeos presentes na parede celular (SANTOS et al., 2012; ALBUQUERQUE et al., 2014; PROCÓPIO et al., 2018). Vários estudos relatam o potencial antimicrobiano de lectinas

de plantas; Procópio e colaboradores (2017), demonstraram a atividade antimicrobiana contra as bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus saprophyticus* e contra os fungos *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* e *Candida parapsilosis* da lectina do folíolos de folhas de *Calliandra surinamensis* (Casul); PgTel, lectina encontrada no suco de *Punica granatum* demonstrou atividades antifúngicas contra os fungos *Candida albicans* e *Candida krusei* (SILVA et al., 2018), assim como a lunatina, uma lectina de sementes comestíveis de *Phaseolus lunatis* billb, que também apresentou ser um potente antifúngico contra várias espécies de fungos como *Sclerotium rolfsii*, *Physalospora piricola*, *Fusarium oxysporum* e *Botrytis cinerea* (ALBUQUERQUE et al., 2014; WU et al., 2016).

Proteases constituem um grande grupo de enzimas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas gerando peptídeos, representando um dos mais importantes grupos de enzimas comerciais e industriais (AGUILAR & SATO et al., 2018; SUN et al., 2018; SILVA et al., 2017). Essas enzimas podem ser utilizadas em diferentes processos industriais tais como em aplicações farmacêuticas, atuando em formulações como auxiliares digestivos, combinações com antibióticos e para tratamentos de lesões (BRANDELLI et al., 2010); na indústria de alimentos, na produção de laticínios, massas, produção de molhos, para amaciar carnes na produção de hidrolisados protéicos (TAVANO, 2013; MO et al., 2016; SUN, et al., 2018) e no processamento do couro (KANTH et al., 2009).

As proteases derivadas de plantas apresentam um caminho promissor nas indústrias de alimentos, biotecnologia e aplicações farmacêuticas devido à sua ampla especificidade de substrato, boa solubilidade e atividade em uma ampla faixa de pH e temperatura. Com todas essas possibilidades de atuação de enzimas derivadas de plantas, a purificação de proteases a partir de uma variedade de plantas tornam-se cada vez mais importante (ALICI et al., 2018; MUTHU et al., 2017).

As atividades antimicrobianas das proteases podem ser observadas em trabalhos realizados por Muthu et al. (2017), onde proteases purificada a partir das folhas de *Wrightia tinctoria* e do caule de *Cissus quadrangularis* mostraram possuir uma alta atividade contra bactérias gram-positivas e gram-negativas (MUTHU et al., 2017; MUTHU et al., 2017a).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial uso de Cramoll 1, 2 e 3 e proteases de semente de *C. mollis* como agentes antimicrobianos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 COLETA DO MATERIAL

As sementes de *C. mollis* foram coletadas na cidade de Ibimirim, Estado de Pernambuco, no Nordeste do Brasil. Essas sementes foram colocadas para secagem à temperatura de 26°C. Após devidamente secas, foi confeccionada uma farinha das sementes com utilização de um multiprocessador e em seguida a farinha foi armazenada em um freezer à temperatura de +/- 20°C.

2.2 EXTRATO BRUTO

O extrato proteico na proporção 10% (peso/volume) foi obtido através da homogeneização da farinha de sementes de *C. mollis* em Cloreto de Sódio 0,15 M, durante 16 horas, na temperatura de +/-26°C. O extrato então foi submetido a um processo de centrifugação a 9.000g por 15 minutos. Após esse processo a porção precipitada do extrato foi descartada e o sobrenadante correspondeu ao extrato bruto. A porção total de proteínas foi mensurada a partir do método de Lowry et al. (1951) utilizando a albumina sérica bovina como padrão. O extrato foi avaliado quanto à presença de lectinas (ver secção 2.5) e proteases (ver secção 2.7).

2.3 FRACIONAMENTO SALINO

O extrato bruto foi submetido ao fracionamento com sulfato de amônio (GREEN & HUGHES, 1955), para obter-se preparações fracionadas ricas em lectinas e proteases. As frações sobrenadantes e precipitadas obtidas foram dialisadas durante 4 horas contra água destilada para a retirada do sal. Todas as frações foram analisadas quanto à concentração de proteínas (Lowry et al., 1951), à presença de lectinas (ver secção 2.5) e proteases (ver secção 2.7). A preparação sobrenadante saturada em 60% (FS60) mostrou ser ricas em lectinas (Cramoll 1, 2 e 3), e a preparação precipitada saturada em 80% (FP80) mostrou conter proteases.

2.4 OBTENÇÃO DA PREPARAÇÃO CRAMOLL 1,2,3

Para a obtenção da Cramoll 1,2,3 foi utilizado FS60 (50 mg de proteína) que foi aplicado em coluna Sephadex G-100 ($6,0 \times 1,6$ cm) previamente equilibrada (fluxo de 36 mL/h) com NaCl 0,15 M. A fração de proteínas não-adsorvidas e adsorvidas foram coletadas e avaliadas quanto à presença de lectinas.

