



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Centro de Ciências Exatas e da Natureza
Departamento de Química Fundamental
Programa de Pós-Graduação em Química

Tese de Doutorado

Constituintes Químicos da Madeira-de-lei
***Myracrodruon urundeuva* com Propriedades**
Antioxidantes e Ação contra Fungos, Bactérias
e Insetos

ROBERTO ARAÚJO SÁ

Recife-PE / Brasil
Junho / 2008



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FUNDAMENTAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Constituintes Químicos da Madeira-de-lei
***Myracrodruon urundeuva* com Propriedades**
Antioxidantes e Ação contra Fungos, Bactérias
e Insetos

ROBERTO ARAÚJO SÁ

Tese apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Química
da UFPE, como parte dos
requisitos para obtenção do
título de Doutor em Química.

Orientador: Prof. Lothar Wilhelm Bieber

Co-orientadora: Prof^a Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva

*Bolsista CAPES

Recife-PE / Brasil
Junho / 2008

Sá, Roberto Araújo

Constituintes químicos da madeira-de-lei *Myracrodruon urundeuva* com propriedades antioxidantes e ação contra Fungos, Bactérias e Insetos - Recife : O autor, 2008.

171 f. : il., fig., tab.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco. CCEN. Química Fundamental, 2008.

Inclui bibliografia, apêndice e anexos.

1. Química orgânica 2. Aroeira-do-sertão 3. Lectina 4. Antioxidante 5. *Aedes Aegypti* I. Título.

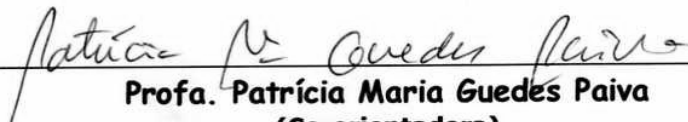
547

CDD (22.ed.)

FQ2008-019

Tese submetida ao Corpo Docente do Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Doutor em Química.

Aprovada:



Profa. Patrícia Maria Guedes Paiva
(Co-orientadora)
Departamento de Bioquímica
Universidade Federal de Pernambuco



Profa. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho
Departamento de Bioquímica
Universidade Federal de Pernambuco



Prof. Benildo Sousa Cavada
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará



Profa. Maria Tereza dos Santos Correia
Departamento de Bioquímica
Universidade Federal de Pernambuco



Profa. Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro
Departamento de Química Fundamental
Universidade Federal de Pernambuco

**"Constituintes Químicos da Madeira-de-Lei Myracrodruon
Urundeuva com Propriedades Antioxidantes e Ação Contra Fungos,
Bactérias e Insetos".**

por

ROBERTO ARAUJO SÁ

**Departamento de Química Fundamental
Centro de Ciências Exatas e da Natureza
Universidade Federal de Pernambuco
Recife-PE-Brasil
13 de Junho de 2008**

Dedico esta Tese a meus pais **Nicodêmio Pereira de Sá e Antonia Araújo Sá** e a meus irmãos (**Antônio Silva Sá, Hélio Araújo Sá, Elizabete Araújo Sá, João Carlos Aires, Naiza Araújo Sá e Charles Araújo Sá**) que, mesmo estando longe, sempre me apoiaram e acreditaram no meu potencial, me incentivando na busca de novas realizações.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Lothar Wilhelm Bieber, meu orientador, pela sua confiança, orientação científica e apoio no desenvolvimento e escrita da Tese.

À Prof^a. Patrícia Maria Guedes, pela confiança, amizade e orientação científica. Enfim, foi a pessoa que há quatro anos me acolheu como seu aluno. Pessoa genial, supertranquila e companheira. Muito Obrigado!

À Prof^a. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho, pela confiança no meu trabalho e colaboração ao longo desta Tese.

Ao Prof. Benildo Sousa Cavada, por ter aberto as portas do seu laboratório para a realização de parte desta tese. Obrigado pelo apoio, amizade e confiança.

Aos Professores Daniela Navarro (Dep. de Química Fundamental-UFPE), Norma Gusmão (Dep. de Antibióticos-UFPE), Auristela Albuquerque (Dep. de Biologia-UFRPE), Haroudo Xavier (Dep. de Farmácia-UFPE) e Eduardo Beltrão (Dep. de Bioquímica-UFPE), que colaboraram para a realização desta Tese. Obrigado por terem me acolhido nos seus laboratórios e dado todo suporte para execução dos experimentos.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Química Fundamental e Bioquímica da UFPE e especialmente aos funcionários Maurílio, Patrícia, Neide, Miron, Maria Barbosa Reis da Silva, técnica do Laboratório de Glicoproteínas, pelos seus conhecimentos passados com toda experiência de vida, e João Virgílio, por toda ajuda e tranquilidade amizade, apoio e atenção constantes.

A todos do Laboratório de Glicoproteínas, pelo companheirismo, ajuda, atenção e amizade, em especial, Mariana, Romero, Andréa, Natália, Renata, Flávia, Neila, Regina, Jayra, Cynthia e Adriana.

Aos grandes amigos, Michele Dalvina, Mariana Cristina (Cris), Amanda, Fernando, Carla Lêdo, Marcos Souza e Walewska pela ajuda, apoio, amizade, grande colaboração, tranquilidade e presença de fundamental importância nesta jornada.

A Maria Isaura, que tão bem me acolheu na sua família e pelo apoio na minha vida em Recife.

A todos os colegas do Biomol-LAB, em especial Raquel Benevides, por toda prontidão e capacidade ímpar de estar sempre disposta a ajudar.

A CAPES e CNPq pelo suporte financeiro.

Aos meus filhos, amigos e alunos de Iniciação Científica (hoje mestrando em Bioquímica), Thiago Henrique, Nataly Santos e Francis Gomes que trabalharam assiduamente para concretização deste trabalho. Obrigado pela amizade, companheirismo, simpatia e dedicação ao longo de todo o meu doutorado.

A toda minha família pela ajuda e compreensão nos momentos mais difíceis para superar os obstáculos.

RESUMO

Sabe-se que algumas árvores, como a aroeira-do-sertão, *Myracrodruon urundeuva*, apresentam madeira que não é atacada por agentes biodeterioradores. O conhecimento da resistência natural da madeira é importante na recomendação de sua utilização, para evitar gastos com a reposição de peças deterioradas e reduzir os impactos sobre as florestas remanescentes. Os extrativos de madeiras são conhecidos por aumentar a durabilidade e sugere-se que compostos com atividades antioxidante, antimicrobiana e inseticida também protegem o cerne. Dentre os componentes do metabolismo primário das plantas, algumas proteínas têm sido relacionadas a mecanismos de defesa, como as lectinas, proteínas que se ligam a carboidratos. Os objetivos desse trabalho foram (A) analisar fitoquimicamente e avaliar a propriedade antioxidante de preparações do cerne de *M. urundeuva* e (B) isolar, caracterizar parcialmente e avaliar potencial biotecnológico e atividades biológicas de uma lectina isolada do cerne. Pó do cerne de *M. urundeuva* foi utilizado na preparação dos extratos metanólico (EM) e salino – NaCl 0,15 M – (ES; 10%, p/v). Os extratos foram avaliados quanto à presença de extrativos e metabólitos secundários e quanto à capacidade de capturar radicais livres (atividade antioxidante). A presença de lectinas em ES foi detectada através do ensaio de atividade hemaglutinante (AH). As proteínas presentes em ES foram precipitadas com sulfato de amônio. A fração 40-60% (F_1), de maior AH específica (AHE), foi avaliada quanto à presença de metabólitos secundários e atividade antioxidante. AH de F_1 foi avaliada em presença de carboidratos e glicoproteínas. F_1 foi aplicada em coluna de quitina (polímero de N-acetil-glicosamina, GlcNAc) equilibrada com NaCl 0,15M. O pico protéico ativo eluído com ácido acético 1,0 M foi definido como a lectina de cerne de *M. urundeuva* (MuHL). A afinidade da lectina por GlcNAc foi também avaliada através da eluição da coluna de quitina com solução de GlcNAc 0,1 M e por cromatografia de F_1 em coluna desse monossacarídeo imobilizado em agarose. A massa molecular nativa de MuHL foi obtida através de cromatografia de exclusão molecular em coluna Hiprep 16/60 Sephacryl S-300/Äkta-FPLC. MuHL foi analisada em eletroforese em gel de poliacrilamida para proteínas nativas básicas ou ácidas e em condições desnaturantes e redutoras (SDS-PAGE). MuHL também foi avaliada quanto à natureza glicoprotéica. A AH de MuHL em presença de íons, a estabilidade térmica da lectina e o efeito do pH sobre a AH foram avaliados. MuHL foi imobilizada em Sepharose CL-4B, para ser utilizada no isolamento de glicoproteínas, e conjugada à peroxidase para utilização como marcador histoquímico de tecidos de próstata (normal, hiperplasia benigna e carcinoma) e do hipocampo de pacientes com Mal de Alzheimer. Atividade antibacteriana de MuHL foi avaliada frente a bactérias Gram-positivas (*Bacillus subtilis*, *Corynebacterium callunae*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus faecalis*) e Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*). As concentrações mínimas inibitória (CMI), bactericida (CMB) e aglutinante (CMA) foram determinadas. Atividade antifúngica contra *Fusarium* (*F. solani*, *F. oxysporum*, *F. moniliforme*, *F. decemcellulare*, *F. lateritium*, *F. fusarioides* e *F. verticiloides*) e atividades inseticida e repelente contra cupins *Nasutitermes corniger* de MuHL foram avaliadas. A concentração que mata 50% dos insetos (CL_{50}) foi determinada. MuHL também foi avaliada quanto à atividade larvicida contra larvas no quarto estágio (L4) de *Aedes aegypti* e as CL_{16} , CL_{50} e CL_{84} foram calculadas. ES e EM apresentaram flavonóides, proantocianidinas condensadas e leucoantocianidinas. Ação antioxidante de EM e ES foi evidenciada pela capacidade dos extratos de captar

radicais livres DPPH. A quantidade de radicais que reagiu com EM e ES foi bastante elevada (91,1% e 84,5%, respectivamente), enquanto que com F₁ foi muito baixa (11,2%). ES, F₁ e MuHL aglutinaram eritrócitos de todos os tipos sanguíneos do sistema ABO, assim como eritrócitos de coelho. A AH de F₁ foi inibida parcialmente por GlcNAc (estimulando a purificação da lectina por cromatografia de afinidade em coluna de quitina) e pelas glicoproteínas fetuína, ovoalbumina, tireoglobulina e azocazeína. A avaliação fitoquímica de F₁ demonstrou somente resquícios de leucoantocianidinas. MuHL, recuperada da cromatografia em coluna de quitina com AHE de 2.560, foi inibida por N-acetil-glicosamina. Eluição com solução de GlcNAc também resultou em recuperação da AH e a lectina também adsorveu à matriz Agarose-GlcNAc. MuHL se apresentou como uma glicoproteína básica constituída de um único polipeptídeo de aproximadamente 14,4 kDa (em SDS-PAGE). O perfil cromatográfico de MuHL na cromatografia de exclusão molecular revelou um pico principal de 21 kDa. Ensaio indicaram que a lectina é termoresistente (30-100 °C) e sensível à variação de pH, apresentando maior AH em pH 5,5. A AH de MuHL, após diálise contra o agente quelante EDTA, foi estimulada por Ca⁺², Mg⁺² e Mn⁺². A matriz MuHL-Sepharose foi capaz de reter as glicoproteínas comerciais fetuína, tireoglobulina e ovoalbumina, assim como glicoproteínas presentes no homogenato da tireóide de porco, soro fetal bovino e extrato da clara de ovo. MuHL marcou de forma intensa e homogênea a membrana das células de tecidos de hiperplasia benigna prostática e hipocampo de pacientes com o Mal de Alzheimer. A inibição por GlcNAc e a capacidade de se ligar à quitina estimularam a avaliação das propriedades antimicrobiana e inseticida da lectina. MuHL apresentou atividade antifúngica após 72 horas contra todas as espécies de *Fusarium*. ES, F₁ e MuHL apresentaram efeito antibacteriano sobre todas as bactérias testadas. A maior ação inibitória de MuHL foi para *S. aureus* (CMI: 0,58 µg/mL; CMB: 8,1 µg/mL). MuHL também aglutinou todas as bactérias, sendo *S. aureus* a espécie mais sensível (CMA: 2.34 µg/mL). O contato com MuHL em todas as concentrações testadas induziu 100% de mortalidade dos operários e soldados. Os valores de CL₅₀ após 4 dias foram de 0,248 mg/mL para os operários e 0,199 mg/mL para os soldados. MuHL não apresentou efeito repelente. A lectina também apresentou atividade larvicida sobre *A. aegypti*. Os valores de CL₁₆, CL₅₀ e CL₈₄ foram de 0,03, 0,04 e 0,05 mg/ml. O estudo revelou a presença de compostos com potente atividade antioxidante e contribuiu para a construção de um painel sobre lectinas de plantas ao caracterizar a lectina isolada. A lectina de *M. urundeuva* é o primeiro peptídeo bioativo encontrado em um cerne e em um tecido de uma madeira-de-lei. Por suas propriedades antimicrobiana e inseticida, MuHL é, provavelmente, um dos componentes da barreira química que confere a elevada resistência da madeira da aroeira-do-sertão à biodegradação. MuHL também é a primeira lectina com atividade inseticida descrita para cupins e *A. aegypti*. Em resumo, o trabalho ressalta a importância do estudo das propriedades dessa planta, ameaçada de extinção, tanto para o entendimento da fisiologia das plantas resistentes quanto como uma potencial fonte de lectina que pode ser explorada do ponto de vista biotecnológico.

Palavras Chaves: Aroeira-do-sertão, Lectina, Antioxidante, Aedes Aegypti.

ABSTRACT

It is known that some trees, as aroeira-do-sertão, *Myracrodruon urundeuva*, have wood that is not attacked by biodeteriorant agents. The knowledge of natural resistance of wood is important for recommendation of use, to avoid spending on replacement of damaged parts and to reduce the impacts on remaining forests. The extractives of woods are known to increase the durability and it is suggested that compounds with antioxidant, antimicrobial and insecticide activities also protect the heartwood. Among the compounds of primary metabolism of plants, some proteins have been related to defensive mechanisms, such as lectins, proteins that bind carbohydrates. The objectives of this study were (A) to examine phytochemically and to evaluate antioxidant property of preparations of *M. urundeuva* heartwood and (B) to isolate, characterize partially and assess biotechnological potential and biological activities of a lectin isolated from heartwood. Powder of *M. urundeuva* heartwood was used in preparation of methanolic (ME) and saline – 0.15 M NaCl – (SE, 10%, w/v) extracts. The extracts were evaluated for presence of extractives and secondary metabolites and for ability to capture free radicals (antioxidant activity). The presence of lectins in SE was detected by hemagglutinating activity (HA) assay. The proteins present in ES were precipitated with ammonium sulfate. The 40-60% fraction (F_1), with highest specific HA (SHA), was evaluated for the presence of secondary metabolites and antioxidant activity. F_1 HA was evaluated in presence of carbohydrates and glycoproteins. F_1 was loaded on chitin (polymer of N-acetylglucosamine, GlcNAc) column equilibrated with 0.15 M NaCl. The active proteic peak eluted with 1.0 M acetic acid was defined as *M. urundeuva* heartwood lectin (MuHL). Lectin affinity for GlcNAc was also evaluated by elution of chitin column with 0.1 M GlcNAc solution and by chromatography of F_1 in column of this monosaccharide immobilized in agarose. Native molecular weight of MuHL was obtained by molecular exclusion chromatography in a Hiprep 16/60 Sephacryl S-300/Äkta-FPLC column. MuHL was evaluated by polyacrylamide gel electrophoresis for native acidic or basic proteins and in denaturing and reducing conditions (SDS-PAGE). MuHL was also evaluated for glycoproteic nature. MuHL HA in presence of ions, thermostability of lectin and effect of pH on the HA were evaluated. MuHL was immobilized on Sepharose CL-4B, for use in isolation of glycoproteins, and combined to peroxidase, for use as histochemical marker for prostate tissues (normal, benign hyperplasia and carcinoma) and hippocampus of Alzheimer's disease patients. Antibacterial activity of MuHL was assessed against Gram-positive (*Bacillus subtilis*, *Corynebacterium callunae*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus faecalis*) and Gram-negative (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*) bacteria. Minimum inhibitory (MIC), bactericidal (MBC) and agglutinating (MAC) concentrations were determined. MuHL antifungal activity against *Fusarium* (*F. solani*, *F. oxysporum*, *F. moniliforme*, *F. decemcellulare*, *F. lateritium*, *F. fusarioides* and *F. verticiloides*) and insecticide and repellent activities against *Nasutitermes corniger* were evaluated. The concentration required to kill 50% of insects (LC_{50}) was determined. MuHL were also evaluated for larvicidal activity against *Aedes aegypti* larvae in the fourth stage (L4) and the LC_{16} , LC_{50} and LC_{84} values were calculated. SE and ME presented flavonoids, condensed proanthocyanidins and leucoanthocyanidins. Antioxidant action of ME and SE was evidenced by the ability of extracts to capture DPPH free radicals. The amount of radicals that reacted with ME and SE was very high (91.1 and 84.5%, respectively), whereas with F_1 was very low (11.2%). SE, F_1 and MuHL agglutinated erythrocytes of all ABO system

blood types, as well as rabbit erythrocytes. F₁ HA was partially inhibited by GlcNAc (stimulating the purification of lectin by affinity chromatography using chitin column) and by fetuin, ovalbumin, thyroglobulin and azocazein glycoproteins. Phytochemical evaluation of F₁ revealed only remnants of leucoanthocyanidins. MuHL, recovered with SHA of 2,560 after chromatography on chitin column of chitin, was inhibited by N-acetyl-glucosamine. Elution with GlcNAc solution also resulted in recovery of HA and the lectin was also adsorbed in Agarose-GlcNAc matrix. MuHL is a basic glycoprotein consisting of a single polypeptide of approximately 14.4 kDa (in SDS-PAGE). Chromatographic profile of MuHL in molecular exclusion chromatography showed a main peak of 21 kDa. Assays indicated that the lectin is thermoresistant (30-100 °C.) and sensitive to changes in pH, with high HA at pH 5.5. MuHL HA, after dialysis against chelating agent EDTA, was stimulated by Ca⁺², Mg⁺² and Mn⁺². The matrix MuHL-Sepharose was able to retain fetuin, thyroglobulin and ovalbumin commercial glycoproteins and glycoproteins present in hog thyroid homogenate, fetal bovine serum and egg yolk extract. MuHL stained homogeneous and intensely the cellular membrane of benign prostatic hyperplasia and hippocampus of patients with Alzheimer's Disease tissues. Inhibition by GlcNAc and chitin-binding ability stimulated the evaluation of antimicrobial and insecticidal properties of lectin. MuHL showed antifungal activity after 72 hours against all *Fusarium* species. SE, F₁ and MuHL showed antibacterial effect on all tested bacteria. The high inhibitory activity of MuHL was for *S. aureus* (MIC: 0.58 µg/mL; MBC: 8.1 µg/mL). MuHL also agglutinated all bacteria and *S. aureus* was the most sensitive (MAC: 2.34 µg/mL). Contact with MuHL at all tested concentrations induced 100% mortality of workers and soldiers. The values of LC₅₀ after 4 days were 0.248 mg/ml for workers and 0.199 mg/ml for soldiers. MuHL had no repellent effect. The lectin also showed larvicidal activity on *A. aegypti*. The values of LC₁₆, LC₅₀ and LC₈₄ were 0.03, 0.04 and 0.05 mg/ml, respectively. The study revealed the presence of compounds with potent antioxidant activity and contributed to construction of a plant lectins panel in characterize the isolated lectin. The *M. urundeuva* lectin is the first bioactive peptide found in heartwood and in a timber tissue. Due to its antimicrobial and insecticidal properties, MuHL is probably one of the components of the chemical barrier that confers high resistance for aroeira-do-sertão wood against biodegradation. MuHL is also the first lectin with insecticidal activity described for termites and *A. aegypti*. In short, the work emphasizes the importance of studying the properties of this plant, threatened of extinction, both for understanding the physiology of resistant plants and as a potential source of lectin that can be explored from the view point of biotechnology.

Keywords: Aroeira-do-sertão, Lectin, Antioxidant, Aedes Aegypti.

LISTA DE ABREVIATURAS

ABS: absorbância.

ADL: lectina de *Arundo donax*.

AH: Atividade hemaglutinante.

AHE: Atividade hemaglutinante específica.

AN: Agar Nutriente.

A_{T0} e **A_{TS}**: absorbâncias no tempo 0 e no estado estacionário, respectivamente.

BHA: hidroxianisol butilado.

BPA: aglutinina de *Bauhinia purpurea*.

BmoLL: lectina de folha de *Bauhinia monandra*.

CCD: cromatografia de camada delgada.

CL₅₀: concentração letal para matar 50% dos insetos.

CMA: Concentração Mínima Aglutinante.

CMB: Concentração Mínima Bactericida.

CMi: Concentração Mínima Inibitória.

CN: Caldo Nutriente.

Con A: lectina das sementes de *Canavalia ensiformis*.

Con M: lectina de *Canavalia maritima*.

Cramoll: lectina da semente de *Cratylia mollis*.

DAB: diaminobenzidina.

DEAE: Dietilaminoetil.

DEN: vírus causador da febre de dengue.

DF: febre de dengue.

DHF: febre de dengue hemorrágica.

DPPH: Difenilpicrilhidrazil.

DPPH_{REM}: DPPH remanescente

DMSO: dimetilsufóxido.

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

EM: extrato metanólico do cerne de *M. urundeuva*.

ES: extrato salino do cerne de *M. urundeuva*.

F₁: fração 40-60% de ES precipitada com sulfato de amônio.

Gal: galactose

GalNAc: N-acetilgalactosamina

GlcNAc: N-acetilglicosamina.

HPLC-RP: Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa.

IP: porcentagem de inibição de atividade oxidante; porcentagem de radical livre que reagiu com um antioxidante.

IPT: Instituto de Pesquisas Tecnológicas.

L4: quarto estágio larval de *Aedes aegypti*.

LsL: lectina de *Litopenaeus setiferus*.

MuHL: lectina do cerne de *M. urundeuva*.

NAPRALERT: Natural Products Alert Database.

OMS: Organização Mundial de Saúde.

PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida.

P_{AK1}: pico principal obtido na cromatografia de exclusão molecular de P_{D2}.

P_{AK2}: 2º pico obtido na cromatografia de exclusão molecular de P_{D2}.

PAS: ácido periódico de Schiff.

P_{D1}: Pico não-adsorvido da cromatografia de MuHL em DEAE-Sephacel.

P_{D2}: Pico adsorvido da cromatografia de MuHL em DEAE-Sephacel.

PVA: álcool polivinílico

SDS: sulfato sódico de dodecila.

TEMED: N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina

Tris: Trishidroximetilaminometano.

UFC: Unidade(s) formadora(s) de colônia(s)

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Artemisina.	21
Figura 2. Morfina.	21
Figura 3. Taxol.	21
Figura 4. Anatomia da Madeira.	23
Figura 5. Estrutura dos urushióis.	26
Figura 6. <i>Myracrodruon urundeuva</i> .	27
Figura 7. Chalconas isoladas de <i>Myracrodruon urundeuva</i> .	29
Figura 8. Estrutura química do β -cariofileno, óleo essencial das folhas de <i>Myracrodruon urundeuva</i>	30
Figura 9. Constituintes químicos isolados de <i>Schinus lentifolius</i> .	30
Figura 10. Pisatina, a primeira fitoalexina isolada e caracterizada	37
Figura 11. Exemplos de piretróides.	41
Figura 12. Ninho de <i>Nasutitermes corniger</i> .	46
Figura 13. Soldado e operário de <i>Nasutitermes</i> .	47
Figura 14. Representação esquemática entre a ligação da lectina a um carboidrato.	51
Figura 15. Representação esquemática de aglutinação por lectinas.	52
Figura 16. Ilustração de um segmento de quitina.	54
Figura 17. Exemplo de domínio heveínico.	54
Figura 18. Estruturas de lectinas.	56
Figura 19. Sítio de ligação a metais na estrutura nativa de Con M.	61
Figura 20. Imobilização de proteína em Sepharose-4B.	68
Figura 21. Esquema de purificação parcial da lectina de <i>M. urundeuva</i> , através de fracionamento com sulfato de amônio.	78
Figura 22. Cromatograma dos componentes polifenólicos dos	93

extratos do cerne de *M. urundeuva*.

Figura 23. Cromatograma dos flavanóides do cerne de <i>M. urundeuva</i> .	94
Figura 24. Cromatograma dos componentes polifenólicos de F ₁ .	96
Figura 25. Cromatografia de F ₁ (20.6 mg) em coluna de quitina (7,5 x 1,5 cm).	97
Figura 26. Cromatografia de F ₁ (20 mg) em coluna de quitina utilizando N-acetil-glicosamina como eluente.	98
Figura 27. Cromatografia de F ₁ em coluna de Agarose-N-acetil-glicosamina.	98
Figura 28. Eletroforese em gel de poliacrilamida (7,5 %, p/v) para proteínas nativas básicas.	99
Figura 29. SDS-PAGE (10 %, p/v) de ES, F ₁ , MuHL corada com ácido periódico de Schiff e MuHL corada com Azul de Coomassie.	100
Figura 30. Cromatografia de MuHL em coluna DEAE-Sephacel (2,0 x 10,0 cm).	100
Figura 31. SDS-PAGE de P _{D1} e P _{D2} .	101
Figura 32. Cromatografia de exclusão molecular de MuHL acoplada ao equipamento Äkta-FPLC System.	101
Figura 33. Cromatografia de exclusão molecular de P _{D2}	102
Figura 34. SDS-PAGE (10 %, p/v) dos picos (P _{AK1} e P _{AK2}) obtidos na cromatografia de P _{D2} em coluna Superose 6HR 10/300 GL.	102
Figura 35. Efeito da temperatura sobre a AH de MuHL (1 mg/mL).	103
Figura 36. Efeito do pH sobre a AH de MuHL.	104
Figura 37. Efeito da presença de cátions divalentes na AH de MuHL após tratamento com EDTA.	105
Figura 38. Cromatografia de preparações contendo glicoproteínas em MuHL-Sepharose CL-4B (2,3 x 1,2 cm).	106
Figura 39. Cromatografias de preparações contendo glicoproteínas em MuHL-Sepharose CL-4B (2,3 x 1,2 cm).	107
Figura 40. Avaliação da ligação de MuHL (88 µg/mL) a células do hipocampo de pacientes com a doença de Alzheimer e a tecidos de	110

próstata.

Figura 41. Ensaio qualitativo da atividade antioxidante em folha de sílica imersa em solução metanólica de DPPH a 0,4 mM.	112
Figura 42. Comportamento cinético das reações dos extratos e da fração provenientes do cerne de <i>M. urundeuva</i> com a solução metanólica de DPPH a 90 µM, determinado espectrofotometricamente a 515 nm.	113
Figura 43. Crescimento dos fungos <i>F. solani</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F. decemcellulare</i> e <i>F. lateritium</i> em meio YNB.	116
Figura 44. Crescimento dos fungos <i>F. verticiloides</i> , <i>F. fusarioides</i> e <i>F. moniliforme</i> em meio YNB.	117
Figura 45. Efeito do contato com o extrato salino (ES) e a fração 40-60% (F ₁) em operários e soldados de <i>N. corniger</i>	120
Figura 46. Efeito do contato com MuHL em operários de <i>N. corniger</i> .	121
Figura 47. Efeito do contato com MuHL em soldados de <i>N. corniger</i> .	121
Figura 48. Atividade larvívica do extrato salino (ES) do cerne de <i>M. urundeuva</i> .	123
Figura 49. Atividade larvívica da fração protéica 40-60% (F ₁) obtida de extrato salino do cerne de <i>M. urundeuva</i> .	123
Figura 50. Atividade larvívica de MuHL.	124

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1. Características gerais da aroeira-do-sertão / aroeira-preta.	28
Tabela 2. Listagem de gêneros de cupins que ocorrem no Brasil, nas Américas e no mundo e são considerados como espécies-praga.	44
Tabela 3. Famílias de Lectinas de plantas: ocorrência e especificidade.	53
Tabela 4. Lectinas comumente usadas como ligantes em suportes para cromatografia de afinidade.	69
Tabela 5. Atividade hemaglutinante de F ₁ e MuHL com diferentes eritrócitos.	95
Tabela 6. Purificação de MuHL por cromatografia em coluna de quitina.	95
Tabela 7. Inibição da AH de F ₁ e MuHL com carboidratos e glicoproteínas.	96
Tabela 8. Adsorção de proteínas ao suporte MuHL-Sepharose CL-4B.	108
Tabela 9. Atividade antifúngica dos extratos metanólico (EM) e salino (ES) do cerne de <i>M. urundeuva</i> .	114
Tabela 10. Atividade antibacteriana de preparações do cerne de <i>M. urundeuva</i> .	118
Tabela 11. Valores de CMI e CMA de MuHL.	118

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	20
1.1. Anatomia e resistência de madeiras	23
1.2. Considerações sobre a família Anacardiaceae e a espécie <i>Myracrodruon urundeuva</i> (aroeira-do-sertão, aroeira-preta)	25
1.2.1. A Família Anacardiaceae	25
1.2.2. A espécie <i>Myracrodruon urundeuva</i>	26
1.3. Estudo químico da aroeira-do-sertão	29
1.4. Propriedades medicinais da aroeira-do-sertão	30
1.5. Atividades biológicas da aroeira-do-sertão	32
1.6. Interações entre plantas e seus predadores: defesas mecânicas e defesas químicas	33
1.6.1. Fitoalexinas	36
1.6.2. Alelopatia	38
1.7. Controle de insetos por substâncias naturais	40
1.7.1. Inseticidas naturais	40
1.7.2. Cupins	42
1.7.3. O mosquito <i>Aedes aegypti</i>	47
1.8. Lectinas	49
1.8.1. Generalidades	49
1.8.2. Definição	49
1.8.3. Fontes de lectinas	50
1.8.4. Detecção e Especificidade	50
1.8.4.1. Lectinas ligadoras de quitina	52
1.8.5. Lectinas de dicotiledôneas	54
1.8.6. Características estruturais das lectinas de plantas	55
1.8.7. Purificação de lectinas	57
1.8.8. Caracterização de lectinas	59
1.8.9. Importância fisiológica e atividades biológicas de lectinas de plantas	63
1.8.9.1. Atividade antimicrobiana	63
1.8.9.1.1. Bactérias	63

1.8.9.1.2. Fungos	64
1.8.9.1.3. Lectinas com atividade antimicrobiana	65
1.8.9.2. Atividade inseticida	66
1.8.10. Aplicações biotecnológicas de lectinas	67
2. OBJETIVOS	72
2.1. Objetivo geral	72
2.2. Objetivos específicos	72
3. MATERIAIS E MÉTODOS	74
3.1. Material botânico	74
3.2. Preparação dos extratos	74
3.3. Avaliação fitoquímica	74
3.3.1. Alcalóides	75
3.3.2. Monoterpenóides, sesquiterpenóides e diterpenóides	75
3.3.3. Triterpenóides e esteróides	75
3.3.4. Iridóides	75
3.3.5. Saponinas	76
3.3.6. Cumarinas	76
3.3.7. Ácido gálico	76
3.3.8. Flavanóides	76
3.3.9. Proantocianidinas condensadas e leucoantocianidinas	77
3.3.10. Taninos hidrolisáveis	77
3.4. Fracionamento salino	77
3.5. Determinação de atividade antioxidante	78
3.5.1. Ensaio qualitativo	78
3.5.2. Ensaio quantitativo	79
3.6. Estimativa de proteínas	80
3.7. Determinação de atividade hemaglutinante (AH)	80
3.8. Cromatografia em coluna de quitina	81
3.9. Inibição da AH por carboidratos e glicoproteínas	81
3.10. Cromatografia em coluna de GlcNAc-Agarose	82
3.11. Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sephacel	82
3.12. Cromatografias de exclusão molecular	82
3.13. Efeito de íons sobre a AH	83

3.14. Avaliação da estabilidade térmica e efeito do pH sobre a AH	83
3.15. Avaliação da AH após tratamento com tripsina	84
3.16. Eletroforese em gel de poliacrilamida para proteínas nativas e básicas	84
3.17. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes e redutoras	85
3.18. Imobilização de MuHL em Sepharose CL-4B	86
3.19. Isolamento de glicoproteínas por cromatografia de afinidade em colunas de MuHL imobilizada em Sepharose	86
3.20. Histoquímica com MuHL	87
3.21. Avaliação da atividade antimicrobiana	88
3.21.1. Ensaios de atividade antibacteriana	88
3.21.2. Ensaio de aglutinação de bactérias	89
3.21.3. Atividade antifúngica	89
3.22. Avaliação da atividade inseticida contra cupins	90
3.22.1. Ensaio termiticida	90
3.22.2. Ensaio de repelência	90
3.23. Avaliação da atividade inseticida contra <i>Aedes aegypti</i>	91
3.23.1. Larvas de <i>Aedes aegypti</i>	91
3.23.2. Bioensaio larvicida	91
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	93
4.1. Avaliação fitoquímica	93
4.2. Isolamento e caracterização da lectina do cerne de <i>M. urundeuva</i> (MuHL)	94
4.3. Imobilização de MuHL em Sepharose-CL-4B e avaliação da ligação de glicoproteínas ao suporte	104
4.4. Histoquímica com MuHL	108
4.5. Atividades biológicas	111
4.5.1. Avaliação de atividade antioxidante	111
4.5.2. Avaliação da atividade antifúngica	114
4.5.3. Avaliação de atividade antibacteriana	117
4.5.4. Avaliação da atividade inseticida contra cupins	119
4.5.5. Avaliação da atividade larvicida de MuHL contra <i>Aedes</i>	122

aegypti.

5. CONCLUSÕES	126
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	127
ANEXOS	156
Anexo A – Certificado de Menção Honrosa	157
Anexo B – Certificado de Honra ao Mérito	158
Anexo C – Artigo aceito para publicação	159
“Induction of mortality on <i>Nasutitermes corniger</i> (Isoptera, Termitidae) by <i>Myracrodruon urundeuva</i> heartwood lectin”	

1. INTRODUÇÃO

As células dos organismos vivos são laboratórios onde se realiza a síntese de uma enorme variedade de substâncias orgânicas de grande importância, não só para a humanidade como para a sobrevivência das próprias espécies que as fabricam (DIAS, 2000).

No processo chamado fotossíntese, as plantas utilizam a energia do sol para produzir carboidratos a partir de materiais simples, como água e dióxido de carbono. Uma série de reações metabólicas, conhecidas como processos do “metabolismo primário”, leva à produção, a partir desses carboidratos, de outras substâncias, fabricadas pelas plantas com a introdução de nutrientes retirados do solo - nitrogênio, fósforo e sais minerais. Essas substâncias, que têm a função de promover os processos básicos da planta, são os ácidos carboxílicos do ciclo do ácido cítrico, os cerca de vinte aminoácidos que constituem a maioria das proteínas, os lipídeos e os açúcares comuns e seus derivados. São substâncias que existem em todas as plantas e constituem a matéria-prima para reações posteriores, catalisadas por enzimas e controladas geneticamente, que levarão à produção de compostos secundários (DIAS, 2000).

Usualmente, os compostos naturais presentes nas plantas são separados em compostos do metabolismo primário (aminoácidos, lipídios, carboidratos) e do metabolismo secundário (flavonóides, alcalóides, terpenos, etc.). Os metabólitos primários são amplamente distribuídos nos seres vivos, enquanto os metabólitos secundários são de ocorrência restrita e utilidade não evidente, embora essenciais para os organismos que os produzem (MANN et al., 1994).

As funções fisiológicas de muitas substâncias extraídas das plantas ainda não estão completamente esclarecidas, mas associa-se a sua produção à defesa da própria planta contra agentes externos como doenças, pragas e radiação solar, entre outros. Assim, essas substâncias possuem funções ecológicas importantes para a sobrevivência da espécie e são produzidas (quase todas) pelo metabolismo secundário das plantas (INGKANINAN et al., 1999; HARBORNE, 1993).

Os metabólitos secundários podem apresentar ação farmacológica tranqüilizante, analgésica, antiviral, fungicida, inseticida, com as mais diversas aplicações, tanto na terapêutica médica, como na indústria de cosméticos, de alimentos e outras (PLETSCH, 1998). Entre os diversos exemplos de substâncias de

uso terapêutico oriundas do metabolismo especial de plantas, podemos citar a artemisina (Figura 1), presente em *Artemisia annua*, que possui atividade antimalárica (KLAYMAN et al., 1984); a morfina (Figura 2), obtida do látex de *Papaver somniferum* que ainda é o analgésico mais potente para uso clínico (SAMUELSSON, 1989) e o diterpeno taxol (Figura 3), isolado de *Taxus brevifolia*, usado para o tratamento de câncer dos ovários e pulmões (WANI et al., 1971).

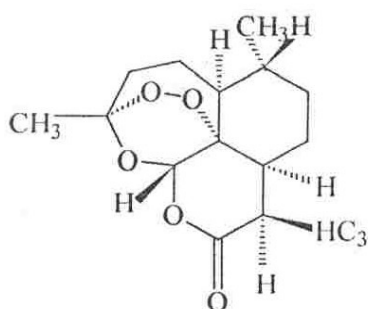


Figura 1. Artemisina

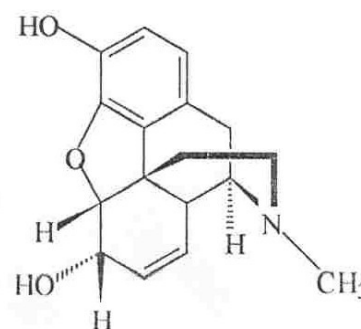


Figura 2. Morfina

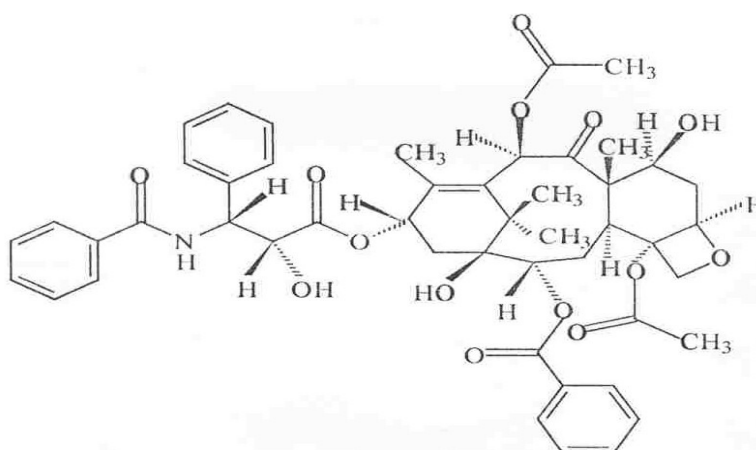


Figura 3. Taxol

Esta vasta gama de compostos naturais biologicamente ativos é também conhecida por suas ações repelentes ou atraentes em interações interespecíficas, na proteção contra estresses biótico e abiótico, e na manutenção da integridade estrutural.

Além dos metabólitos secundários, alguns componentes do metabolismo primário das plantas têm sido relacionados a mecanismos de defesa. As lectinas de plantas, por exemplo, são proteínas que têm diferentes papéis biológicos. Todavia, não existe uma função universal para todas elas. De maneira abrangente, as lectinas podem assumir papéis exógenos como, por exemplo, atividade antifúngica

contra fitopatógenos ou podem assumir papéis endógenos se interagirem com ligantes do próprio organismo para, por exemplo, auxiliar a deposição de proteínas de reservas nos corpos protéicos. As questões concernentes às funções biológicas que as lectinas desempenham nos organismos em que são produzidas têm ganhado atenção crescente, diminuindo o contraste entre função e aplicação de lectinas que predominava no passado (PEUMANS & VAN DAMME, 1995).

O conhecimento sobre as plantas sempre tem acompanhado a evolução do homem através dos tempos. As primeiras civilizações logo cedo se aperceberam da existência, ao lado das plantas comestíveis, de outras dotadas de maior ou menor toxicidade que, ao serem experimentadas no combate às doenças, revelaram, empiricamente, o seu potencial curativo (DI STASI et al., 2002).

O Brasil é o país com maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com um total de 55 mil espécies catalogadas de um total entre 250-500 mil espécies de plantas existentes na flora mundial. Menos de 10 % dessas plantas foram avaliadas sob aspectos biológicos e não mais que 5 % sob aspectos químicos até meados dos anos 90 (DI STASI, 1996). Dessa forma, as plantas constituem ainda uma fonte importante para a descoberta de novas substâncias biologicamente ativas.