2.5 ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE

A determinação da atividade hemaglutinante de Cramoll 1,2,3 foi realizada de acordo com Paiva e Coelho (1992), utilizando uma suspensão (2,5% v/v) de eritrócitos de coelho tratados com glutaraldeído (Bing et al., 1967). A amostra (50 μ L) foi diluída duas vezes em NaCl 0,15 M em uma fileira de microplaca de 96 poços e depois foram adicionados a cada poço 50 μ L da suspensão de eritrócitos. Um controle negativo também foi realizado. O número de unidades de atividade hemaglutinante foi determinado como o inverso da maior diluição da amostra que promoveu a aglutinação completa de eritrócitos e a atividade hemaglutinante específica foi definida como a relação entre as unidades de atividade hemaglutinante e a concentração de proteína (mg/mL).

2.6 PURIFICAÇÃO DAS PROTEASES DE SEMENTES DE CRATYLIA MOLLIS

Para a obtenção da protease foi utilizada a fração salina precipitada com 80% de sulfato de amônio (FP80). Esta fração foi submetida à diálise contra água destilada e contra tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 durante 4 horas. Logo após, 3ml da solução FP80 fracionada e dialisada, foi submetida a uma matriz cromatográfica de DEAE-sephadex confeccionada em um suporte de 10ml e equilibrada com tampão Tris-HCl pH 8,0 a 0,1 M. A fração não adsorvida à matriz (p1) foi eluída com o tampão de equilíbrio e a fração adsorvida (p2) foi eluída com solução de NaCl 1,0 M em Tris-HCl pH 8,0. A leitura dos picos coletados foi realizada em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 280nm. Após a leitura os picos coletados foram dialisados contra água destilada, quantificados quanto à concentração de proteínas (Lowry *et al.*, 1951) e avaliados quanto à presença de atividade proteolítica total (Azeez *et al.*, 2007).

2.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA TOTAL

A atividade proteolítica foi determinada através da utilização da azocaseína como substrato para a reação através do método de Azeez *et al.* (2007). Extrato bruto e frações salinas sobrenadantes (FS80) e precipitadas (FP80), foram analisadas quanto à presença de proteases. A amostra foi misturada a fosfato de sódio pH 7,5 a 0,1 M, contendo azocaseína 0,6% (m/v). A mistura foi suplementada com triton X-100 0,1% (v/v) e foi encubada a 37°C durante 3h. A parada da reação foi realizada através da adição de ácido tricloroacético 10% (v/v), posteriormente, a amostra foi incubada a 4°C por 30 minutos, centrifugadas a 9.000g durante 10 minutos e então foi determinada a absorbância do sobrenadante em espectrofotômetro a 366nm.

2.8 ELETROFORESE SDS-PAGE

A homogeneidade da amostra ao longo do processo de purificação foi avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), contendo sulfato de dodecila (SDS) de acordo com Laemmli (1970). Amostras (200 µg de proteínas) de extrato bruto, fração precipitada a 80% (FP80), fração não-adsorvida(p1) e adsorvida (p2) a DEAE-celulose numa concentração de foram submetidas á eletroforese em um gel de acrilamida a 12%.

2.9 ELETROFORESE NATIVA BÁSICA

Para análise da presença de Cramoll 1, 2 e 3, FS60 e fração de proteínas adsorvidas e não-adsorvidas á sephadex G-100, foram submetidas a uma eletroforese em condições nativas para da proteína básicas através do método descrito por Reisfelet al. (1962), a identificação das bandas polipeptídicas foi realizada através de coloração com negro de amido em ácido acético 10%.

2.10 DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES MÍNIMA INIBITÓRIA (CMI), BACTERICIDA (CMB) E FUNGICIDA

Cramoll 1,2,3 e a protease foram avaliadas quanto à atividade antimicrobiana contra bactérias e fungos patogênicos humanos. As bactérias testadas foram *Escherichia coli* ATCC-25922, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* ATCC-6538

obtidas da coleção de culturas (WDCM114) do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. Os fungos testados foram *Candida albicans* (URM 5901), *Candida glabrata* (URM 4246), *Candida krusei* (URM 6391) e *Candida tropicalis* (URM 6551) obtidos da coleção de culturas da Universidade do Recife Micologia (URM) do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco. A concentração mínima inibitória (CMI) foi determinada de acordo com o ensaio de microtitulação proposto pelo Instituto de Normas Laboratoriais e Clínicas (CLSI - Clinical and Laboratory Standards, 2012). As bactérias foram cultivadas em Caldo Mueller Hinton (MHB) à 37°C e os fungos em Caldo Sabouraud Dextrose (SDB) à 28°C, overnight, sob agitação. A densidade dos inóculos foi ajustada turbidimetricamente em comprimento de onda de 600 nm à 3×10^6 CFU/mL. Cada ensaio correspondeu a uma linha de uma microplaca de 96 poços de fundo chato (TPP Techno Plastic Products AG, Suíça). Primeiro, 80 µL de água destilada foram adicionados ao segundo e do quinto ao décimo segundo poço. Em seguida, foram adicionados 80 µL da amostra ao quarto e quinto poço a partir do qual foi diluída seriadamente até o décimo segundo poço. Os antibióticos ampicilina, tetraciclina e fluconazol foram usados como controles positivos no terceiro poço. Posteriormente, 40 µL do meio MHB ou SDB foram adicionados em todos os poços, exceto no primeiro, que foi preenchido com 200 µL do meio de cultura, correspondendo ao controle de esterilidade. Finalmente, a suspensão bacteriana foi adicionada do segundo até o último poço da fileira. O segundo poço (que contém microrganismos na ausência da amostra) correspondeu ao controle de crescimento de 100%. As placas foram incubadas a 37°C (bactérias) ou 28°C (fungos) e a densidade óptica foi medida no tempo zero e após 24 h de incubação usando um leitor de microplacas. O CMI₅₀ correspondeu a menor concentração da amostra capaz de promover a redução de $\geq 50\%$, na densidade óptica, em comparação ao controle de crescimento 100%. Cada ensaio foi realizado em triplicata e três experimentos independentes foram realizados. Para determinar a concentração mínima bactericida (CMB) ou fungicida (CMF), o sobrenadante (10 µL) de cada poço, onde a inibição do crescimento foi maior ou igual a 50%, foi transferido para placas de petri contendo meio Ágar Mueller Hinton ou Ágar Sabouraud-Dextrose, e incubadas por 24 h. Foi determinado o CMB ou CMF, correspondente à menor concentração das amostras capazes de reduzir o número de UFC em 99,9% em comparação com o inóculo inicial. Cada ensaio foi realizado em triplicado em três experiências independentes.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Cramoll 1,2,3 foi purificada de acordo com o protocolo estabelecido anteriormente (NAPOLEÃO et al., 2013). A lectina apresentou AH específica de 32,8 assegurando a propriedade ligadora a carboidratos, tornando-as aptas para os ensaios antimicrobianos. Os resultados dos ensaios antifúngicos revelaram que a Cramoll 1,2,3 foi capaz de inibir o crescimento de *C. albicans*, *C. tropicallis* e *C. krusei* com MIC de 100, 200 e 400 µg/mL, respectivamente, mas não apresentou nenhuma atividade para *C. glabrata* (Tabela 1). Diversos estudos relatam a atividade antifúngica de lectinas de plantas. Por exemplo, a Lunatina - lectina purificada de sementes comestíveis de *Phaseolus lunatus*, exerceu uma forte atividade antifúngica contra uma variedade de espécies de fungos, inibindo o crescimento de *Sclerotium rolfii*, *Physalospora piricola*, *Fusarium oxysporum* e *Botrytis cinerea*, (WU et al., 2016); lectinas das sementes de *Archidendron jiringa* apresentaram atividades antifúngicas contra *Colletotrichum cassiicola* e *Candida albicans* nas concentrações mínimas inibitórias de 10 µg / mL e 56,7 µg / mL, respectivamente (CHARUNGCHITRAK et al., 2011); PgTel, lectina encontrada no suco de *Punica granatum*, inibiu o crescimento de *Candida albicans* e *C. krusei* com MIC₅₀ de 25,0 e 12,5 µg / mL, respectivamente. PgTel também induziu a morte celular de ambas as espécies, com valores de MFC de 50,0 µg / mL (*C. albicans*) e 12,5 µg / mL (*C. krusei*) (SILVA et al., 2018); Lectinas isoladas do folíolo da folha de *Calliandra surinamensis*, CasuL, apresentou atividade antifúngica contra *C. krusei* causando alterações na morfologia celular e danos à parede celular apresentando MIC de 125 µg / mL (PROCÓPIO et al., 2018). A inibição do crescimento fúngico pela ação das lectinas, parece ser devido à inibição da germinação de esporos, bem como o crescimento do micélio. De acordo com Cordeiro et al., (2006) as lectinas vegetais são ativas contra fungos porque podem reconhecer e imobilizar os microorganismos através da ligação a componentes de carboidratos, e assim, impedem o seu crescimento e multiplicação subsequentes, no entanto, o exato mecanismo de ação ainda não foi identificado, mas uma alteração na parede celular fúngica causada por alterações na síntese de quitina pode causar uma deficiência na deposição da parede celular (GOMES et al., 2012). No entanto a Cramoll 1,2,3 não apresentou atividade antibacteriana. Resultado semelhante foi observado em um trabalho apresentado com a lectina de sementes de *A. jiringa* para as bactérias *E. coli* e *P. auroginosa* (CHARUNGCHITRAK et al., 2011).

Tabela 1. Concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima fungicida (CMF) da lectina de sementes de *Cratylia mollis*, Cramoll 1,2,3.

Fungos	Cramoll 1,2,3	
	CMI	CMB
<i>Candida albicans</i>	100	ND
<i>Candida tropicalis</i>	200	ND
<i>Candida krusei</i>	400	ND
<i>candida glabrata</i>	ND	ND

CMI e CMF são valores expressos em $\mu\text{g} / \text{mL}$. ND: Não detectado.