A indústria farmacêutica mundial tem um faturamento anual que ultrapassa os 10 bilhões de dólares e o Brasil, se situa entre os dez maiores consumidores de medicamentos do mundo (FERREIRA, 1998). No entanto, cerca de 60% de toda produção de medicamentos é consumida por apenas 23% da população, devido à falta de recursos para compra de remédios (BERMUDEZ, 1995).

Levando em consideração o saber popular e na tentativa de suprir a falta de recursos financeiros para os setores de saúde, o uso de fitoterápicos tem crescido substancialmente. No Brasil, estima-se que o mercado de fitoterápicos tenha alcançado em 2001 a casa dos US\$ 550 milhões. Nesta sua revitalização, a fitoterapia tem sido acompanhada pelo abandono de seu empirismo inicial, agora se apresentando respaldada por um crescente número de pesquisas e estudos, dando conta de constituintes químicos ativos e novas tecnologias, o que pode ser traduzido como uma síntese da relação dialética entre o saber popular e o conhecimento científico (ARAÚJO, 2002).

O valor intrínseco de uma planta medicinal está no seu efeito terapêutico. A Organização Mundial de saúde diz que planta medicinal é qualquer planta que

possua, em um ou em vários de seus órgãos, substâncias usadas com finalidade terapêutica, ou que estas substâncias sejam ponto de partida para a síntese de produtos químicos e farmacêuticos. Essas substâncias são chamadas de princípios ativos.

1.1. Anatomia e resistência de madeiras

Observando-se a extremidade de um tronco de árvore, podem-se observar dois tecidos bem distintos em termos de cor na maioria das madeiras (Figura 4): a parte central, mais escura, é denominada cerne, enquanto a parte mais clara é denominada de alburno. A cor escura está relacionada com o aumento no teor de compostos fenólicos que são biossintetizados nas células do parênquima. À medida que novas células são produzidas pelo câmbio a parte mais interna do alburno (xilema) é convertida em cerne (RAVEN et al., 2004).

O cerne é considerado um tecido morto, sem atividade vegetativa. A transformação do alburno em cerne é iniciada internamente e não por condições externas. A morte da maioria das células após o espessamento celular é marcada pelo desaparecimento do núcleo e do protoplasma, pela mudança química do citoplasma, redução em amido, açúcares e materiais nitrogenados. Entretanto, algumas células retêm seu protoplasto, como as células do parênquima que ocorrem como células longitudinais e radiais. As células vivas do alburno são responsáveis por processos metabólicos como a respiração e digestão (SILVA, 2002).

Em uma árvore, o alburno fornece suporte ao tronco, conduz a seiva bruta até as folhas e armazena alimentos. O cerne, por outro lado, não armazena alimento nem faz condução de seiva, funcionando somente como suporte (HUNT & GARRATT, 1967).

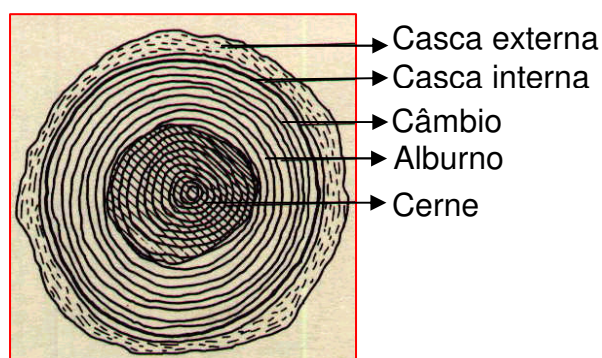


Figura 4. Anatomia da Madeira (SILVA, 2002).

A madeira é um material que apresenta várias propriedades, tais como energética, medicinal, química e alimentícia (LEPAGE et al., 1986), apresentando uma vasta gama de utilização nos meios rural e urbano. Porém, em virtude da sua estrutura e constituição química, boa parte das madeiras é passível de sofrer o ataque de vários organismos, sendo os fungos e os térmitas (cupins) os responsáveis pelos maiores danos (HUNT & GARRATT, 1967; CAVALCANTE, 1982; CARBALLEIRA LOPEZ et al., 1986; OLIVEIRA et al. 1986).

Naturalmente, a madeira é degradada biologicamente por microrganismos e organismos xilófagos que utilizam os polímeros naturais da parede celular como fonte de nutrição, e alguns deles possuem sistemas enzimáticos capazes de metabolizá-los (OLIVEIRA et al., 1986). A durabilidade natural da madeira é interpretada pela capacidade que a mesma possui de resistir à ação dos agentes deterioradores, tanto os biológicos como os físico-químicos. Sendo assim, a madeira pode apresentar alta, média ou baixa resistência à ação desses agentes. Sabe-se que o cerne da madeira é a parte mais durável, entretanto, há variações de espécie para espécie e entre árvores com idades diferentes (CARBALLEIRA LOPEZ et al., 1986).

Apesar de não ser formado por tecido vivo, o cerne de algumas árvores apresenta elevada resistência a agentes biodegradadores. A resistência à deterioração de algumas madeiras tem sido atribuída a substâncias presentes no lenho, denominadas extrativos, tais como taninos e outras substâncias fenólicas complexas, que são tóxicas aos organismos xilófagos (FINDLAY, 1985; LELLES & REZENDE, 1986; OLIVEIRA et al., 1986; HUNT & GARRATT, 1967). Os extrativos se distribuem homogeneamente pela árvore, sendo encontrados principalmente nas partes externas do cerne e próximo à base da árvore, diminuindo em direção à medula e ao topo (CARBALLEIRA LOPEZ et al., 1986).

De modo geral, há grande diferença na resistência natural entre as madeiras do cerne interno e externo, como observado por Paes & Vital (2000) para as madeiras de *Eucalyptus saligna* e *E. urophylla*. Em quase todas as espécies em que tais diferenças ocorrem, a porção interna do cerne, formada pela planta jovem é menos resistente à decomposição que a externa. Porém, nem todas as espécies apresentam este padrão, e entre as mais duráveis, a madeira próxima à medula é tão resistente quanto àquela da região externa do cerne. Por outro lado, a madeira

de alburno é reconhecidamente susceptível à deterioração biológica (FINDLAY, 1985).

O conhecimento da resistência natural da madeira é de suma importância na recomendação de sua utilização, bem como para evitar gastos desnecessários com a reposição de peças deterioradas e para reduzir os impactos sobre as florestas remanescentes.

1.2. Considerações sobre a família Anacardiaceae e a espécie *Myracrodruon urundeuva* (aroeira-do-sertão, aroeira-preta)

1.2.1. A Família Anacardiaceae

Anacardiaceae é uma família botânica representada por 70 gêneros e cerca de 600 espécies, conhecidas por suas espécies frutíferas, entre elas a mangueira (*Mangifera indica*), originária da Ásia, e o cajueiro (*Anacardium occidentale*), nativo do Brasil. São geralmente árvores ou arbustos (não há ervas nessa família) com canais resinosos que, quando expostos por injúrias, têm um cheiro característico. Sua madeira é de boa qualidade e muitas substâncias são extraídas para uso na indústria e na medicina.

As anacardiáceas sempre têm canais resiníferos nos ramos e troncos. As folhas são alternadas, simples ou imparipenadas, às vezes ternadas, sempre sem estípulas. Os canais resiníferos são ricos em taninos. O gênero *Anacardium* apresenta um pequeno número de espécies, todas elas originárias da América Central e do Sul à exceção de *Anacardium encardium*, provavelmente procedente da Malásia. A espécie mais importante é *Anacardium occidentale* por ser a única cultivada em escala comercial e apresentar o maior grau de dispersão em todo o mundo (WATSON & DALLWITZ, 1992).

Nos cerrados, a família Anacardiaceae está representada principalmente pelos gêneros *Anacardium*, *Lithraea*, *Schinus* e *Tapirira*. Na América Tropical, o gênero *Tapirira* é representado por *Tapirira guianensis*, que produz um óleo aromático. Uma característica peculiar da família Anacardiaceae é a presença de canais secretores nos órgãos vegetativos e reprodutivos. O material secretado tem reconhecido valor biológico, econômico e medicinal, justificando a proposta de

investigações que caracterizem a morfologia das estruturas secretoras e a composição química do exsudato (WATSON & DALLWITZ, 1992).

A família distingue-se de outras pela combinação de um disco intra-estaminal, com a presença de vasos resiníferos e o fruto drupáceo. Há dois centros vegetativos: um na Malásia e outro na América andina. Estendem-se da zona quente até ambas as zonas temperadas. No Brasil conhecem-se aproximadamente 40 espécies (CRONQUIST, 1981; RAVEN et al., 2004).

O urushiol é o nome dado a uma mistura de compostos fenólicos isolados de plantas da família Anacardiaceae (LU et al., 2004). Eles são compostos formados por um núcleo catecólico ligado a uma longa cadeia de ácido graxo (15 a 17 carbonos) (Figura 5). A função destas substâncias na planta é de proteção contra invasões de fungos ou vírus, além de funcionarem como unidades iniciadoras de outras substâncias vegetais, como os flavonóides. Os fenóis das anacardiáceas são vesicantes poderosos, e produzem severas dermatites quando em contato com a pele. Os urushióis são, *in vivo*, oxidados a quinóis que reagem com proteínas da pele para formar antígenos, provocando reações de hipersensibilidade (VICKERY & VICKERY, 1981).

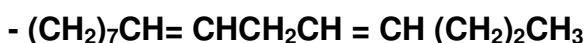
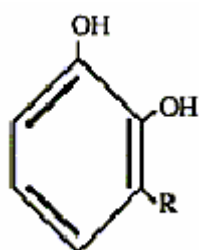


Figura 5. Estrutura dos urushióis

1.2.2. A espécie *Myracrodruon urundeuva*

O termo aroeira tem sido usado para designar plantas classificadas em três gêneros da família Anacardiaceae: *Lithraea*, *Schinus*, e *Myracrodruon*. A aroeira-do-sertão, ou aroeira-preta, é *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. (Figura 6; Tabela 1) que possui os sinônimos *Astronium juglandifolium* Griseb. e *Astronium urundeuva* Engl. Considerada madeira de lei, ela é muito densa, dura, elástica e resistente a cupins. Recebe excelente polimento e, quando seca, é de difícil trabalhabilidade; a madeira é muito pesada (densidade = 1,00 a 1,21 g/cm³), com textura média e uniforme, grã

irregular; o albúrnio é bem diferenciado do cerne e facilmente decomposto (MORAIS et al., 1999). Estudos realizados pelo Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT) indicam que um pedaço de aroeira-preta do tamanho de uma caixa de fósforos suporta seis toneladas de carga, sem se deformar. A madeira da aroeira suporta cerca de três vezes mais peso do que o concreto, sendo excelente para obras externas – como postes, moirões, esteios, estacas, vigas, armações de pontes e moendas de engenho – e na construção civil – como caibros, vigas, tacos, assoalhos, ripas e peças torneadas (MAINIERI & CHIMELO, 1989).

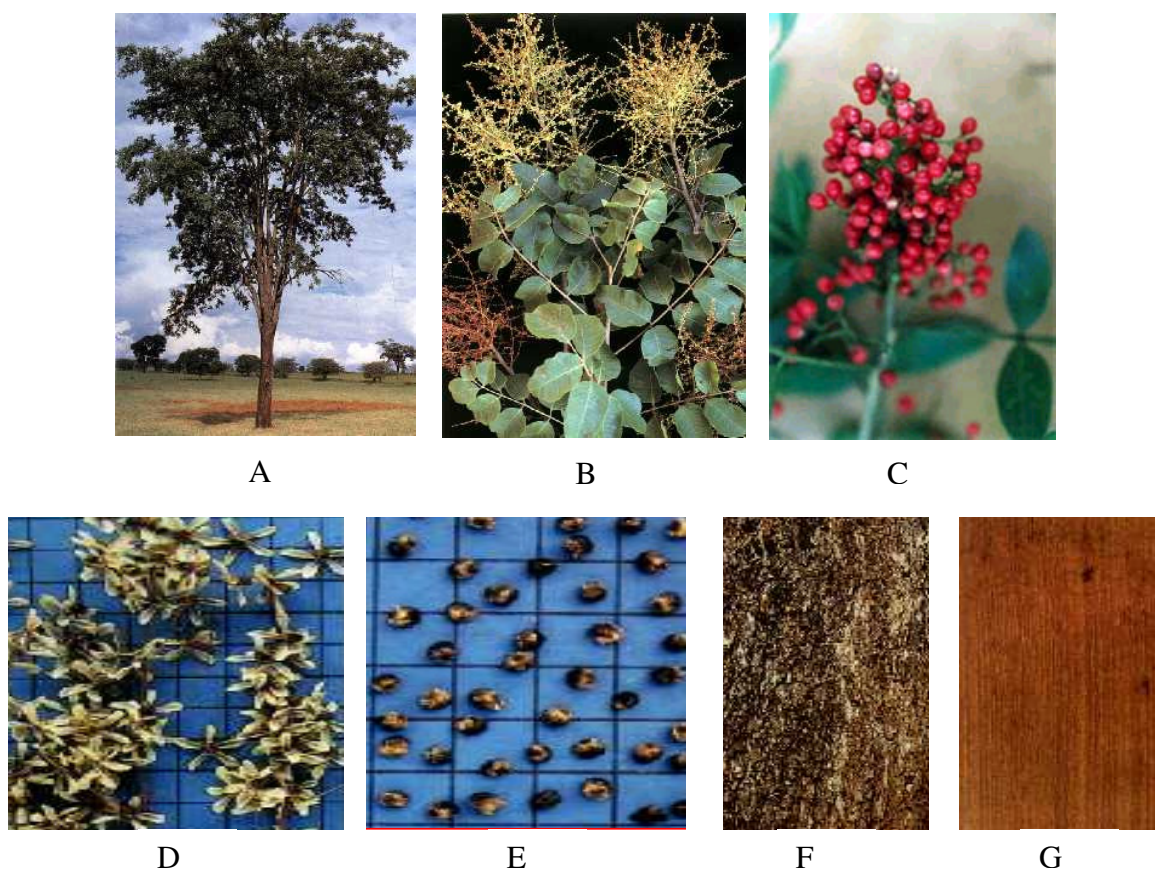


Figura 6. *Myracrodruon urundeuva*.

(A) Aspecto geral. (B) Folhas. (C) Inflorescência. (D) Frutos. (E) Sementes. (F) Casca. (G) Madeira.
Fonte: LORENZI, 2000.

A característica de durabilidade é encontrada em apenas 1 a 5 % das madeiras e menos de 1 % delas são muito duráveis. De acordo com testes realizados pelo IPT, a aroeira-preta foi classificada como muito durável e está incluída no grupo das madeiras chamadas imputrescíveis. Além das propriedades mecânicas que formam uma barreira física de proteção, existe também uma barreira química, formada pelos extrativos e outras substâncias, que possuem efeitos

fungicida e inseticida. Essas substâncias se formam principalmente no processo de transformação do alburno em cerne (MAINIERI & CHIMELO, 1989).

Tabela 1. Caracteres gerais da aroeira-preta / aroeira-do-sertão

Família	Anacardiaceae
Nome Científico	<i>Myracrodruon urundeuva</i>
Nomes Comuns	Aroeira, urundeuva, aroeira-preta, aroeira-do-sertão,
Crescimento	Arbóreo
Ocorrência	Cerrado, caatinga, cerrado,
Distribuição Geográfica	AL BA ES GO MA MG MS MT PB PE PI RJ RN SE SP
Floração	JUN JUL
Frutificação	SET OUT NOV
Utilizado para	Construção, Carvão, Arborização e Medicina
Dados do Caule (Figura 6A)	
Altura	6-14 m
Diâmetro do tronco	50-80 cm
Dados da Folha (Figura 6B)	
Tipo	Composta
Forma	Ovalada
Tamanho	8 x 16 cm
Dados da Flor (Figura 6C)	
Cor	Vermelha
Tipo	Inflorescência
Dados dos frutos (Figura 6D)	
Tipo do Fruto	Drupa
Estrutura	Carnoso
Dados das Sementes (Figura 6E)	
Tamanho	0,2 cm
Germinação	95 % após 40 dias

Fontes: LORENZI (2000); MAINIERI & CHIMELO (1989); MORAIS et al. (1999).

A aroeira tem de 6 a 14 m de altura no Cerrado e na Caatinga, e até 20-25 m em solos mais férteis da floresta latifoliada semi-decídua, com tronco de 50 a 80 cm de diâmetro. Ocorre desde o México a Argentina. No Brasil, esta espécie possui ampla distribuição do Maranhão até o Paraná e Mato Grosso do Sul, sendo mais freqüente nos estados de Minas Gerais, Bahia, São Paulo, Mato Grosso e Goiás. A copa é aproximadamente piramidal, perdendo as folhas durante o inverno. É uma planta característica de terrenos secos e rochosos, ocorrendo em agrupamentos densos. O nome aroeira é uma corruptela do nome “arara” e da terminação “eira”, significando “árvore da arara”, por ser uma árvore onde esta ave gosta de pousar e

viver. O nome “urundeuva” vem de um conceito guarani para “incorrutível na água” (LORENZI, 2000; ALMEIDA-CORTEZ et al., 2007).

Por causa de suas qualidades, é muito explorada e tornou-se escassa em todas as áreas de ocorrência. Está na lista oficial das espécies brasileiras, ameaçadas de extinção, na categoria vulnerável.

1.3. Estudo químico da aroeira-do-sertão

Estudo químico da aroeira-do-sertão foi realizado visando à caracterização das substâncias responsáveis pelas atividades terapêuticas da planta observadas, de início, nos levantamentos etnobotânicos já realizados e, posteriormente, através dos ensaios farmacológicos e clínicos aos quais a planta foi submetida. Várias tentativas de fracionamento dos extratos e purificação das substâncias isoladas, utilizando as técnicas usuais de fitoquímica, falharam, indicando que os constituintes desta planta são dotados de propriedades especiais que os tornam dificilmente separáveis pelos processos usuais.

Extrato de acetato de etila a partir de entrecasca da *M. urundeuva* triturada e previamente desengordurada por meio de lavagem exaustiva com hexano, foi fracionado, resultando na separação de sete frações úteis, das quais uma com predominância de duas substâncias de natureza chalcônica e outra constituída predominantemente de taninos condensados. Através de análises espectrométricas de RMN de ^1H e ^{13}C , foi elucidada a estrutura de duas chalconas diméricas (Figura 7) (BANDEIRA et al., 1993).

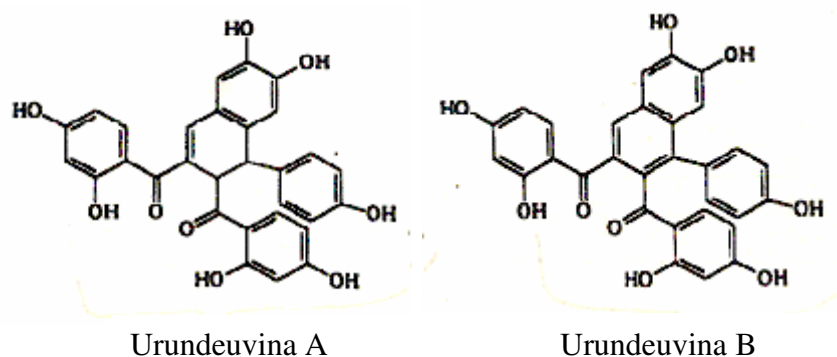


Figura 7. Chalconas isoladas de *Myracrodruon urundeuva*.

Além da entrecasca, as folhas de aroeira foram também analisadas quanto à presença de óleos essenciais, em razão de seu aroma típico. Foram identificados, por análises cromatográficas em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa, dezesseis constituintes voláteis, sendo o β -cariofileno (Figura 8) o principal, com um teor de quase 40 %. Dentre os óleos essenciais de folhas de outras anacardiáceas brasileiras, elas apresentam, em comum com aroeira, a presença de α -pineno (VIANA et al., 1995).

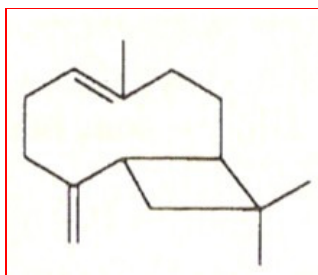


Figura 8. Estrutura química do β -cariofileno, óleo essencial das folhas de *Myracrodruon urundeuva*.

Além dos compostos químicos isolados de *M. urundeuva*, outras estruturas químicas também foram isoladas de outras espécies denominadas popularmente de aroeira, todas pertencentes ao gênero *Schinus*. Na Figura 9, apresentam-se substâncias isoladas de *Schinus lentifolius* (VIANA et al., 1995).

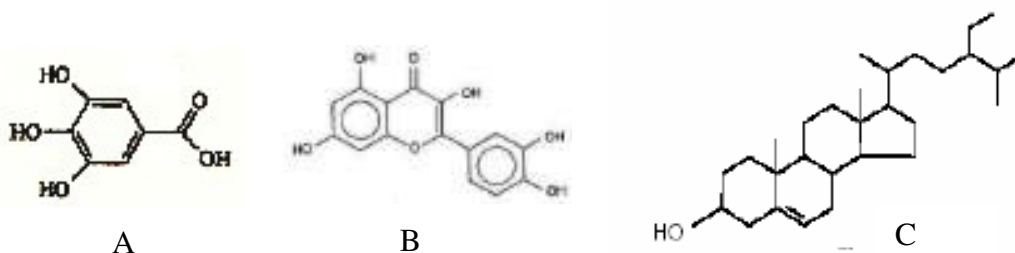


Figura 9. Constituintes químicos isolados de *Schinus lentifolius*.
(A) ácido gálico; (B) quercetina; (C) sitosterol.

1.4. Propriedades medicinais da aroeira

A indiscutível riqueza da flora brasileira, que desde muitos séculos tem despertado o interesse de pesquisadores em todo o mundo, é ressaltada principalmente pelos estudos etnofarmacológicos, abrangendo conhecimentos de

origem ameríndia, enriquecidos historicamente pelas presenças africanas e européias, a partir do século XVI. Estima-se hoje que o Brasil detém cerca de 20 % das espécies de plantas de todo o mundo, somente na região Amazônica, acrescentando-se ainda a Mata Atlântica e a região do Cerrado, podendo esta última ser depositária, talvez, do maior potencial terapêutico do nosso patrimônio vegetal (SANDES & DI BLASI, 2000; XAVIER, 1991).

Em meio ao crescente número de trabalhos envolvendo as plantas medicinais, publicados no mundo inteiro, as plantas conhecidas como aroeira se destacam pelo uso popular, que, no Brasil, remonta ao período colonial, já sendo citadas por Guilherme Piso no século XVII, que as comparou ao lentisco (*Pistacia lentiscus*), observando o uso que se fazia então, entre outros, na conservação de carnes frescas, provavelmente resultante de uma atividade antimicrobiana (PISO, 1658).

A aroeira, presente já na primeira edição da Farmacopéia Brasileira, era utilizada pelos nativos mesmo antes da chegada dos escravos negros, ou dos colonizadores brancos, quando teve seu uso consagrado na medicina popular. Todas as partes da planta aparecem com várias indicações, porém a casca do caule, sob forma de infuso, é um dos remédios vegetais mais utilizados pela medicina popular, com indicações tanto para febres e hemoptises, como para o tratamento de vários processos inflamatórios e infecciosos, inclusive no aparelho digestivo, tais como úlceras, gastrites e diarreias (NAPRALERT, 2001).

Gonzalez Torres (1986), ressaltando o emprego medicinal da aroeira, cita Guilherme Piso, que indicava o uso das folhas como febrífugo, balsâmico e anti-reumático, sendo o principal ingrediente do “Bálsamo das Missões” dos jesuítas missionários. Conceição (1982) refere-se às propriedades excitante, antireumática e adstringente. Cruz (1964), Moreira et al. (1994), Sanguineet (1989) e Coimbra (1994) fazem referências às suas propriedades tônica e adstringente, indicando o cozimento das cascas para o tratamento de feridas, “tumores” e inflamações em geral, como emoliente, e ainda como antidiarréica. Coimbra (1994) também se refere a várias formas de preparo da aroeira, como infuso, extrato fluido, tintura e xarope, indicados como balsâmicos e adstringentes e empregados nas doenças das vias urinárias, como blenorragias, cistites e uretrites ou para doenças das vias respiratórias, tais como tosse, bronquite, resfriados e gripes.

Silva (1999), em triagem com produtos desenvolvidos a partir da aroeira utilizados para tratar infecções ginecológicas, encontrou uma eficácia semelhante em comparação com tratamento convencional entre diversos grupos de voluntárias tratadas, concluindo que apesar de não ter significância estatística, teria por vantagem, pelo menos, o baixo custo do tratamento.

1.5. Atividades biológicas da aroeira-do-sertão

Além das atividades biológicas aproveitadas pela medicina tradicional e popular, a aroeira-do-sertão apresenta outras propriedades interessantes avaliadas em laboratório.

Viana et al. (1988) mostraram que a fração rica em taninos isolados de entreasca de *Myracrodruon urundeuva* possuía efeitos antiinflamatório e analgésico em camundongos. Viana et al. (2003) isolaram chalconas da aroeira preta e constataram que estes compostos químicos também possuíam os mesmos efeitos que as frações tânicas isoladas deste vegetal. Extrato metanólico da casca de *M. urundeuva* apresentou elevada atividade antioxidante in vitro (DESMARCHELIER et al., 1999)

Rodrigues et al. (2002), pesquisando a ação do extrato aquoso da aroeira-do-sertão sobre a colite difusa induzida por ácido acético, em ratos, observaram que este extrato tinha efeito antiinflamatório e antilulcerogênico. Os resultados encontrados comprovam que a aroeira-do-sertão apresenta importantes propriedades farmacológicas, tais como inibição da permeabilidade vascular e de lisossomos e um antagonismo direto para alguns dos mediadores inflamatórios, como a histamina e a bradicinina.

Quatro modelos experimentais de inflamação são geralmente utilizados para avaliar a potência antiinflamatória em extratos hidroalcoólico de *M. urundeuva*: inflamação subaguda induzida por formaldeído, inflamação aguda induzida por carragenina, inflamação subaguda induzida por nistatina e inflamação aguda induzida por ácido acético (VIANA et al., 2003). Chalconas isoladas do extrato acetato de etila da aroeira do sertão, mostraram ser eficientes sobre o processo inflamatório e analgésico induzidos com ácido acético e formaldeído em ratos (VIANA et al., 1995).

A eficácia antidiarréica do extrato etanólico foi estudada como modelo experimental de diarreia induzida por óleo de rícino. O extrato da aroeira, nas doses de 200 mg/kg não modificou o trânsito intestinal induzido pelo óleo de rícino, enquanto, na dose de 400 mg/kg via oral, produziu uma inibição significativa (15 %). A clorpromazina, droga padrão, demonstrou um efeito mais potente (51 % de inibição) (VIANA et al., 1988).

Paes et al. (2001) mostraram que o cerne da aroeira-do-sertão apresentou melhor resistência ao ataques de cupins subterrâneos (*Nasutitermes corniger*) e fungos que atacam madeiras (*Postia placenta* e *Neolentinus lepideus*) em relação ao ipê (*Tabebuia impetiginosa*) e à cássia (*Senna Siamea*). A resistência da madeira de *Myracrodruon urundeuva* tem sido estudada, com o objetivo de se esclarecer os mecanismos envolvidos, principalmente do ponto de vista químico, partindo da descoberta de substâncias envolvidas nos processos de defesa dessa planta.

1.6. Interações entre plantas e seus predadores: defesas mecânicas e defesas químicas

As plantas, assim como os animais, estão sujeitas durante todo seu ciclo de vida ao ataque de microorganismos causadores de doenças. Por serem organismos sedentários representam um substrato extremamente atrativo para o desenvolvimento de patógenos que podem comprometer seu desenvolvimento normal, causando inclusive sua morte. Apesar disso, em ambientes naturais de mata e cerrado, o aparecimento de doenças em plantas é um evento raro, graças à existência de mecanismos de proteção que conferem resistência à maioria dos patógenos vegetais. Em resposta ao ataque de herbívoros, as plantas podem armar suas partes mais atraentes ou mais expostas com defesas mecânicas, como espinhos ou pêlos que cortam ou irritam a pele e produzem dor. A urtiga (*Urtica dioica*) é um exemplo de planta que usa contra os predadores uma combinação de defesa mecânica e química. Os pêlos existentes nas folhas da urtiga são reservatórios de venenos, cuja química inclui as aminas serotonina, histamina e acetilcolina. As defesas químicas empregadas pelas plantas contra seus predadores podem incluir desde simples toxinas até substâncias que interferem com o ciclo de crescimento e de reprodução de insetos (DIAS, 2000).

Espécies silvestres de plantas contêm, muitas vezes, toxinas com as quais conseguem controlar o ataque de herbívoros. A *Asclepia curassavica*, por exemplo, é conhecida por causar vômitos e ataques cardíacos súbitos, sendo responsável pela morte de muitos animais em fazendas. Quando essas plantas passam a ser cultivadas, as toxinas vão sendo eliminadas através do melhoramento genético e as plantas perdem sua defesa natural (THALER et al., 1999).

Os extrativos de madeiras de plantas são conhecidos por aumentar a durabilidade. Madeiras resistentes são ricas em extrativos que estão envolvidos na resistência natural (BRAND et al., 2006). Essas substâncias podem ser tóxicas a xilófagos (HARUN & LABOSKY, 1985; HWANG et al., 2006) e proteger as madeiras do ataque de fungos (BECERRA et al., 2002; BRAND et al., 2006). Schultz & Nicholas (2002) sugeriram que há uma ação sinérgica entre os extrativos e outras substâncias bioativas, como os antioxidantes, que agem juntos para proteger o cerne da degradação.

Os antioxidantes protegem o organismo da ação dos radicais livres (por exemplo, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, como o radical hidroxil e peroxinitrito, ONOO^-) e da sua produção não controlada *in vivo*, que pode provocar danos em lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (BECKEMAN, 1996; MAN, 1992; MONTINE et al., 1997; SOLER-RIVAS et al., 2000).

Muitas substâncias de plantas como compostos fenólicos e nitrogenados, carotenóides e o ácido ascórbico têm potente capacidade antioxidante e são encontrados em alta concentração nas células (ARGOLO et al., 2004). Compostos antioxidantes nas plantas são induzidos em resposta a fatores que possam elevar a concentração de espécies reativas de oxigênio e outros radicais livres, como infecções por fitopatógenos, estresse hídrico e variações sazonais de temperatura e luminosidade (BRAY et al., 2000; BULBOVAS et al., 2005; KUK et al., 2003).

Além dos radicais livres poderem causar danos às plantas, eles também agem mediando reações envolvidas em alguns processos degenerativos e patológicos em humanos. Radicais livres eventualmente causam aterosclerose, angina, câncer (SOLER-RIVAS et al., 2000; KEIS, 1995), artrite reumatóide, doenças intestinais inflamatórias e doença de Parkinson (LIPWORTH et al., 1997). Adicionalmente estão envolvidos na deterioração de alimentos (HALLIWEL & SUSANNA, 1996). O desenvolvimento de novos e potentes antioxidantes desempenha um importante papel na terapia de distúrbios neurodegenerativos com

a doença de Alzheimer na qual o stress oxidativo vem sendo implicado (MARKESBERRY, 1997; ZHANG & WANG, 2002).

Catequinas, polifenóis antioxidantes e anticancerígenos encontrados em chá verde, carne de porco e de galinha, peixes, vegetais e gordura animal têm a capacidade antioxidante equivalente a do α -tocoferol (CHOI et al., 2001; SANTOS et al., 2005). A atividade de capturar radicais livres por antioxidantes fenólicos é essencialmente determinada pela força das pontes de hidrogênio (HALLIWEL & SUSANNA, 1996).

Taninos encontrados em legumes têm sido associados com a diminuição do aproveitamento da dieta, taxa de crescimento e digestibilidade protéica em animais experimentais (TANG et al., 2002). Contudo, a detecção de sua atividade antioxidante tem boas implicações para a saúde humana (CHUNG et al., 2001). Usados como modelo de polifenóis antioxidantes derivados de plantas (AL-MAMARY et al., 2001), exercem vários efeitos biológicos: atividade anti-inflamatória (VARANKA et al., 2001), potente atividade anti-tumoral (DESMARCHELIER et al., 1999) ou carcinogênica (GALI et al., 1992), inibição do crescimento de fungos, leveduras, bactérias e vírus, aceleração da coagulação sangüínea, redução da pressão sangüínea e diminuição dos níveis de lipídeos no soro. Contudo, altas concentrações de taninos podem induzir necrose no fígado (KAPADLA et al., 1976) bem como, podem agir como toxinas e/ou inibidores da digestão (HOLLIMAN, 1985).

Segundo Haslam (1989), o termo "tanino" designa os metabólitos secundários de natureza polifenólica extraídos de plantas (taninos vegetais) que foram classificados em dois grupos: as proantocianidinas, que são os taninos condensados, responsáveis pelas características normalmente atribuídas a estas substâncias, como adstringência e precipitação de proteínas, e os taninos hidrolisáveis, que são ésteres do ácido gálico e seus dímeros (ácido digálico e elágico) com monossacarídeos, principalmente a glicose.

De acordo com Santos & Mello (1999), taninos de plantas compreendem os produtos naturais e fenólicos baseados no ácido gálico (taninos hidrolisáveis) ou poliflavonóides (taninos condensados). Ainda segundo este autor, as plantas apresentam uma habilidade natural de defesa contra os seus inimigos naturais, e esta capacidade de defesa estaria ligada à presença dos taninos. Os taninos hidrolisáveis seriam responsáveis pela defesa das plantas contra os herbívoros e os taninos condensados iriam assegurar a defesa contra microorganismos patogênicos.

Quanto à ação dos taninos hidrolisáveis sobre os herbívoros, Harborne (1991) relatou que estes compostos estariam implicados no processo digestivo destes animais, dificultando-o em decorrência da complexação dos taninos com certas proteínas ligadas à produção de enzimas digestivas.

Além dos taninos, outras substâncias têm sido relacionadas a mecanismos de defesa das plantas, como as fitoalexinas, como será mostrado a seguir, e as lectinas, que serão consideradas mais adiante.

1.6.1. Fitoalexinas

A idéia de que as plantas possuem um sistema de defesa semelhante ao sistema imunológico dos animais é bastante antiga, tendo surgido no final do século IX. Entretanto, evidências de que elas respondem ao ataque de microrganismos, alterando seu metabolismo e sintetizando substâncias capazes de protegê-las das doenças, só foram obtidas por volta de 1940. Estudos realizados na Alemanha com cultivares de batata atacados por fungos levaram à descoberta de que as plantas resistentes acumulavam substâncias de defesa, o que não ocorria nas plantas suscetíveis à doença (SILVA & BRAGA, 2004). Estas substâncias foram denominadas de fitoalexinas (do grego *phyton* = planta e *alexin* = composto que repele) e sua descoberta causou mudanças no conceito de resistência de plantas a patógenos (FLORES et al., 2005).

Ao contrário dos anticorpos sintetizados pelos animais, as fitoalexinas não são proteínas, não apresentam especificidade e não imunizam a planta. São produtos, ausentes na planta sadia que se acumulam temporariamente no local e nos arredores da infecção. Possuem atividade inibidora sobre bactérias, fungos, nematóides e efeito tóxico para animais e para as próprias plantas. Podem ser acumulados em resposta a vários microrganismos, mas também como consequência de fatores que causam estresse na planta, como ferimentos e exposição a substâncias tóxicas (BRAGA et al., 1991).

A primeira fitoalexina caracterizada quimicamente foi a pisatina (Figura 10), isolada de plantas de ervilha *Pisum sativum* (CRUICKSHANK & PERRIN, 1960). Desde sua descoberta, diversas outras fitoalexinas tem sido obtidas de plantas cultivadas como feijão, soja, ervilha, batata, tomate, alface, algodão, arroz, cevada e banana.

Acredita-se que a maioria das plantas seja capaz de sintetizar fitoalexinas, mas algumas fazem de maneira muito lenta, permitindo que o microorganismo

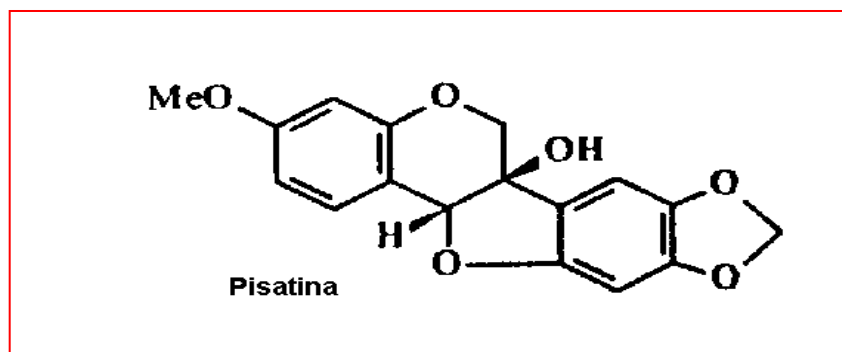


Figura 10. Pisatina, a primeira fitoalexina isolada e caracterizada.

complete a infecção antes que haja o acúmulo dessas substâncias em quantidades suficientes para inibi-lo. Isso significa que a velocidade de acúmulo das fitoalexinas é um dos fatores decisivos para o estabelecimento ou não da infecção na planta.

A produção de fitoalexinas sofre a influência de diversos fatores, como umidade, disponibilidade de água e temperatura. Em plantas nativas crescendo em ambiente natural, como *Tocoyena formosa*, uma rubiácea de cerrado, a síntese de fitoalexinas varia nas diferentes estações do ano, sugerindo uma adaptação do sistema de defesa às flutuações ambientais (BRAGA et al., 1991).

Folhas, caules, raízes, sementes, flores e frutos podem sintetizar fitoalexinas em resposta à presença de um patógeno. As sementes parecem ser particularmente sensíveis à presença de microorganismos, sintetizando fitoalexinas em grandes quantidades. Como a semente representa o principal meio de dispersão e propagação da maioria plantas, a produção de substâncias de defesa durante a germinação e o crescimento inicial da planta pode ser fundamental para garantir que uma determinada espécie possa sobreviver e crescer em ambientes de mata e cerrado, onde a presença de microorganismos e a limitação de fatores como nutrientes, água e luz tornam esses ambientes altamente competitivos (BRAGA et al., 1991).

O estudo da síntese de fitoalexinas, especialmente em espécies nativas de ambientes tropicais, abre enormes possibilidades para a descoberta de substâncias naturais que possam ser utilizadas como modelo para a síntese química de novos defensivos agrícolas.

Além das possibilidades já mencionadas, a síntese de fitoalexinas constitui uma das mais rápidas e dramáticas respostas metabólicas das plantas. A análise da produção dessas substâncias de defesa representa uma oportunidade única de estudar eventos metabólicos e novas rotas de biossíntese além de compreender como os vegetais, sobrevivem em um ambiente altamente competitivo resistindo ao ataque de microrganismos causadores de doenças (MARGIS-PINHEIRO et al., 1999).

Por outro lado, algumas espécies que reconhecidamente não produzem fitoalexinas, como é o caso do café, já possuem naturalmente outras substâncias de defesa e que são suficientes para impedir o ataque de alguns patógenos. Isso indica que a produção de fitoalexinas parece ter sido selecionada como principal estratégia de defesa apenas em algumas plantas, sendo outros mecanismos de resistência encontrados em plantas que não acumulam fitoalexinas.

1.6.2. Alelopatia

A noção de que as plantas têm a capacidade de interferir no desenvolvimento de outras, por meio de substâncias que liberam na atmosfera ou no solo, remonta à Antigüidade. Já no século III a.C., o grego Teofrasto, autor de um tratado sobre Botânica conhecido pela versão latina "De Plantis", recomenda que não se cultive a couve junto da videira, pois os "odores" da primeira prejudicam o desenvolvimento da segunda. Mais tarde, no século I a.C., o poeta romano Virgílio refere-se ao efeito da queima que o linho e a papoula dormideira provocam nas culturas instaladas em seguida no mesmo terreno (DURIGAN & ALMEIDA, 1993).