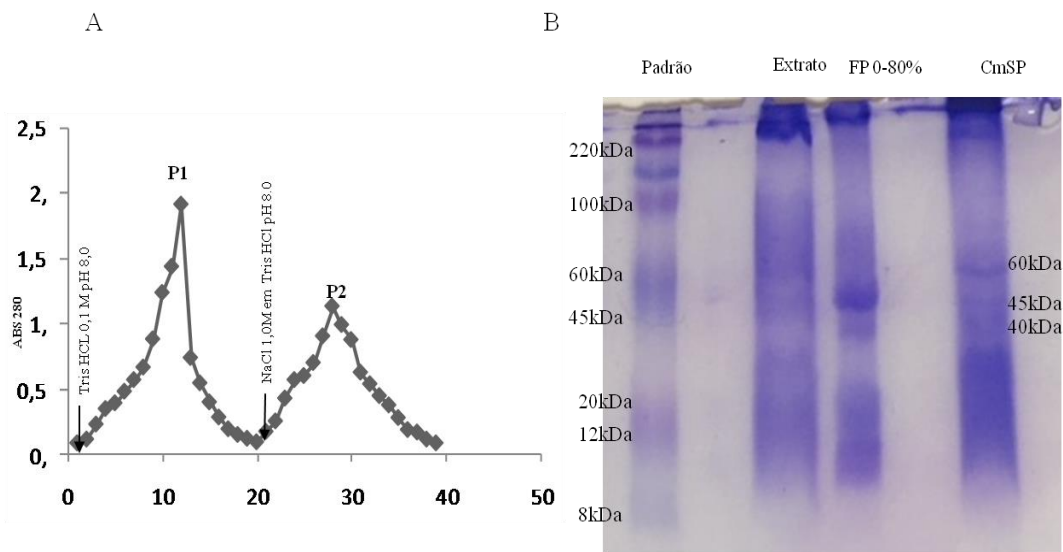
O extrato de sementes (EB) de *C. mollis* apresentou atividade proteolítica total específica de 40,5 U/mg (Tabela 2). O fracionamento salino com sulfato de amônio purificou parcialmente essas proteases na fração precipitada 80% (FP80) com atividade proteolítica específica de 133,0 U/mg. A cromatografia em DEAE-sephadex de FP80 (Figura 1A) foi eficiente em separar as proteases resultando em um pico não adsorvido, chamado de p1, com atividade proteolítica específica de 236 U/mg e fator de purificação igual a 5,8 enquanto o pico adsorvido á matriz, chamado de p2 não apresentou atividade proteolítica. O pool de proteases p1 foi denominado CmSP (do inglês *Cratylia mollis* Seeds Proteases). O SDS-PAGE mostrou a presença de várias bandas polipeptídicas, revelando a heterogeneidade da amostra com proteínas de massas moleculares aproximadas de 40 a 60 kDa (Fig. 3B).

Tabela 2: Purificação da protease de sementes de *Cratylia mollis*.

Amostra	Proteína (mg/mL)	AP	APE (U/mg)	PF
Extrato Bruto	6,2	50,3	40,5	1
Fração Precipitada 80%	5,6	149,5	133	3,2
Pico Proteína	4,4	208,5	236	5,8

AP = Atividade protease total; APE = Atividade proteolítica específica que corresponde a razão entre a atividade proteolítica (U) e concentração de proteínas (mg); FP = fator de purificação, corresponde á razão da atividade proteolítica específica de cada amostra com a do extrato de sementes. *Uma unidade de atividade de protease foi definida como a quantidade de enzima que promove um aumento de 0,01 de absorbância

Figura 1: A) Cromatograma de fração precipitada 0-80% (FP80) de sementes de *Cratylia mollis*, em matriz de troca iônica DEAE-sephadex equilibrada em tampão Tris-HCl 0,1M pH 8,0. O conjunto de proteínas não-adsorvidas foi eluído com Tris-HCl 0,1M pH 8,0 (p1) e as proteínas que aderiram á resina foram eluídas com NaCl 1,0 M em Tris-HCl 0,1M pH 8,0 (p2). B) Eletroforese SDS-PAGE 12%, do extrato bruto de sementes de *C. mollis*, fração precipitada 0-80% (FP80) e do pool de proteases CmSP.



Os resultados dos ensaios antimicrobianos revelaram que CmSP apresentou atividade antifúngica e antibacteriana, sendo capazes de inibir o crescimento dos fungos *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. glabrata* com MIC de 110, 110, 55 e 400 $\mu\text{g} / \text{mL}$. CmSP também induziram a morte de todas as espécies de fungos com valores de CMF de 220, 110, 220 e 1760 $\mu\text{g} / \text{mL}$ (Tabela 2).

Quanto aos ensaios antimicrobianos, CmSP inibiu o crescimento de todas as bactérias testadas com valores de CMI de 55, 880, 110 e 1760 $\mu\text{g} / \text{mL}$ para as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, respectivamente. No entanto, a protease foi bactericida apenas para a *E. coli* apresentando o CMB no valor de 440 $\mu\text{g} / \text{mL}$ (Tabela 3).

Tabela 3. Concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima fungicida (CMF) da protease de sementes de *Cratylia mollis*.