Em 1925, pela primeira vez a ciência começou a explicar as causas do fenômeno, quando A.B. Massey observou que morriam todos os tomates plantados a uma distância de até 16 m do tronco de *Juglans* (nogueira), enquanto os tomates plantados além dessa distância se desenvolviam bem. Como essa distância coincidia com a extensão das raízes da noqueira, ele supôs que as raízes liberassem no solo uma substância tóxica para outras plantas. Depois se descobriu que a área da copa da árvore também influía no fenômeno e demonstrou-se que as folhas da noqueira produziam uma substância que era extraída pela umidade e que, ao penetrar no solo, sofria hidrólise e oxidação, transformando-se em uma naftoquinona, toxina que recebeu o nome juglona (SOUZA FILHO & ALVES, 2002).

O termo "alelopatia" foi criado em 1937, pelo pesquisador alemão Hans Molisch, com a reunião das palavras gregas "*allelon*" e "*pathos*", que significam respectivamente, *mútuo* e *prejuízo*. Alelopatia é "a capacidade das plantas, superiores ou inferiores, produzirem substâncias químicas que, liberadas no ambiente de outras, influenciam de forma favorável ou desfavorável o seu desenvolvimento". O conceito engloba atualmente o reino animal, com o reconhecimento de que a alelopatia se processa também entre plantas e animais (RICE, 1984). As interferências alelopáticas raramente são provocadas por uma única substância. A forma de atuação dos compostos alelopáticos também não é específica. As funções prejudicadas com maior frequência são a assimilação de nutrientes, o crescimento, a fotossíntese, a respiração, a síntese de proteínas, a permeabilidade da membrana celular e a atividade enzimática (RICE, 1979; RICE, 1984).

Presentes em todos os seres vivos, as substâncias alelopáticas são encontradas em maior quantidade e diversidade nas plantas. Distribuem-se por todos os seus órgãos de maneira não-uniforme, mas geralmente a concentração é maior na epiderme das folhas e nas raízes. Na natureza, a alelopatia confunde-se com outras interferências existentes entre as plantas, como a competição e, por isso, alguns autores colocam sua existência em dúvida. Os dois conceitos, porém, são bastante distintos: enquanto a competição se dá pela retirada ou redução de fatores do meio ambiente, como água, nutrientes e luz, a alelopatia se caracteriza pela introdução de novos fatores - os compostos químicos - no ambiente (SILVA, 1978).

A função principal das substâncias alelopáticas é a proteção dos organismos que as produzem. A condição natural dos seres vivos é a de serem saudáveis, o que é propiciado, em grande parte, pela presença de produtos secundários que os defendem dos inimigos. A identificação dessas substâncias, em diversas culturas, auxilia os especialistas em melhoramento genético na criação de genótipos mais resistentes a bactérias, fungos e insetos.

O emprego prático da alelopatia pode não levar ao controle total das espécies prejudiciais, sejam elas fungos, insetos ou ervas. A ação dos produtos secundários é essencialmente inibidora, reduzindo populações ou afetando o desenvolvimento e o vigor dos organismos atingidos. No entanto, se esta inibição ajudar a manter o

equilíbrio biológico das espécies, sem causar dano às culturas ou ao meio ambiente, estará sendo atingido o almejado objetivo ecológico (MÜLLER & BÖRGER, 1940).

1.7. Controle de insetos por substâncias naturais

1.7.1. Inseticidas Naturais

O aparecimento dos pesticidas químicos, à primeira vista, pareceu ser a melhor solução para o controle de pragas agrícolas, mas experiências mostraram que insetos sob o tratamento intensivo dos inseticidas passaram a ser tolerantes, tornando-se necessário o aumento das doses e a aplicação com maior frequência dos produtos químicos. Desta forma, o uso freqüente de inseticidas tem resultado na quase extinção de parasitas e predadores, ao mesmo tempo em que tem aumentado a quantidade de pestes existentes. Esta seqüência de eventos e a preocupação com o impacto de inseticidas inorgânicos e/ou sintéticos no ambiente têm estimulado a busca por compostos que ocorram naturalmente e que possam atuar como substâncias tóxicas aos insetos. Várias substâncias orgânicas extraídas de tecidos vegetais têm sido avaliadas quanto à sua atividade pesticida (SAXENA, 1989; CAVALCANTE et al., 2006). Jacobson (1989) incluiu as espécies da família Anacardiaceae entre as mais promissoras fontes vegetais de substâncias inseticida.

As plantas não aceitam de modo passivo as agressões que sofrem de vírus, bactérias, insetos e demais organismos ou de agentes não-biológicos como radiação, temperaturas extremas, poluição e outros. Para sobreviver, durante sua evolução, elas desenvolveram mecanismos de resposta a danos e doenças, acionados assim que reconhecem a agressão. Por apresentarem um certo grau de resistência a insetos, tem-se estudado a biossíntese e a regulação de compostos químicos associados com essas defesas. O tubo digestivo é o alvo principal destes compostos, por ser a maior região de contato entre os insetos e o meio ambiente (SIMAS et al., 2004).

No que concerne à defesa contra herbívoros, as plantas desenvolveram dois tipos de defesa, a direta e a indireta. Na defesa direta estão envolvidas substâncias como sílica, metabólitos secundários, enzimas e proteínas, além de órgãos como tricomas e espinhos que afetam diretamente a atividade do inseto. Na defesa

indireta estão envolvidas substâncias emitidas pela planta, que atraem parasitas e predadores de insetos fitófagos (RYALS et al., 1994; BALDWIN et al., 2001).

A resistência de algumas plantas ao ataque de insetos pode ser mediada por metabólitos primários (e.g., inibidores de proteinases e amilases, tioninas e lectinas) e secundários (e.g., alcalóides, taninos e rotenóides) (PEUMANS & VAN DAMME, 1995; CHRISPEELS & RAIKHEL, 1991; MELLO & SILVA-FILHO, 2002).

Os inseticidas piretróides são derivados sintéticos das piretrinas – ingredientes de inseticidas preparados a partir das flores do gênero *Chrysanthemum* (GODFREY, 1995). As aplicações incluem o controle de muitos vetores de doenças, como os mosquitos da malária, moscas tsé-tsé e moscas pretas, além do uso em setores urbanos para o controle de pestes como baratas, pulgas e percevejos. No campo veterinário são usados no controle de parasitas externos do gado, *Boophilus microplus*. São considerados como uma classe mais segura de pesticidas, pela sua pequena persistência no meio ambiente e baixa toxicidade para o homem. Os compostos mais conhecidos são: cadetrina, permetrina, tetrametrina, bartrina, deltametrina e resmetrina (Figura 11).

Diversas pesquisas têm demonstrado a viabilidade do uso de pós e óleos vegetais (LIU & HO, 1999; HAQUE, 2000) e substâncias inertes (BANKS & FIELDS, 1995) no controle de insetos como *Sitophilus zeamais* (Coleoptera, Curculionidae), uma das principais pragas do milho e de outros cereais armazenados, devido ao seu efeito, facilidade de obtenção, baixo custo e segurança para aplicadores e consumidores (OLIVEIRA & VENDRAMIM, 1999).

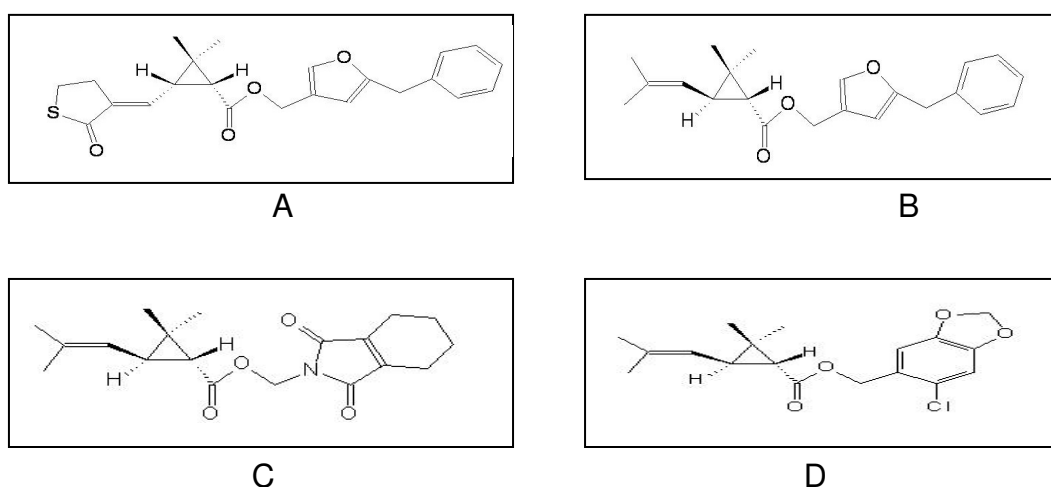


Figura 11. Exemplos de piretróides.
Cadetrina (A), resmetrina (B), tetrametrina (C) e bartrina (D).

A terra de diatomáceas, obtida de algas fossilizadas, possui como principal ingrediente ativo o dióxido de sílica (KORUNIC, 1997). Esta substância tem capacidade de desidratar os insetos-praga, matando-os em um período variável de um a sete dias. Trata-se de um produto que, apesar da elevada persistência residual, tem baixa toxicidade para mamíferos (FIELDS & KORUNIC, 2000).

Entre outros defensivos encontrados em tecidos vegetais, incluem-se as proteínas. Muitas famílias de plantas possuem inibidores de proteinases encontradas em seus órgãos reprodutivos, órgãos de reserva e tecidos vegetativos. A maioria desses inibidores são moléculas pequenas, estáveis e abundantes, podendo atuar como proteínas de reserva, como reguladores de enzimas endógenas e também parecem estar envolvidos nos processos de defesa de plantas contra o ataque de pragas e/ou patógenos (RYAN, 1990).

O mecanismo pelo qual os inibidores de proteinases interferem no processo digestivo dos insetos se deve à diminuição da assimilação de nutrientes. Em algumas ordens de insetos, como dípteros e isópteros, a luz do trato digestivo é revestida por uma estrutura quitinosa, acelular, chamada membrana peritrófica. As enzimas digestivas são produzidas por células epiteliais que revestem o trato digestivo, atravessando a membrana peritrófica, para então atuar sobre os alimentos na luz intestinal.

As lectinas ligam-se especificamente a resíduos de carboidratos e outros gliconjugados na superfície de células. Ligam-se à membrana peritrófica, às células epiteliais do trato digestivo ou a enzimas glicosiladas do inseto, interferindo no processo digestivo. As enzimas quitinases podem ter ação inseticida por destruírem a membrana peritrófica (PEUMANS & VAN DAMME, 1995; CARLINI & GROSSI-DE-SÁ, 2002). Desta forma, quando insetos são submetidos a uma dieta artificial que contenha inibidores específicos para glicohidrolases ou proteinases e lectinas estes têm seu crescimento e desenvolvimento retardados, bem como podem apresentar índices de mortalidade bastante significantes (McMANUS & BURGESS, 1995; CUNHA et al., 2005; POLANCZYK et al., 2003).

1.7.2. Cupins

Os cupins ou térmitas (do latim, *termes* = verme da madeira) são insetos eussociais da ordem Isoptera (do grego, *isos* = igual, *ptera* = asas, ou seja, dois

pares de asas semelhantes). Restos fossilizados destes insetos já foram encontrados em formações geológicas datadas de 55 milhões de anos. Estão representados nas Américas por cerca de 90 gêneros distribuídos em 5 famílias, com cerca de 640 espécies. Registram-se no Brasil cerca de 290 espécies em 67 gêneros (FLORÊNCIO & DIEHL, 2006).

Ocorrem principalmente em regiões tropicais e subtropicais, com algumas espécies sendo encontradas em lugares de clima temperado e outras em regiões desérticas. Dependendo do habitat e do gênero, os cupins podem nidificar em diversos locais, construindo seus ninhos no interior de árvores (raízes, troncos), de móveis ou de estruturas de edificações; em troncos e paus em decomposição; e no solo (subterraneamente ou exteriormente em forma de montículos), com formatos e tamanhos diversificados (KAMBHAMPATI & EGGLETON, 2000; ZANETTI, 2002).

Vivem em colônias em sistema de cooperação mútua, onde os indivíduos são divididos em castas: a dos reprodutores, formada basicamente pela rainha, rei e reprodutores alados (siriris ou aleluias); a casta dos operários, a dos soldados, e outras castas menores (ZANETTI, 2002; KOSHIKAWA et al., 2002).

Os soldados são morfologicamente bem diferentes dos operários e são os responsáveis pela defesa da colônia, apresentando muitas adaptações para esta função. Por exemplo: as mandíbulas podem ser muito desenvolvidas (defesa mecânica), de variadas formas, simétricas ou assimétricas; podem apresentar glândulas especiais que produzem substâncias usadas na defesa química (HOJOA et al., 2002). Os soldados não realizam outras tarefas na colônia e são alimentados pelos operários.

O papel ecológico dos térmitas é dos mais importantes. Juntamente com as formigas, constituem e interagem com enorme parte da biomassa nos ecossistemas tropicais, habitando desde áreas de vegetação aberta como o cerrado até as florestas tropicais, funcionando como consumidores primários e decompositores, atuando na reciclagem dos nutrientes acumulados nos tecidos vegetais. Também promovem benefícios no solo, aerando, drenando e transportando nutrientes (VASCONCELLOS et al., 2005).

Entretanto, cerca de 10% das espécies conhecidas de isópteros estão registradas como pragas. A tabela 2 apresenta gêneros e espécies atuais que ocorrem no Brasil e no Mundo e são consideradas espécies-praga.

Tabela 2. Listagem de gêneros de cupins que ocorrem no Brasil, nas Américas e no mundo e são considerados como espécies-praga (MILANO & FONTES, 2002).

Família / Subfamília	Gêneros	Nº de espécies		
		Mundo	Américas	Brasil
Família Kalotermitidae	<i>Incisitermes</i>	28	20	1
	<i>Tauritermes</i>	3	3	2
	<i>Cryptotermes</i>	54	16	4
Família Rhinotermitidae	<i>Coptotermes</i>	76	5	3
	<i>Heterotermes</i>	49	9	4
Família Serritermitidae	-	-	-	-
Família Termitidae / Subfamília Apicoterminae	-	-	-	-
Família Termitidae / Subfamília Nasutitermitinae	<i>Nasutitermes</i>	241	72	47
	<i>Cornitermes</i>	15	15	10
	<i>Cortaritermes</i>	3	3	1
	<i>Armitermes</i>	12	12	9
	<i>Embiratermes</i>	14	14	8
	<i>Procornitermes</i>	6	5	5
	<i>Rhynchotermes</i>	6	6	5
	<i>Syntermes</i>	27	23	20
Família Termitidae / Subfamília Termitinae	<i>Amitermes</i>	104	17	3
Família Termopsidae	-	-	-	-

O principal dano causado pelos cupins é consequência da sua capacidade de “digerir” celulose. A celulose é digerida por protozoários flagelados e bactérias que vivem no tubo digestivo desses animais. Esta associação é um excelente exemplo de simbiose. Os simbiossitos protozoários ocorrem em todas as famílias, exceto em Termitidae. Várias espécies de cupins são pragas agrícolas nos trópicos, alimentando-se de várias partes de plantas cultivadas, constituindo ameaças a plantações de cana-de-açúcar, eucalipto, frutíferas, entre outras (ZANETTI, 2002; FROHLICH et al., 2007).

A biodegradação por cupins é um dos problemas mais sérios para a utilização da madeira. Sabe-se também que os térmitas danificam uma variedade de materiais

que variam de telas de papel a materiais não-celulósicos tais como o betume do asfalto e folhas de metal (CHENG et al., 2007).

Os problemas com cupins vêm crescendo e causando prejuízos cada vez maiores em diversas áreas urbanas no Brasil e no mundo. Provavelmente o impacto ambiental provocado pelo processo de urbanização e a elevada plasticidade biológica dos cupins têm contribuído para este aumento. Os danos às estruturas de madeira e a outros materiais celulósicos causados por térmitas chegam a mais de US\$ 3 bilhões em todo o planeta, anualmente.

Controlar cupins é, certamente, um dos mais difíceis desafios técnicos enfrentados pelos profissionais de controle de pragas do mundo inteiro. O sucesso no controle de qualquer praga (e, em especial, as de cupins) depende diretamente do nível de conhecimento sobre a biologia e comportamento das espécies-alvo. Destacam-se como altamente prejudiciais à economia e em áreas domiciliares e peridomiciliares, os gêneros *Coptotermes*, *Heterotermes*, *Nasutitermes*, *Cryptotermes* e *Syntermes*, entre outros (SU & SCHEFFRAHN, 1990).

O método convencional de combate aos cupins tem como princípio a utilização de produtos químicos. Os inseticidas atuais, principalmente organofosforados e piretróides, apresentam toxicidade para o homem e outros seres vivos e risco de contaminação ambiental. Para evitar os problemas ambientais de poluição e saúde causados pelo uso de preservativos ou de pesticidas sintéticos, o interesse pelo uso de substâncias naturais, não-tóxicas ao homem e a outros animais, tem aumentado (CHANG et al., 2001). As madeiras-de-lei, resistentes ao ataque de cupins, constituem potenciais exemplos de fontes alternativas de compostos destinados ao controle de térmitas (CAVALCANTE, 1982).

Atualmente, a espécie de maior expressão urbana é *Coptotermes havilandi*, bastante conhecida pelo comportamento voraz, agressivo e com alto poder de destruição patrimonial. Entretanto, um outro importante grupo de cupins vem sendo favorecido pelo desequilíbrio ambiental provocado pelo homem. Os *Nasutitermes* (Termitidae) são mundialmente conhecidos por causarem danos em diversas peças de madeiras e em construções, demonstrando sinais de acentuada nocividade, infestando residências, cercas e árvores, em decorrente do desequilíbrio causado pela ocupação inadequada pelo homem (FIGUEIREDO, 2004; FILHO et al., 2006; MIURA et al., 2000).

O gênero *Nasutitermes* tem distribuição mundial e é um dos mais ricos em espécies. O número de indivíduos em um ninho (Figura 12) pode chegar a três milhões e a longevidade máxima das colônias de *Nasutitermes*, é de 40 a 80 anos. No Brasil, esse grupo tem ampla distribuição. Enquanto gênero, são morfologicamente bem diferenciados da grande maioria dos cupins pelo aspecto bem característico da cabeça nos soldados (Figura 13), mas a classificação ao nível de espécie não é uma tarefa fácil (KAMBHAMPATI & EGGLETON, 2000; MIURA et al., 2000; CONSTANTINO, 1992; SCHEFFRAHN et al., 2002).



Figura 12. Ninho de *Nasutitermes corniger*.

Os ninhos de *Nasutitermes* podem apresentar padrões endógenos ou exógenos. Em seu ambiente natural, os *Nasutitermes* geralmente são cupins arbóreos, construindo seus ninhos em troncos. Algumas espécies também constroem ninhos diretamente no solo ou no sistema radicular. Todos esses casos são exemplos de padrões endógenos. Já no meio urbano, eles constroem seus ninhos preferencialmente em telhados, forros e vãos estruturais, afastados da superfície do solo, caracterizando um padrão exógeno. Os *Nasutitermes* também são capazes de caminhar sobre o solo em trilhas, semelhante às formigas cortadeiras, não necessitando a qualquer momento se locomoverem dentro de túneis (CUNHA et al., 2005; ZANETTI, 2002; FIGUEIREDO, 2004; SCHEFFRAHN et al., 2002; EDWARDS & MILL, 1986).

Nas áreas propensas ou com histórico da presença de *Nasutitermes*, propõem-se ações de controle químico, ainda na fase de pré-construção dos ninhos, para prevenir infestações e, conseqüentemente, os sérios danos econômicos decorrentes da ação deste grupo. O esclarecimento da resistência natural de madeiras é uma ferramenta essencial para o desenvolvimento de substâncias que possam ser utilizadas no controle desses cupins (FILHO et al., 2006).

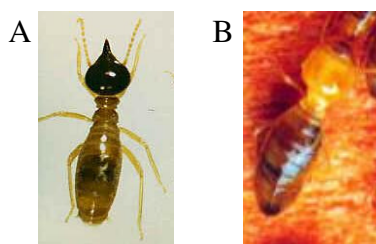


Figura 13. Soldado (A) e operário (B) de *Nasutitermes*

1.7.3. O mosquito *Aedes aegypti*

Os mosquitos são transmissores de inúmeras doenças que afetam milhões de pessoas a cada ano, como malária, filariose, febre amarela e dengue (JACOB, 2001). O mosquito *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) é um vetor de diversos patógenos, incluindo o vírus da dengue e o vírus da família Flaviviridae que causa a febre amarela. É um mosquito de hábito doméstico e diurno, utilizando-se preferencialmente de depósitos de água limpa para oviposição. Seus ovos têm elevada capacidade de resistir à dessecação. O *A. aegypti* tem revelado grande capacidade de adaptação a diferentes situações ambientais desfavoráveis (TAUIL, 2002).

A origem de *A. aegypti* é africana. Somente a fêmea é hematófaga e, por isso, transmite o agente etiológico das doenças. A fêmea precisa de uma proteína do sangue (a albumina) para completar o processo de amadurecimento de seus ovos. O macho se alimenta de seivas de plantas. O mosquito apenas transmite as doenças, mas não sofre seus efeitos (ROBERTS, 2002).

O dengue é a arbovirose (virose transmitida por artrópodes, principalmente insetos ou ácaros) de maior incidência no mundo, sendo endêmica em todos os continentes, exceto na Europa. Cerca de dois terços da população mundial vivem em áreas infestadas com mosquitos vetores do dengue, especialmente o *A. Aegypti* (CLARO et al., 2004). O dengue é uma infecção reemergente que vem preocupando as autoridades sanitárias de todo o mundo em virtude de sua circulação nos cinco continentes e grande potencial para assumir formas graves e letais.

O dengue não é transmitido diretamente entre seres humanos. A infecção viral pode ser causada por quatro sorotipos do arbovírus (DEN1, DEN2, DEN3 e DEN 4) e apresenta-se, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), de duas

formas: a *clássica* ou *febre dengue* (DF), descrita como "doença febril aguda acompanhada por cefaléia e dores musculares e articulares"; e a *febre dengue hemorrágica* (DHF), descrita como "doença febril aguda, caracterizada clinicamente por uma diátese hemorrágica (Organização Mundial de Saúde, 2002).

Entre os fatores associados à emergência do dengue e do dengue hemorrágico nas Américas estão o acelerado crescimento e urbanização populacional, associado à insuficiência no controle do vetor e ao aumento do trânsito de pessoas entre os países. A urbanização, rápida e desordenada, associada a uma distribuição desequilibrada dos níveis de renda, conduz a uma proporção cada vez maior de pessoas vivendo em áreas onde o abastecimento de água, esgotamento sanitário e coleta de lixo são precários ou inexistentes (TAUIL, 2002; GUBLER & CLARK, 1994). Como a água é indispensável à sobrevivência, a população que habita esses locais vê-se obrigada a armazenar água em depósitos domésticos, que servem como criadouros do vetor (CLARO et al., 2004).

A OMS estima que entre 50 a 100 milhões de pessoas se infectem anualmente. Cerca de 550 mil doentes necessitam de hospitalização e 20 mil morrem em consequência do dengue (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2002). Em 2006, 345.922 casos foram registrados no Brasil e, de Janeiro a novembro de 2007 foram registrados 536.519 casos (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2007).

Com o surgimento de formas resistentes do mosquito aos inseticidas convencionais utilizados, tem crescido a procura por extratos vegetais e substâncias naturais que sejam efetivas no combate ao mosquito adulto e/ou à larva de *A. aegypti* e que sejam isentas de toxicidade para o meio ambiente. Resistência a inseticidas convencionais é um dos principais obstáculos ao controle de insetos de importância na agricultura e na medicina. A resistência resulta no aumento da frequência de aplicação de inseticidas, dosagens crescentes, rendimentos diminuídos, danos ambientais e surgimento de doenças, quando os vetores não podem ser controlados. Segundo a OMS, o custo da resistência de insetos a inseticidas pode alcançar anualmente US\$ 1,4 bilhões nos Estados Unidos (HEMINGWAY & RANSON, 2000). Sendo assim, substâncias naturais com atividade inseticida têm sido avaliadas quanto à sua ação sobre *A. aegypti*.

1.8. Lectinas

1.8.1 Generalidades

O primeiro relato a respeito de lectinas se deu em 1888, quando Stillmark, estudando a toxicidade de extratos de *Ricinus communis* (mamona), observou sua capacidade para aglutinar eritrócitos devido à presença de uma proteína extraída, a ricina, marcando o início das pesquisas envolvendo lectinas (KENNEDY et al., 1995). Pouco tempo depois, outra hemaglutinina, chamada abrina, foi descoberta em sementes de *Abrus precatorius* (jequiriti). Entretanto, o estudo sobre estas proteínas só começou a ganhar ímpeto em 1960, abrindo uma vasta área de aplicação para as lectinas (GABOR et al., 2004).

A rota biossintética de muitas lectinas de plantas segue a via secretória: as lectinas são sintetizadas nos ribossomos e entram no retículo endoplasmático; de lá são transportadas pelo complexo de Golgi para os vacúolos, ficando lá armazenadas (VAN DAMME et al., 1998).

As lectinas, por terem a habilidade de se ligar a mono e oligossacarídeos, apresentam uma variedade de efeitos biológicos. Alguns destes efeitos servem como base para a aplicação de lectinas na investigação de problemas químicos e biológicos tais como ação contra insetos, fungos, bactérias e inibição do crescimento de células tumorais (LIS & SHARON, 1986).

1.8.2. Definição

O termo *lectina* (originado do latim “lectus”, que significa selecionado) refere-se à habilidade dessas proteínas ligarem-se seletivamente e reversivelmente a carboidratos (SHARON & LIS, 2002). Ao contrário dos anticorpos, não são produtos de uma resposta imune. A ênfase que é dada quanto à origem não imunológica das lectinas serve para distingui-las de anticorpos anticarboidratos que aglutinam células. Enquanto os anticorpos são estruturalmente similares, as lectinas diferem entre si quanto à composição aminoacídica, requerimentos de metais, peso molecular e estrutura tridimensional (VAN DAMME et al., 1998).

1.8.3. Fontes de lectinas

Lectinas estão largamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em seres unicelulares (KAWAGISHI et al., 2001) e pluricelulares animais (DUNPHY et al., 2002) e vegetais (BRANCO et al., 2004). Em vegetais as lectinas são freqüentemente isoladas de sementes (CAVADA et al., 1998; GUPTA & SRIVASTAVA, 1998; MOREIRA et al., 1998; MACHUKA et al., 1999; FREIRE et al., 2002; REGO et al., 2002; KONOZY et al., 2003) e, em menores proporções, de outros tecidos vegetais, tais como folhas, entrecascas, frutos, raízes e flores (BERTRAND et al., 1998; NOMURA et al., 1998; WITITSUWANNAKUL et al., 1998; COELHO & SILVA, 2000; MARTINEZ & CORDOBA, 2000; NAEEM et al., 2001; MISHRA et al., 2004). As lectinas de plantas que são produzidas em órgãos de estocagem (sementes, na maioria, mas também tubérculos, bulbos e raízes, dependendo da planta) dominam o cenário da Lectinologia por serem encontradas em quantidades preparativas.

As lectinas mais estudadas são da família Leguminosae. Entretanto, muitas lectinas de outras famílias também têm sido freqüentemente isoladas e caracterizadas, como por exemplo, lectinas de Solanaceae, Poaceae, Cyperaceae e Cucurbitaceae entre outras (VAN DAMME et al., 1998; RUDIGER, 1998).

1.8.4 Detecção e Especificidade

As lectinas são, em sua maioria, di ou polivalentes e são capazes de formar pontes entre carboidratos ou glicoproteínas que se apresentam em solução ou ligadas à membrana celular (FLEMMING et al., 1992) (Figura 14).

A presença de lectinas em uma amostra pode ser facilmente detectada a partir de ensaios de aglutinação, nos quais estas interagem com carboidratos da superfície celular através de seus sítios de ligação, formando diversas ligações reversíveis entre células opostas. As lectinas podem aglutinar diversos tipos de células. O ensaio mais comumente utilizado é o de hemaglutinação. Este ensaio 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. O inverso da maior diluição onde se observa a hemaglutinação (título), corresponde à atividade hemaglutinante (AH) (SANTOS et al., 2005) (Figura

15). Os eritrócitos utilizados podem ser de humanos ou de outros animais, onde estes podem ser tratados enzimaticamente (com tripsina, papaína, entre outras) ou quimicamente (com glutaraldeído ou formaldeído) aumentando ou não a sensibilidade das células a lectina (NOMURA et al., 1998; COELHO & SILVA, 2000).

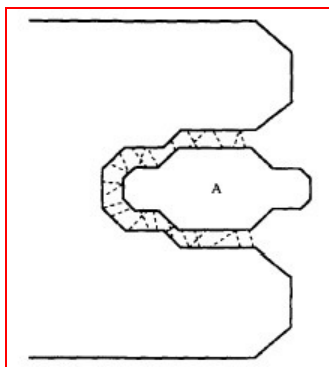


Figura 14. Representação esquemática entre a ligação da lectina a um carboidrato (A). As linhas pontilhadas representam pontes de hidrogênio. Fonte: Kennedy et al. (1995).

As lectinas podem apresentar especificidade para eritrócitos, como a lectina de *Zizyphus mauritiana* (GUPTA & SRIVASTAVA, 1998), que só aglutina eritrócitos humanos, as lectinas de *Charybdis japonica* (UMETSU et al., 1991) e do cogumelo *Marasmius oreades* (WINTER et al., 2002), específicas para eritrócitos tipo B; outras lectinas, no entanto, são caracterizadas como não específicas para grupos sanguíneos (BANERJEE et al., 2004). Para assegurar que o agente aglutinante é uma lectina, são necessários ensaios subseqüentes de inibição da AH utilizando uma solução do carboidrato ligante (KENNEDY et al., 1995; MOREIRA et al., 1990; KAWAGISHI et al., 2001; CAVADA et al., 1998). A grande maioria de lectinas de plantas apresenta especificidade por carboidratos simples (monossacarídeos) ou complexos (oligossacarídeos e glicanas). Estes podem ser de origem vegetal ou não, como N-acetilglicosamina e ácidos N-glucurônico, galacturônico, xilurônico, L-idurônico, siálico e N-acetilmurâmico (VAN DAMME et al., 1998).

Apesar de serem caracterizadas segundo o monossacarídeo que reconhecem, é bem documentado que as lectinas de plantas já descritas predominantemente ligam oligossacarídeos com constantes de afinidade até 1000 vezes maiores e que esta associação é entalpicamente favorecida. Na grande maioria, as lectinas de plantas reconhecem glicoconjugados sintetizados a partir de monossacarídeos encontrados na natureza, mas a diversidade de glicanas formadas

por estas unidades básicas é tão grande que continuamente se descobre uma lectina nova com uma especificidade nova (RUDIGER, 1998; LIS & SHARON, 1998).

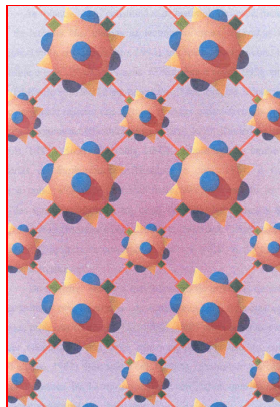


Figura 15. Representação esquemática de aglutinação por lectinas.

Lectina , e seus ligantes de superfície da célula , , , carboidratos ou não carboidratos, ligantes ou não. Fonte: Kennedy et al. (1995).

Assim, de acordo com Sharon & Lis (1990), algumas lectinas apresentam interações mais fortes com oligossacarídeos em comparação com monossacarídeos, outras são quase exclusivas para oligossacarídeos. Dessa forma, as lectinas podem ser classificadas com especificidade para monossacarídeo ou para oligossacarídeo (Tabela 3) (PEUMANS & VAN DAMME, 1998).

1.8.4.1. Lectinas ligadoras de quitina

Lectinas ligadoras de quitina (Figura 16) têm sido isoladas de diversas fontes, incluindo bactérias, insetos, plantas e mamíferos (HUANG et al., 2000; TRINDADE et al., 2006; GOZIA et al., 1993) e muitas delas apresentam atividade antifúngica, uma vez que a quitina é o componente-chave da parede celular de fungos.

As lectinas ligantes de quitina também têm sido estudadas do ponto de vista estrutural. As mais estudadas são aquelas pertencentes à família das heveínas, assim chamadas por possuírem em comum o domínio heveínico como motivo estrutural de reconhecimento da quitina.

A heveína é uma lectina ligadora de quitina, constituída por 43 aminoácidos (cerca de 4,5 kDa), encontrada na seringueira (*Hevea brasiliensis*). A heveína é especialmente rica em resíduos de glicina e cisteína e sua estrutura é mantida por 4 pontes dissulfetos, o que lhe confere uma estabilidade notável, característica esta

que se estende às demais lectinas da família das heveínas. Mesmo depois de aquecida a 90 °C por 10 minutos, a heveína ainda inibiu o crescimento de fungos (PARIJS et al., 1991). A figura 17 mostra um exemplo de um domínio heveínico. A heveína é o principal fator alérgico do látex e, por isso, também tem sido apontada como envolvida na defesa da planta frente ao ataque de insetos e fungos (PARIJS et al., 1991), uma vez que o exoesqueleto de insetos e a parede celular de fungos são constituídos por quitina.

Tabela 3. Famílias de Lectinas de plantas: ocorrência e especificidade

Família	Ocorrência (número de lectinas identificadas)	Especificidade
Legumes	>100	Manose/glicose; Fucose; Gal/GalNAc; (GlcNAc) _n ; Ácido Siálico
Ligadoras de quitina	>100	(GlcNAc) _n GlcNAc
Ligadoras de manose de monocotiledôneas	>50	Manose
Cucurbitaceae	<10	(GlcNAc) _n
Amaranthaceae	<10	GlcNAc
Jacalina	<10	Gal/GalNAc Manose/maltose
RIP Tipo 2	>20	Gal/GalNAc Siaα2-6Gal/GalNAc

Gal, galactose; GalNAc, N-acetilgalactosamina; GlcNAc, N-acetilglicosamina

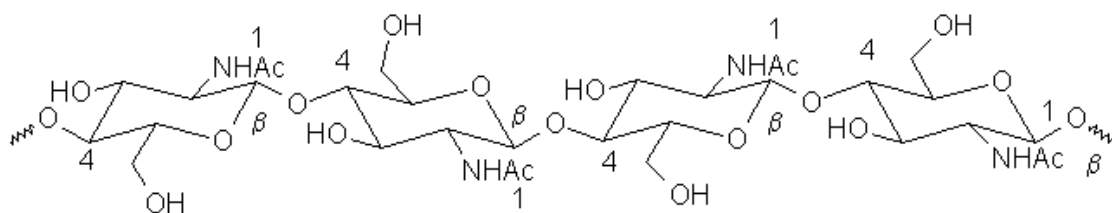


Figura 16. Ilustração de um segmento de quitina.

A quitina é um homopolímero de unidades de N-acetilglicosamina ligadas no sentido β-1-4.

1.8.5. Lectinas de Dicotiledôneas

A classe das dicotiledôneas possui lectinas purificadas em várias famílias, como por exemplo, Amaranthaceae (ZENTENO & OCHOA, 1988), Cactaceae (ZENTENO et al., 1995), Euphorbiaceae (LALONDE et al., 1984), Labiateae (ALPERIN et al., 1992), Leguminosae (SUMNER & HOWELL, 1936), Moraceae (MOREIRA & OLIVEIRA, 1983) e Urticaceae (PEUMANS et al., 1984), entre outras. Dentro de Anacardiaceae, Viana (2002) isolou a lectina de entrecasca da aroeira-da-praia, *Schinus terebinthifolius*, que, dentre outras atividades biológicas, foi capaz de induzir a liberação de peróxido de hidrogênio por macrófagos. Maciel (2000) purificou a lectina da entrecasca do cajueiro-roxo, *Anacardium occidentale*, e Oliveira et al. (2000) detectaram a presença de lectinas em *Spondias tuberosa*, o umbu. Em *Mangifera indica* (mangueira) é encontrada uma aglutinina com atividades semelhantes a das lectinas, capaz de aglutinar células de bactérias (WAUTERS et al., 1995).

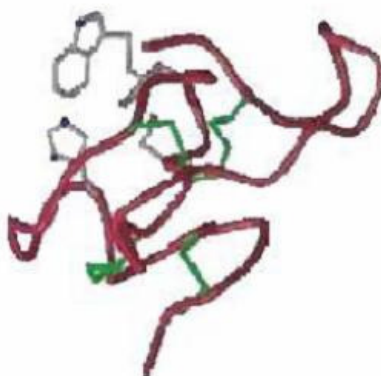


Figura 17. Exemplo de domínio heveínico.

Domínio II de uma das subunidades da lectina dimérica de *Phytolacca americana* PL-D: as pontes dissulfeto estão coloridas em verde e os aminoácidos que interagem com o carboidrato estão em cinza. Fonte: HAYASHIDA et al., 2003

A maioria das lectinas de dicotiledôneas estudadas foi isolada de plantas de tribos da família das leguminosas. A lectina de *Canavalia ensiformis* (Con A), glicose-manose específica, é representante típico deste grupo.

As lectinas de leguminosas pertencem à família de lectinas mais estudadas, sendo encontradas exclusivamente em espécies representativas desta família (Leguminosae ou Fabaceae). Devido à abundância de lectinas em sementes de leguminosas não é raro o isolamento de mais de uma lectina em determinadas espécies (VAN DAMME et al., 1998). Quanto à localização das lectinas em

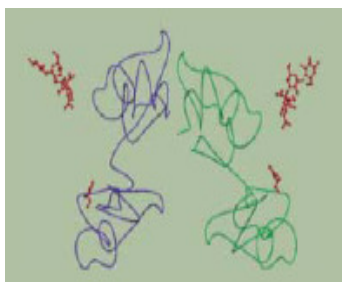
sementes, elas são encontradas em células do parênquima dos cotilédones e nos corpos protéicos (ETZLER, 1986). Do ponto de vista estrutural, estas lectinas são geralmente compostas de 2 ou 4 subunidades, iguais ou diferentes, com massa molecular em torno de 25 a 30 kDa. Muitas vezes, em cada subunidade monomérica é encontrado um domínio de um ou mais metais (geralmente cálcio ou manganês) e um sítio de ligação a carboidratos com a mesma especificidade.

As lectinas de leguminosas apresentam grande diversidade de especificidade a carboidratos, que parece ter origem na variabilidade de regiões adjacentes ao sítio de ligação a carboidrato, influenciando tanto no tamanho quanto na abertura do sítio (YOUNG & OOMEN, 1992). A estabilização do complexo lectina-carboidrato depende da presença de outros sítios, entre eles a cavidade hidrofóbica presente em diversas lectinas (ROUGÉ et al., 1991). Através dos sítios hidrofóbicos, lectinas podem interagir com moléculas não polares, como acontece, por exemplo, entre Con A e o ácido indolacético, um hormônio vegetal (EDELMAN & WANG, 1978). Muitas lectinas apresentam também sítios para ligação de cátions divalentes como Ca^{2+} e Mn^{2+} (íons fundamentais para essas lectinas exibirem suas atividades) (HARDMAN et al., 1982).

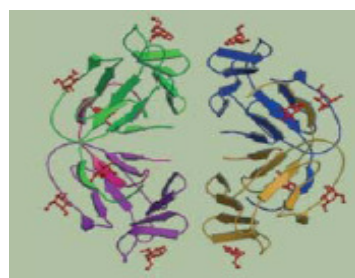
1.8.6. Características estruturais das lectinas de plantas

As diferenças estruturais entre as lectinas são devidas a variações no número de subunidades por molécula e na natureza dos polipeptídeos (Figura 18). Pontes dissulfeto, pontes de hidrogênio e também as interações hidrofóbicas podem estar presentes na associação das subunidades (KENNEDY et al., 1995); as interações entre as subunidades parecem desempenhar um papel dominante na estabilidade dessas proteínas (MITRA et al., 2002).

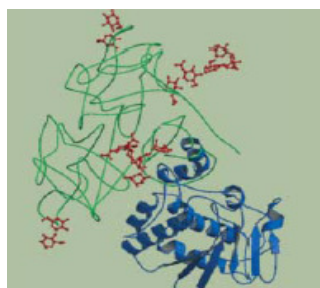
As especificidades e afinidades dos sítios de ligação a carboidratos são determinadas principalmente por pontes de hidrogênio, com a ajuda de forças de van der Waals e interações hidrofóbicas com resíduos de aminoácidos aromáticos que estão próximos às porções hidrofóbicas de monossacarídeos (SHARON, 1993) contribuindo para a estabilidade e especificidade dos complexos formados.