Fungos	Protease (CmSP)	
	CMI	CMB
<i>Candida albicans</i>	110	220
<i>Candida tropicalis</i>	110	110
<i>Candida krusei</i>	55	220
<i>Candida glabrata</i>	440	1760

CMI e CMF são valores expressos em $\mu\text{g} / \text{mL}$. ND: Não detectado

Diversas substâncias naturais como proteínas, proteases e outras classes de enzimas como quitinase são isolados e apresentam várias atividades biológicas, entre elas, a atividade antifúngica que desempenham um papel importante contra fungos patogênicos. Ainda são poucos os trabalhos envolvendo o potencial antimicrobiano de proteases vegetais, entretanto, existem estudos que relatam atividades de outras substâncias naturais , como exemplo, uma protease aspártica recombinante (rP6281), secretada pelo fungo *Trichoderma harzianum* e

expressa em *Pichia pastoris* que mostrou possuir atividade antifúngica inibindo o crescimento de *B. cinerea* em 57,3%, de *Mucor circinelloides* em 30,9%, *Aspergillus flavus* em 26,1%, e *Aspergillus fumigates* 27,2%. Algumas proteínas de sementes apresentaram atividades contra fungos, como as de sementes de *Prosopis cineraria* (P2C2) e de sementes de *Sesbania virgata* (FP1-A); a P2C2 foi antifúngica para *Lasiodiplodia theobromae* e *Aspergillus fumigates* e FP1-A inibiu o crescimento em até 30% dos fungos filamentosos *Aspergillus niger*, *Cladosporium cladosporioides*, *Colletotrichum gloeosporioides* e *Fusarium solani* (PRAXEDES et al., 2011; DENG et al., 2018; SOLANKI et al., 2018). Outras enzimas também mostraram-se antimicrobianas; uma enzima quitinase (TDSC) purificada a partir de sementes de *Trichosanthes dioica* mostrou atividade antifúngica contra *Aspergillus niger* e *Trichoderma sp* (KABIR et al., 2016); a quitinase purificada da pêra "Baozhu" também demonstrou uma alta atividade antifúngica contra *Fusarium oxysporum*, *Fusarium Solani*, *Rhizoctonia solani* e *Trichoderma viride* (HAN et al., 2016); assim como uma lisozima isolada do feijão canadense *Phaseolus vulgaris* apresentou propriedades antifúngicas inibindo o crescimento dos fungos *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl, *Pythium aphanidermatum*, *Fusarium oxysporum* e *Botrytis cinerea* (WANG et al., 2012).

Tabela 4. Concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB) da protease de sementes de *Cratylia mollis*.

Bactérias	Protease (CmSP)	
	CMI	CMB
<i>Staphylococcus aureus</i>	55	ND
<i>Micrococcus luteus</i>	880	ND
<i>Escherichia coli</i>	110	440
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1760	ND

CMI e CMB são valores expressos em µg / mL. ND: Não detectado.

Em trabalhos realizados por Muthu et al., (2017), verificaram que a protease purificada a partir das folhas de *Wrightia tinctoria* e a partir do caule *Cissus quadrangularis* demonstraram uma alta atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas e Bactérias Gram-negativas; bem como, uma protease obtida a partir do caule *Cissus quadrangularis* demonstrou uma alta atividade antibacteriana contra bactérias patogênicas. Em um outro trabalho realizado com uma protease purificada a partir de plântulas de *Bauhinia purpurea*, foi observado que a mesma exibiu atividade antibacteriana contra *Bacillus cereus* e *Escherichia coli* e apresentou o MIC de 13 µg / ml e 15 µg / ml, respectivamente (MUTHU & PALANI, 2016). Anjos et al. (2016) analisando as enzimas proteolíticas derivadas do mamão e do abacaxi, a papaína e a bromelina contra as bactérias *Alicyclobacillus spp*, observaram que as mesmas inibiram o crescimento de *A. acidoterrestris*, apresentando MIC para a papaína de 0,98 µg / mL e MBC de 3.91µg / mL e bromelina MIC de 62,5 µg / mL e MBC de 250 µg / mL. Uma Endopeptidase Cisteína Degradante de Vitelina (VTDCE), enzima que está envolvida na degradação de vitelinas (VTs) de *Rhipicephalus* (Boophilus) *microplus* inibiu significativamente o crescimento de *Staphylococcus epidermidis*(OLDIGES et al., 2012). Tem sido sugerido que essas atividades ocorrem devido ao rompimento das membranas bacterianas pelas proteases. Com o rompimento da parede e membrana celular bacteriana, ocorre também um desequilíbrio que abre caminho para o vazamento do conteúdo citoplasmático levando à morte celular (SIRITAPETAWEET et al., 2012).

4 CONCLUSÃO

A lectina Cramoll 1,2,3, purificada das sementes de *C. mollis*, é um agente antifúngico contra *C. albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis*. A preparação rica em proteases CmSP também isolada das sementes de *C. mollis*, mostrou atividades fungicidas contra *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*, efeitos bacteriostáticos contra as bactérias *S. aureus*, *M. luteus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* e bactericida contra *E. coli*. O presente trabalho reforça a Cramoll 1,2,3 e a CmSP como moléculas que podem estar associada às bioatividades e estimula trabalhos adicionais para compreender melhor o mecanismo de ação destas biomoléculas.