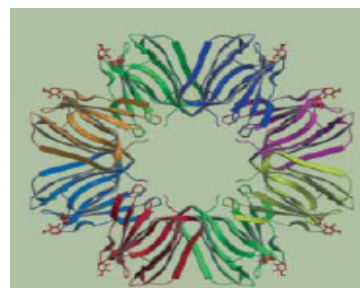
Proteínas que se unem a quitina
Complexo de WGA de semente
de trigo com NAc5Neu-lactose



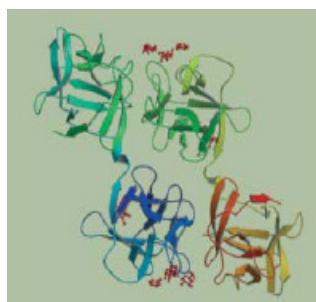
**Lectina de monocotiledônea
específica de Manose**
GNA de bulbos de *Galanthus nivalis*



Ricina
Ricina, de sementes de *Ricinus
communis* com D-galactose, D-Glicose,
 α -D-manose e NacGlic unidos



Lectinas similares à jacalina de
Helianthus tuberosus
com dissacarídeos Man- α -1,3-Man
unidos a cada monômero



Lectina da família da amarantina
Complexo de ACA de semente de
Amaranthus caudatus com o antígeno T

Figura 18. Estruturas de lectinas.

Famílias de lectinas de plantas (proteínas que se unem a quitina, lectina de monocotiledônea específica de manose, lectinas similares à jacalina, lectina da família da amarantina).

Algumas lectinas apresentam íons metálicos ligados à sua estrutura; tais ligações são coordenadas por moléculas de água, que também servem para mediar as interações das lectinas com carboidratos (SHARON & LIS, 2002; MOREIRA et al., 1990).

A especificidade de lectinas de plantas a carboidratos é primeiramente determinada pela estrutura tridimensional dos seus sítios de ligação, que se

apresentam conservados a nível aminoacídico, dentro de famílias de lectinas (PEUMANS & VAN DAMME, 1998). As lectinas exibem uma elevada homologia em seus resíduos de aminoácidos, incluindo aqueles envolvidos na ligação a carboidratos e a maioria dos que coordenam os íons metálicos necessários à integridade das subunidades e ao correto posicionamento dos resíduos para a ligação (SHARON, 1993).

Com base na estrutura geral das proteínas, as lectinas de plantas têm sido subdivididas em merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas (PEUMANS & VAN DAMME, 1998). Merolectinas são aquelas que possuem apenas um domínio para ligação a carboidratos. Elas são monovalentes e por isso não podem precipitar glicoconjugados ou aglutinar células. Hololectinas também possuem domínio específico para ligação a carboidratos, mas contêm pelo menos dois domínios idênticos ou mais domínios homólogos ligantes a açúcares; sendo di ou multivalentes, aglutinam células e/ou precipitam glicoconjugados. A maioria das lectinas de plantas pertence a este grupo. Quimerolectinas são proteínas com um ou mais domínios de ligação a carboidratos e um domínio não relacionado. Este domínio diferente pode ter uma atividade enzimática bem definida ou outra atividade biológica, mas age independentemente dos outros domínios de ligação a carboidratos. Superlectinas consistem, exclusivamente, de pelo menos dois domínios de ligação a açúcares diferentes. Este pode ser considerado um grupo especial de quimerolectinas consistindo de dois domínios estruturalmente e funcionalmente diferentes de ligação a carboidratos (VAN DAMME et al., 1996).

1.8.7. Purificação de Lectinas

O isolamento de lectinas é estimulado pela sua potencial utilização em diversas áreas da medicina clínica, bem como em pesquisa química e biológica (BANERJEE et al., 2004; VAN DAMME et al., 1996; SPILATRO et al., 1996). Lectinas têm sido purificadas por métodos convencionais que se baseiam nos seus aspectos moleculares gerais, como carga elétrica, tamanho e solubilidade, e seus aspectos particulares, como um grupo de proteínas com afinidade por carboidratos e glicoconjugados.

Métodos comuns utilizados na purificação de proteínas são aplicados para purificar as lectinas. Extratos podem ser feitos a partir de uma solução salina como

no caso do isolamento da lectina das sementes de *Erythrina speciosa* (KONOZY et al., 2003) ou usando tampões como na obtenção das lectinas de cotilédones de *Luetzelburgia auriculata* (OLIVEIRA et al., 2002), dos tubérculos de *Helianthus tuberosus* (SUSEELAN et al., 2002) e da entrecasca de *Hevea brasiliensis* (WITITSUWANNAKUL et al., 1998), *Sambucus sieboldiana* (ROJO et al., 1997) e *Morus nigra* (ROUGÉ et al., 2003).

Para a preparação do extrato, o material é submetido à extração sob período de tempo e condições de temperatura estabelecidas, sob agitação constante. A partir do extrato bruto, as proteínas podem ser isoladas por métodos tais como o fracionamento de proteínas com sais. O sulfato de amônio, altamente hidrofílico, remove a camada de solvatação das proteínas fazendo com que as mesmas precipitem (KENNEDY et al., 1995).

As lectinas parcialmente purificadas pelo tratamento com sulfato de amônio são geralmente submetidas ao processo de diálise em membranas semipermeáveis, método baseado na separação de moléculas por diferenças de peso molecular; as proteínas ficam retidas dentro da membrana enquanto que moléculas menores - como carboidratos ou sais - presentes na amostra passam para a solução solvente.

As lectinas podem ser purificadas à homogeneidade através de cromatografia de afinidade, cromatografia de troca iônica ou cromatografia de gel filtração (COLLINS et al., 1997). O que varia, principalmente, são as matrizes que são utilizadas nestas cromatografias cuja escolha depende da especificidade a carboidratos (cromatografia de afinidade), carga líquida (cromatografia de troca iônica) e tamanho molecular da proteína (cromatografia de gel filtração).

A cromatografia de afinidade, técnica mais amplamente utilizada, tem como princípio de separação a habilidade das lectinas se ligarem especificamente a suportes polissacarídicos, através de ligações não covalentes. A proteína desejada é obtida com alto grau de pureza alterando-se as condições de pH (KENNEDY et al., 1995), força iônica (FREIRE et al., 2002) ou pela eluição com uma solução contendo um competidor (KONOZY et al., 2003; BANERJEE et al., 2004).

Na cromatografia de troca iônica a ligação da proteína ocorre com os grupos de carga de sinal contrário imobilizados na matriz. A coluna é lavada com solução tampão e as proteínas com nenhuma ou pouca interação com o trocador de íons são excluídas. As proteínas adsorvidas à matriz podem ser eluídas pelo aumento da força iônica ou alteração do valor de pH do meio (COLLINS et al., 1997).

Matrizes orgânicas como o dextrano e a agarose podem ser usadas na cromatografia de troca iônica, porém a mais utilizada é a celulose. A celulose é um biopolímero de glicose que apresenta ligações cruzadas de pontes de hidrogênio, tendo grupos hidroxílicos que são facilmente oxidáveis a grupos carboxílicos, sendo esta a razão que capacita a celulose como trocador (COLLINS et al., 1997). Dentre os trocadores utilizados, derivados da matriz de celulose, estão o dietilaminoetilcelulose (DEAE-celulose), um trocador aniônico, e o carboximetilcelulose (CM-celulose), um trocador catiônico, ambos carregados em pH neutro.

Na cromatografia de gel filtração, a separação ocorre de acordo com o tamanho da proteína. A fase estacionária consiste de esferas de gel contendo poros cujos intervalos de tamanho são relativamente estreitos. Quando uma solução aquosa contendo moléculas de vários tamanhos é passada através da coluna, as maiores permanecem na solução que contorna as esferas e, portanto, atravessam a coluna mais rapidamente que as moléculas pequenas, que passam através dos poros. Este tipo de cromatografia é utilizado tanto para obter preparações protéicas homogêneas como para definição da massa molecular da proteína nativa (KAWAGISHI et al., 2001; FREIRE et al., 2002).

Os géis utilizados comumente como matriz de exclusão molecular são dextrano (Sephadex), os géis de poliacrilamida (Bio-Gel), os géis de agar e agarose e outros. O Sephadex, dentre todos eles, é o mais utilizado. Trata-se de um biopolímero (polissacarídeo) obtido por fermentação da sacarose, pela ação bacteriana; é formado por unidades de glicose predominantemente unidas por ligações α -1-6, apresentando ramificações que variam entre 1-2, 1-3 e 1-4. Seu tratamento com substâncias químicas produz ligações cruzadas nas cadeias polissacarídicas fornecendo um material que, em água, produz um gel com estrutura tridimensional útil para sua utilização em processos de purificação de lectinas (COLLINS et al., 1997).

1.8.8. Caracterização de Lectinas

Para a caracterização de lectinas diversas propriedades físico-químicas são avaliadas. A eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) pode ser realizada usando um gel contendo dodecilsulfato de sódio (SDS), que tem como função

dissociar as proteínas, onde as subunidades se ligam a iguais quantidades de SDS por unidade de peso e quantidade de carga negativa. A utilização de agentes redutores tais como o β -mercaptoetanol, rompe as pontes dissulfeto entre subunidades protéicas. SDS-PAGE em condições desnaturantes e redutoras revela o grau de pureza, a composição de subunidades e a massa molecular (LAEMMLI, 1970). A eletroforese em condições nativas indica a pureza da lectina e caracteriza a proteína em relação à sua carga líquida. Proteínas ácidas, como a de *Erythrina speciosa* (KONOZY et al., 2003), e proteínas básicas, como a de *Helianthus tuberosus* (SUSEELAN et al., 2002), são reveladas. Os géis de poliacrilamida podem ser corados com Azul de Coomassie ou Negro de Amido, que revelam bandas polipeptídicas, ou com colorações específicas para glicoproteínas (SUSEELAN et al., 2002).

Avaliação da AH de lectinas em diferentes valores de pH e temperatura é importante para a determinação da estabilidade das moléculas quanto à sua propriedade de ligação a carboidratos e glicoconjugados. O pH tem efeito variado sobre as lectinas; em alguns casos não afeta a atividade (WITITSUWANNAKUL et al., 1998) e em outros a lectina perde sua atividade em determinada faixa de pH. Quanto ao efeito da temperatura, algumas lectinas permanecem estáveis até 55-65 °C e a partir de então, com a elevação da temperatura, a atividade hemaglutinante decai até ser abolida (KONOZY et al., 2003; SPILATRO et al., 1996). Lectinas ativas após aquecimento a 100 °C também foram isoladas (PARIJS et al., 1991; SUSEELAN et al., 2002).

Os sítios de ligação a carboidratos e aos íons metálicos apresentam elevada conservação nos padrões de interações de glicanos e metais com os resíduos de aminoácidos (GADELHA et al., 2005). Modificações em apenas um desses resíduos podem resultar em aumento ou diminuição em diferentes atividades biológicas, como observado pela mutagênese em sítios de algumas lectinas (HIRABAYASHI & KASAI, 1991).

Na estrutura nativa da lectina de *Canavalia marítima* (ConM), os aminoácidos envolvidos na ligação de metais são conservados e as estruturas dos sítios de ligação a Mn^{+2} e Ca^{+2} apresentam similaridades com aqueles determinados para outras lectinas de leguminosas. Monômeros de ConM contêm íons Mn^{+2} e Ca^{+2} na vizinhança dos sítios de ligação a carboidrato (Figura 19).

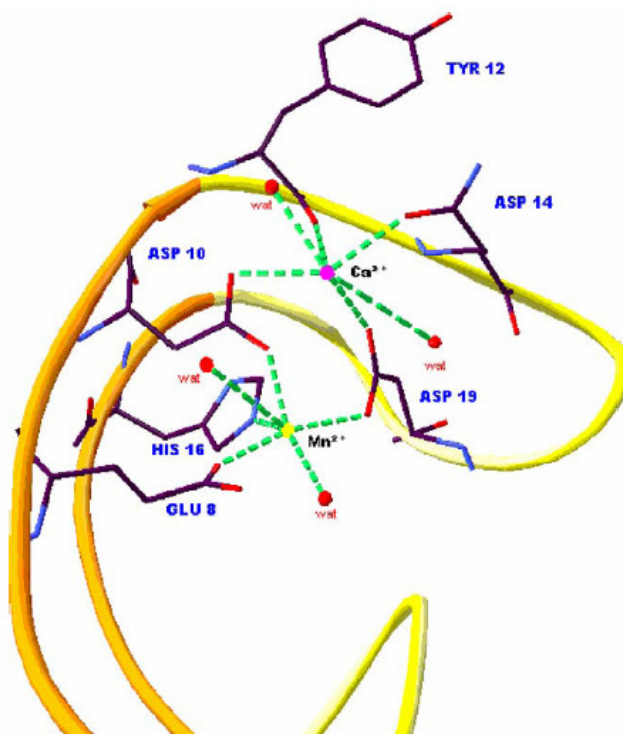


Figura 19. Sítio de ligação a metais na estrutura nativa de Con M. (GADELHA et al., 2005).

A ligação do íon Ca^{+2} direciona a isomerização de *trans* para *cis* da ligação peptídica Ala207–Asp208, que é conservada em todas as estruturas conhecidas de cristais de lectinas de leguminosas. Essa ligação peptídica *cis* contribui para a estabilização através da orientação das posições dos resíduos Asn14 e Arg228. Cada um dos íons metálicos é coordenado por quatro cadeias laterais de aminoácidos e duas moléculas de água: Glu8, Asp10, Asp19 e His24 com Mn^{+2} ; e Asp10, Tyr12, Asn14 e Asp19 com Ca^{+2} . No caso do íon Ca^{+2} , uma das moléculas de água forma uma ponte entre o metal e o grupo carboxil da cadeia principal do resíduo Asp208, estabilizando, assim, a incomum ligação *cis* Ala207–Asp208 (GADELHA et al., 2005; DELATORRE et al., 2006).

A determinação da dependência ou não de lectinas por íons metálicos constitui outra etapa necessária na caracterização, pois algumas lectinas precisam da presença destes íons para promover sua atividade biológica (KENNEDY et al., 1995; SAMPAIO et al., 1998b). A lectina de *E. Speciosa* (KONOZY et al., 2003), por exemplo, é uma metaloproteína que contém Ca^{2+} e Mn^{2+} e que, quando tratada com EDTA, sua AH é totalmente abolida sendo a mesma restaurada após a adição de Ca^{2+} e Mn^{2+} . Por outro lado, a lectina de *Heliantus tuberosus* (SUSEELAN et al.,

2002) não teve sua atividade abolida quando tratada com EDTA e não necessitou de íons metálicos tais como Ca^{2+} , Mn^{2+} e Mg^{2+} para a mesma. A presença de cátions na estrutura da proteína promove termoestabilidade e uma relativa resistência à ação enzimática. Exemplos de lectinas dependentes de metais são a lectina isolada de sementes de *Dioclea altissima* (MOREIRA et al., 1997) e a lectina de *Pitilota filicina* (SAMPAIO et al., 1998a).

Testes de inibição da AH, fazendo uso de monossacarídeos simples ou carboidratos complexos, também são freqüentes na caracterização de lectinas, desde que a especificidade é um critério para classificar lectinas de plantas nos grupos de especificidade anteriormente relatados (PEUMANS & VAN DAMME, 1998). Duas lectinas com diferentes propriedades de ligação a carboidratos foram isoladas da entrecasca de *Morus nigra* (ROUGÉ et al., 2003); morniga M e morniga G foram específicas para manose e galactose, respectivamente. Lectinas de entrecasca também têm sido inibidas com glicoproteínas, como é o caso da isolada de *Hevea brasiliensis* (WITITSUWANNAKUL et al., 1998) que foi inibida com fetuína. A interação de lectinas com glicopeptídeos (ZENG et al., 2000) e glicoproteínas (LIMA et al., 1997) tem sido também identificada através de ensaio de difusão dupla em gel de agarose.

Outras maneiras de caracterizar as lectinas são pela determinação do ponto isoelétrico, eletroforese bidimensional, análise da composição de aminoácidos, determinação do N-terminal, estudos de fluorescência, dicroísmo circular, avaliação de atividade mitogênica e estudos toxicológicos, dentre outros.

O seqüenciamento de lectinas tem permitido detectar isoformas, e identificar membros de novas famílias homólogas destas proteínas, em grupos de organismos, através da comparação de seqüências de lectinas com elevada homologia entre si (SHARON, 1993; CANDY et al., 2003); a análise da estrutura primária permite sugerir a presença de pontes dissulfeto em pontos específicos da molécula, e indica que alguns resíduos são determinantes da atividade biológica (ZHANG et al., 2003).

A técnica de HPLC-RP (cromatografia líquida de alta resolução em fase reversa) constitui um meio útil de obter lectinas puras que já tenham sido pré-purificadas, de estimar massas moleculares, caracterizar e fracionar proteínas e tem sido amplamente utilizada como um passo final de purificação de lectinas, após a utilização de outros métodos cromatográficos (NG et al., 2003; WONG & NG, 2003) e como um método de caracterização de massa molecular destas proteínas. FPLC e

HPLC-RP têm sido utilizadas para estabelecer a homogeneidade de lectinas, para separar estruturas em subunidades, assim como determinar se essas moléculas são monoméricas ou não (WANG et al., 2001).

1.8.9. Importância fisiológica e atividades biológicas das lectinas de plantas

Muitas hipóteses sobre o papel fisiológico das lectinas foram levantadas devido à ocorrência de lectinas em microorganismos, animais e plantas, mas admite-se que a função primária das lectinas seja a de reconhecimento de carboidratos. Lectinas vegetais poderiam desempenhar importantes papéis tais como proteínas de reserva, no mecanismo de defesa contra microorganismos fitopatogênicos, insetos e animais predadores (PONCHEL & IRACHE, 1998; SIDDIQUI et al., 1995; PEREIRA et al., 1991; WANG et al., 2001) e como mediadores da simbiose planta-microorganismo (RUDIGER et al., 2000; NAEEN et al., 2001; LIMPENS & BISSELING, 2003).

As lectinas têm a capacidade de reconhecer e se ligar a glicoconjugados presentes na superfície de microorganismos ou no trato intestinal de insetos e mamíferos herbívoros (SHARON & LIS, 1990); desempenham um importante papel de proteção do vegetal contra esses organismos predadores, afetando o crescimento e desenvolvimento de insetos e apresentando atividades tóxicas em animais herbívoros. Algumas lectinas já são conhecidas quanto à sua toxicidade, tais como a lectina de *Sambucus sieboldiana* (ROJO et al., 1997), a aglutinina de *Phaseolus vulgaris*, a lectina de *Robinia pseudoacacia* e a lectina de *Sambucus nigra* (SHARON & LIS, 1990).

1.8.9.1. Atividade antimicrobiana

1.8.9.1.1. Bactérias

As bactérias são organismos unicelulares, procariontes e pertencentes ao reino Monera. Sua classificação é feita de acordo com a constituição da parede celular em dois grupos: Gram-positivas e Gram-negativas. As bactérias Gram-positivas apresentam em sua parede celular polissacarídeos, ácidos teicóicos e

peptideoglicanos, enquanto as Gram-negativas apresentam na sua parede celular peptideoglicanos, lipídeos, proteínas e lipopolissacarídeos (TRABULSI, 2000).

Dentre as bactérias Gram-positivas, destaca-se *Staphylococcus aureus*, de forma esférica, geralmente com distribuição em cachos irregulares semelhantes a cachos de uvas. É um patógeno responsável por muitas infecções graves nos seres humanos. Pode provocar, por exemplo, endocardite, osteomielite hematogênica aguda, meningite ou infecção pulmonar, entre outras. Outras bactérias Gram-positivas são as do gênero *Streptococcus*, de forma esférica, tipicamente formando pares ou cadeias durante o seu crescimento. Apresentam-se amplamente distribuídas na natureza. Podem estar presente na flora humana normal, como também estar associadas a importantes doenças humanas que podem ser atribuída em parte à infecção por estreptococos.

Entre as Gram-negativas, destacam-se: 1) *Escherichia coli*, que se apresenta na forma de bastonete, além de formar colônias lisas, convexas e circulares; faz parte da flora normal e acidentalmente causa infecção do trato urinário, diarreia, meningite e septicemia. 2) *Klebsiella*, também em forma de bastonete, que forma colônias grandes e mucóides. Encontrada no trato respiratório e nas fezes, é responsável por uma pequena fração de pneumonias bacterianas, provocando extensa consolidação necrosante hemorrágica nos pulmões. 3) *Pseudomonas aeruginosa*, um bacilo aeróbico móvel. Amplamente distribuído na natureza, sendo comum seu achado em ambientes úmidos de hospitais. Consegue colonizar seres humanos normais, nos quais é saprófita, sendo encontrada em pequenos grupos na flora intestinal normal e na pele (JAWETZ et al., 1991).

1.8.9.1.2 Fungos

Os fungos são organismos não-fotossintéticos que crescem como uma massa de filamentos (hifas) entrelaçados e ramificados, conhecida como micélio. Os fungos, em sua maioria, têm sua parede celular constituída por celulose ou quitina (JAWETZ et al., 1991). Estes microrganismos são ubíquos, encontrados no solo, água, vegetais, homem e detritos em geral (TRABULSI, 2000). Muitos dão origem a doenças em plantas, contudo somente cerca de 100 das milhares de espécies conhecidas de levedura e fungos filamentosos provocam doenças em seres humanos ou em animais. *Candida albicans*, levedura ovalada, trata-se de um

membro da flora normal das mucosas nas vias respiratórias, gastrintestinais e genitais femininas. Nesses locais, pode predominar e associar-se às condições patogênicas, podendo provocar doença sistêmica em pacientes imunodeprimidos ou debilitados e ser comumente transmitida de um ser humano para outro (MEYER et al., 2000). *Aspergillus niger* apresenta conidióforos simples, cabeça conidial grande, radiada, preta e ocre. É patogênico ao homem, capaz de provocar aspergilose pulmonar, aspergilose disseminada, lesões cutâneas, nasais e do sistema nervoso central, bem como outros processos. *Colletotrichum*, forma assexuada de *Glomerella cingulata*, apresenta micélio de coloração branca, conídios hialinos e arredondados. O *Colletotrichum gloesporioides* corresponde ao estado conidial de *Glomerella cingulata*. Este gênero é um dos mais importantes e difundidos na natureza, com mais de 1.000 espécies, sendo normalmente patógenos de plantas (LACAZ et al., 1998).

Alguns fungos fitopatogênicos, principalmente do gênero *Fusarium*, como *Fusarium oxysporum*, apresentam importantes implicações na saúde das plantas e do homem (DI PIETRO et al., 2003; WANG & NG, 2003).

1.8.9.1.3. Lectinas com atividade antimicrobiana

Muitas substâncias, inclusive proteínas, estão sendo avaliadas quanto ao seu efeito antimicrobiano. As proteínas antimicrobianas, em animais, constituem parte do sistema imune inato. Peptídeos e pequenas proteínas com atividade antimicrobiana são usados contra inúmeros microrganismos perigosos. Por causa dos distintos mecanismos de ação, houve um crescente interesse no uso de peptídeos e proteínas antimicrobianos como antibióticos para o controle de patógenos (WANG & BUNKERS, 2000). Em plantas, as proteínas antimicrobianas estão envolvidas com mecanismo de defesa (YE & NG, 2001).

Duas proteínas de *Malva parviflora* possuem uma potente atividade antifúngica e curiosamente a inibição é fungicida em vez de ser fungistática frente ao fungo *Fusarium graminearum* (WANG & BUNKERS, 2000). Peptídeos isolados de sementes de *Phaseolus vulgaris* e *Adzuckia angularia* possuem uma potente atividade antifúngica frente aos fungos *Botrytis cinerea*, *Mycosphaerella arachidicola* e *Fusarium oxysporum* (YE & NG, 2001).

Lectinas estão sendo avaliadas quanto à sua atividade antibacteriana. Por exemplo, a lectina de *Anguilla japonica* apresenta atividade aglutinante frente à bactéria patogênica *Streptococcus difficile* (TASUMI et al., 2004). Uma lectina manose-dependente isolada do soro de peixe (salmão) do Atlântico teve efeito antibacteriano contra a bactéria Gram (-) patogênica *Aeromonas salmonicida*, através da associação com macrófagos (OTTINGER et al., 1999) e outra lectina de peixe (*Trichogaster trichopterus*) associada a macrófagos, também apresentou ação antibacteriana frente a *Aeromonas hydrophila* (FOCK et al., 2001). Lectinas parcialmente purificadas a partir de sete plantas medicinais do Sul da África foram avaliadas quanto ao efeito antibacteriano frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* através de método de aglutinação, apresentando efeito inibitório no crescimento das mesmas (GAIDAMASHVILI & VAN STANDEN, 2002). Concanavalina A, lectina de *Canavalia ensiformis*, aglutinina da *Bauhinia purpurea* (BPA), aglutinina da *Lens culinaris* e a aglutinina de gérmen de trigo bloquearam a adesão dos conídios de *Colletotrichum graminicola*, indicando que o material associado à aderência do conídio é composto de glicoproteínas (MERCURE et al., 1995).

As lectinas possuem a capacidade de se ligarem especificamente a hifas fúngicas e atuam impedindo o consumo de nutrientes e a incorporação de precursores necessários para o crescimento do fungo. Atuam ainda sobre a germinação de esporos fúngicos, provavelmente num estágio muito inicial do processo, inibindo-a, de modo que há um prolongamento do período latente que precede a germinação (LIS & SHARON, 1981).

Atividade antifúngica foi observada em uma lectina isolada de sementes de *Castanea mollisma*, frente aos fungos *Botrytis cinerea*, *Mycosphaerella arachidicola*, *Physalospora piricola* (WANG & NG, 2003); bem como na lectina de *Talisia esculenta*, a qual inibiu o crescimento dos fungos *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum lindemuthianum* e *Saccharomyces cerevisiae* através da interação da lectina com as estruturas dos fungos (FREIRE et al., 2002).

1.8.9.2. Atividade inseticida

Lectinas de plantas, em particular, têm sido estudadas sob vários aspectos, incluindo seu potencial inseticida devido à sua atuação em proteger as plantas que

as produzem naturalmente, podendo ser exploradas através da introdução de material genético que codifique a expressão deste tipo de lectina atóxica ao homem (FIELDS & KORUNIC, 2000; HUANG et al., 2000; TRINDADE et al., 2006; GOZIA et al., 1993; VAN DAMME et al., 1996).

A ação tóxica de lectinas inseticidas tem sido relacionada à ligação dessas proteínas a glicoproteínas presentes no trato digestivo de animais (MACEDO et al., 2007). Lectinas entomotóxicas são resistentes à degradação proteolítica no intestino de insetos (ZHU-SALZMAN et al., 1998; ZHU-SALZMAN & SALZMAN, 2001; MACEDO et al., 2002).

Essas proteínas demonstraram atividade inseticida contra larvas, estágios de desenvolvimento e formas maduras (MACEDO et al., 2002; VASCONCELOS & OLIVEIRA, 2004; SAUVION et al., 2004; MACEDO et al., 2004; KAUR et al., 2006), podendo ser exploradas no controle de pragas através de técnicas de engenharia genética, com o objetivo de aumentar a resistência de plantas a pragas (CARLINI & GROSSI-DE-SÁ, 2002; SAHA et al., 2006).

A lectina de *Arisaema helleborifolium* (KAUR et al., 2006) apresentou atividade inseticida contra larvas do segundo instar de *Bactrocera cucurbitae*, mosca que ataca o melão. Outra lectina com propriedades inseticidas é a de folhas de *Bauhinia monandra* (BmoLL), que induziu a morte de larvas de *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera), *Zabrotes subfasciatus* e *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera), ligando-se no trato digestivo desses insetos (MACEDO et al., 2007).

1.8.10. Aplicações biotecnológicas das lectinas

As interações específicas entre molécula, como as interações hormônio-receptor, DNA-proteína e antígeno-anticorpo, podem ser exploradas para a purificação de macromoléculas através de cromatografia de afinidade. A propriedade de ligação a carboidratos das lectinas pode ser explorada em cromatografia de afinidade, como é o caso da imobilização de lectinas em suportes insolúveis para o isolamento de glicoconjugados (SANTOS FILHO, 2001).

A síntese da matriz inicia-se com a introdução do grupo ligante (lectina), seguindo-se da etapa de ligação covalente do ligante ao suporte insolúvel. As características que o ligante deve ter incluem ser compatível com as soluções usadas durante o processo de imobilização; possuir no mínimo um grupo funcional

através do qual ele será acoplado à matriz ($-\text{NH}_2$, amino; $-\text{COOH}$, carboxílico; $-\text{CHO}$ aldeído; $-\text{SH}$, tiol; $-\text{OH}$, hidroxílico) e que este grupo funcional não seja essencial para a sua função biológica, ou seja, sua capacidade de ligação não deve ser afetada pela imobilização (JANSON & RYDÉN, 1989). Entre os suportes que podem ser usados para imobilização de proteínas estão a Sepharose, a agarose e o álcool polivinílico (PVA).

A agarose, polissacarídeo isolado de algas vermelhas (Rhodophyceae), é constituído de unidades alternadas de D-galactose e 3,6-anidro-L-galactose, com cadeias laterais de 6-metil-D-galactose (GARRET & GRISHAM, 1995). Pode ser processada para a remoção de grupos carregados, fornecendo a Sepharose. Em geral, a Sepharose é ativada com brometo de cianogênio antes do procedimento de imobilização da proteína (Figura 20).

Um problema observado na cromatografia em matrizes contendo proteínas imobilizadas é a baixa eficiência de ligação da matriz decorrente de impedimento estérico que inviabiliza o acesso da molécula a ser isolada ao ligante. O uso de braços espaçadores em várias matrizes cromatográficas, como Sepharose 6B, Sepharose 4B ou Sephadex G-100, minimiza ou resolve este problema, ampliando as possibilidades de interação, uma vez que aumenta a acessibilidade a todos os centros de ligação disponíveis numa proteína. Por outro lado, a incorporação de braços espaçadores pode promover interações não-específicas de várias proteínas à matriz (DEMARTINO, 1989; KARMAI, 2001).

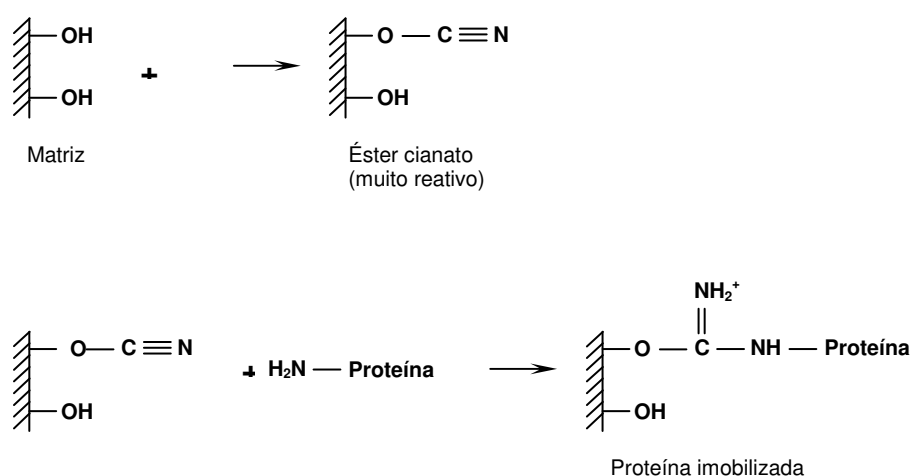


Figura 20. Imobilização de proteína em Sepharose-4B (JANSON & RYDÉN, 1989).

As proteínas podem ser imobilizadas sem que sua estrutura ou função seja perdida, já que possuem um grande número de grupos reativos. Como as lectinas interagem especificamente com carboidratos, esse grupo de proteínas se constitui em excelentes ferramentas para a purificação de glicoproteínas, solúveis ou derivadas de membranas (SANTOS FILHO, 2001). Na tabela 4 estão listadas algumas das lectinas mais usadas, bem como suas especificidades monossacarídicas (PEUMANS & VAN DAMME, 1998).

Tabela 4. Lectinas comumente usadas como ligantes em suportes para cromatografia de afinidade.

Lectina	Especificidade	Matriz
<i>Canavalia ensiformis</i>	Glc/Man	Sepharose-4B
<i>Dolichos biflorus</i>	GalNAc	Agarose
<i>Hellix pomatia</i>	GalNAc	Agarose
<i>Lens culinaris</i>	Glc/Man	Sepharose-4B
<i>Phaseolus vulgaris</i>	GalNAc	Agarose
<i>Pisum sativum</i>	Glc/Man	Agarose

Man, manose; Glc, glicose; GlcNAc, N-acetilglicosamina; Gal, galactose; GalNAc, N-acetilgalactosamina.

Os grupos amino das lectinas são usados para a sua imobilização. No método mais amplamente empregado a imobilização da proteína é feita por reação entre o grupo amino da lectina e o resíduo imidocarbonato da Sepharose-CNBr ativada. Dentre os suportes mais amplamente usados para imobilização de lectinas podem ser citados a Sepharose e a agarose (YOSHIDA et al., 1997).

A lectina de *Cratylia mollis* imobilizada em Sepharose 4B foi capaz de isolar a enzima lecitina colesterol aciltransferase (LIMA et al., 1997); o complexo pode ser então utilizado para o estudo de glicoproteínas de soro humano.

O interesse na purificação de glicoproteínas representa uma vasta área de aplicação em pesquisas. A glicoproteína avidina (66 KDa) constitui 0,05% das proteínas presentes na clara de ovo e seu ponto isoelétrico é 10,0. A avidina é formada por quatro subunidades idênticas. Cada subunidade é composta de 128 resíduos de aminoácidos e é capaz de ligar uma molécula de biotina. Essa habilidade da avidina tem sido base da sua exploração como uma ferramenta molecular na biotecnologia e aplicações terapêuticas e diagnósticas, coletivamente chamadas de biotecnologia da avidina-biotina (ROTHERMUND et al., 2002; MARTTILA et al., 2000).

Algumas lectinas são capazes de atuar sobre linfócitos, fazendo com que estas células passem de um estado quiescente para um estado de crescimento e proliferação. A lectina de *Aloe arborescens* (KOIKE et al., 1995), as lectinas de *Phytolacca americana* (KINO et al., 1995) a lectina de *Cladrastis lutea* (VAN DAMME et al., 1995), a lectina de *Belamya bengalensis* (BANERJEE et al., 2004) e a lectina de semente de *Cratylia mollis* (MACIEL et al., 2004) são alguns exemplos de lectinas com atividade mitogênica e podem ser utilizadas em ensaios *in vitro*.

Lectinas, como a aglutinina de *Canavalia ensiformis* e a aglutinina de gérmen de trigo, podem ser citotóxicas para células de mamíferos tanto *in vitro* como *in vivo*. No entanto, a toxicidade destas proteínas é muito baixa quando comparada com outras toxinas de plantas. A ação tóxica de lectinas sobre células é geralmente seletiva; elas são muito mais ativas sobre células transformadas, que são mais sensíveis aos seus efeitos quando comparadas a células normais (LIS & SHARON, 1986). Portanto, a seletividade do efeito induzido por lectinas pode ser explorada para uma ação antitumoral.

Carboidratos têm um enorme potencial para codificar informação biológica. Eles atuam em processos de reconhecimento, incluindo adesão entre células, células e matriz-extracelular e reconhecimento específico das células por outras (NANGIA-MAKKER et al., 2002; SHARON & LIS, 2004; TAYLOR & DRICKAMER, 2002). Tipos de células diferentes variam na natureza de expressão dos seus carboidratos de superfície e um tipo celular simples pode mudar o perfil de expressão desses carboidratos durante processos de desenvolvimento e diferenciação celulares tais como a carcinogênese (NANGIA-MAKKER et al., 2002; SHARON & LIS, 2004; ORNTOLT & VESTERGAARD, 1999; FUKUDA & HINDSGAUL, 2000). Tem sido observada uma alteração no perfil de alguns carboidratos nas células tumorais como uma forma de escape ao reconhecimento pelas células do sistema imune e o poder destas células de se metastizar (NANGIA-MAKKER et al., 2002; MONZAVI-KARBASSI et al., 2002).

O reconhecimento entre lectinas e carboidratos é específico e, assim, as lectinas têm sido utilizadas em Histologia e Patologia como ferramentas em ensaios citoquímicos para localização de glicoconjugados em diferentes tecidos de animais invertebrados (FRANCESCHINI et al., 2000), em ensaios histoquímicos e imunohistoquímicos para detecção de resíduos glicosilados em superfícies teciduais de humanos, animais e vegetais (JACOBS et al., 1985; BAROU et al., 2002; PEDINI

et al., 2002) e como ferramentas glicohistoquímicas para análises de estruturas de tecidos humanos normais e alterados. Essas proteínas têm sido aplicadas na exploração de tecidos renais de humanos e de outros animais e têm fornecido contribuições importantes para o prognóstico e diagnóstico de doenças em humanos, como o câncer (DANGUY et al., 1998; KABIR, 1998), para distinguir o câncer de próstata e a hiperplasia benigna neste órgão (BASU et al., 2003), para caracterizar e avaliar o padrão de ligação em tecidos humanos de mama transformados (BELTRÃO et al., 1998), para detecção de modificações celulares em vários tecidos (KUNSTFELD & PETZELBAUER, 2001), para detectar inflamação e alterações associadas à neoplasia em intestino humano (BRINCK et al., 1998), e para a caracterização de patologias cerebrais, como a hidrocefalia fetal humana (ULFIG et al., 2003) e prognóstico/diagnóstico de patologias em tecidos cerebrais, como mudanças degenerativas convencionais (NISHI et al., 1999) e tumor meningotelial (BELTRÃO et al., 2003).

Na histoquímica, as lectinas com diferentes especificidades de ligação a carboidratos são ferramentas úteis para investigar mudanças na glicosilação e expressão de carboidratos que podem ocorrer no crescimento e progressão de câncer, doenças metabólicas e outras condições patológicas (SHARON & LIS, 2004; COLEMAN, 2000). Assim, modificações em glicoconjugados na superfície celular e no citoplasma durante transformações malignas em tumores podem ser estudados através da histoquímica com lectinas.

Devido ao fato de algumas lectinas possuírem habilidade para mediar mucoadesão, citoadesão e citoinvasão de drogas (GABOR et al., 2004), essas moléculas têm sido exploradas quanto à sua utilização em sistemas de liberação de drogas. Nesse sentido, lectinas têm sido avaliadas em ensaios biotecnológicos. Lectina de folhas de *Bauhinia monandra* e a lectina de *Lens culinaris* foram incorporadas e também adsorvidas na superfície de nanopartículas, mostrando ser potenciais ferramentas para a utilização dessas nanopartículas em medicamentos de administração oral com liberação controlada (RODRIGUES et al., 2003).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar fitoquimicamente preparações do cerne de *Myracrodruon urundeuva*, isolar e caracterizar parcialmente a lectina do cerne de *M. urundeuva* e avaliar propriedades biológicas e biotecnológicas da lectina isolada.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a composição fitoquímica de extratos salino (ES) e metanólico (EM) do cerne da aroeira, bem como na preparação lectínica obtida por tratamento com sulfato de amônio.
- ✓ Determinar atividade hemaglutinante no extrato salino.
- ✓ Isolar a lectina do cerne de *M. urundeuva*.
- ✓ Determinar a atividade hemaglutinante da lectina com diferentes eritrócitos.
- ✓ Definir a especificidade de ligação da lectina a carboidrato e glicoproteínas.
- ✓ Avaliar a estabilidade térmica e o efeito de íons e pH na atividade hemaglutinante da lectina.
- ✓ Caracterizar a lectina através de eletroforese em gel de poliacrilamida para proteínas nativas e em condições desnaturantes e redutoras.
- ✓ Avaliar a atividade antibacteriana de preparações do cerne: extrato salino, preparação lectínica e lectina isolada.
- ✓ Determinar as concentrações mínima inibitória, mínima bactericida e mínima aglutinante da lectina.
- ✓ Avaliar o efeito antifúngico da lectina contra espécies de *Fusarium*.
- ✓ Avaliar o efeito inseticida da lectina contra cupins da espécie *Nasutitermes corniger*.
- ✓ Avaliar o efeito larvicida das preparações do cerne (extrato salino e preparação lectínica) e da lectina isolada contra o quarto estágio larval (L4) de *Aedes aegypti*.
- ✓ Avaliar as propriedades antioxidantes dos extratos salino e metanólico e da preparação lectínica.