REFERÊNCIAS

- ANJOS, M. M., SILVA, A. A., PASCOLI, I. C., MIKCHA, J. M. G., MACHINSKI JR, M., PERALTA, R. M., ABREU FILHO, B. A. Antibacterial activity of papain and bromelain on *Alicyclobacillus spp.* **International Journal of Food Microbiology**. v. 216, p.121–126, 2016.
- ALBUQUERQUE, L. P., SANTANA, G. M. S., NAPOLEÃO, T. H., COELHO, L.. B. B., SILVA, M. V., PAIVA, P. M. G. Antifungal Activity of *Microgramma vacciniifolia* Rhizome Lectin on Genetically Distinct *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici Races. **Appl Biochem Biotechnol**, v.172, p.1098–1105, 2014.
- BRITO, J. S., FERREIRA, G. R. S., KLIMCZAK, E., GRYSHUK, L., SANTOS, N. D. L., PATRIOTA, L. L. S., MOREIRA, L. R., SOARES, A. K. A., BARBOZA, B. R., PAIVA, P. M. G., NAVARRO, D. M. A. F., LORENA, V. M. B., MELO, C. M. L., CORIOLANO, M. C., NAPOLEÃO, T. H. Lectin from inflorescences of ornamental crop *Alpinia purpurata* acts on immune cells to promote Th1 and Th17 responses, nitric oxide release, and lymphocyte activation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.94, p. 865-872, 2017.
- 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., CUNHA, M. G. C. C., CORREIA, M. T. S. Purification, characterization and antibacterial potential of a lectin isolated from *Apuleia leiocarpa* seeds. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 75, p. 402-408, 2015.
- CHARUNGCHITRAK, S., PETSOM, A., SANGVANICH, P., KARNCHANATAT, A. Antifungal and antibacterial activities of lectin from the seeds of *Archidendron jiringa* Nielsen. **Food Chemistry**, v. 126, p. 1025–1032, 2011.
- COELHO, L. C. B. B., SILVA, P. M. S., LIMA, V. L. M., PONTUAL, E. V., PAIVA, P. M. G., NAPOLEÃO, T. H., CORREIA, M. T. S. Lectins, Interconnecting Proteins with Biotechnological/Pharmacological and Therapeutic Applications. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, v. 2017, p. 1-22, 2017.
- CORDEIRO, R.A., GOMES, V.M., CARVALHO, A.F.U., MELLO, V. M.M. Effect of proteins from the red seaweed *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux on the growth of human pathogen yeasts. **Braz Arch Biol Technol**, v. 49, p.915–921, 2006.
- DENG, J. J., HUANG, W. Q., LIA, Z. W., LUA, D., ZHANG, Y., LUOA, X. C. Biocontrol activity of recombinant aspartic protease from *Trichoderma harzianum* against pathogenic fungi. **Enzyme and Microbial Technology**. v.112, p. 35–42, 2018.
- FIGUEIRÔA, E. O., ARANDA-SOUZA, M.A., VAREJÃO, N., ROSSATO, F. A., COSTA, R. A. P., FIGUEIRA, T. R., SILVA, L. C. N., CASTILHO, R. F., VERCESI, A. E., CORREIA, M. T. S. pCramoll and rCramoll lectins induce cell death in human prostate adenocarcinoma (PC-3) cells by impairment of mitochondrial homeostasis. **Toxicology in Vitro**, v.43, p. 40-46, 2017.

GOMES, B. S., SIQUEIRA, A. B. S., MAIA, R. C. C., GIAMPAOLI, V., TEIXEIRA, E. H., ARRUDA, F. V. S., KYRIA SANTIAGO DO NASCIMENTO, K. S., LIMA, A. N., SOUZA-MOTTA, C. M., CAVADA, B. S., PORTO, A. L. F. Antifungal activity of lectins against yeast of vaginal secretion. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.43, p. 770-778, 2012.

GOMES, F.S., PROCÓPIO, T. F., NAPOLEÃO, T.H., COELHO, L.C.B.B., PAIVA, P.M.G. Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf, **J. Appl. Microbiol.**, v. 114, p.672–679, 2013.

HAN, P., YANG, C., LIANG, X., LI, L. Identification and characterization of a novel chitinase with antifungal activity from ‘Baozhu’ pear (*Pyrus ussuriensis* Maxim.). **Food Chemistry**, v.196, p. 808–814, 2016.

KABIR, S. R., RAHMANA, M. M., TASNIMA, S., KARIMA, R., KHATUNAN., HASANA, I., AMINC, R., ISLAMA, S. S., NURUJJAMANA, M., KABIR, A. H., SANAA, N. K., OZEKI, Y., ASADUZZAMAN, A.K.M. Purification and characterization of a novel chitinase from *Trichosanthes dioica* seed with antifungal activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 84, p.62–68, 2016.

LACERDA, R. R., NASCIMENTO, E. S., LACERDA, J. T. J. G., PINTO, L. S., RIZZI, C., BEZERRA, M. M., PINTO, I. R., FILHO, S. M. P., PINTO, V. P. T., FILHO, G. C., GADELHA, C. A. A., GADELHA, T. S. Lectin from seeds of a Brazilian lima bean variety (*Phaseolus lunatus* L.var. cascavel) presents antioxidant, antitumour and gastroprotective activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.95, p.1072–1081, 2017.

LIMA, D. B., MELO, J. W. S., GONDIM JR, M. G. C., GUEDES, R. N. C., OLIVEIRA, J. E. M. Population-level effects of abamectin, azadirachtin and fenpyroximate on the predatory mite *Neoseiulus baraki*. **Exp. Appl. Acarol.**, v.70, p. 165-77, 2016.

MARQUES, D. N., ALMEIDA, A. S., SOUZA, A. R. O., PEREIRA, R., ANDRADE, A. L., CHAVES, R. P., CARNEIRO, R. F., VASCONCELOS, M. A., NASCIMENTO-NETO, L. G., PINHEIRO, U., VIDEIRA, P. A., TEIXEIRA, E. H., NAGANO, C. S., SAMPAIO, A. H. Antibacterial activity of a new lectin isolated from the marine sponge *Chondrilla caribensis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 109, p.1292–1301, 2018.