- ✓ Avaliar o potencial biotecnológico da lectina imobilizada, como suporte de afinidade para purificação de glicoproteínas.
- ✓ Avaliar a lectina como marcador histoquímico em tecidos de próstata e hipocampo humanos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Material botânico

Cerne de *M. urundeuva* foi coletado no município de Caxias, Estado do Maranhão. A identificação foi feita pelo professor Gonçalo Conceição, da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA). A exsicata encontra-se depositada no Herbário Aluísio Bittencourt do Centro de Estudos Superiores de Caxias (CESC) da UEMA, sob o número 054.

3.2. Preparação dos extratos

O tronco de *M. urundeuva* foi cortado em discos de 7,0 cm que foram colocados para secar à temperatura ambiente. A parte central (cerne) dos discos foi retirada e reduzida a pó (40 mesh), acondicionada em vidros e armazenada a -20 °C. Cerca de 3 g do cerne de *M. urundeuva* seco e pulverizado foram submetidos à infusão metanólica (10 mL) com agitação durante 30 minutos. O extrato resultante, denominado extrato metanólico (EM), foi submetido à filtração simples em papel de filtro.

Outra parte da farinha do cerne (10 g) foi submetida à extração a 10 % (p/v) em NaCl 0,15 M (100 mL), por 16 h a 4 °C, seguida de filtração em gaze e centrifugação a 8.000 rpm, por 20 min a 4 °C. O extrato resultante foi determinado extrato salino (ES).

3.3. Avaliação fitoquímica

Alíquotas de EM ou ES (15 µL) foram submetidas à cromatografia em camada delgada (CCD) em placas de gel de sílica (Merck, Alemanha). Utilizaram-se diversos sistemas de desenvolvimento e reveladores apropriados para a determinação de alcalóides, polifenóis (derivados cinâmicos, cumarinas, glicosídeos de fenilpropanosídeos, proantocianidinas condensadas, leucoantocianidinas, taninos hidrolisáveis, ácido gálico e flavonóides) e terpenóides (monoterpenóides, sesquiterpenóides, diterpenóides, triterpenóides, esteróides, iridóides e ácido gálico).

3.3.1. Alcalóides (WAGNER & BLODT, 1996)

Alíquotas (15 µL) de EM ou ES foram submetidas à CCD, empregando-se uma mistura Ac-HCCOH-AcOH-H₂O (100:11:11:27, v/v) e revelando-se em seguida com o reagente de Dragendorff. Solução de pilocarpina a 10 % em metanol foi utilizada como padrão. A presença de mancha de coloração alaranjada intensa revela a existência de alcalóides.

3.3.2. Monoterpenóides, sesquiterpenóides e diterpenóides (WAGNER & BLODT, 1996).

Alíquotas (15 µL) de EM ou ES foram submetidas à CCD, empregando-se uma mistura Benzeno-AcOEt (97:3, v/v), revelando-se com vanilina sulfúrica e aquecimento em estufa (100 °C) por 5 min. O surgimento de manchas com coloração azul escura foi usado como critério de evidência da presença de monoterpenóides, sesquiterpenóides, e diterpenóides, de acordo com os valores de R_f (fator de referência) apresentados.

3.3.3. Triterpenóides e esteróides (HARBORNE, 1991)

Alíquotas (15 µL) de EM ou ES foram submetidas à CCD, empregando-se a mistura Ac-HCCOH-AcOH-H₂O (100:0,5:0,5:0,5; v/v), revelando-se o com a solução de Liebermann/Burchard, seguido de aquecimento em estufa (100 °C) por 5 min e, por fim, procedendo-se a visualização no visível e em câmera de U.V. (365 nm). O surgimento de manchas com coloração levemente rósea foi usado como critério de evidência da presença de triterpenóides e esteróides.

3.3.4. Iridóides (WAGNER & BLODT, 1996).

Alíquotas (15 µL) de EM ou ES foram submetidas à CCD, empregando-se a mistura Ac-HCCOH-AcOH-H₂O (100:0,5:0,5:0,5; v/v), revelando-se o cromatograma com Lieberman/Burchard, seguido de aquecimento em estufa (100 °C) por 5 min. Foram utilizados β-amirina, β-sitosterol e ácido ursólico como padrões. O surgimento de manchas de coloração roxa foi usado como critério de evidência da presença de iridóides.

3.3.5. Saponinas (WAGNER & BLODT, 1996).

Alíquotas (15 µL) de EM ou ES foram submetidas à CCD, empregando-se a mistura Ac-HCCOH-AcOH-H₂O (100:0,5:0,5:0,5; v/v), revelando-se o cromatograma com anilsaldeído, seguido de aquecimento em estufa (100 °C) por 5 min. Foi utilizado extrato aquoso metanólico de *Zizyphus joazeiro* Mart. como padrão. O surgimento de manchas com coloração verde escura foi usado como critério de evidência da presença de saponinas.

3.3.6. Cumarinas (WAGNER & BLODT, 1996).

Alíquotas (15 µL) de EM ou ES foram submetidas à CCD, empregando-se uma mistura Éter-tolueno-AcOH 10 % (50:50:50; v/v). Em seguida, o cromatograma foi analisado em câmara U.V. (365 nm). Manchas de fluorescência azul intensa foram usadas como critério de evidência da presença de cumarinas.

3.3.7. Ácido gálico (STIASNY, 1912)

Alíquotas (15 µL) de EM ou ES submetidas à CCD, empregando-se uma mistura de AcOEt-metiletilcetona-HCOOH-H₂O (100:60:10;10; v/v). Foi utilizado ácido gálico como padrão. Manchas de fluorescência azul quando reveladas com o reagente de NEU (solução metanólica a 1 % de difenilborinato de amino-2-etila) foram usadas como critério de evidência da presença de ácido gálico.

3.3.8. Flavonóides (MARKHAN, 1982; NEU, 1956)

Alíquotas (15 µL) de EM ou ES foram submetidas à CCD empregando-se AcOEt-Metiletilcetona-HCOOH-H₂ (100:60:10:10; v/v), revelando-se com reagente de Neu em câmara de U.V. (365 nm). Foram utilizados quercetina (coloração amarela) e quemiferol (coloração verde) como padrões. Manchas de fluorescências alaranjada, amarela ou verde foram usadas como critério de evidência da presença de flavonóides.

3.3.9. Proantocianidinas condensadas e leucoantocianidinas (ROBERTSON et al., 1956).

Alíquotas (15 µL) de EM ou ES foram submetidas à CCD, empregando-se Ac-HCCOH-AcOH-H₂O (100:11:11:27; v/v). Foram utilizados catequina e epigallocatequina como padrões. A presença de coloração vermelha após revelação com vanilina clorídrica foi usada como critério determinante da existência de proantocianidinas condensadas e leucoantocianidinas.

3.3.10. Taninos hidrolisáveis

A presença de taninos hidrolisáveis foi pesquisada de acordo com a metodologia descrita por Stiasny (1912) modificada por Xavier et al.,(2002). Alíquotas (15 µL) de EM ou ES foram submetidas ao tratamento hidrolítico com 15 mL de formaldeído e 5,0 mL de ácido clorídrico concentrado, refluxando-se sob agitação durante 30 min. Quando frio, os hidrolisados foram submetidos à filtração simples em papel e os filtrados tornaram-se desprovidos de formol e ácido por passagem em coluna cromatográfica Duolite S-861, efetuando-se a lavagem com água destilada.

Os fenóis retidos na resina foram desadsorvidos com acetona e submetidos à cromatografia com ácido gálico, empregando-se uma mistura de AcOEt-Metiletilcetona-HCOOH-H₂O (100:60:10:10; v/v), e revelando-se primeiramente com reagente de Neu. Procedeu-se outra CCD, nas mesmas condições, porém revelando-se com Alúmen de ferro 1 %. Utilizou-se ácido gálico como padrão. Manchas de fluorescências azul foram usadas como critério de evidência de taninos hidrolisáveis.

3.4. Fracionamento salino

O extrato salino (ES) foi submetido ao fracionamento com diferentes saturações de sulfato de amônio, visando a purificação parcial das proteínas presentes, de acordo com a técnica de Green & Hughes (1995).

O sulfato de amônio sólido foi adicionado ao extrato, lentamente, sob agitação, segundo o esquema da Figura 21. As frações obtidas por precipitação foram ressuspensas em NaCl 0,15M e submetidas à diálise exaustiva com água

destilada (4 h), seguida de NaCl 0,15 M (4 h). Após diálise, a AH foi determinada. A fração 40-60%, denominada F₁, foi avaliada quanto à presença de metabólitos secundários, de acordo com as metodologias descritas no item 3.3.

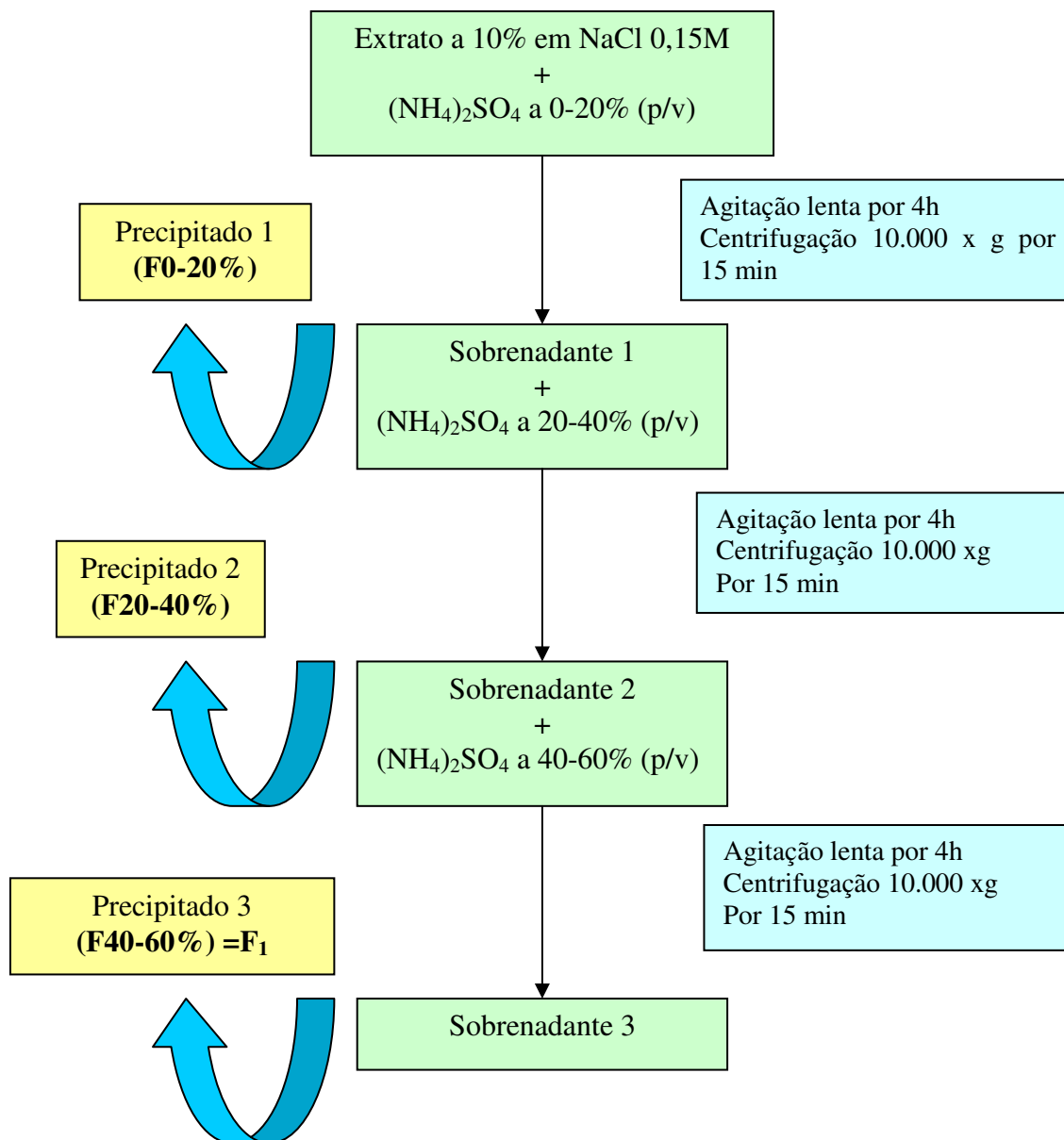


Figura 21. Esquema de purificação parcial da lectina de *Myracrodruon urundeuva*, através de fracionamento com sulfato de amônio.

3.5. Determinação de atividade antioxidante

3.5.1. Ensaio qualitativo

ES, EM e F₁ foram secos por liofilização e o pó obtido utilizado na preparação das soluções utilizadas nos ensaios de determinação de atividade antioxidante, sendo as concentrações determinadas pela relação entre peso seco e volume. Ensaio qualitativo da captação de radicais livres (*free-radical scavenger capacity*) por ES, EM, F₁ e dos padrões ácido ascórbico e catequina (soluções a 1 mg/mL em metanol, 2 mL) foi realizado de acordo com Soler-Rivas et al., (2000) usando “dot-blots” em placas de CCD (sílica-gel 60F254 20 x 10 cm). Diluições (1:2, 1:4 e 1:8) das amostras foram aplicadas, em duplicata, e deixadas a 25 °C para secar por 2-3 minutos. A folha de CCD foi imersa em uma solução a 0,4 mM do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH). Resultado positivo foi observado na folha de sílica como pontos de cor amarela.

3.5.2. Ensaio quantitativo

O efeito de ES, EM e F₁ na solução de DPPH foi mensurado de acordo com os métodos de Brand-Williams et al. (1995) e Soler-Rivas et al. (2000). Controle positivo foi preparado pela mistura de 20 µL de ácido ascórbico (0,5 mg/mL), catequina (1 mg/mL) e 980 µL de DPPH (90 µM). O controle negativo continha 1 mL de metanol puro. Uma alíquota (20 µL) de cada extrato e da fração (1 mg/mL) foi misturada separadamente com a solução metanólica de DPPH 90 µM. Absorbância a 515 nm foi determinada e o desaparecimento do DPPH foi monitorado pela diminuição nos valores de absorbância, que foram registrados nos tempos: 0, 1, 2, 3, 4 e 5 min, e subsequente a cada 5 min, até serem completados 30 min de experimento. A concentração de DPPH durante as reações foi calculada utilizando uma curva de calibração, de acordo com a regressão linear:

$$A_{515\text{nm}} = 0,00853 + 0,00929[\text{DPPH}] \quad (r = 0,99695),$$

sendo a [DPPH] expressa em mg/mL. A percentagem de DPPH remanescente (%DPPH_{REM}) foi calculada de acordo com Brand-Williams et al. (1995), como segue:

$$\% \text{DPPH}_{\text{REM}} = [\text{DPPH}]_{\text{T}} / [\text{DPPH}]_{\text{T0}} \times 100,$$

onde T é o tempo em que a absorbância foi determinada e T₀, o tempo zero. O IP (a quantidade total de DPPH que reagiu com o antioxidante no estado em que a reação atingiu a estabilidade) foi determinado adicionando 50 µL da amostra a 2 mL de uma solução metanólica de DPPH a 90 µM e a absorbância (515 nm) no estado estacionário foi determinada. O IP foi calculado de acordo com a expressão:

$$IP = [(A_{T0} - A_{TS}) / A_{T0}] \times 100,$$

em que A_{T0} é a absorbância no tempo zero e A_{TS} é a absorbância no estado estacionário. Resultados foram expressos como percentagem (%) de inibição.

3.6. Estimativa de proteínas

A determinação da quantidade de proteínas foi realizada de acordo com Lowry et al. (1951). Foram adicionados 1 mL de uma mistura composta de uma solução de carbonato de sódio anidro 2 % (p/v) em hidróxido de sódio 0,1 % (p/v) e de uma solução de sulfato de cobre a 0,5 % (p/v) em citrato de sódio a 1 % (p/v) a um tubo contendo 0,2 mL da amostra convenientemente diluída (em duplicata). A mistura foi agitada e colocada em repouso por 10 min. Em seguida, foi adicionado 0,1 mL do reagente de Folin–Ciocalteu (Merck), previamente diluído a 1:1 com água deionizada, sendo imediatamente misturado em agitador. Após 30 min de incubação em temperatura ambiente, a absorbância a 720 nm foi medida.

A concentração de proteína foi determinada utilizando-se uma curva padrão de albumina sérica bovina (Sigma, Fração V-98 a 99 % em albumina), com amplitude de 0 a 500 µg/mL.

3.7. Determinação de atividade hemaglutinante (AH) (KENNEDY et al., 1995).

Em duas fileiras de placa de microtitulação, foram colocados 50 µL de NaCl 0,15 M em cada poço. Uma alíquota da amostra (50 µL) foi adicionada ao segundo poço da primeira fileira. Diluição seriada foi efetuada e, em seguida foram adicionados em todos os poços 50 µL de suspensão a 2,5 % (v/v) em NaCl 0,15 M de eritrócitos glutarizados de humanos ou de coelho. Após 45 min, a atividade hemaglutinante (AH) foi definida como o inverso da maior diluição com aglutinação

total. AH específica (AHE) foi determinada pela razão AH/concentração de proteínas (mg/mL).

3.8. Cromatografia em coluna de quitina

A coluna (7,5 cm x 1,5 cm) foi empacotada com 10 mL de quitina (polímero de N-acetilglicosamina) à temperatura ambiente e o fluxo ajustado para 20 mL/h. A matriz foi equilibrada com NaCl 0,15M. Uma alíquota de 2,0 mL (27,2 mg) de F₁ foi aplicada à coluna de quitina, que foi lavada com NaCl 0,15 M até a obtenção de uma absorbância (280 nm) menor que 0,05. A eluição (20 mL/h) foi efetuada com ácido acético 1,0 M. As frações (2,0 mL) coletadas foram monitoradas por absorbância a 280 nm e AH. O pico protéico eluído com ácido acético contendo AH foi definido como a lectina de cerne de *M. urundeuva* (MuHL). As soluções de MuHL foram dialisadas em água e NaCl 0,15 M.

A eluição de coluna de quitina a qual foi aplicada F₁ também foi realizada com solução de N-acetilglicosamina (GlcNAc) 0,1 M, sendo as frações (2,0 mL) coletadas monitoradas por absorbância a 280 nm e AH.

3.9. Inibição da AH por carboidratos e glicoproteínas

A AH das preparações do cerne foi avaliada em presença de carboidratos (25 a 200 mM) em NaCl 0,15 M. A solução de carboidrato foi adicionada a todos os poços, exceto no segundo poço da primeira fileira de cada ensaio. Neste poço foram colocados 50 µL de uma solução do respectivo carboidrato com o dobro da concentração em estudo e 50 µL de F₁ ou MuHL, sendo então procedidas diluições seriadas. Após repouso por 15 min, foram adicionados em todos os poços 50 µL da suspensão de eritrócitos glutarizados de coelho. O título foi determinado após repouso durante 45 min.

O ensaio de inibição da AH também foi realizado com soluções de glicoproteínas (1,95 a 500 µg/mL) em NaCl 0,15 M. Assim como no caso dos carboidratos, a solução de glicoproteínas foi adicionada a todos os poços, exceto no segundo poço da primeira fileira de cada ensaio. Neste poço foram colocados 50 µL da solução da respectiva glicoproteína com o dobro da concentração em estudo e 50 µL das amostras lectínicas; foram procedidas diluições seriais e, após repouso por

15 min, foram adicionados em todos os poços 50 μ L de suspensão de eritrócitos glutarizados de coelho. O título foi determinado após repouso durante 45 min.

3.10. Cromatografia em Coluna de GlcNAc-Agarose

A afinidade de MuHL por N-acetilglicosamina foi avaliada através da realização de uma cromatografia em coluna desse monossacarídeo imobilizado em agarose. A coluna (7,5 cm x 1,5 cm) foi empacotada com 10 mL de GlcNAc-agarose e o fluxo ajustado para 20 mL/h. A matriz foi inicialmente equilibrada com NaCl 0,15 M. Uma alíquota de 1,0 mL de F₁ foi aplicada à coluna, que foi lavada com NaCl 0,15 M até a obtenção de uma absorbância (280 nm) menor que 0,05. A eluição foi efetuada com Glicina-NaOH 0,1 M em NaCl 0,15 M pH 9,0 a um fluxo de 20 mL/h. As frações (2,0 mL) coletadas foram monitoradas por absorbância em U.V. a 280 nm e AH.

3.11. Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sephacel

A coluna (10 cm x 2,0 cm) foi empacotada com 5,0 mL da resina trocadora de ânions DEAE-Sephacel à temperatura ambiente e o fluxo ajustado para 20 mL/h. A matriz foi inicialmente equilibrada com tampão fosfato 0,02 M, pH 7,0. Uma alíquota de 3 mL (3 mg) de MuHL dialisada contra água destilada foi aplicada à coluna contendo DEAE-Sephacel. O pico não retido (P_{D1}) foi eluído com tampão fosfato 20 mM até a obtenção de uma absorbância (280 nm) menor que 0,05. A eluição do pico retido, P_{D2}, foi efetuada com gradiente 0-2,0 M. de NaCl. As frações (2,0 mL/h) coletadas foram monitoradas por absorbância a 280 nm e por AH. P_{D2} foi submetido à diálise exaustiva contra água, liofilizado e estocado para posterior caracterização.

3.12. Cromatografias de exclusão molecular

A fim de determinar o grau de pureza das preparações obtidas, MuHL foi avaliada através de cromatografias de exclusão molecular (filtração em gel).

MuHL, isolada através de cromatografia em coluna de quitina, foi aplicada em coluna Hiprep 16/60 Sephacryl S-300 (16 mm x 60 cm) acoplada a ao sistema Äkta-FPLC pré-equilibrado a 24°C com NaCl 0,5 M. A amostra (2,0 mL; 2 mg) foi injetada

e eluída com a mesma solução a um fluxo de 0,5 mL/min, com a absorbância a 280 nm sendo monitorada. Os padrões cromatografados similarmente foram albumina sérica bovina (66 KDa), fetuína (64 KDa), ovoalbumina (45 KDa), inibidor de tripsina do tipo III-O de galinha (28 KDa) e tripsina (25 kDa).

Uma segunda cromatografia de exclusão molecular foi realizada com P_{D2} obtido em coluna de DEAE-Sephacel. Foi utilizada coluna Superose 6HR 10/300 GL acoplada ao equipamento ÄKTA Purifier. A lectina foi dissolvida em tampão fosfato 20 mM pH 7,0 numa concentração final de 1,0 mg/mL e a eluição foi realizada com o mesmo tampão de dissolução da amostra a 0,5 mL/min, sendo monitorada a 280 nm.

3.13. Efeito de íons sobre a AH

A AH foi determinada em presença de íons, de acordo com Shiomi et al. (1979), utilizando diluição dupla seriada de MuHL. Na placa de microtitulação, a lectina foi incubada com soluções (5, 10, 20, 30, 40 e 50 mM) em NaCl 0,15 M dos íons Ca^{+2} , Mg^{+2} e $Ca^{2+}-Mn^{+2}$. A AH foi determinada após 45 min da adição da suspensão de eritrócitos de coelho. A AH de MuHL também foi avaliada após diálise com o agente quelante EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) a concentrações de 10 e 100 mM. Após diálise em NaCl 0,15 M, a lectina tratada com EDTA foi incubada com as soluções de íons utilizadas anteriormente e a AH foi determinada.

3.14. Avaliação da estabilidade térmica e efeito do pH sobre a AH

A avaliação da estabilidade térmica foi efetuada de acordo com Shiomi et al. (1979). F_1 e MuHL (100 μ g/mL de cada amostra) foram aquecidas em banho-maria nas temperaturas de 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 °C, por 30 minutos e, em seguida, imediatamente resfriadas e centrifugadas a 3000 x g por 20 min. A AH nos sobrenadantes foi determinada utilizando eritrócitos de coelho.

O efeito do pH na AH também foi determinado de acordo com Shiomi et al. (1979). F_1 e MuHL foram incubadas em tampões com diferentes valores de pH (citrato-fosfato, pH 3,5 a 6,0; fosfato de sódio, pH 6,5 a 7,5 ; Tris-HCl, pH 7,5 a 9,0) e a AH foi determinada utilizando eritrócitos de coelho.

3.15. Avaliação da AH após tratamento com tripsina

Tripsina bovina (0,1 mg/mL em Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0; 500 µL) foi incubada (37 °C, 60 min) com MuHL (0,2 mg/mL em NaCl 0,15 M; 500 µL). A reação enzimática foi parada por aquecimento (100 °C, 20 min). Um tubo controle contendo a lectina (0,2 mg/mL em NaCl 0,15 M; 500 µL) em Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0 (500 µL) foi submetido à mesmas etapas. Os tubos teste e controle foram avaliados por AH. A atividade da enzima foi avaliada antes e após o aquecimento de acordo com Kakade et al. (1969) pela incubação (30 min at 37°C) de uma alíquota do tubo teste (100 µL) com o substrato N- α -benzoyl-DL-arginil-p-nitroanilida 4 mM (30 µL) dissolvido em dimetil-sulfóxido e diluído com o tampão Tris. A reação foi parada com ácido acético 10 % (p/v) (50 µL). A hidrólise do substrato foi determinada pela medida da absorbância a 405 nm (OLIVA et al., 2000).

3.16. Eletroforese em gel de poliacrilamida para proteínas nativas e básicas

O gel de poliacrilamida, para proteínas básicas nativas, foi preparado segundo a técnica de Reisfeld (1962) sendo utilizadas duas placas de vidro (8 x 8 cm x 1,5 mm) lavadas, desengorduradas e seladas.

5 mL do gel de corrida a 7,5 % (p/v) foi adicionado às placas. O gel constituiu de uma mistura de: 1) 1 mL de solução composta por 48 mL de hidróxido de potássio 1N, 17,2 mL de ácido acético glacial e 4 mL de TEMED); 2) 2 mL de solução de acrilamida 30 %; 3) 1 mL de água destilada; 4) 4 mL de solução de persulfato de amônio 0,28 %; 5) 64 µL de TEMED. Após polimerização, o gel de concentração a 2,5 % (p/v), foi adicionado até o limite superior da placa. O gel constituiu de uma mistura de: 1) 1 mL de solução de 48 mL de hidróxido de potássio 1 N, 2,87 mL de ácido acético glacial e 0,46 mL de TEMED; 2) 1 mL de solução de acrilamida 10 %; 3) 0,5 mL de riboflavina (8 mg para 100 mL); 4) 2 mL de água destilada. Imediatamente, foi posto no gel um pente marcador para a formação dos poços. O gel foi polimerizado sob a luz e, após a polimerização, o pente foi retirado.

Amostras protéicas, com concentrações ajustadas, foram liofilizadas até a secura, diluídas em 30 µL do gel de concentração e aplicadas nos poços, sob luz fluorescente.

As placas foram ajustadas na cuba contendo o tampão (31,2 g de β -alanina, 8 mL de ácido acético glacial e água destilada para um volume final de 1 L). Uma corrente de 150 mA foi aplicada por 3 h, em temperatura ambiente.

A coloração para detecção de proteínas foi realizada com solução de Negro de Amido a 1 % (p/v) em ácido acético a 10 % (v/v), por 30 s. Para a descoloração, foram procedidas sucessivas lavagens do gel com ácido acético 10 % (v/v).

3.17. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes e redutoras

Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo sulfato sódico de dodecila (SDS-PAGE) foi realizada de acordo com Laemmli (1970), utilizando duas placas de vidro (8 x 8 cm x 1,5 mm), rigorosamente lavadas, desengorduradas e seladas. 5 mL do gel de corrida (10 %) foi adicionado às placas.

O gel de corrida foi constituído de uma mistura das seguintes soluções: 1) 29,2 g de acrilamida, 0,8 g de bisacrilamida e água destilada para um volume final de 100 mL; 2) 3,75 mL de água destilada; 3) 2,25 mL de tampão Tris (Tris-hidroximetilaminometano)-HCl 1,5 M, pH 8,8; 4) SDS 10 % (p/v); 5) 45 μ L de persulfato de amônio 10 % (p/v); 6) 8,7 μ L de TEMED (tetrametilenodiamino). Após polimerização, um gel de concentração a 6 % (p/v), foi colocado na placa, consistindo de: 1) 0,5 mL da mistura de acrilamida e bisacrilamida descrita acima; 2) 1,8 mL de água destilada; 3) 780 μ L de tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8; 4) SDS 10 % (p/v); 5) 10,7 μ L de persulfato de amônio 10 %; 6) 5,7 μ L de TEMED. O conjunto placa/géis, com os poços formados, foi ajustado à cuba contendo o tampão Tris-Glicina-SDS (3 g de Tris, 14,4 g de glicina, 1 g de SDS e água destilada para um volume final de 1 L).

Amostras protéicas liofilizadas e os padrões de massa molecular foram ressuspensos em 30 μ L de tampão Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8, contendo SDS 2 % (p/v), β -mercaptoetanol 5 % (v/v), glicerol 10 % (v/v) e azul de bromofenol 0,002 % (p/v), aquecidas a 100 °C, por 5 min, imediatamente resfriadas, e aplicadas ao gel já ajustado à cuba. A corrida foi realizada a 100 mA, por 2 h, em temperatura ambiente. A coloração para detecção de proteínas foi realizada com solução de Azul de Coomassie 0,02 % (p/v) em ácido acético 10 % (v/v) durante 16 h, em

temperatura ambiente. Para descoloração, o gel foi lavado sucessivas vezes com ácido acético 10 % (v/v).

A eletroforese em condições desnaturantes e redutoras também foi utilizada para detecção da natureza glicoprotéica das bandas polipeptídicas. O gel contendo a proteína foi tratado com ácido periódico de Schiff (PAS) (Pharmacia Fine Chemicals, 1980).

3.18. Imobilização de MuHL em Sepharose CL-4B

5 g de Sepharose CL-4B ativada com brometo de cianogênio (Pharmacia, Suécia) foram hidratadas em 70 mL de tampão bicarbonato 0,1 M contendo NaCl 0,5 M, pH 9,0. Após a decantação, a solução da resina foi colocada em funil de placa porosa (vácuo) e lavada com 250 mL de bicarbonato 0,1 M contendo NaCl 0,5 M, pH 9,0; 500 mL de NaCl 0,5 M; 500 mL de HCl 0,5 M; 500 mL de NaCl 0,5 M e 500 mL de bicarbonato 0,1 M contendo NaCl 0,5 M, pH 9,0. Após a decantação, foram adicionados 12,5 mL de MuHL (2,585 mg/mL) e 6,4 mL de NaCl 0,15 M, ficando com um volume final de 20 mL. Distribuiu-se aproximadamente 6 mL da mistura em tubos plásticos, os quais foram vedados e colocados para agitar durante 3 h a temperatura ambiente, seguidas de 16 h a 4 °C. Os sobrenadantes resultantes foram avaliados quanto ao volume e estimativa de proteínas. A estimativa da quantidade de MuHL imobilizada foi feita pela diferença entre a concentração de proteína inicial e aquela determinada nos sobrenadantes.

3.19. Isolamento de glicoproteínas por cromatografia de afinidade em colunas de MuHL imobilizada em Sepharose

As colunas (2,3 x 1,2 cm) foram montadas com MuHL-Sepharose (1,0 mL) e a cromatografia foi realizada em temperatura ambiente. Após a lavagem do suporte (quatro vezes o volume da coluna) com NaCl 0,15 M, as amostras de ovoalbumina (1,0 mL, 0,5 mg), fetuína (1,0 mL, 0,5 mg) soro fetal bovino (1,0 mL, 8,0 mg de proteínas), tireoglobulina (1,0 mL, 0,5 mg de proteínas), extrato da clara do ovo (10 %, v/v; 500 µL, 5 mg de proteínas) ou homogenato da tireóide do porco (10 %, p/v; 500 µL, 4,4 mg de proteínas) foram aplicadas ao suporte.

A etapa de lavagem foi efetuada com o tampão de equilíbrio da coluna. A

eluição foi efetuada com NaCl 1,0 M e o procedimento para cada amostra foi repetido três vezes. As frações de 1,0 mL foram coletadas a um fluxo de 15 mL/h e a concentração protéica foi determinada em cada fração de acordo com a absorbância em 280 nm.

3.20. Histoquímica com MuHL

Foram utilizados blocos de tecidos de próstata normal (5 casos), com hiperplasia benigna (10 casos) e com carcinoma em diferentes graus de malignidade (10 casos), obtidos no Arquivo do Setor de Patologia do Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami (LIKA) e no Setor de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco.

A conjugação de MuHL à peroxidase foi efetuada como descrito por Beltrão et al. (1998). A lectina (3 mg/mL) foi dialisada contra tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,8. Posteriormente, foram adicionados 9 mg de peroxidase a cada mistura. As soluções foram suavemente agitadas, adicionando-se gota a gota 50 µL de uma solução aquosa de glutaraldeído a 1% (v/v). As misturas de reação foram deixadas em repouso por 2 h, em temperatura ambiente, sendo, então, dialisadas por 16 h em tampão fosfato de sódio 0,01 M, pH 6,8, contendo NaCl 0,15 M, a 4 °C. A inibição dos sítios de reconhecimento a carboidrato foi efetuada utilizando N-acetilglicosamina, numa concentração final de 0,3 M.

Cortes de 4 µm dos tecidos foram colocados em lâminas albuminizadas. Em seguida, os tecidos foram desparafinizados com xilol, hidratados com etanol (70-100 %). e tratados com solução de tripsina 0,1 % (p/v) a 37 °C, por 2 min. Um segundo tratamento foi feito com uma solução metanólica de peróxido de hidrogênio a 0,3 % (v/v), por 20 min. Em seguida, as secções histológicas foram tratadas com MuHL conjugada a peroxidase em diferentes concentrações e incubadas a 4 °C por 2 h. A peroxidase foi visualizada utilizando tampão fosfato de sódio contendo soluções de diaminobenzidina (DAB) e peróxido de hidrogênio. As secções histológicas foram, então, contracoradas com hematoxilina e avaliadas através de microscopia ótica.

3.21. Avaliação da atividade antimicrobiana

3.20.1. Ensaios de atividade antibacteriana

As linhagens de bactérias Gram-positivas (*Bacillus subtilis* ATCC-6633, *Corynebacterium callunae* ATCC-15991, *Staphylococcus aureus* ATCC-6538 e *Streptococcus faecalis* ATCC-6057) e Gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC-25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC-29665 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-27853) foram fornecidas pelo Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, sendo mantidas como culturas estacionárias em Ágar Nutriente (AN) a 4 °C.

As bactérias foram cultivadas em Caldo Nutriente (CN) e incubadas sob agitação permanente a 37 °C durante 16 h. As concentrações das culturas foram ajustadas turbidimetricamente a 600 nm para 10^5 - 10^6 unidades formadoras de colônia (UFC)/mL.

O método de difusão em disco (BAUER et al., 1966) foi utilizado no ensaio. As bactérias foram semeadas em meio AN. Extrato bruto, F₁ ou MuHL contendo 725, 309 e 15 µg de proteínas, respectivamente, foram impregnados em discos de papel estéreis e colocados sobre o ágar. Controles negativos e positivos continham NaCl 0,15 M e amoxicilina (1 mg/mL), respectivamente. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. Um anel transparente ao redor do disco de papel revelou atividade antimicrobiana. As zonas de inibição do crescimento (halos) foram medidas em milímetros.

As concentrações mínimas inibitória (CMI) e bactericida (CMB) foram determinadas de acordo com Courvalin et al. (1988). MuHL (0,2 mL, 300 µg) foi adicionada a um tubo de ensaio contendo 1,8 mL de AN. Após homogeneização, diluições sucessivas (1:1) foram procedidas, movendo-se 1 mL do conteúdo do tubo anterior para um outro tubo contendo 1 mL de AN. Em seguida, 0,2 mL da suspensão de microrganismos (fase exponencial de crescimento, $1,5 \times 10^8$ UFC/mL; 0.5 na escala de McFarland) foram inoculados em todos os tubos. Amostras foram incubadas por 24 h a 37 °C. Os tubos de controle continham meio AN e microrganismo. A CMI correspondeu a menor concentração de lectina capaz de inibir o crescimento visível do microrganismo.

A CMB foi determinada a partir das diluições que inibiram o crescimento bacteriano. Diluições de 1:10.000 de cada tubo de ensaio foram realizadas e alíquotas (10 µL) foram removidas e semeadas em placas de Petri contendo meio AN. Leituras foram feitas através da contagem de UFC crescidas nas placas. CMB correspondeu a menor concentração de lectina capaz de reduzir o número de UFC para 0,1 % do inóculo inicial.

3.21.2. Ensaio de aglutinação de bactérias

A atividade aglutinante em células de bactérias foi avaliada através da determinação da concentração mínima aglutinante (CMA) foi registrada. As culturas de bactérias foram diluídas a uma razão de 1:100 com CN. O ensaio de aglutinação foi realizado em placas de microtitulação com duas séries de diluição de MuHL (50 µL de uma solução a 0,6 mg/mL) em NaCl 0,15 M. Uma alíquota (100 µL) da suspensão diluída da bactéria foi adicionada a cada poço. CMA foi determinada pela observação da aglutinação visual após incubação por 16 h das placas a 37 °C. Inibição da aglutinação de bactérias foi realizada com solução de N-acetilglicosamina 200 mM.

3.21.3. Atividade antifúngica

Fusarium solani (URM-2480), *F. oxysporum* (URM-2489), *F. moniliforme* (URM-3226), *F. decemcellulare* (URM-3006) e *F. lateritium* (URM-2491) foram obtidos do Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil. *F. fusarioides* e *F. verticiloides* foram fornecidos pelo Laboratório de Fungos do Solo, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil.

Atividade antifúngica foi realizada através de um ensaio modificado baseado no método de Cunico et al. (2004). A amostra (50 µL; EM, ES ou MuHL [1,0 mg/mL]) foi espalhada em placas de Petri (100 x 15 mm) contendo meio YNB (Yeast Nitrogen Base). Um disco miceliar (0.625 cm de diâmetro) foi disposto no centro da placa de Petri. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Uma solução salina de NaCl 0,15 M e Cercobin 10 ppm foram usadas como controles negativo e positivo, respectivamente. As placas foram incubadas a 28 °C por 72 h. Atividade antifúngica foi indicada pela redução do halo de crescimento do fungo nas placas.

3.22. Avaliação da atividade inseticida contra cupins

Colônias de *Nasutitermes corniger* (Motschulsky) foram mantidas em casa de vegetação do Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

3.22.1. Ensaio termiticida

Atividade termiticida foi avaliada através de um ensaio “sem escolha” baseado no método de Kang et al. (1990). Cada unidade experimental era constituída de uma placa de Petri (90 x 15 mm) com o fundo coberto com papel de filtro. Discos de papel de filtro de 4 cm de diâmetro foram embebidos com 200 µL das soluções de tratamento e, em seguida, colocada em cada placa. Um total de 20 cupins ativos (operários e soldados, na proporção de 4:1) procedentes das colônias mantidas na casa de vegetação foi transferido para cada placa. Os tratamentos foram NaCl 0,15 M (controle negativo), extrato salino (ES), soluções da fração protéica (F₁) e soluções de MuHL (0,1, 0,2, 0,4 e 0, 8 mg/mL). As placas foram mantidas a 28 °C na escuridão.

A avaliação foi realizada diariamente até a morte de todos os insetos. O ensaio foi feito em quintuplicata e as taxas de sobrevivência foram obtidas para cada tratamento e expressas como uma média ± d.p. O teste-t de Student foi realizado utilizando OriginTM 6.0 (Microcal, USA). Diferenças significantes entre os grupos foram consideradas com $p < 0.05$. A concentração necessária para matar 50% dos insetos em cada tratamento (CL₅₀) em 3 dias foi determinada através de análise de probitos (MCLAUGHLIN et al., 1993), a partir de concentrações na faixa entre 0,2 e 0,8 mg/mL, com um intervalo de confiança de 95%.

3.22.2. Ensaio de repelência

Um ensaio “com escolha” baseado no método de Su et al.(1982) foi utilizado para avaliar a atividade repelente. Placas de Petri (90 x 15 mm) foram preenchidas com ágar 2% até que não houvesse espaços entre a superfície do ágar e a tampa das placas. Após a solidificação, poços foram feitos no ágar através da remoção de um cilindro central de 25 mm de diâmetro e de 8 cilindros na periferia de 6 mm de diâmetro. Em cada poço periférico foi colocado papel de filtro embebido com 15 µL

das soluções de MuHL (0.2, 0.4 e 0.8 mg/mL) e NaCl 0,15 M (controle negativo). Cada solução de tratamento estava presente em dois poços de cada placa, assim como o controle negativo. 16 operários e 4 soldados foram transferidos das colônias para o poço central. As placas foram mantidas a 28 °C na escuridão e foram observadas a presença ou ausência de cupins nos poços periféricos e os padrões de construção de túneis no ágar, além do fechamento de galerias construídas. O ensaio foi realizado em triplicata.

3.23. Avaliação da atividade inseticida contra *Aedes aegypti*

3.23.1. Larvas de *Aedes aegypti*

Os ovos de *A. aegypti* foram mantidos até a eclosão em recipientes contendo água destilada, por submersão, num limite de temperatura de 25–27 °C. Para permitir que as larvas crescessem e realizassem as mudas, foi oferecida ração para gatos autoclavada de acordo com a quantidade de larvas. Ao atingirem o quarto estágio larval (L₄), as larvas foram separadas e utilizadas na determinação da atividade larvicida.

3.23.2. Bioensaio Larvicida

ES, F₁ e MuHL foram avaliados quanto à atividade larvicida sobre o quarto estágio larval (L₄) de *A. aegypti* utilizando o bioensaio descrito por Navarro et al. (2003) de acordo com as recomendações da Organização Mundial de Saúde. Para estabelecer o valor da LC₅₀ (a concentração de proteínas, em mg/mL, necessária para matar 50% das larvas), diluições de ES, F₁ e MuHL foram realizadas a partir de soluções-estoque para prover uma faixa de concentração de trabalho. A concentração de proteínas nos estoques foram de 25 mg/mL em ES, 12,9 mg/mL em F₁ e 0,274 mg/mL em MuHL.

O ensaio foi realizado em triplicata. Para todas as concentrações da amostra, foi utilizado um volume final de 20 mL e 20 larvas em estágio L₄ (cabeça branca). Todos os ensaios foram conduzidos com fotoperiodismo 12:12 em temperaturas variando entre 25-27 °C. As larvas foram observadas após 24 e 48h e foram consideradas mortas quando não respondiam aos estímulos tornando-se

completamente imóveis ou quando elas não subiam à superfície da solução (Organização Mundial de Saúde, 1981).

Cada ensaio foi acompanhado por um controle negativo que continha larvas tratadas com água destilada e solução salina (NaCl 0,15 M). A LC_{50} foi calculada através de análise de probitos (MCLAUGHLIN et al., 1993) com intervalo de confiança de 95%, utilizando o programa *Probit Analysis* (Statplus 2006) e através de regressão linear simples utilizando o programa Origin 8.0.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação fitoquímica

ES e EM foram avaliados por CCD e foi constatada a predominância de proantocianidinas condensadas (taninos catéquicos) e leucoantocianidinas em ambos extratos (Figura 22). ES e EM não apresentaram, nas condições utilizadas, alcalóides, polifenóis (cumarinas, glicosídeos de fenilpropanosídeos) e terpenóides (monoterpenóides, sesquiterpenóides, diterpenóides, triterpenóides, esteróides, iridóides, saponosídeos e taninos hidrolisáveis).



Figura 22. Cromatograma dos componentes polifenólicos dos extratos do cerne de *M. urundeuva*.

ES (extrato salino), EM (extrato metanólico), P₁ (padrão: catequina) e P₂ (padrão: epigallocatequina).

Os cromatogramas visualizados a U.V. (365 nm) de EM e ES (Figura 23 A e B), apresentaram flavonóides, com maior intensidade em EM: derivados cinâmicos (coloração azul intensa), luteolina (amarelo canário) e ácido gálico (coloração azul) que adquiriu após revelação com reagente de Neu uma fluorescência de coloração violeta. CCD com padrão de ácido gálico revelou a presença desta substância (R_f e coloração idênticos).

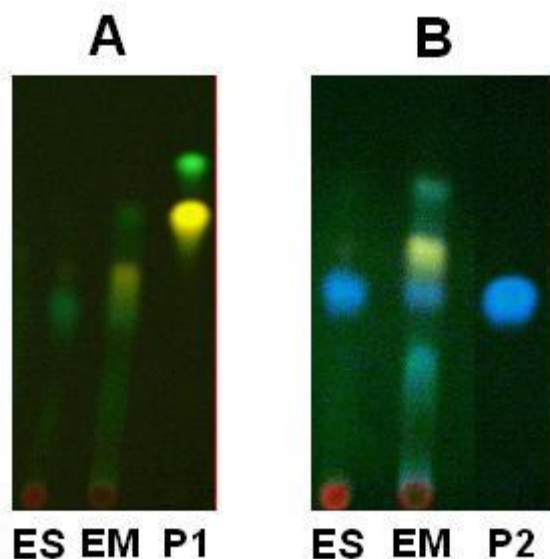


Figura 23. Cromatograma dos flavonóides do cerne de *M. urundeuva*. ES (extrato salino), EM (extrato metanólico), P1 (padrões: quecetina-cor amarela; quemiferol-cor verde) e P2 (padrão: ácido gálico).

4.2. Isolamento e caracterização da lectina do cerne de *M. urundeuva* (MuHL)

ES apresentou elevada concentração protéica (13,6 mg/mL) e AH (32.768), constituindo-se, portanto, em um material adequado para a purificação subsequente de lectinas presentes. Os extratos salinos do cerne de outras madeiras, como jatobá (*Hymenaea stigonocarpa*) e sucupira (*Bowdichia virgilioides*), também foram avaliados quanto à presença de lectinas, mas não apresentaram AH.

ES, F₁ e MuHL aglutinaram eritrócitos de todos os tipos sanguíneos do sistema ABO, assim como eritrócitos glutarizados de coelho. A maior AH de MuHL foi obtida com eritrócitos humanos do tipo O. F₁ e MuHL também apresentaram elevado título com eritrócitos de coelho (Tabela 5). As lectinas de *Splenostyles stenocarpa* (MACHUKA et al., 1999) também apresentaram preferência para tipo O. Eritrócitos de coelho foram selecionados para os ensaios de hemaglutinação de MuHL devido à facilidade de obtenção e menor risco em sua manipulação. Os eritrócitos de coelho são rotineiramente utilizados para determinação de AH de lectinas. A diferença de AH entre diferentes tipos de células é devido a diferenças na cadeia de glicoproteínas da superfície dos eritrócitos, que podem não ser reconhecidas pela lectina ou ser fracamente ou, ainda, fortemente reconhecidas.

F₁ constituiu a amostra de escolha para a purificação de MuHL através de processos cromatográficos, desde que apresentou alta AHE (Tabela 6). A AH de F₁

foi inibida parcialmente por N-acetilglicosamina e pelas glicoproteínas fetuína, ovoalbumina, tireoglobulina e azocaseína (Tabela 7). A inibição com N-acetilglicosamina estimulou a purificação da lectina através de cromatografia de afinidade em colunas de quitina e de Agarose-N-acetilglicosamina. A avaliação fitoquímica de F₁ por CCD demonstrou somente a presença de resquícios de leucoantocianidinas (Figura 24), estando a preparação pura em relação aos demais metabólitos analisados.

Tabela 5. Atividade hemaglutinante de F₁ e MuHL com diferentes eritrócitos

Eritrócitos	AH ⁻¹	
	F ₁	MuHL
Humanos		
A	128	512
B	512	1024
AB	256	1024
O	262.144	32.768
Coelho	32.768	1024

Tabela 6. Purificação de MuHL por cromatografia em coluna de quitina.

Amostra	Volume (mL)	Proteína (mg/mL)	Proteína total (mg)	AH (título ⁻¹)	AHE	AHT	R %	Purificação (vezes)
ES	70,0	13,6	952	32.768	2.409	2.293.760	100	1,0
F ₁	14,2	10,3	146,2	32.768	3.181	465.306	20,2	1,3
MuHL	23,0	0,40	9,3	1.024	2.560	23.552	1,0	1,1

AH específica (AHE) determinada pela razão AH/proteína (mg/mL). Rendimento (R) corresponde a AH Total (AHT) recuperada na etapa. Purificação (P) determinada pela razão AHE da etapa/AHE do extrato.

O processo de purificação através de cromatografia de coluna de quitina (Figura 25; Tabela 6) constituiu a principal etapa de purificação, sendo o pico ativo (MuHL) obtido através dessa etapa utilizado na avaliação das atividades biológicas da lectina purificada.



Figura 24. Cromatograma dos componentes polifenólicos de F₁.
P₁: padrão catequina e P₂: padrão epigallocatequina.

Tabela 7. Inibição da AH de F₁ e MuHL com carboidratos e glicoproteínas.

Carboidrato e glicoproteínas	AH ⁻¹	
	F ₁	MuHL
Carboidrato		
N-acetil-D-glicosamina (mM)		
200	512	64
100	1024	64
50	1024	64
25	1024	64
12,5	4.096	N/I
6,25	4.096	N/I
Glicoproteínas (500 µg/mL)		
Azocaseína	2	2
Fetuína	8	8
ovoalbumina	2	2
Tireoglobulina	16	16

N/I: não inibiu. AH em NaCl 0,15 M: F₁ - 32.768; MuHL - 1.024.

Na cromatografia em coluna de quitina (Figura 25), foram obtidos dois picos bem definidos: o primeiro, não adsorvido à coluna, com uma forte coloração de tom roxo claro, típica de F₁, sem AH; e o segundo, eluído em ácido acético 1 M, apresentando-se clarificado e com AHE de 2.560, denominado MuHL (Tabela 6). O

protocolo estabelecido para o isolamento de MuHL utilizando o suporte quitina constitui um meio bastante econômico, uma vez que o suporte é reutilizado por várias vezes consecutivas, com o mesmo rendimento. Este resultado é bastante significativo, uma vez que lectinas ligadoras de quitina, polímero de N-acetilglicosamina, podem ter um papel na defesa de plantas contra fungos e insetos (FREIRE et al., 2002).

MuHL foi inibida por N-acetilglicosamina (Tabela 7). A afinidade de MuHL por esse monossacarídeo foi avaliada de outras duas maneiras. Primeiramente, foi realizada uma cromatografia de F_1 em coluna de quitina, utilizando-se solução de N-acetilglicosamina 0,1 M como eluente em vez do ácido acético. O cromatograma (Figura 26) mostra que a AH foi recuperada após a eluição com o monossacarídeo. A desorção de lectinas ligadas à matriz de afinidade tem sido eficiente em soluções contendo o carboidrato inibidor da AH (PAIVA & COELHO, 1992). A segunda maneira constitui na cromatografia de F_1 em coluna de Agarose-GlcNAc (Figura 27). A AH só foi detectada nas frações eluídas com Glicina-NaOH 0,1 M em NaCl 0,15 M, pH 9,0.

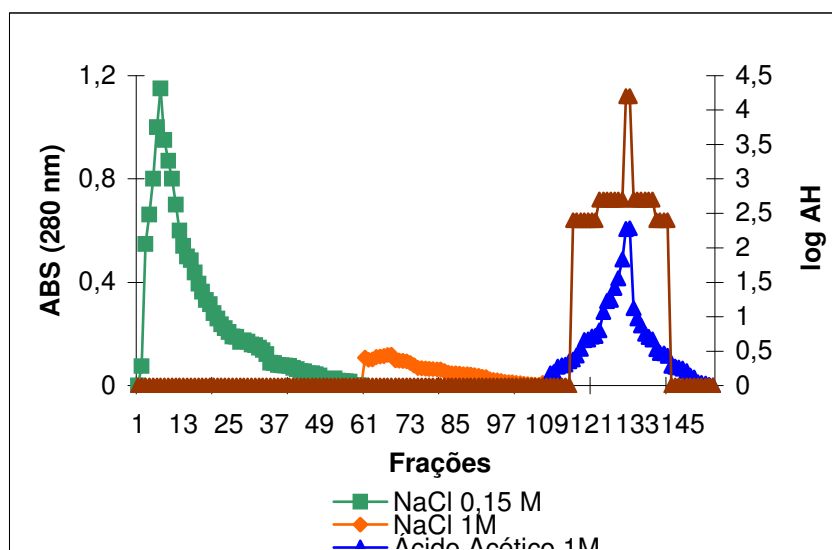


Figura 25. Cromatografia de F_1 (20.6 mg) em coluna de quitina (7,5 x 1,5 cm). O suporte foi equilibrado com NaCl 0,15 M a um fluxo de 20 mL/h. Frações de 2,0 mL foram coletadas. MuHL foi obtida através de eluição com ácido acético 1,0 M.

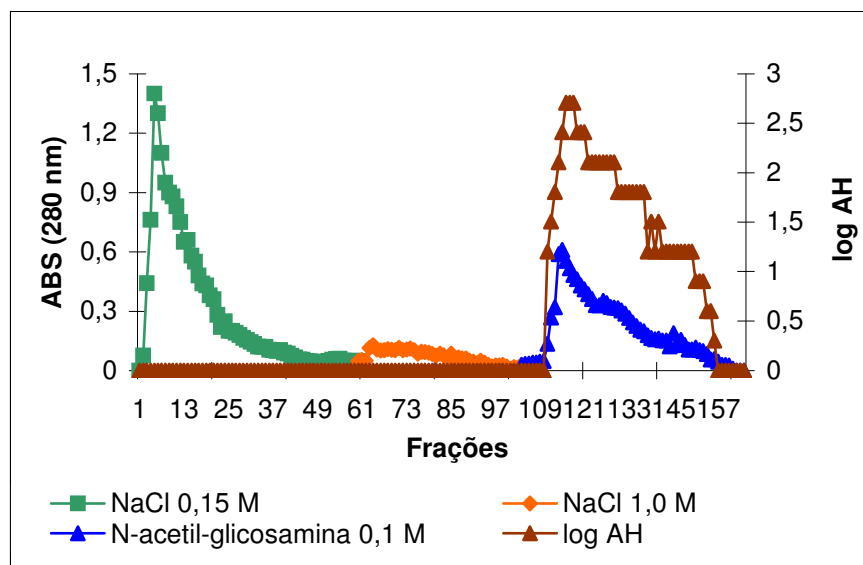


Figura 26. Cromatografia de F₁ (20 mg) em coluna de quitina utilizando N-acetilglicosamina como eluente. O suporte foi equilibrado com NaCl 0,15 M a um fluxo de 20 mL/h. Frações de 2,0 mL foram coletadas.

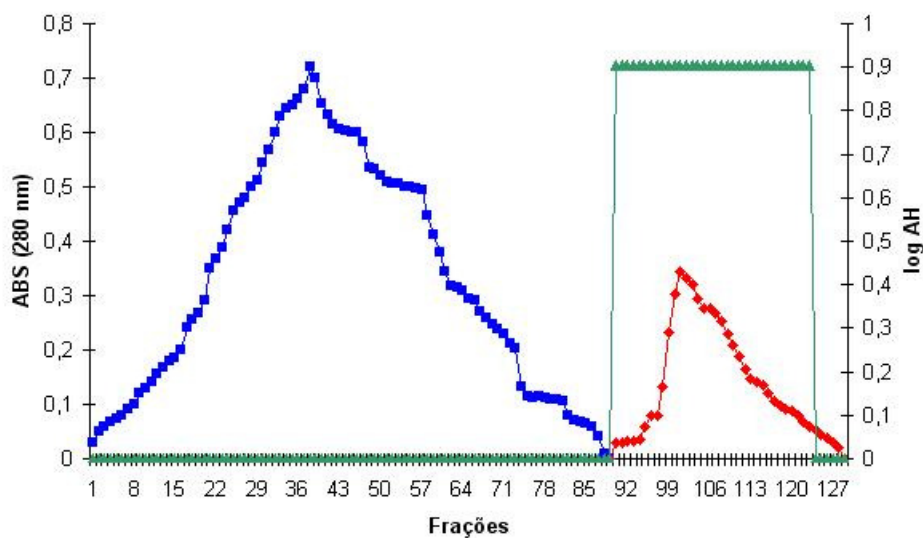


Figura 27. Cromatografia de F₁ em coluna de Agarose-N-acetil-glicosamina. O suporte foi equilibrado com NaCl 0,15 M a um fluxo de 20 mL/h (em azul). Frações de 2,0 mL foram coletadas. A AH (em verde) foi recuperada com Glicina-NaOH 0,1 M em NaCl 0,15 M, pH 9,0 (em vermelho).

A homogeneidade de MuHL, isolada por cromatografia em coluna de quitina (Figura 26) foi avaliada por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida para proteínas nativas ácidas ou básicas. Nenhuma banda polipeptídica foi detectada em gel para proteínas ácidas. Em eletroforese para proteínas nativas básicas (Figura 28), apenas uma banda foi detectada, indicando a homogeneidade da lectina isolada.

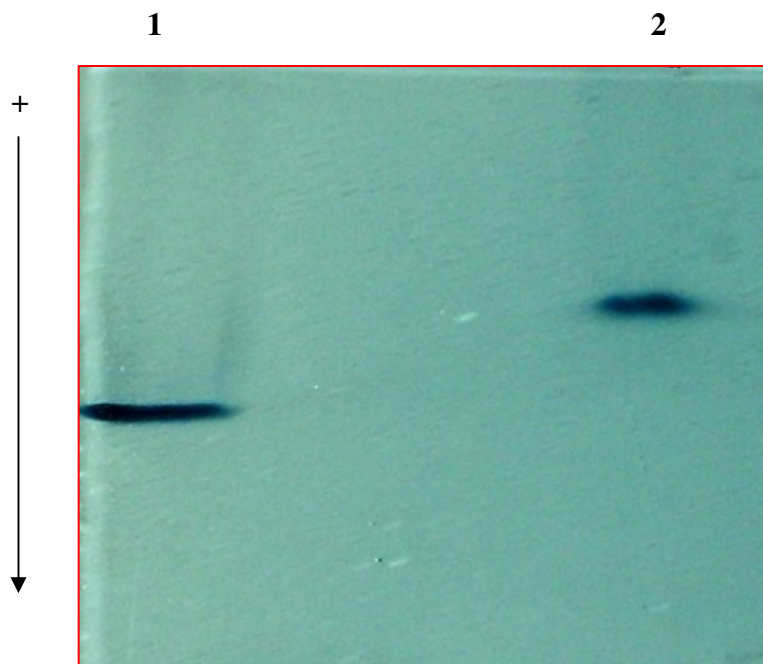


Figura 28. Eletroforese em gel de poliacrilamida (7,5 %, p/v) para proteínas nativas básicas. Coloração efetuada com Negro de amido (1%, p/v) em ácido acético 10 % (v/v). (1) Citocromo c; (2) MuHL (180µg).

Poli-peptídeo de aproximadamente 14,4 kDa (Figura 29D) foi detectado quando MuHL foi submetida a eletroforese em condições desnaturantes e redutoras (SDS-PAGE). A banda também foi observada nas preparações ES e F₁ (Figuras 29 A e B, respectivamente). Coloração com ácido periódico de Schiff revelou a natureza glicoprotéica de MuHL (Figura 29C).

Visando avaliar a homogeneidade da lectina isolada, MuHL foi submetida à cromatografia em coluna DEAE-Sephacel (Figura 30). Foram obtidos dois picos ativos: P_{D1}, não adsorvido, e P_{D2}, eluído com NaCl 0,5 M. P_{D1} e P_{D2} foram analisados em SDS-PAGE (Figura 31) e apresentaram o mesmo padrão eletroforético de MuHL.

MuHL e P_{D2} foram submetidos à cromatografia de gel filtração. O perfil cromatográfico de MuHL (Figura 32) revelou um pico principal de 21 kDa. Quando P_{D2} foi cromatografado (Figura 33), perfil semelhante foi obtido e tanto o pico principal como o outro pico associado a ele apresentaram o mesmo perfil em SDS-PAGE (Figura 34).

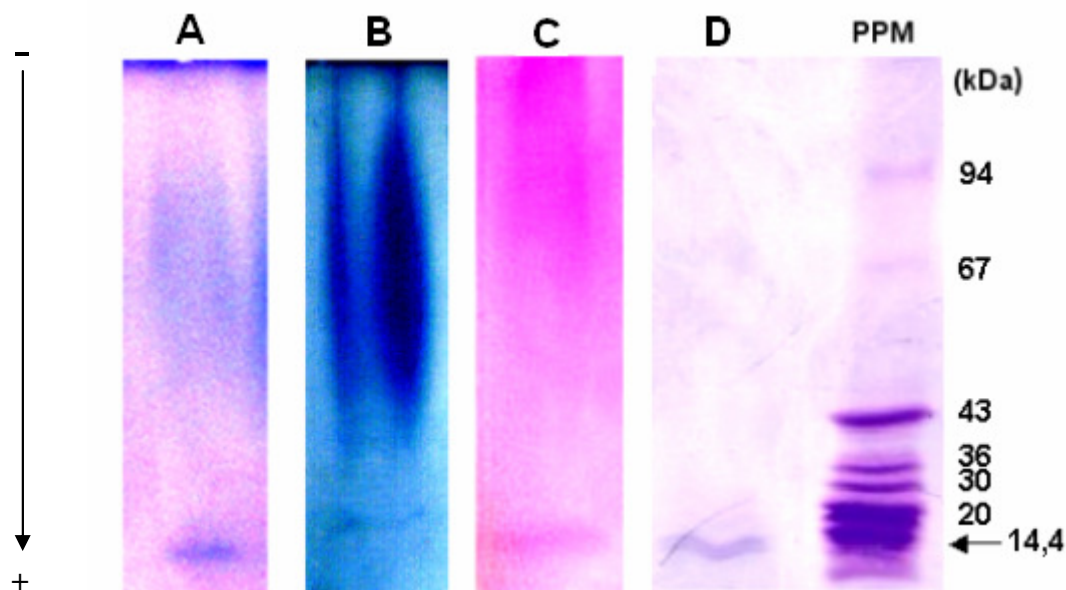


Figura 29. SDS-PAGE (10 %, p/v) de ES (A), F₁ (B), MuHL corada com ácido periódico de Schiff (C) e MuHL corada com Azul de Coomassie (D).

Padrão de peso molecular (PPM): fosforilase b (94 kDa), albumina sérica bovina (67 kDa), ovoalbumina (43 kDa), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (36 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20 kDa) e α -lactoalbumina (14,4 kDa). ES, F₁ e MuHL contendo 180 μ g de proteínas.

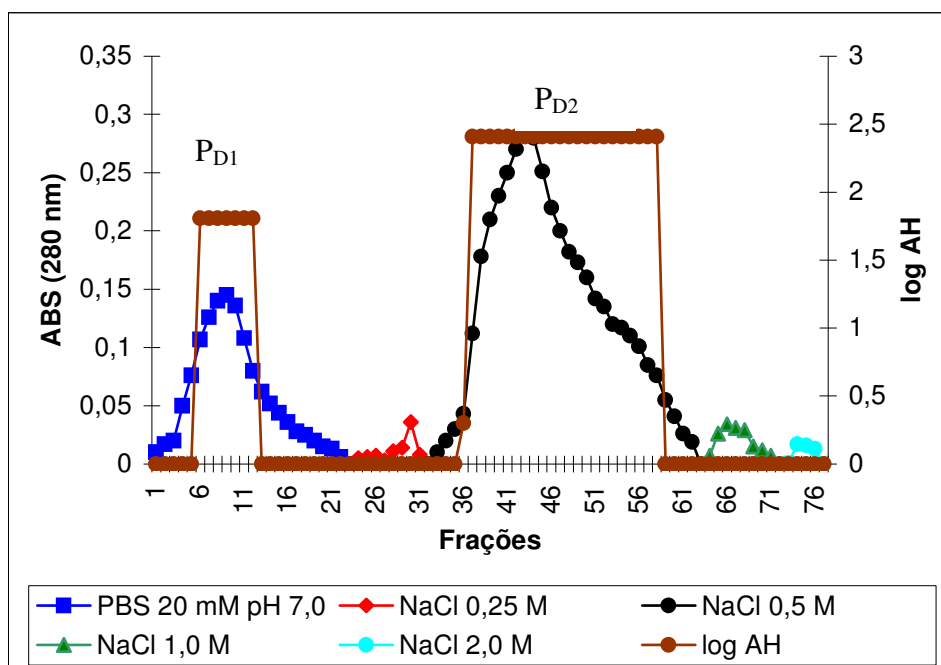


Figura 30. Cromatografia de MuHL em coluna DEAE-Sephacel (2,0 x 10,0 cm).

O suporte foi equilibrado com tampão fosfato (PBS) 20 mM, pH 7,0, a um fluxo de 20 mL/h. Frações de 2,0 mL foram coletadas. A AH foi recuperada com NaCl 0,5 M.

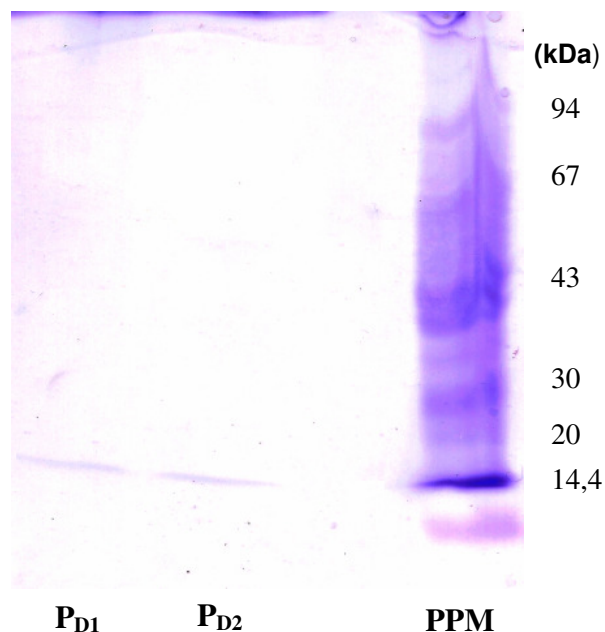


Figura 31. SDS-PAGE de P_{D1} e P_{D2} . Padrão de peso molecular (PPM): fosforilase b (94 kDa), albumina sérica bovina (67 kDa), ovoalbumina (43 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20 kDa) e α -lactoalbumina (14,4 kDa).

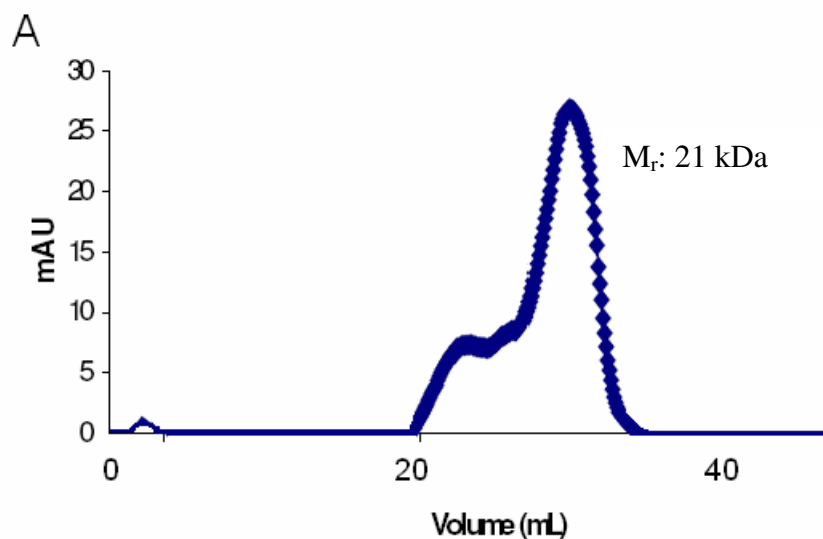


Figura 32. Cromatografia de exclusão molecular de MuHL acoplada ao equipamento Äkta-FPLC System. A lectina (1 mg/mL), isolada através de cromatografia em coluna de quitina, foi aplicada em coluna Sephacryl S-300 (16 mm x 60 cm). Eluição foi realizada com NaCl 0,5 M e frações (3 mL) foram coletadas a um fluxo de 0,5 mL/min. O perfil cromatográfico de MuHL revelou um pico principal de 21 kDa.

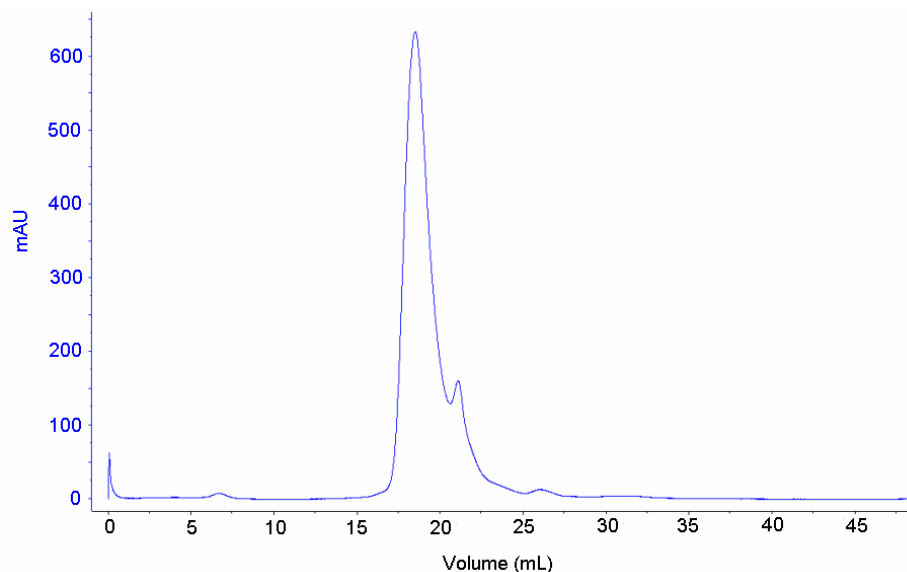


Figura 33. Cromatografia de exclusão molecular de P_{D2} .

A preparação (1 mg/mL), obtida em coluna DEAE-Sephacel, foi aplicada em coluna Superose 6HR 10/300 GL acoplada ao equipamento ÄKTA Purifier. Eluição foi realizada com tampão fosfato 20 mM pH 7,0 e frações (3 mL) foram coletadas a um fluxo de 0,5 mL/min .



Figura 34. SDS-PAGE (10 %, p/v) dos picos (P_{AK1} e P_{AK2}) obtidos na cromatografia de P_{D2} em coluna Superose 6HR 10/300 GL.

A AH de MuHL foi avaliada a diferentes temperaturas (Figura 35) e o ensaio indicou que a AH é termoresistente, permanecendo elevada após aquecimento a 100 °C. Comportamento semelhante foi observado com Cramoll, a lectina de sementes de *Cratylia mollis* que, na temperatura de 80°C, manteve AH elevada

(CORREIA & COELHO, 1995). A lectina da vagem de *Caesalpinia ferrea* (XIMENES, 2004) também se manteve ativa após 30 min a 100 °C. Já a lectina de entrecasca de *Crataeva tapia* (ARAÚJO, 2004) teve sua AH abolida a temperaturas acima de 60 °C e a lectina do líquen *Cladonia verticillaris* (SILVA, 2004) também mostrou ser sensível ao aumento da temperatura, havendo redução gradual de sua AH a partir de 40 °C e perda total a 70 °C. A AH da lectina do líquen *Dictyonema glabratum* (ELIFIO et al., 2000) também foi afetada pelo aquecimento, sendo diminuída a partir dos 40 °C e totalmente perdida aos 80 °C. Outras lectinas termossensíveis são a do cogumelo *Mycoleptodonoides aitchisonii* (KAWAGHISHI et al., 2001), que perdeu totalmente sua AH a 50 °C, e a lectina de folhas de *Bauhinia membranacea* (FERNANDES, 2006). A perda da AH após aquecimento está associada ao processo de desnaturação protéica (ELIFIO et al., 2000).

A AH de MuHL se manteve após a incubação com tripsina bovina, indicando que a lectina é resistente à degradação proteolítica. A resistência à degradação por enzimas do trato digestivo é uma característica importante em lectinas das quais se pretende avaliar uma atividade inseticida, uma vez que a maior parte dos efeitos entomotóxicos descritos para lectina ocorre a nível do trato gastrointestinal (MACEDO et al., 2007).

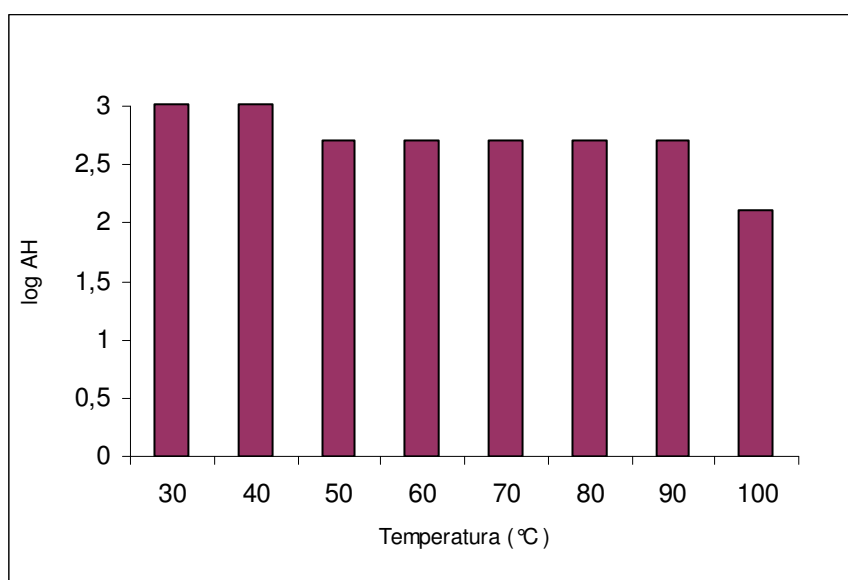


Figura 35. Efeito da temperatura sobre a AH de MuHL (1 mg/mL). A AH da lectina em temperatura ambiente corresponde à observada a 30 °C. AH com eritrócitos de coelho.

MuHL apresentou AH tanto em valores de pH básicos quanto ácidos (Figura 36). No ensaio, foi observado que a lectina tem maior AH em pH 5,5, enquanto em pH básico, MuHL apresentou redução na sua AH. Assim, MuHL é uma lectina sensível a variação de pH.

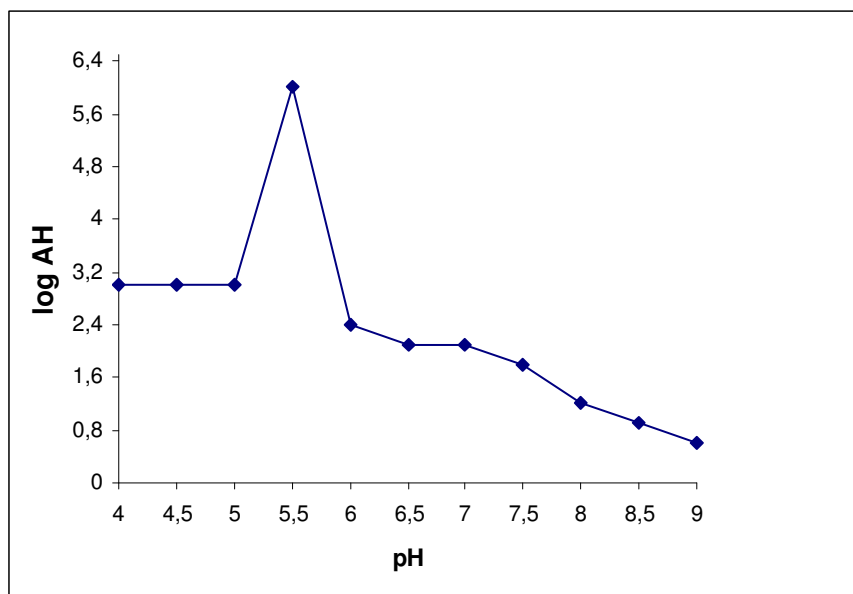


Figura 36. Efeito do pH sobre a AH de MuHL.

AH determinada com eritrócitos de coelho.

O efeito de cátions divalentes na AH de MuHL foi avaliado pela adição de íons após diálise da lectina com EDTA. A lectina foi estimulada por Ca^{+2} , Mg^{+2} e Mn^{+2} (Figura 37). A AH de lectinas pode ser estimulada, inibida ou não afetada pela presença de íons. A lectina da hemolinfa do camarão branco *Litopenaeus setiferus*, LsL, é dependente de cátions divalentes (ALPUCHE et al., 2005), ao contrário da lectina de *Arundo donax*, ADL, que não necessita de íons metálicos para sua AH (KAUR et al., 2005).

4.3. Imobilização de MuHL em Sepharose-CL-4B e avaliação da ligação de glicoproteínas ao suporte.

Matrizes contendo lectina imobilizada representam uma alternativa para a purificação de glicoconjugados, sendo o princípio de separação a interação lectina-porção glicídica da molécula.

Colunas contendo lectinas imobilizadas foram usadas para fracionar

oligossacarídeos derivados de glicoproteínas (ENDO, 1996), para análise estrutural de oligossacarídeos (KOBATA & ENDO, 1992; MATSUI et al., 2001), para análise de glicoconjugados de tegumento de *Schistosoma mansoni* (HAYUNGA et al., 1986), para isolamento de glicoproteínas do vírus da imunodeficiência de símios (GILLJAN et al., 1994) e para o isolamento das enzimas fosfatase ácida de próstata humana (VAN ET TEN & SAINI, 1977) e da lecitina colesterol aciltransferase de plasma humano (LIMA et al., 1997).

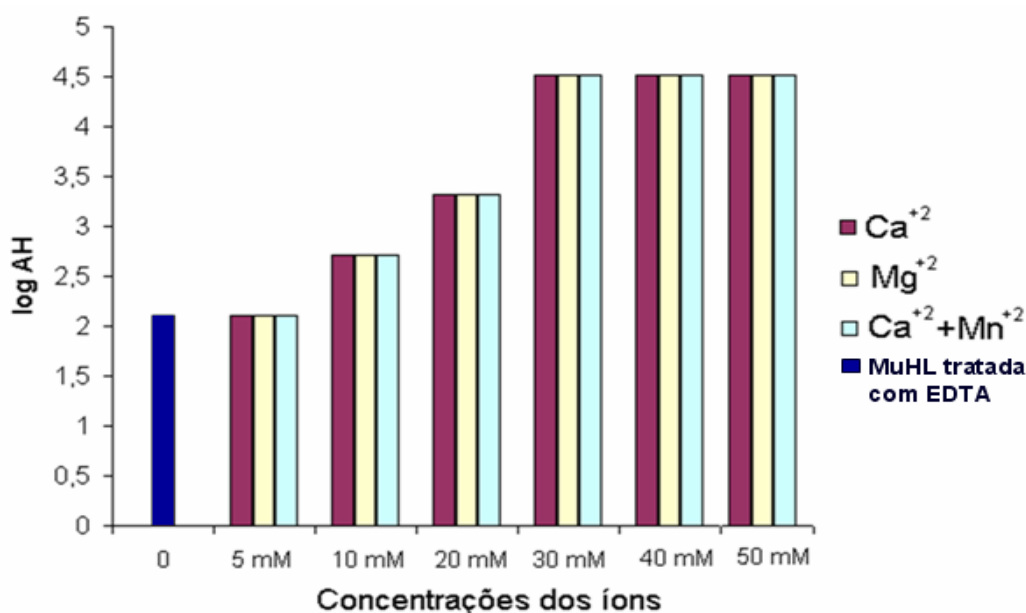


Figura 37. Efeito da presença de cátions divalentes na AH de MuHL após tratamento com EDTA. AH determinada com eritrócitos de coelho.

Amostra de MuHL (32 mg) foi imobilizada em Sepharose CL-4B. Determinação quantitativa da proteína solúvel após o processo de imobilização revelou que 60 % (19,3 mg) de MuHL foi imobilizada. A matriz MuHL-Sepharose foi capaz de reter as glicoproteínas (Figuras 38 e 39) comerciais fetuína (38A), tireoglobulina (38C) e ovoalbumina (39B), assim como glicoproteínas presentes no homogenato da tireóide de porco (38B), soro fetal bovino (39A) e extrato da clara de ovo (39C). A eluição das glicoproteínas foi realizada com NaCl 1,0 M (Tabela 8), através de alteração da força iônica. Os resultados mostram que MuHL imobilizada permanece com a propriedade de ligação a carboidratos e pode ser aplicada no fracionamento e purificação de glicoproteínas, similar às isolectinas de *Cratylia mollis* (PAIVA et al., 2003).