MELO, C. M. L., PORTO, C. S., MELO-JÚNIOR, M. R., MENDES, C. M., CAVALCANTI, C. C. B., COELHO, L. C. B. B., PORTO, A. L. F., LEÃO, A. M. A.C., CORREIA, M. T. S. Healing activity induced by Cramoll 1,4 lectin in healthy and immunocompromised mice. **International Journal of Pharmaceutics**, v.408, p. 113-119, 2011.

MELO, C. M. L., Lima, A. L. R., Beltrão, E. I. C., CAVALCANTI, C. C. B., MELO-JÚNIOR, M. R., Montenegro, S. M. L., COELHO, L. C. B. B., PORTO., CORREIA, M. T. S., LEÃO, A. M. A.C. Potential effects of Cramoll 1,4 lectin on murine *Schistosomiasis mansoni*. **Acta Tropica**, v.118, p.152-158, 2011a.

MOURA, M.C., TRENTIN, D.S., NAPOLEÃO, T.H., PRIMON-BARROS, M., XAVIER, A.S.; CARNEIRO, N.P., PAIVA, P.M.G., MACEDO, A.J., COELHO, L.C.B.B. Multi-effect

of the water-soluble *Moringa oleifera* lectin against *Serratia marcescens* and *Bacillus* sp.: antibacterial, antibiofilm and anti-adhesive properties. **Journal of Applied Microbiology**, v. 123, p. 861-874, 2017.

MUTHU, S., PERUMAL, P. Isolation, purification and characterization of antimicrobial protein from seedlings of *Bauhinia purpurea* L. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 86, p. 390-401, 2016.

OLDIGES, D. P., PARIZI, L. F., ZIMMER, K. R., LORENZINI, D. M., ADRIANA SEIXAS, A., MASUDA, A., VAZ JR, I. S., TERMIGNONI, C. A *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* cathepsin with dual peptidase and antimicrobial activity. **International Journal for Parasitology**. v.42, p. 635-645, 2012.

OLIVEIRA, W. F., SILVA, G. M.M., CABRAL FILHO, P. E., FONTES, A., OLIVEIRA, M. D. L., ANDRADE, C. A. S., SILVA, M. V., COELHO, L. C. B. B., MACHADO, G., CORREIA, M. T. S. Titanium dioxide nanotubes functionalized with *Cratylia mollis* seed lectin, Cramoll, enhanced osteoblast-like cells adhesion and proliferation. **Materials Science and Engineering: C**, v.90, p. 664-672, 2018.

PRAXEDES, P. G., ZERLIN, J. K., DIAS, L. O., PESSONI, R.A.B. A novel antifungal protein from seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Leguminosae-Faboideae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 71, p. 687-692, 2011.

PROCÓPIO, T. F., PATRIOTA, L. L. S., MOURA, M. C., SILVA, P. M., OLIVEIRA, A. P. S., CARVALHO, L. V. N., LIMA, T. A., SOARES, T., SILVA, T. D., COELHO, L. C. B. B., PITTA, M. G. R., RÊGO, M. J. B. M., FIGUEIREDO, R. C. B. Q., PAIVA, P. M. G., NAPOLEÃO, T. H. CasuL: A new lectin isolated from *Calliandra surinamensis* leaf pinnulae with cytotoxicity to cancer cells, antimicrobial activity and antibiofilm effect. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, p.419-429, 2017.

SANTOS, A.F.S., NAPOLEÃO, T. H., PAIVA, P.M.G., COELHO, L.C.B.B. Lectins: important tools for biocontrol of *Fusarium* species, in: T.F. Rios, E.R. Ortega (Eds.), *Fusarium: Epidemiology, Environmental Sources and Prevention*. **Nova Science Publishers Inc.**, p. 161-175, 2012.

SILVA, P. M., MOURA, M. C., GOMES, F. S., TRENTIN, D. S., OLIVEIRA, A. P. S., MELLO, G. S. V., PITTA, M. G. R., MOACYR JESUS BARRETO DE MELO REGO, M. J. B. M., COELHO, L. C. B. B., MACEDO, A. J., FIGUEIREDO, R. C. B. Q., PAIVA, P. M. G., NAPOLEÃO, T. H. PgTeL, the lectin found in *Punica granatum* juice, is an antifungal agent against *Candida albicans* and *Candida krusei*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108 p.391-400, 2018.

SIRITAPETAWE, J., THUMANU, K., SOJIKUL, P., THAMMASIRIRAK, S. A novel serine protease with human fibrinolytic activities from *Artocarpus heterophyllus* latex. **Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics**, v.1824, p.907-912, 2012.

SOLANKI, D.S., KUMAR, S., PARIHAR, K., TAK, A., GEHLOT, P., R. PATHAK, R., SINGH, S. K. Characterization of a novel seed protein of *Prosopis cineraria* showing antifungal activity. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 116, p. 16-22, 2018.

WANG, S., YE, X., RAO, P. Isolation of a novel leguminous lysozyme and study on the antifungal activity. **Food Research International**, v. 47, p.341–347, 2012.