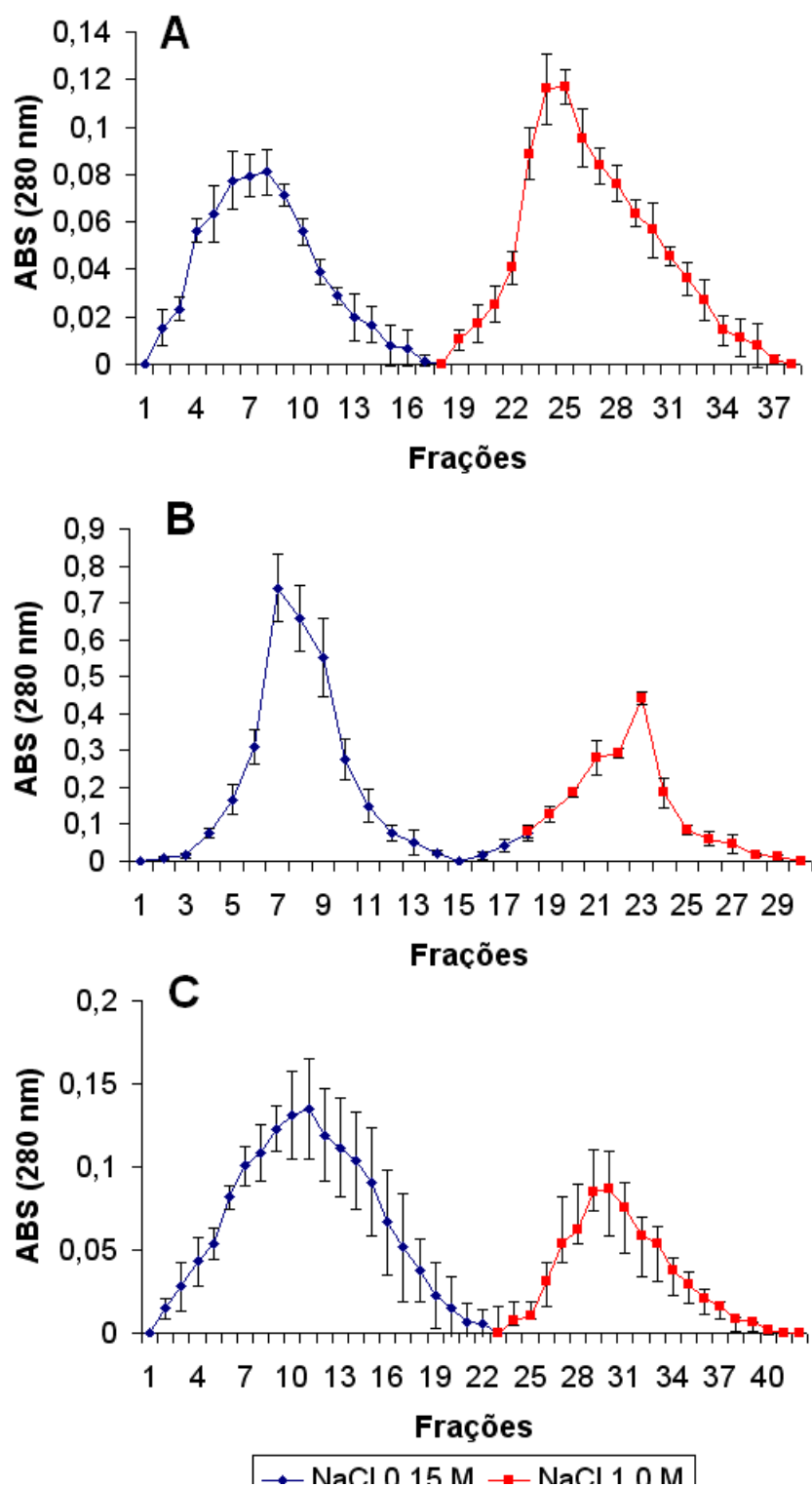


Figura 38. Cromatografia de preparações contendo glicoproteínas em MuHL-Sepharose CL-4B (2,3 x 1,2 cm).

Amostras de fetuína (0,5 mg) (A), homogenato da tireóide de porco (4,4 mg) (B) e tireoglobulina (0,5 mg) (C) foram aplicadas à coluna. Frações de 1,0 mL foram coletadas. Cada barra representa a média $\pm$ d.p. de três experimentos.

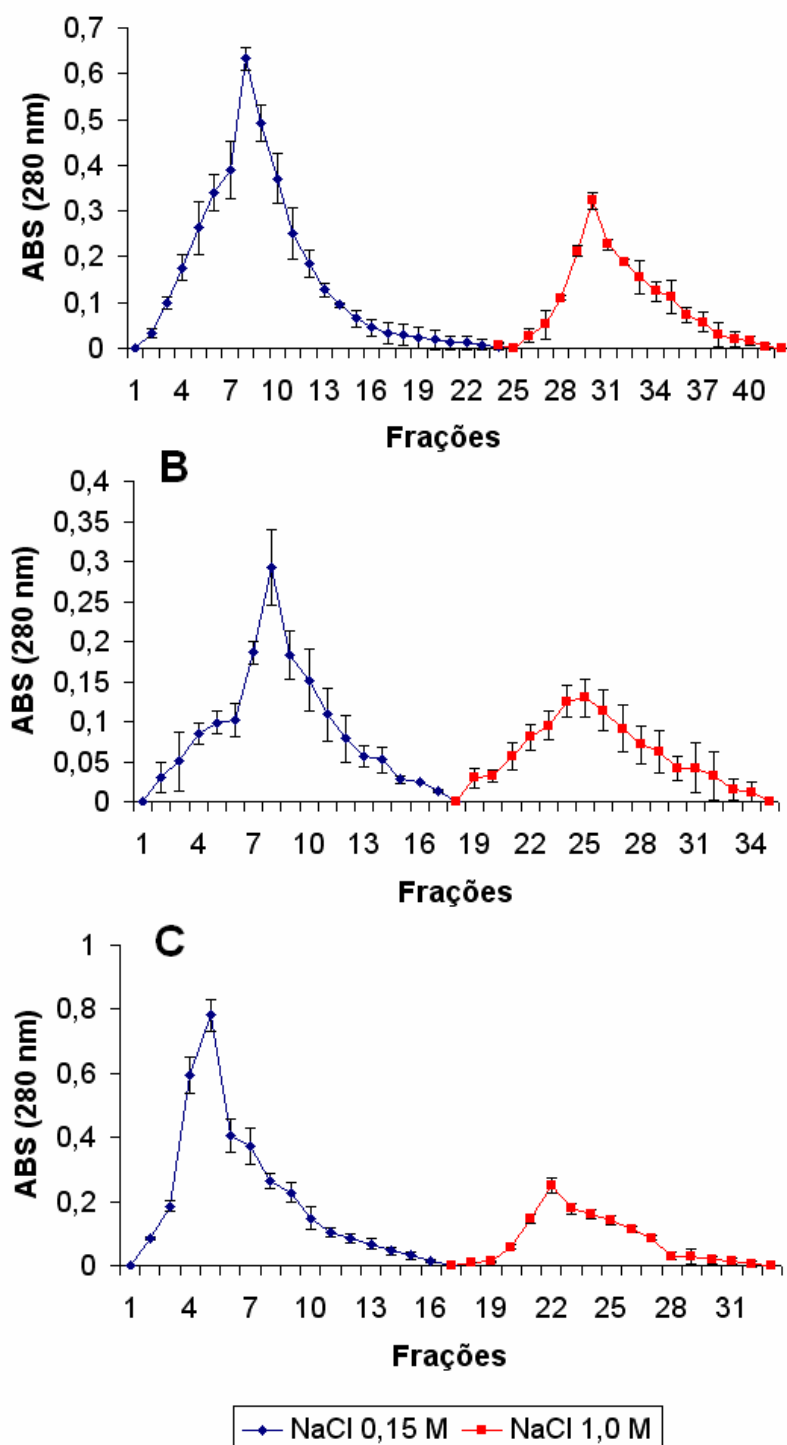


Figura 39. Cromatografias de preparações contendo glicoproteínas em MuHL-Sepharose CL-4B (2,3 x 1,2 cm).

Amostras de soro fetal bovino (8 mg) (A), ovoalbumina (0,5 mg) (B) e extrato da clara de ovo (5 mg) (C) foram aplicadas à coluna. Frações de 1,0 mL foram coletadas. Cada barra representa a média $\pm$ d.p. de três experimentos.

Tabela 8. Adsorção de proteínas ao suporte MuHL-Sepharose CL-4B.

Glicoproteína / Preparação	Quantidade de proteínas (mg) cromatografada	Quantidade de proteínas eluída com NaCl 1,0M	
		mg	%
Extrato da clara de ovo	5,0	1,1	22
Fetúina	0,5	0,1	20
Homogenato da tireóide de porco	4,4	1,3	29
Ovoalbumina	0,5	0,2	40
Soro fetal bovino	8,0	1,7	21
Tireoglobulina	0,5	0,1	20

4.4. Histoquímica com MuHL

Novelos neurofibrilares do córtex cerebral na área do hipocampo de pacientes com o Mal de Alzheimer apresentaram radicais glicídicos que foram reconhecidos pela lectina MuHL (Figura 40A), que liga N-acetilglicosamina (GlcNAc).

A lectina MuHL também mostrou ser útil para a avaliação e estudo de células em tecidos prostáticos humanos. A lectina marcou de forma intensa e homogênea a membrana das células de tecidos de hiperplasia benigna (Figura 40E), não marcando tecidos normais (Figura 40C) ou malignos (Figura 40D). Resultados similares foram obtidos com as lectinas Con A e GNA para marcação de tecidos prostáticos com hiperplasia benigna (MORALES et al., 2005). O padrão de marcação das células da próstata com a lectina foi abolido pela inibição dos sítios de ligação a carboidratos da lectina com uma solução de N-acetil-D-glicosamina (GlcNAc) em todos os tecidos estudados (de cérebro e de próstata) (Figura 40B e F).

Lectinas têm se mostrado poderosas ferramentas para detecção, isolamento e caracterização de glicoconjugados em células e tecidos, bem como para a avaliação de mudanças na superfície celular durante os variados processos fisiológicos e patológicos (SHARON & LIS, 2004). Lectinas, com diferentes especificidades de ligação a carboidratos, são amplamente utilizadas em histoquímica para detectar alterações na composição de carboidratos de glicoconjugados na superfície celular e no citoplasma que acompanham processos de desenvolvimento, diferenciação e transformação neoplásica (SARKAR et al., 1991; SPICER, 1993; REMANI et al., 1994; BELTRÃO et al., 1998; BELTRÃO et al., 2003; KOMATH et al., 2006), doenças metabólicas e outras condições patológicas

(COLEMAN, 2000; SHARON & LIS, 2004). Desta forma como marcadores histoquímicos, as lectinas têm sido utilizadas para caracterizar uma diversidade de tecidos, dentre eles, tumores neoplásicos cerebrais (NISHIMURA et al., 2000; NISHI et al., 2003) bem como alterações em tecidos de próstata (ALLSBROOK JR. & SIMMS, 1992; ARENAS et al., 1999; MORALES et al., 2005) e mama (BELTRÃO et al., 1998).

As incorporações de cadeias de carboidratos em glicoconjugados são modificações co-translacionais ou pós-translacionais em proteínas e/ou lipídeos, mas podem ser encontrados também como moléculas livres em secreções. Em glicoconjugados, são inseridas através das ações seqüenciais de glicosiltransferases celulares e outras enzimas. Desequilíbrios no glicometabolismo podem resultar na acumulação ou deposição de glicoconjugados dentro das células ou na matriz intercelular (NISHIMURA et al., 2000) bem como no processo de modificações co- ou pós-translacionais.

Sabe-se que muitas destas modificações em proteínas possuem importantes papéis nos processos celulares. Em tecidos cerebrais, as enzimas que catalisam a adição (*O*-GlcNAc transferase), e remoção (*O*-glicoproteína 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopiranosidase) da modificação do tipo *O*-GlcNAc são fortemente expressas (KREPPPEL et al., 1997; GAO et al., 2001), indicando que tal modificação possui importante papel nas funções cerebrais. Tem sido observado que, quando as modificações de *O*-GlcNAc e fosforilação ocorrem simultaneamente, elas parecem estar envolvidas com a regulação da participação da proteína Tau na formação dos novos neurofibrilares que ocorrem no Mal de Alzheimer (LIU et al., 2004), apresentando-se hiperfosforilada nestes novos.

A lectina WGA (LAFUENTE et al., 1999), de igual especificidade, marcou intensa e homogeneamente células de pacientes que sofreram danos cerebrais. Outros autores estudaram a diferenciação de superfícies celulares do hipocampo de camundongos através da histoquímica com lectinas (HIDALGO et al., 2006).

Um mínimo defeito no glicometabolismo e gliconeogênese das células do sistema nervoso central pode ser um obstáculo para manter a homeostase e causar desordens devido a mudanças conformacionais por glicosilações incomuns de uma proteína nativa. Tem sido demonstrado que a marcação com histoquímica com lectinas é um método prático e econômico para detectar mudanças envolvendo

carboidratos em doenças degenerativas no cérebro humano e em outros órgãos (NISHI et al., 1999).

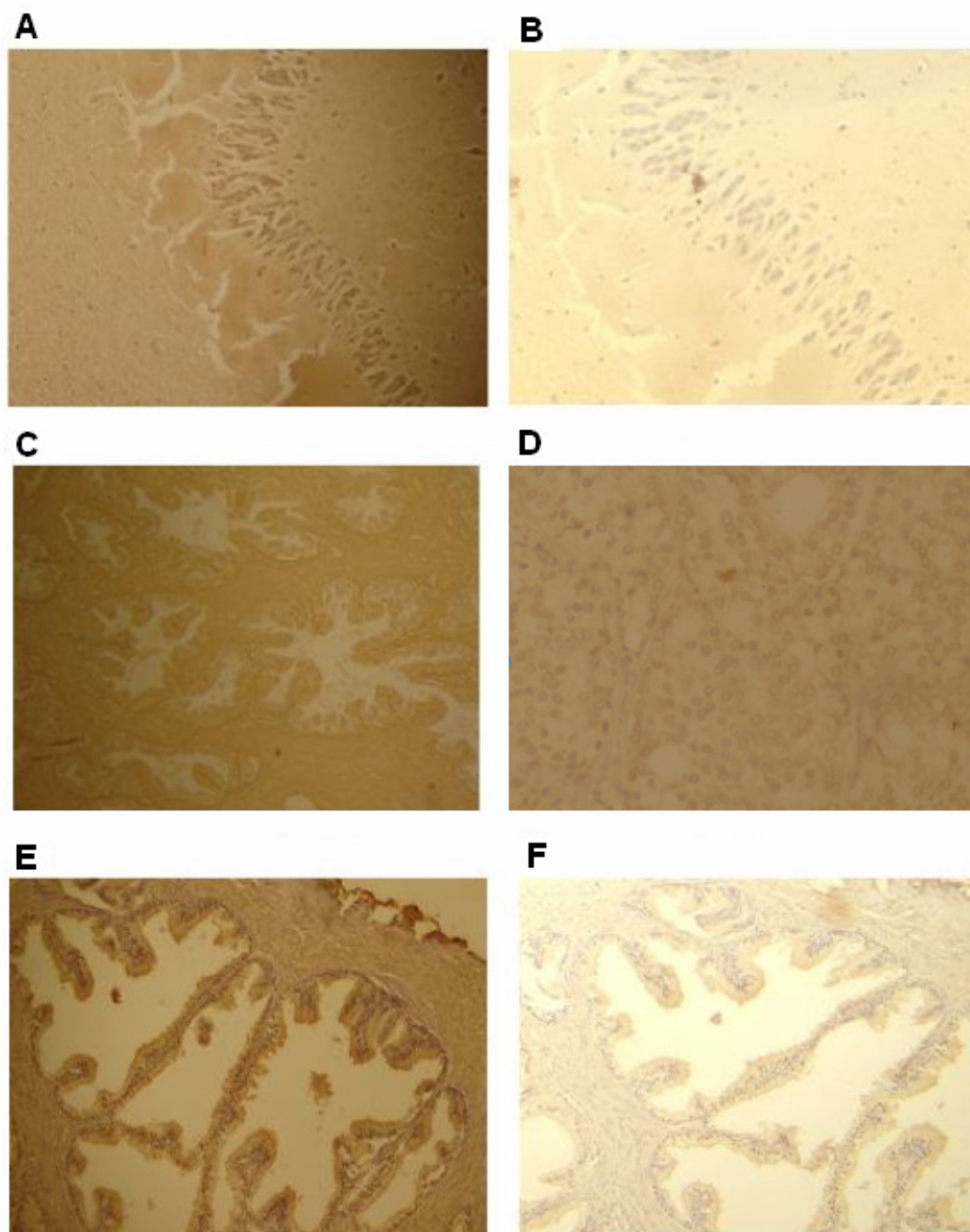


Figura 40. Avaliação da ligação de MuHL (88 µg/mL) a células do hipocampo de pacientes com a doença de Alzheimer e a tecidos de próstata.

(A) Marcação de células do hipocampo com MuHL; x20. (B) Inibição da marcação de células do hipocampo com MuHL, utilizando N-acetilglicosamina 0,3 M; x10. (C) Próstata normal sem marcação na presença de MuHL; x10. (D) Carcinoma prostático sem marcação na presença de MuHL; x20. (E) Tecidos hiperplásicos de próstata intensamente marcados com MuHL no citoplasma apical e na membrana das células epiteliais; x10. (F) Inibição da marcação de próstata hiperplásica com MuHL, utilizando N-acetilglicosamina 0,3 M; x10.

A aplicação da histoquímica com lectinas tem proporcionado informações úteis para o diagnóstico pós-morte na neuropatologia forense. Modificações degenerativas comuns no cérebro, como placas neuríticas (placas senis), novos neurofibrilares e corpos amiláceos foram marcados com lectinas. Resíduos de carboidratos em novos neurofibrilares foram reconhecidos pelas lectinas WGA, GSI, GSAI-B4, Con A e PSA (NISHI et al., 1999).

4.5 Atividades biológicas

4.5.1. Avaliação de atividade antioxidante

Madeiras que são resistentes à biodeterioração são freqüentemente protegidas por compostos biocidas. É sabido que o decaimento de madeiras causado por fungos pode envolver reações mediadas por radicais livres os quais podem também degradar biocidas orgânicos que são artificialmente usados para proteger madeiras não-resistentes da degradação (SCHULTZ et al., 2006).

A capacidade de EM e ES reagirem como um agente varredor de radicais livres ou doador de hidrogênio foi revelada no ensaio qualitativo com DPPH, pela redução do DPPH após 30 min (formação de pontos amarelos na folha de sílica). Ação antioxidante foi detectada em ambos extratos, assim como na fração F₁, sendo que, nessa última, com menor intensidade (Figura 41A e B). De acordo com os resultados da avaliação fitoquímica em CCD, a atividade antioxidante da madeira de *M. urundeuva* não pode ser facilmente atribuída a um único composto ou a uma única classe de compostos. Entretanto, flavonóides e seus glicosídeos são conhecidos por serem bons antioxidantes e a presença desses compostos deve certamente contribuir para a atividade antioxidante.

EM e ES apresentaram elevada atividade varredora de radicais (DPPH) similar aos extratos polares de *Mentha spicata* (KANATT et al., 2007). A fração, entretanto, promoveu uma reação muito fraca que prosseguiu muito lentamente quando comparada com a dos potentes controles positivos (Figura 42). Esses resultados estão de acordo com a avaliação fitoquímica em CCD, que mostrou grande redução na quantidade de compostos que poderiam ter atividade antioxidante. Esse dado também demonstra que a precipitação de proteínas com

sulfato de amônio foi eficiente em separar boa parte dos compostos não-protéicos do extrato salino das proteínas presentes.

A capacidade antioxidante também foi quantificada para todas as soluções e controles (Figura 57). Para EM e ES, o estado estacionário foi atingido com menos de 10 min. Apesar dos resultados obtidos nesses ensaios *in vitro* nem sempre corresponderem ao comportamento dos compostos *in vivo*, eles funcionam como importantes indicadores preliminares do potencial antioxidante. A comparação com a vitamina C (ácido ascórbico), um antioxidante natural, proporciona uma boa indicação da força da atividade antioxidante.

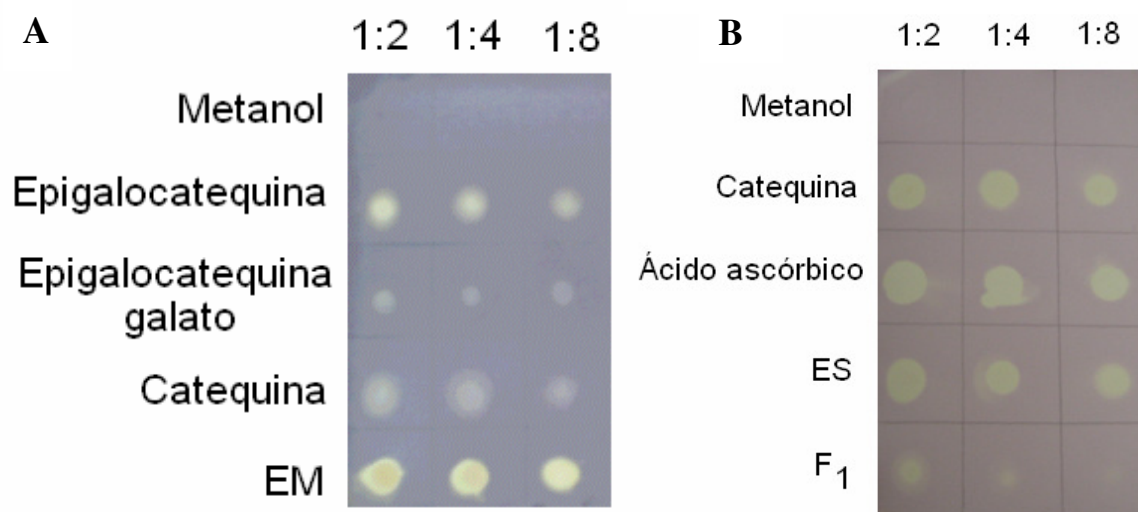


Figura 41. Ensaio qualitativo da atividade antioxidante em folha de sílica imersa em solução metanólica de DPPH a 0,4 mM.

Diluições das amostras (EM, extrato metanólico; ES, extrato salino e F₁, fração 40-60%) foram realizadas: 1:2, 1:4 e 1:8, da esquerda para a direita nas figuras). Pontos amarelos revelam a atividade antioxidante da amostra. Metanol foi utilizado como controle negativo. Epigallocatequina, epigallocatequina galato, catequina e ácido ascórbico foram utilizados como controle negativo.

Compostos fenólicos são capazes de varrer espécies reativas de oxigênio devido a suas propriedades de doar elétrons. Sua efetividade antioxidante depende da estabilidade em diferentes sistemas, assim como no número e localização de grupos hidroxila. Em muitos estudos *in vitro* os compostos fenólicos demonstraram atividades antioxidantes elevadas (PODSEDEK, 2007).

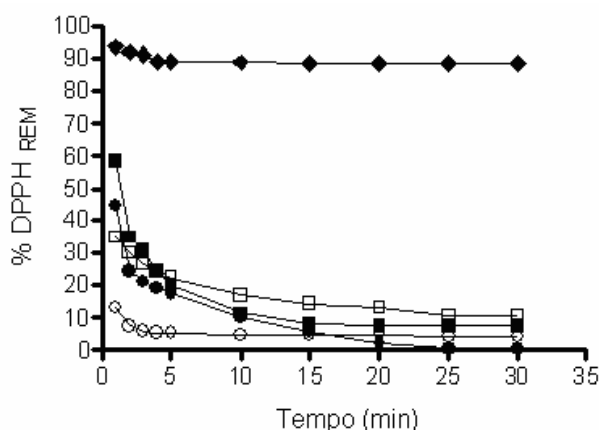


Figura 42. Comportamento cinético das reações dos extratos e da fração provenientes do cerne de *M. urundeuva* com a solução metanólica de DPPH a 90 μ M, determinado espectrofotometricamente a 515 nm. (■) Extrato metanólico, EM (0.5 mg/mL), (□) Extrato salino, ES (1.0 mg/mL) e (◆) fração 40-60%, F₁ (1 mg/mL). Controles positivos: (●) catequina e (○) ácido ascórbico (0.5 mg/mL).

Os valores de IP são considerados como boas medidas da eficiência antioxidante de compostos puros e extratos. Os valores obtidos para os extratos confirmaram as observações feitas a partir do ensaio qualitativo em folha de sílica. A quantidade de radicais de DPPH que reagiram com F₁ foi muito baixa (IP = 11,2%), enquanto que os valores obtidos para EM e ES foram bastante elevados (91,1% e 84,7%, respectivamente). Valores de IP típicos de materiais provenientes de plantas que tem uma potente atividade antioxidante conhecida são, por exemplo, 93% para a casca e 75% para a folha de *Cassia fistula*, uma planta medicinal tradicionalmente utilizada na Índia, (SIDDHURAJU et al., 2002). Materiais menos potentes apresentam valores de IP na faixa entre 9 e 14%, como as sementes de *Gevuina avellana* (MOURE et al., 2001).

A presença de extrativos e antioxidantes nas madeiras pode ser considerada como um dos fatores da resistência natural (SCHULTZ & NICHOLAS, 2002). A avaliação dos extratos da madeira de *M. urundeuva* quanto à capacidade de reagir com radicais revelou potentes atividade antioxidantes, indicando que a presença de compostos antioxidantes potentes também podem ser um dos fatores relacionados com a resistência da madeira à biodegradação.

4.5.2. Avaliação da atividade antifúngica

EM e ES apresentaram atividade antifúngica, revelando que os compostos identificados nesses extratos provavelmente contribuem para a resistência do cerne de *M. urundeuva* ao ataque de fungos. ES foi mais eficiente do que EM em reduzir o crescimento de espécies de *Fusarium* (Tabela 9). Elevadas porcentagens de inibição foram obtidas para *F. moniliforme*, *F. oxysporum* e *F. solani* com ambos extratos.

Tabela 9. Atividade antifúngica dos extratos metanólico (EM) e salino (ES) do cerne de *M. urundeuva*.

Fungo	Inibição do crescimento (%)	
	EM	ES
<i>F. decemcellulare</i>	9.5 ± 4.1	46.6 ± 6.7
<i>F. lateritium</i>	25.0 ± 0.0	13.3 ± 2.3
<i>F. moniliforme</i>	46.4 ± 3.5	50.3 ± 2.6
<i>F. oxysporum</i>	30.8 ± 2.8	50.8 ± 1.4
<i>F. solani</i>	45.2 ± 2.1	68.4 ± 3.1

Taninos do extrato metanólico de *Rubus ulmnifolius* foram ativos contra 70% de 37 espécies de fungos fitopatogênicos testadas por Sisti et al. (2008). Extratos ricos em taninos de espécies da família Combretaceae também foram eficientes contra fungos patogênicos humanos (BABA-MOUSSA et al., 1999). Flavonóides (LAKS, 1987), ácido gálico (AHN et al., 2005; GOVINDARAJAN et al., 2006) e luteolinas (BÁIDEZ et al., 2006) são também descritos como constituintes bioativos de extratos que têm atividade contra fungos fitopatogênicos.

Antioxidantes são descritos como agentes antifúngicos que afetam *Fusarium*. Óleos essenciais de *Ocimum basilicum* que apresentaram atividade antioxidante frente a radicais livres de DPPH também afetaram o crescimento de *F. solani* e outros fungos (HUSSAIN et al., 2008). Antioxidantes como o hidroxianisol butilado (BHA) são agentes antifúngicos contra *Fusarium* (FARNOCHI et al., 2005). Plantas transgênicas de linhaça (*Linum usitatissimum*) com maior conteúdo de flavonóides mostraram uma atividade antioxidante aumentada que conferiu resistência a *Fusarium* (LORENC-KUKUŁA, 2007). A butenolida, uma micotoxina produzida por espécies de *Fusarium* que infecta cereais, age em humanos induzindo o dano oxidativo sobre células do miocárdio (LIU et al., 2007), mostrando que reações

mediadas por radicais livres são uma importante etapa na infecção por *Fusarium* em plantas e humanos. Dessa forma, provavelmente existe uma relação entre a presença de compostos antioxidantes e a resistência do cerne de *M. urundeuva* ao ataque de fungos.

Em outro aspecto, a detecção de AH no cerne de *M. urundeuva* pode indicar que sua resistência natural a agentes biológicos deteriorantes é, entre outros fatores, devido à presença de lectina. Em plantas, proteínas antimicrobianas estão envolvidas em mecanismos de defesa (YE & NG, 2002) e proteínas isoladas de tecidos vegetais mostraram potentes atividades antibacteriana (ORDÓÑEZ et al., 2006) e antifúngica (WANG & BUNKERS, 2000; WANG & NG, 2003). O isolamento de proteínas bioativas tem estimulado o potencial uso como antibióticos naturais.

A inibição da AH de MuHL por N-acetilglicosamina estimulou a avaliação da atividade antifúngica da lectina isolada contra espécies de *Fusarium*. A quitina (polímero de N-acetilglicosamina) é o principal componente da parede celular dos fungos. Proteínas que se ligam à quitina com propriedades antifúngicas incluem quitinases (VAN DAMME et al., 1993; VERGAUWEN et al., 1998), proteínas semelhantes a quitinases (LAM et al., 2000; YE et al., 2000), proteínas ligadoras de quitina (HUANG et al., 2000; VAN DEN BERGH et al., 2004) e lectinas (GOZIA et al., 1993; FAKHOURY & WOLOSHUK, 2001). A lectina isolada de uma variedade de trigo da Romênia inibiu o crescimento de *Fusarium* (CIOPRAGA et al., 1999).

MuHL apresentou atividade antifúngica contra todas as espécies de *Fusarium* (Figuras 43 e 44); *F. decemcellulare* apresentou o crescimento mais lento dentre os fungos testados (Figura 43A) e MuHL retardou ainda mais o crescimento desse fungo (Figura 43D). A atividade inibitória da lectina foi melhor observada após 72 h. Elevados percentuais de inibição do crescimento foram obtidos para *F. oxysporum* (60,8% $\pm$ 2,9), *F. decemcellulare* (51,1% $\pm$ 3,8) e *F. fusarioides* (51,1% $\pm$ 1,9).

Também se destaca a ação de MuHL na inibição do crescimento de *F. lateritium* e de *F. oxysporum*, desde que a lectina do cerne de *M. urundeuva* foi mais eficiente que o controle positivo Cercobin (Figura 44C). Ainda, a melhor atividade de ES, em relação a EM (Tabela 9), pode estar relacionada à presença da lectina, além dos compostos antioxidantes.

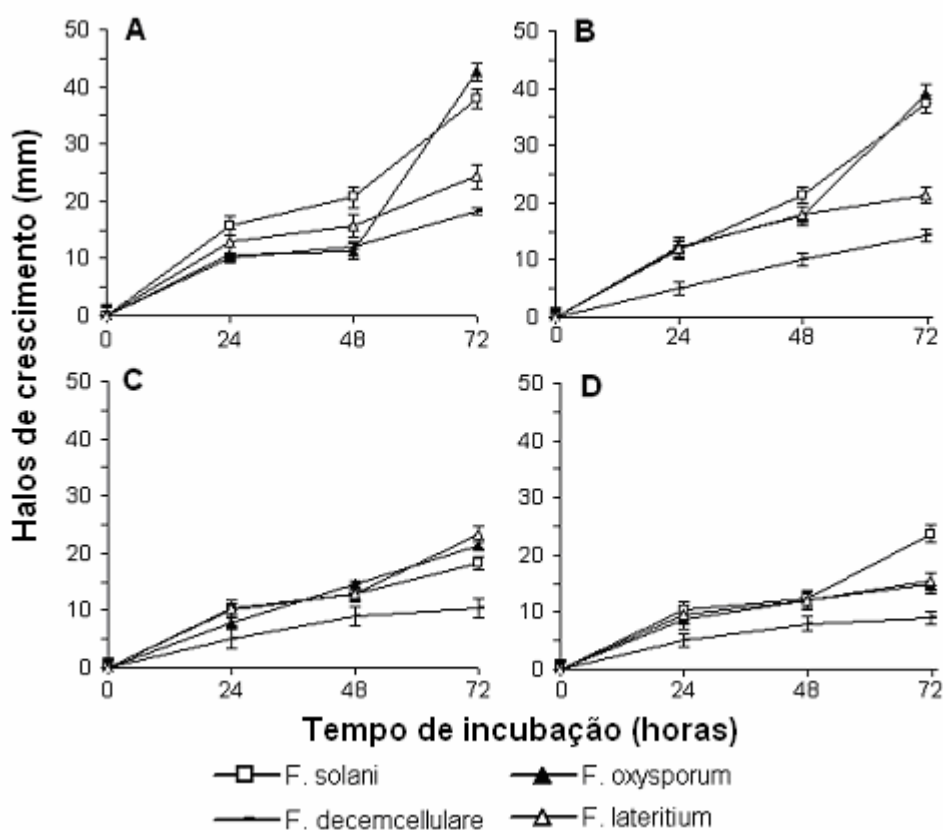


Figura 43. Crescimento dos fungos *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. decemcellulare* e *F. lateritium* em meio YNB. As condições dos ensaios foram: somente o disco micelial (A) e em presença de NaCl 0,15 M (B), Cercobin 10 ppm (C) e MuHL (50 µg) (D). Cada ponto representa a média $\pm$ d.p. de três experimentos.

Proteínas ligadoras de quitina afetam o desenvolvimento e crescimento fúngico, causando distúrbios na síntese e/ou deposição de quitina na parede celular (SELITRENIKOFF, 2001). Lectinas também interferem na germinação dos esporos, provavelmente num estágio muito inicial do processo, de forma que o período de latência que precede a germinação é estendido (LIS & SHARON, 1981).

A quitinase de *Phaseolus mungo* e uma proteína semelhante à quitinase isolada de *P. vulgaris* mostraram efeito antifúngico em quantidades de 60 e 300 µg, respectivamente (YE & NG, 2002; YE & NG, 2005). Outra lectina ligadora de quitina isolada das sementes de *Artocarpus sp.* (TRINDADE et al., 2006) inibiu a germinação de *F. moniliforme* a uma 225 µg. A atividade antifúngica da lectina do cerne de *M. urundeuva* foi detectada com 50 µg da lectina. Os resultados indicam uma potente capacidade da proteína de inibir o crescimento fúngico.

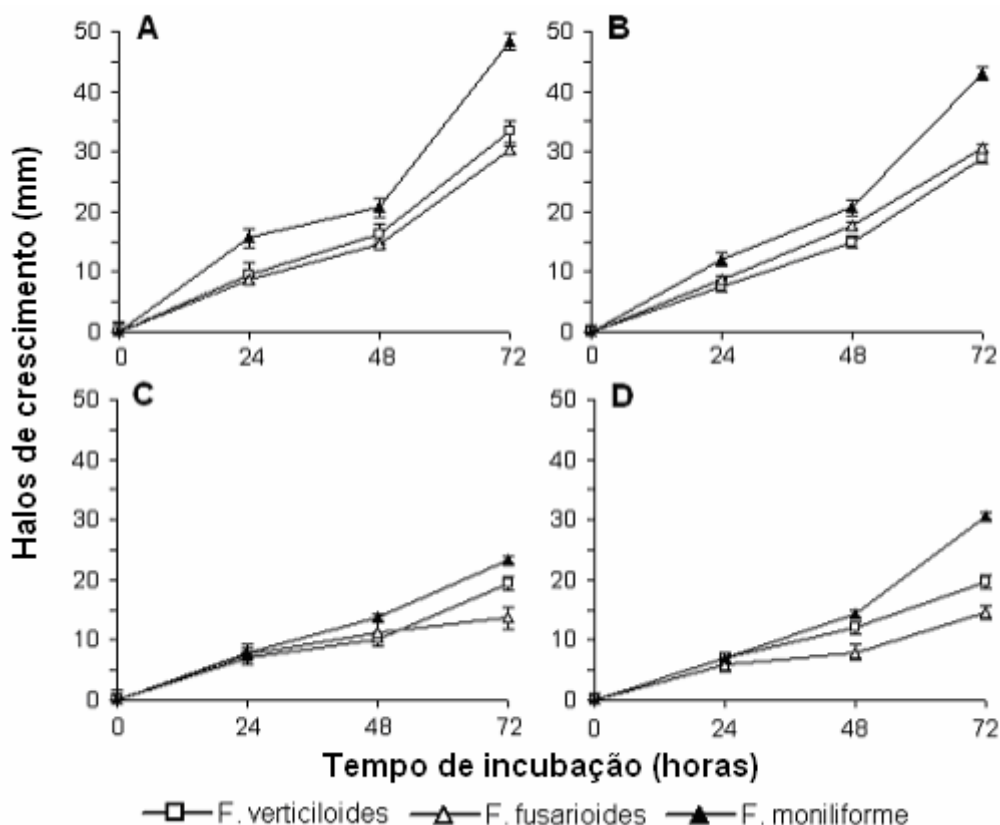


Figura 44. Crescimento dos fungos *F. verticiloides*, *F. fusarioides* e *F. moniliforme* em meio YNB. As condições dos ensaios foram: somente o disco miceliar (A) e em presença de NaCl 0,15 M (B), Cercobin 10 ppm (C) e MuHL (50 µg) (D). Cada ponto representa a média $\pm$ d.p. de três experimentos.

4.5.3. Avaliação de atividade antibacteriana

Extrato bruto, F_1 e MuHL apresentaram efeito antibacteriano sobre *S. aureus*, *S. faecalis*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *C. callunae* e *K. pneumoniae*. Os halos de inibição obtidos através do método de difusão em disco estão sumarizados na Tabela 10.

CMB e CMI foram determinadas para MuHL (Tabela 11). MuHL apresentou atividade antibacteriana contra todas as espécies testadas, embora a maior ação inibitória sobre o crescimento tenha sido para *S. aureus* (CMI: 0,58 µg/mL). Tanto a inibição do crescimento quanto a propriedade bactericida (CMB: 8,1 µg/mL) frente a essa bactéria foram maiores que as descritas para a lectina isolada das sementes de *Eugenia uniflora* (CMI: 1,5 µg/mL e CMB: 16,5 µg/mL; OLIVEIRA et al., 2008).

MuHL também aglutinou todas as bactérias testadas, sendo *S. aureus* a espécie mais sensível (CMA: 2.34 µg/mL). Aglutinação de *S. aureus* também foi observada com as lectinas de sementes de *E. uniflora* (OLIVEIRA et al. 2008) e da

casca de *Combretum mkhuzense* (GAIDAMASHVILI & VAN STADEN 2002), as quais apresentara CMA de 0,25 e 5 µg/mL, respectivamente.

Tabela 10. Atividade antibacteriana de preparações do cerne de *M. urundeuva*

Microorganismo	Diâmetro do halo de inibição* (mm)		
	ES	F ₁	MuHL
<i>Bacillus subtilis</i> (+)	11,6±0,6	11,3±0,6	15,8±0,8
<i>Corynebacterium callunae</i> (+)	11,8±0,8	12,6±0,6	17,1±0,3
<i>Staphylococcus aureus</i> (+)	16,6±0,6	14,5±0,5	14,1±0,5
<i>Streptococcus faecalis</i> (+)	10,3±0,6	10,3±0,6	16,8±0,8
<i>Escherichia coli</i> (-)	10,0±1,0	16,1±0,3	15,9±0,6
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (-)	19,5±0,5	16,5±0,5	16,0±0,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (+)	22,5±0,5	16,5±1,4	14,6±0,6

Bactérias Gram-positivas (+) e Gram-negativas (-). (*) Incluindo o diâmetro do disco. ES, F₁ e MuHL contendo 725, 309 e 15µg de proteínas, respectivamente.

Tabela 11. Valores de CMI e CMA de MuHL

Microorganismo	CMI	CMA
<i>Bacillus subtilis</i> (+)	2,34	4,68
<i>Corynebacterium callunae</i> (+)	1,17	4,68
<i>Staphylococcus aureus</i> (+)	0,58	2,34
<i>Streptococcus faecalis</i> (+)	2,34	4,68
<i>Escherichia coli</i> (-)	1,17	9,37
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (-)	9,37	9,37
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (+)	4,68	9,37

Bactérias Gram-positivas (+) e Gram-negativas (-). CMI e CMA expressas em µg/mL. Concentração inicial de MuHL no ensaio de CMI: 1,5 mg/mL e no ensaio de CMA: 0,6 mg/mL.

Ligação de lectinas a carboidratos das paredes celulares das bactérias pode resultar em atividade antibacteriana (TASUMI et al., 2004; GAIDAMASHVILI & VAN STANDEN, 2002; RATANAPO et al., 2001). Jacobs et al. (1985) descreveram um grande número de bactérias endofíticas, como *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *Corynebacterium sp.* e *Erwinia herbicola*. O possível papel das bactérias endofíticas no desenvolvimento de processos patogênicos em plantas tem sido investigado e essas bactérias podem se tornar patógenos oportunistas (COTHER & DOWLING,

1986). A atividade antibacteriana de MuHL pode estar envolvida na resistência do cerne ao ataque de bactérias.