WU, J., JUNWANG, J., WANG, S., RAO, P. Lunatin, a novel lectin with antifungal and antiproliferative bioactivities from *Phaseolus lunatus* billb. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.89, p. 717-724, 2016.

6 CONCLUSÃO GERAL

As sementes de *Cratylia mollis* mostraram-se ricas em lectinas e proteases. Do extrato salino, por meio de fracionamento salino e cromatografia, foi obtido uma preparação rica em lectina, chamadas de Cramoll 1, 2 e 3, e preparação rica em proteases chamada de CmSP. Cramoll 1, 2, 3 exerceu atividade acaricida contra adultos e ovicida contra a espécie praga *T. bastosi* e reduziu a taxa de crescimento da população. Apresentou efeito termiticida contra cupins da espécie *N. corniger* porém mostrou-se não ser resistente á degradação proteolítica no intestino dos cupins operários. Esses resultados apontam para um efeito termiticida causado não pela Cramoll 1, 2, 3 e sim pelos peptídeos resultantes da proteólise. O pool de peptídeos apresentou capacidade de interagir com as enzimas digestivas de *N. corniger*, podendo ser esse um dos mecanismos de ação inseticida. Cramoll 1,2,3, demonstrou propriedades antifúngicas contra *C. Albicans*, *C. krusei* e *C. Tropicalis*, inibindo o crescimento dos mesmos. CmSP apresentou atividades antimicrobianas, demonstrando atividades fungicidas contra *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. Glabrata* e efeitos bacteriostáticos contra as bactérias *S. aureus*, *M. luteus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* e bactericida contra *E. coli*.

REFERÊNCIAS

- ALICI, E. H., ARABACI, G. A novel serine protease from strawberry (*Fragaria ananassa*): purification and biochemical characterization. **International journal of biological macromolecules**, v. 114, p. 1295-1304, 2018.
- CAMPOS, J.K.L., Araújo, C. S. F., Araújo, T. F. S., Santos, A. F.S., Teixeira, J. A., Lima, V. L.M., Coelho, L. C. B. B. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of Bauhinia monandra leaf lectin. **Biochimie Open**. v.2, p. 62-68, 2016.
- CHANDRA, N. R. et al. Structural similarity and functional diversity in proteins containing the legume lectin fold. **Protein Engineering**, v. 14, n. 11, p. 857-866, 2001.
- CONSTANTINO, R. The pest termites of South America: taxonomy, distribution and status. **Journal of Applied Entomology**, v. 126, n. 7-8, p. 355–365, set. 2002.
- CORREIA, M.T. Lectins, Interconnecting Proteins with Biotechnological/Pharmacological and Therapeutic Applications. Evid Based **Complement Alternat Med**, v.159, p.40 – 74, 2017.
- CRUZ, P. B., BARBOSA, A. F., ZERINGÓTA, V., MELO, D., NOVATO T5, FIDELIS, Q. C., FABRI, R. L., DE CARVALHO, M.G., OLIVEIRA SABAA-SRUR, A. U., DAEMON, E., MONTEIRO, C. M. O. Acaricidal activity of methanol extract of *Acmella oleracea* L. (Asteraceae) and spilanthol on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) and *Derma centornitens* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 228, p. 137–143, 2016.
- DENG, J. J., HUANG, W. Q., LIA, Z. W., LUA, D., ZHANG, Y., LUOA, X. C. Biocontrol activity of recombinant aspartic protease from *Trichoderma harzianum* against pathogenic fungi. **Enzyme and Microbial Technology**. v.112, p. 35–42, 2018.
- MUTHU, S., PERUMAL, P. Isolation, purification and characterization of antimicrobial protein from seedlings of *Bauhinia purpurea* L. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 86, p. 390-401, 2016.
- NAPOLÊÃO, T. H., SANTOS-FILHO, T. G., PONTUAL, E. V., FERREIRA, R. S., COELHO, L.C.B.B., PAIVA, P.M.G. Affinity Matrices of *Cratylia mollis* Seed Lectins for Isolation of Glycoproteins from Complex Protein. **Appl. Biochem. Biotechnol**, v.171, p.744–755, 2013.
- OLDIGES, D. P., PARIZI, L. F., ZIMMER, K. R., LORENZINI, D. M., ADRIANA SEIXAS, A., MASUDA, A., VAZ JR, I. S., TERMIGNONI, C. A *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* cathepsin with dual peptidase and antimicrobial activity. **International Journal for Parasitology**, v.42, p. 635–645, 2012.
- OLIVEIRA, C.T., KUNZ, D., SILVA, C. P., MACEDO, L.M.R. Entomotoxic properties of Dioclea violacea lectin and its effects on digestive enzymes of Anagasta kuehniella (Lepidoptera). **Journal of Insect Physiology**, v.81, p.81–89, 2015.

ULYSHEN, M. D. Wood decomposition as influenced by invertebrates. **Biological Reviews**, v. 91, n. 1, p. 70–85, 2016.

VANDENBORRE, G.; VAN DAMME, E.J.M.; SMAGGHE, G. Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects. **Phytochemistry**, v. 72, p. 1538–1550, 2011.

WU, J., JUNWANG, J., WANG, S., RAO, P. Lunatin, a novel lectin with antifungal and antiproliferative bioactivities from *Phaseolus lunatus* billb. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.89, p. 717-724, 2016.