A detecção de atividades antibacteriana e antifúngica da lectina do cerne de *M. urundeuva* pode indicar que a lectina é um componente bioativo envolvido na durabilidade do cerne.

4.5.4. Avaliação da atividade inseticida contra cupins

Lectinas ligadoras de quitina também apresentam ação inseticida para muitos insetos (CHRISPEELS & REIKHEL, 1991; CARLINI & GROSSI-DE-SÁ, 2002; MACEDO et al., 2007) e, portanto, o efeito de MuHL foi avaliado sobre cupins.

Os bioensaios de toxicidade geralmente consistem na inclusão da substância potencialmente inseticida em dietas artificiais oferecidas aos insetos (MACEDO et al., 2004). Várias lectinas de plantas apresentaram efeitos entomotóxicos quando ingeridas por insetos. Os cupins se nutrem de muitos tipos de alimentos como húmus e materiais celulósicos, como papel e madeira, sendo a aplicação do possível agente inseticida nesses materiais uma boa forma de avaliar sua toxicidade. ES e F₁ induziram a mortalidade de *N. corniger* (Figura 45), indicando a presença de agentes inseticidas e estimulando a avaliação do efeito de MuHL.

O contato com MuHL em todas as concentrações testadas induziu 100% de mortalidade dos operários (Figura 46) e soldados (Figura 47), evidenciando a atividade inseticida. Os tratamentos com as maiores concentrações de MuHL 0,4 e 0,8 mg/mL, induziram a morte de todos os insetos após 8 e 6 dias, respectivamente, enquanto as concentrações de 0,1 e 0,2 mg/mL promoveram 100% de mortalidade após 10 e 9 dias, respectivamente. No controle negativo, a morte de todos os operários ocorreu após 18 dias, e taxas de sobrevivência menores que 50% foram registradas somente após 13 dias.

A figura 47 mostra a atividade de MuHL sobre os soldados. A atividade termiticida foi maior sobre essa casta do que sobre os operários, desde que foi observado 100% de mortalidade em menor período de tempo com todas as soluções de MuHL: com 4 (0,8 mg/mL), 5 (0,4 e 0,2 mg/mL) e 7 (0,1 mg/mL) dias. No controle negativo, os soldados apresentaram elevada resistência em um ambiente artificial, permanecendo vivos em taxas de sobrevivência entre 60 e 80% até 13 dias após o início do experimento. Os valores de CL₅₀ para operários e soldados foram

determinados com 4 dias de experimento, sendo de 0,248 mg/mL para os operários e 0,199 mg/mL para os soldados.

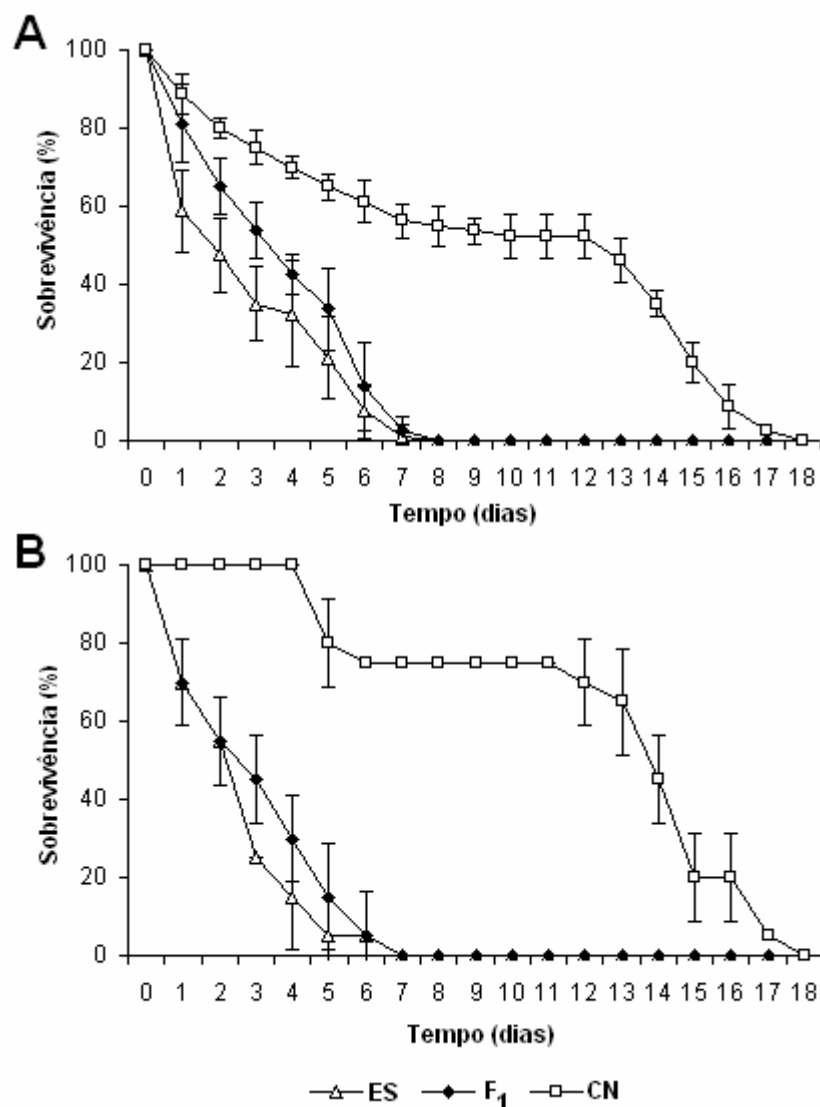


Figura 45. Efeito do contato com o extrato salino (ES) e a fração 40-60% (F₁) em operários (A) e soldados (B) de *N. corniger*. A concentração de proteínas em ES e F₁ foi de 20 e 8 mg/mL, respectivamente. NaCl 0,15 M foi usado como controle negativo (CN). Cada ponto representa a média ± d.p. de cinco experimentos.

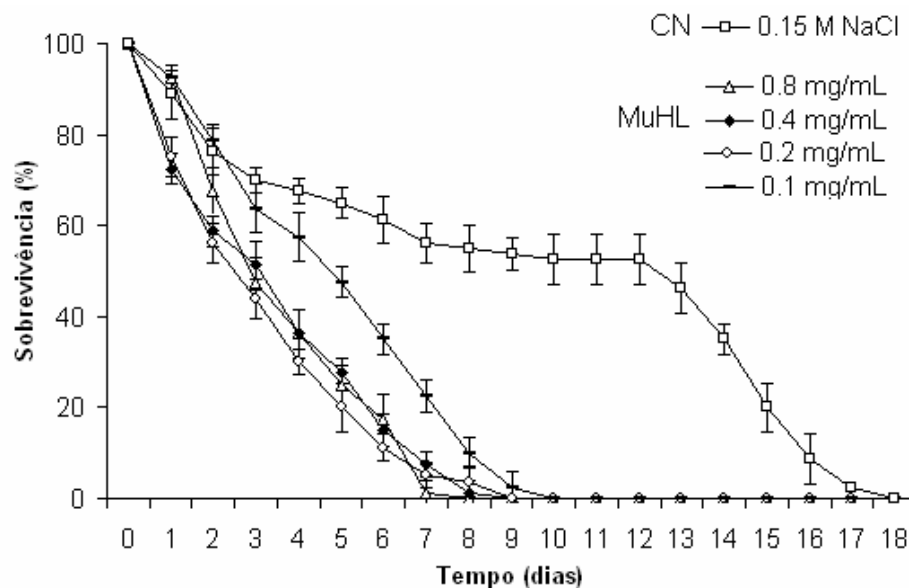


Figura 46. Efeito do contato com MuHL em operários de *N. corniger*.

A lectina foi utilizada em dosagens de 0,1, 0,2, 0,4 e 0,8 mg/mL. NaCl 0,15 M foi usado como controle negativo (CN). Cada ponto representa a média $\pm$ d.p. de cinco experimentos.

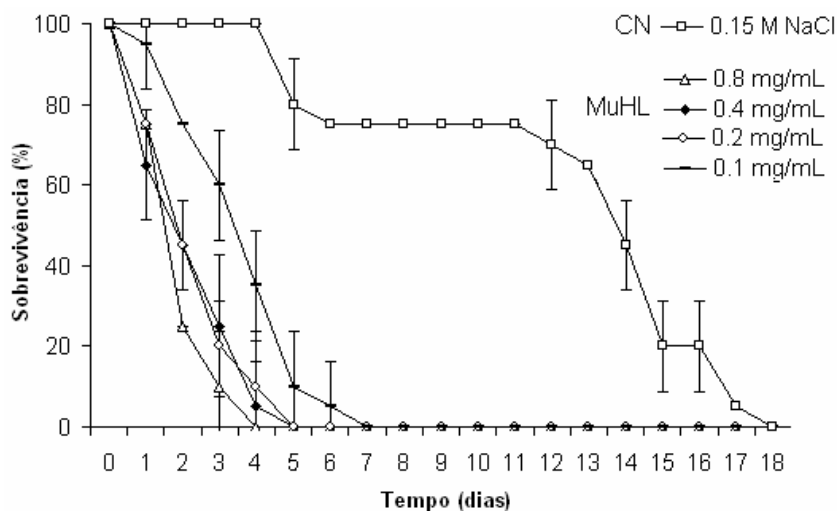


Figura 47. Efeito do contato com MuHL em soldados de *N. corniger*.

A lectina foi utilizada em dosagens de 0,1, 0,2, 0,4 e 0,8 mg/mL. NaCl 0,15 M foi usado como controle negativo (CN). Cada ponto representa a média $\pm$ d.p. de cinco experimentos.

Para avaliar se a atividade inseticida era devido ao não-consumo da celulose pelos cupins, um ensaio de repelência foi realizado. Cupins construtores de túneis são capazes de reagir à presença de substâncias que podem ser tóxicas. Esses cupins podem fechar as galerias construídas para evitar substâncias que possam ser tóxicas, se a mesma tiver propriedade repelente (SU et al., 1982). Observou-se que túneis foram construídos pelos cupins no ágar sem nenhum padrão relacionado

à presença ou ausência de MuHL. Nenhuma das galerias foi fechada e foram observados cupins explorando tanto os poços com o controle negativo como os com a lectina. Esses resultados indicam que MuHL não apresentou efeito repelente.

Os ensaios termiticida e de repelência sugerem que a atividade de MuHL se deve à sua toxicidade, contribuindo para levar à morte os cupins que se alimentaram de material contendo a lectina. Assim, a resistência química da madeira da aroeira-do-sertão a estes insetos pode ser relacionada à presença de MuHL.

A ação tóxica de lectinas inseticidas tem sido relacionada à ligação dessas proteínas a glicoproteínas presentes no trato digestivo de insetos. Lectinas entomotóxicas são resistentes à degradação proteolítica no intestino de insetos e podem se ligar à membrana peritrófica na região do intestino médio, interferindo na ação de enzimas digestivas e proteínas de assimilação (ZHU-SALZMAN et al., 1998; ZHU-SALZMAN & SALZMAN, 2001; MACEDO et al., 2003).

Lectinas com diferentes especificidades a carboidratos provavelmente têm mecanismos diferentes de ação. Lectinas de plantas com especificidade a N-acetilglicosamina agem principalmente por ligação à membrana peritrófica. Elas apresentaram efeito tóxico em Coleoptera (MURDOCK et al., 1990; ZHU-SALZMAN et al., 1998; MACEDO et al., 2007), Homoptera (POWELL et al., 1995), Lepidoptera (CZAPLA & LANG, 1990) e Hemiptera (HABIBI et al., 1998).

Tem sido descrita a ocorrência de extrativos que induzem a mortalidade de cupins, como os óleos essenciais das folhas de *Calocedrus formosanus* ($LC_{50} = 27.6$ mg/g) e do cerne de *Calocedrus macrolepis* ($LC_{50} = 1.7$ mg/g) (CHEN et al., 2004). Para *M. urundeuva*, a atividade termiticida de MuHL provavelmente contribui para a resistência à biodegradação por cupins.

4.5.5. Avaliação da atividade larvicida de MuHL contra *Aedes aegypti*

A atividade inseticida de MuHL foi também avaliada sobre *A. aegypti*. A lectina do cerne de *M. urundeuva* é a primeira lectina avaliada quanto à ação larvicida contra *A. aegypti*. As preparações do cerne ES, F₁ e MuHL foram investigadas quanto à atividade larvicida sobre o quarto estágio larval (L4) de *A. aegypti*, mosquito vetor de doenças muito importantes para a saúde pública, como a dengue e a febre amarela.

A concentração de proteínas nas amostras serviu como parâmetro de referência para determinar a letalidade. Todas as preparações foram capazes de matar as larvas de *A. aegypti*. Os valores de CL_{16} , CL_{50} e CL_{84} foram 14,83, 0,93 e 0,04 mg/mL para ES, F_1 e MuHL, respectivamente.. A avaliação da atividade larvicida usando extrato e a lectina isolada revelou que o protocolo de purificação resultou em valores de CL_{50} menores para MuHL que para a preparação bruta (ES) ou pré-purificada (F_1). F_1 apresentou CL_{50} bem menor que a do extrato, mostrando que a purificação parcial da lectina por precipitação com sulfato de amônio promoveu incremento na atividade larvicida. As Figuras 48, 49 e 50 mostram a ação do extrato (ES), fração protéica (F_1) e MuHL na sobrevivência das larvas de *A. aegypti*, respectivamente.

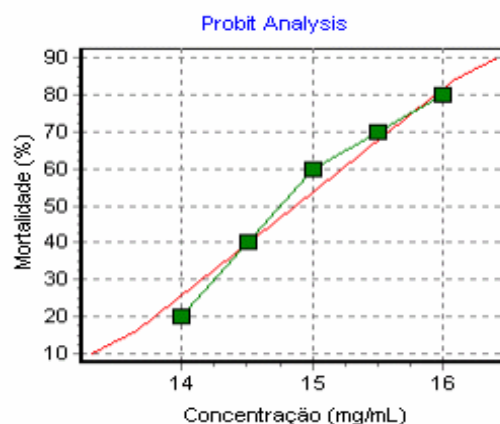


Figura 48. Atividade larvicida do extrato salino (ES) do cerne de *M. urundeuva*. A concentração de proteínas na amostra é o parâmetro de referência utilizado. O valor da CL_{50} determinado foi 14,83 mg/mL.

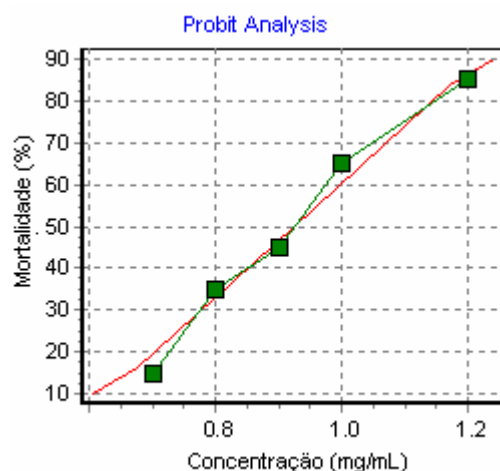


Figura 49. Atividade larvicida da fração protéica 40-60% (F_1) obtida de extrato salino do cerne de *M. urundeuva*. A concentração de proteínas na amostra é o parâmetro de referência utilizado. O valor da CL_{50} determinado foi de 0,923 mg/mL.

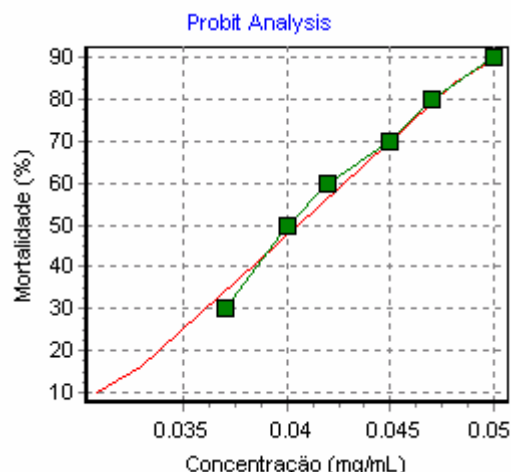


Figura 50. Atividade larvica de MuHL.
A CL₅₀ determinada foi 0,04mg/mL.

Atividade larvica sobre *A. aegypti* tem sido detectada com óleos essenciais. Cavalcanti et al. (2004) encontraram valores de CL₅₀ entre 60 e 538 ppm (ou µg/mL) para 9 óleos essenciais de 9 planta das famílias Graminae (Poaceae), Labiateae (Lamiaceae), Myrtaceae, Rutaceae, Verbenaceae e Zingiberaceae. Nesse estudo, MuHL apresentou uma CL₅₀ de 0,04 mg/mL (40 ppm ou 40 µg/mL), menor que a dos óleos essenciais descritos acima.

Cheng et al. (2003) também avaliaram o efeito de 14 óleos essenciais de tecidos de *Cryptomeria japonica*, *Cunninghamia lanceolata*, *Taiwania cryptomerioides*, *Calocedrus formosana* e *Cinnamomum osmophloeum* contra larvas de *A. aegypti*. As CL₅₀ obtidas estão na faixa 37,6 a 240,0 µg/mL e os valores dos óleos obtidos do cerne (CJH, CLH, TSH e CFH) foram 72,0, 106,4, 79,8 e 75,2 µg/mL, respectivamente. MuHL foi mais efetiva que todos esses óleos obtidos de cerne.

Algumas substâncias químicas usadas para solubilizar óleos essenciais em ensaios larvicidas são Tween 80, dimetil-sufóxido (DMSO) ou acetona, por exemplo. MuHL é uma proteína solúvel em solução salina (NaCl 0,15 M) e sua AH não foi alterada mesmo em baixas concentrações de NaCl (como 0,014 M), após a diluição em água destilada para o teste larvica. A solução salina NaCl 0,15 M é de fácil manipulação, um método simples e barato e sem efeito tóxico no meio ambiente.

A detecção de atividade larvica de compostos de uma madeira resistente a degradação por insetos proporciona uma ligação significativa entre as ciências de fisiologia vegetal e de aplicações biotecnológicas. O estudo também reforça a participação da lectina no mecanismo de defesa de *M. urundeuva*, como discutido

na atividade contra cupins. A termoestabilidade e a resistência à degradação proteolítica são características importantes de MuHL que contribuem para seu potencial inseticida.

5. CONCLUSÕES

O estudo revelou a presença de compostos com potente atividade antioxidante e contribuiu para a construção de um painel sobre lectinas de plantas ao caracterizar a lectina isolada. A lectina de *M. urundeuva* é o primeiro peptídeo bioativo encontrado em um cerne e em um tecido de uma madeira-de-lei. MuHL é resistente à temperatura, permanece ativa em ampla faixa de pH e tem sua atividade estimulada por íons Ca^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+} . A lectina, um peptídeo de aproximadamente 21 kDa, tem sua atividade inibida por N-acetilglicosamina, monômero de quitina, importante componente estrutural de fungos e insetos. Por suas propriedades antimicrobiana e inseticida, MuHL é, provavelmente, um dos componentes da barreira química que confere a elevada resistência da madeira da aroeira-do-sertão à biodegradação. A ação inseticida de MuHL, potencializada após a purificação, sobre cupins de *Nasutitermes corniger* e em insetos que não se alimentam de madeira, como é o caso de *Aedes aegypti*, evidencia que sua propriedade inseticida pode ser explorada biotecnologicamente no controle de diversos insetos, inclusive de importância médica. Assim, MuHL pode ser explorada para o tratamento de madeiras menos duráveis e, através de engenharia genética, pode ser potencialmente utilizada no controle de insetos. A atividade antimicrobiana reforça a hipótese da participação da lectina no mecanismo de defesa da planta, ao lado de compostos que previnem o dano oxidativo causado por fitopatógenos. A detecção desta propriedade biológica sobre bactérias e fungos patogênicos também ao homem evidencia outro potencial uso biotecnológico de MuHL, como agente antibiótico. A preservação da capacidade de MuHL em ligar-se a carboidratos após sua imobilização em Sepharose CL-4B estimula a exploração do suporte MuHL-Sepharose no isolamento de glicoproteínas de interesse. Adicionalmente, os resultados dos ensaios de histoquímica revelam o potencial uso da lectina em diagnóstico. Em resumo, o trabalho ressalta a importância do estudo das propriedades dessa planta, ameaçada de extinção, tanto para o entendimento da fisiologia das plantas resistentes quanto como uma potencial fonte de lectina que pode ser explorada do ponto de vista biotecnológico.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHN, Y..; LEE, H..; OH, H..; HIM, H.; LEE, Y. Antifungal activity and mode of action of *Galla rhois*-derived phenolics against phytopathogenic fungi. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 81: 105-112, **2005**.

AL-MAMARY, M.; AL-HABORI, M.; AL-AGHBARI, A.; AL-OBEIDI, A. *In vivo* effects of dietary sorghum tannins on rabbit digestive enzymes and mineral absorption. **Nutrition Research** 21: 1393-1401, **2001**.

ALLSBROOK JR., W. C.; SIMMS, W. W. Histochemistry of the prostate. **Human Pathology** 23: 297-305, **1992**.

ALMEIDA-CORTEZ, J. S.; CORTEZ, P. H. M.; FRANCO, J. M. V.; UZUNIAN, A. **Caatinga**. Coleção Biomas do Brasil. 1. ed. São Paulo: Harbra, **2007**.

ALPERIN, D. M.; LATTER, H.; LIS, H.; SHARON, N. Isolation, by affinity chromatography and gel filtration in 8 M-urea, of an active subunit from the anti-(blood-group A+N)-specific lectin of *Moluccella laevis*. **Biochemical Journal** 285: 1-4, **1992**.

ALPUCHE, J.; PEREYRA, A.; AGUNDIS, C.; ROSAS, C.; PASCUAL, C.; SLOMIANNY, M. C.; VÁSQUEZ, L.; ZENTENO, E. Purification and characterization of a lectin from the white shrimp *Litopenaeus setiferus* (Crustacea, Decapoda) hemolymph. **Biochimica et Biophysica Acta** 1724: 86-93, **2005**.

ARAÚJO, E. L. Produção de plantas medicinais para programas de fitoterapia em saúde pública no Brasil. **ISHS Acta Horticulturae** 569: I Latin-American Symposium on the Production of Medicinal, Aromatic and Condiments Plants, **2002**.

ARAÚJO, R. M. S. **Isolamento, caracterização parcial e imobilização em Sepharose CL-4B da lectina de entrecasca de *Crataeva tapia* L.** Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco, **2004**.

ARENAS, M. I.; ROMO, E.; DE GASPAR, I.; DE BETHENCOURT, F. R.; SÁNCHEZ-CHAPADO, M.; FRAILE, B.; PANIAGUA, R. A lectin histochemistry comparative study in human normal prostate, benign prostatic hyperplasia, and prostatic carcinoma. **Glycoconjugate Journal** 16: 375-382, **1999**.

ARGOLO, A. C. C.; SANT'ANNA, A. E. G.; PLETSCH, M.; COELHO, L. C. B. B. Antioxidant activity of leaf extracts from *Bauhinia monandra*. **Bioresource Technology** 95: 229-233, **2004**.

BABA-MOUSSA, F.; AKPAGANA, K.; BOUCHET, P. Antifungal activities of seven West African Combretaceae used in traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology** 66: 335-338, **1999**.

BÁIDEZ, A. G.; GÓMEZ, P.; DEL RÍO, J.; ORTUÑO, A. Antifungal capacity of major phenolic compounds of *Olea europaea* L. against *Phytophthora megasperma*

Drechsler and *Cylindrocarpon destructans* (Zinssm.) Scholten. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 69: 224-229, **2006**.

BALDWIN, I. T.; HALITSCHKE, R.; KESSLER, A.; SCHITTKO, U. Merging molecular and ecological approaches in plant–insect interactions. **Current Opinion in Plant Biology** 4: 351-358, **2001**.

BANDEIRA, M. M.; MATOS, F. J. A.; BRAZ-FILHO, R. New Chalconoid dimers from *Myracrodruon urundeuva*. **Natural Product Letters** 4: 113-120, **1993**.

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

BANKS, H. J.; FIELDS, P. G. Physical methods for insect control in stored-grain ecosystems. In: JAYAS, D. S.; WHITE, N. D. G.; MUIR, W. E. (eds.). **Stored-grain Ecosystems**. New York: Marcell Dekker, pp. 353-409, **1995**.

BAROU, O.; MEKRALDI, S.; VICO, L.; BOIVIN, G.; ALEXANDRE, C.; LAFAGE-PROUST, M. H. Relationships between trabecular bone remodeling and bone vascularization: a quantitative study. **Bone** 30(4): 604-612, **2002**.

BASU, P. S.; MAJHI, R.; BATABYAL, S. K. Lectin and serum-PSA interaction as a screening test for prostate cancer. **Clinical Biochemistry** 36: 373-376, **2003**.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal Clinical Pathology** 45: 493-496, **1966**.

BECERRA J.; FLORES, C.; MENA, J.; AQUEVEQUE, P.; ALARCÓN, J.; BITTNER, M.; HERNÁNDEZ, V.; HOENEISEN, M.; RUIZ, E.; SILNA, M. Antifungal and antibacterial activity of diterpenes isolated from wood extractables of Chilean Podocarpaceae. **Boletín de la Sociedad Chilena de Química** 47: 151-157, **2002**.

BECKEMAN, J. S. Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. **Chemical Research in Toxicology** 9: 836-844, **1996**.

BELTRÃO, E. I. C.; CORREIA, M. T. S.; FIGUEREDO-SILVA, J.; COELHO, L. C. B. B. Binding evaluation of isoform 1 from *Cratylia mollis* lectin to human mammary tissues. **Applied Biochemistry and Biotechnology** 74: 125-134, **1998**.

BELTRÃO, E. I. C.; MEDEIROS, P. L.; RODRIGUES, O. G.; FIGUEREDO-SILVA, J.; VALENÇA, M. M.; COELHO, L. C. B. B.; CARVALHO JR., L. B. *Parkia pendula* lectin as histochemistry marker for meningothelial tumor. **European Journal of Histochemistry** 47: 139-142, **2003**.

BERMUDEZ, J. A. Z. **Indústria Farmacêutica, Estado e Sociedade: Crítica da Política de Medicamentos no Brasil**. São Paulo: Hucitec/Sobravime, **1995**.

BERTRAND, O.; COCHET, S.; CARTRON, J. P. Expanded bed chromatography for one-step purification of mannose binding lectin from tulip bulbs using mannose immobilized on DEAE Streamline. **Journal of Chromatography A** 822: 19-28, **1998**.

BRAGA, M. R.; YOUNG, M. C. M.; DIETRICH, S. M. C.; GOTTLIEB, O. R. Phytoalexin induction in Rubiaceae. **Journal of Chemical Ecology** 17: 1079-1090, **1991**.

BRANCO, A. T.; BERNABÉ, R. B.; FERREIRA, B. S.; OLIVEIRA, M. V. V.; GARCIA, A. B.; SOUZA-FILHO, G. A. Expression and purification recombinant lectin from rice (*Oryza sativa* L.). **Protein Expression & Purification** 33: 34-38, **2004**.

BRAND, M. A.; ANZALDO, J.; MORESCHI, J. C. Novos produtos para o tratamento preservante da madeira. "Perspectivas da pesquisa e utilização". **Floresta** 36: 129-138, **2006**.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie** 28: 25-30, **1995**.

BRAY, E. A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E. Responses to abiotic stresses. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISEN, W.; JONES L. R. (eds) **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. New York: American Society of Plant Physiologists, p.1158-1203, **2000**.

BRINCK, U.; KORABIOWSKA, M.; BOSBACH, R.; GABIUS, H. J. Detection of inflammation - and Neoplasia – associated alterations in human large intestine using plant/invertebrate lectins, galectin-1 and neoglycoproteins. **Acta Anatomica** 161: 219-233, **1998**.

BULBOVAS, P.; RINALDI, M. C. S.; DELITTI, W. B. C.; DOMINGOS, M. Variação sazonal em antioxidantes em folhas de plantas jovens de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil). **Revista Brasileira de Botânica** 28: 687-696, **2005**.

CANDY, L.; VAN DAMME, E. J. M.; PEUMANS, W. J.; MENU-BOUAOUICHE, L.; ERARD, M.; ROUGÉ, P. Structural and functional characterization of the GalNAc/Gal-specific lectin from the phytopathogenic ascomycete *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 308: 396-402, **2003**.

CARBALLEIRA LOPEZ, G. A.; MILANO, S. Avaliação da durabilidade natural da madeira e de produtos usados na sua proteção. In: LEPAGE, E. S.; OLIVEIRA, A. M. F.; LELIS, A. T. ; CARBALLEIRA LOPEZ, G. A.; CHIMELO, J. P.; OLIVEIRA, L. C. S.; CANEDO, M. P.; CAVALCANTE, M. S.; IELO, P. K. Y.; ZANATTO, P. A.; MILANO, S. **Manual de preservação de madeiras**, v. 2. São Paulo: IPT, p.473-521. **1986**.

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

CAVADA, B. S.; SANTOS, C. F.; GRANGEIRO, T. B.; NUNES, E. P.; SALES, P. V. P.; RAMOS, R. L.; DE SOUSA, F. A. M.; CRISOSTOMO, C. V.; CALVETE, J. J. Purification and characterization of a lectin from seeds of *Vatairea macrocarpa* Duke. **Phytochemistry** 49: 675-680, **1998**.

CAVALCANTE, M. S. Deterioração biológica e preservação de madeiras. **Pesquisa e Desenvolvimento** 8: 1-40, **1982**.

CAVALCANTE, G. M.; MOREIRA, A. F. C.; VASCONCELOS, S. D. Potencialidade inseticida de extratos aquosos de essências florestais sobre mosca-branca. **Pesquisa agropecuária brasileira** 41: 9-14, **2006**.

CAVALCANTI, E. S.; MORAIS, S. M.; LIMA, M. A. A.; SANTANA, E. W. P. Larvicidal activity of essential oils from Brazilian plants against *Aedes aegypti* L. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 99: 541-544, **2004**.

CHANG, S. T.; CHENG, S. S.; WANG, S. Y. Antitermitic activity of essential oils and components from Taiwan (*Taiwania cryptomerioides*). **Journal of Chemical Ecology** 27: 717-724, **2001**.

CHEN, K.; OHMURA, W.; DOI, S.; AOYAMA, M. Termite feeding deterrent from Japanese larch wood. **Bioresource Technology** 95: 129-134, **2004**.

CHENG, S.; CHANG, H.; CHANG, S.; TSAI, K.; CHEN, W. Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* larvae. **Bioresouce Technology** 89: 99-102, **2003**.

CHENG, S.; CHANG, H.; WU, C.; CHANG, S. Anti-termite activities of essential oils from coniferous trees against *Coptotermes formosanus*. **Bioresource Technology** 98: 456-459, **2007**.

CHOI, Y.; JUNG, C.; LEE, S.; BAE, J.; BACK, W.; SUH, M.; PARK, J.; PARK, C.; SUH, S. The green tea polyphenol (-)epigallocatechin gallate attenuates β -amyloid-induced neurotoxicity in cultured hippocampal neurons. **Life Sciences** 70: 603-614, **2001**.

CHRISPEELS, M. J.; RAIKHEL, N. V. Lectins, lectin genes and their role in plant defense. **Plant Cell** 3: 1-9, **1991**.

CHUNG, J. J., RATNAPALA, L. A., COOKE, I. M.; YANAGIHARA, A. A. Partial purification and characterization of a hemolysin (CAH1) from Hawaiian box jellyfish (*Carybdea alata*) venom. **Toxicon** 39: 981-990, **2001**.

CIOPRAGA, J.; GOZIA, O.; TUDOR, R.; BREZUICA, L.; DOYLE, R. J. *Fusarium* sp. growth inhibition by wheat germ agglutinin. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects** 1428: 424-432, **1999**.

CLARO, L. B. L.; TOMASSINI, H. C. B.; ROSA, M. L. G. Dengue prevention and control: a review of studies on knowledge, beliefs, and practices. **Cadernos de Saúde Pública** 20: 1447-1457, **2004**.

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

COIMBRA, R. **Manual de Fitoterapia**. 2ª ed. Belém: CEJUP, **1994**.

COLEMAN, R. The impact of histochemistry – a historical perspective. **Acta Histochemistry** 102: 5-14, **2000**.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a Métodos Cromatográficos**. 7ª ed. Campinas: Editora da UNICAMP, **1997**.

CONCEIÇÃO, M. **As plantas medicinais no ano 2000**. 2ª ed. São Paulo: TAO, **1982**.

CONSTANTINO, R. Abundance and diversity of termites (Insecta: Isoptera) in two sites of primary rain forest in Brazilian Amazonia. **Biotropica** 24: 420–430, **1992**.

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

COTHER, E. J.; DOWLING, V. Bacteria associated with internal breakdown of onion bulbs and their role in disease expression. **Plant Pathology** 35: 329-336, **1986**.

COURVALIN, P.; GOLDSTEIN F.; PHILIPPON A.; SIROT, J. **L'antibiogramme**. Paris: COFECUB, v. 1, p. 189-198, **1988**.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, **1981**.

CRUICKSHANK, I. A. M.; PERRIN, D. R. Isolation of a phytoalexin from *Pisum sativum* L. **Nature** 187: 799-800, **1960**.

CRUZ, G. L. **Dicionário das Plantas úteis do Brasil**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Bertrand Brasil, **1964**.

CUNHA, F. M.; ALBUQUERQUE, A. C.; PEREIRA, K. C. A.; VEIGA, F. S. L.; ATHAYDE, A. C. R.; LIMA, E. A. L. A. Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e *Metarhizium acridum* var. *acridum* sobre *Nasutitermes coxipoensis* (Holmgren) (Isoptera: Termitidae). **Neotropical Entomology** 34: 585-592, **2005**.

CUNICO, M. M.; CARVALHO, J. L. S.; SILVA, V. C.; MONTRUCCHIO, D. P.; KERBER, V. A.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; AUER, C. G.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Avaliação antifúngica de extratos obtidos de *Ottonia martiana* Miq.

(Piperaceae) sobre três fitopatógenos. **Arquivos do Instituto de Biologia** 71: 141-143, **2004**.

CZAPLA, T. H.; LANG, B. A. Effect of plant lectins on the larval development of european corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) and southern corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). **Journal of Economic Entomology** 83: 2480-2485, **1990**.

DANGUY, A.; DECAESTECKER, C.; GENTEN, F.; SALMON, I.; KISS, R. Applications of lectins and Neoglycoconjugates in histology and pathology. **Acta Anatomica** 161: 206-218, **1998**.

DELATORRE, P.; ROCHA, B. A. M.; GADELHA, C. A. A.; SANTI-GADELHA, T.; CAJAZEIRAS, J. B.; SOUZA, E. P.; NASCIMENTO, K. S.; FREIRE, V. N.; SAMPAIO, A. H.; AZEVEDO JR., W. F.; CAVADA, B. S. Crystal structure of a lectin from *Canavalia maritima* (ConM) bin complex with trehalose and maltose reveals relevant mutation in ConA-like lectins. **Journal of Structural Biology** 154: 280–286, **2006**.

DEMARTINO, G. N. Purification of proteolytic enzymes. In: BEYNON, R. J.; BOND, J. S. **Proteolytic enzymes**. New York: IRL Press, p. 15-23, **1989**.

DESMARCHELIER, C.; ROMAO, RL.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. Antioxidant and free radical scavenging activities in extracts from medicinal trees used in the 'Caatinga' region in northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology** 67: 69-67, **1999**.

DI PIETRO, A.; MADRID, M. P.; CARACUEL, Z.; DELGADO-JARANA, J.; RONCERO, M. I. G. *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. **Molecular Plant Pathology** 4: 315-325, **2003**.

DI STASI, L. C. **Plantas Medicinais: Arte e Ciência. Um Guia de Estudo Interdisciplinar**. São Paulo: Editora da UNESP, **1996**.

DI STASI, L. C.; OLIVEIRA, G. P.; CARVALHAES, M. A.; QUEIROZ, M.; TIEN, O. S.; KAKINAMI, S. H.; REIS, M. S. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. **Fitoterapia** 73: 69-91, **2002**.

DIAS, S. M. C. **Interações entre plantas, insetos e outros seres**. Aulas apresentadas no Curso de Formação Continuada em Serviço de Educadores do Ensino Médio - Curso de Extensão Universitária, realizado no Instituto Biológico de São Paulo, **2000**.

DUNPHY, J. L., ;BARHAM, G. J.; BISCHOF, R. J.; YOUNG, A. R.; NASH, A.; MEEUSEN, E. N. T. Isolation and characterization of a novel eosinophil-specific galectin released into the lungs in response to allergen challenge. **Journal of Biological Chemistry** 277: 14916-14924, **2002**.

DURIGAN, J. C.; ALMEIDA, F. L. S. **Noções sobre a alelopatia**. Jaboticabal: Funep, **1993**.

EDELMAN G. M.; WANG J. L. Binding and functional properties of concanavalin A and its derivatives. I. Monovalent, divalent, and tetravalent derivatives stable at physiological pH. **Journal of Biological Chemistry** 253: 3000-3007, **1978**.

EDWARDS, R.; MILL, A. E. **Termites in buildings: their biology and control**. Felcourt: Rentokil, **1986**.

ELIFIO, S. L.; DA SILVA, M. L. C. C. IACOMINI, M.; GORIN, P. A. J. A lectin from the lichenized basidiomycete *Dictyonema glabratum*. **New Phytology** 148: 327-334, **2000**.

ENDO, T. Fractionation of glycoprotein-derived oligosaccharides by affinity chromatography using immobilized lectin columns. **Journal of Chromatography A** 720: 251-261, **1996**.

ETZLER, M. E. Distribution and function of plant lectins. In: LIENER, I. E.; SHARON, N.; GOLDSTEIN, I. J. (eds.). **The Lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine**. Orlando: Academic Press, pp. 371-435, **1986**.

FAKHOURY, A. M.; WOLOSHUK, C. P. Inhibition of growth of *Aspergillus flavus* and fungal α -Amylases by a lectin-like protein from *Lablab purpureus*. **Molecular Plant-Microbe Interaction** 14: 955-961, **2001**.

FARNOCHI, M. C.; TORRES, A. M.; MAGAN, N.; CHULZE, S. N. Effect of antioxidants and competing mycoflora on *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum* populations and fumonisin production on maize grain. **Journal of Stored Products Research** 41: 211-219, **2005**.

FERNANDES, M. P. **Purificação, caracterização e aplicação biotecnológica da(s) lectina(s) presente(s) em *Bauhinia membranacea* Benth.** Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco, **2006**.

FERREIRA, S. H. (org.). **Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, **1998**.

FIGUEIREDO, L. R. *Nasutitermes*: uma nova ameaça para os grandes centros urbanos. **Boletim Bay Pro Profissional** (Bayer Environmental Science) 3: 1, **2004**.

FIELDS, P.; KORUNIC, Z. The effect of grain moisture content and temperature on the efficacy of diatomaceous earths from different geographical locations against stored-product beetles. **Journal of Stored Products Research** 36: 1-13, **2000**.

FILHO, O. P.; DORVAL, A.; DUDA, M. J.; MOURA, R. G. Efeito de extratos de madeiras de quatro espécies florestais em cupins *Nasutitermes* sp. (Isoptera, Termitidae). **Scientia Forestalis** 71: 51-55, **2006**.

FINDLAY, W. P. K. The nature and durability of wood. In: FINDLAY, W. P. K. (ed). **Preservation of timber in the tropics**. Dordrecht: Martinus Nijhoff/ Dr. W. Junk Publishers, p. 1-13. **1985**.

FLEMMING, C.; ULRICH, M.; SCHWALL, G.; SCHRODER, H. C.; MULLER, W. E. G. W. Determination of lectin characteristics by a novel agglutination technique. **Analytical Biochemistry** 205: 251-256, **1992**.

FLORÊNCIO, D. F.; DIEHL, E. Termitofauna (Insecta, Isoptera) em Remanescentes de Floresta Estacional Semidecidual em São Leopoldo, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia** 50: 505-511, **2006**.

FLORES, H. E.; COSIO, E.; VIVANCO, J. M.; LOYOLA-VARGAS, V. Mecanismos químicos de defensa en las plantas. **Investigación y Ciencia** 341: 68-75, **2005**.

FOCK, W. L.; CHEN, C. L.; LAM, T. J.; SIN, Y. M. Roles of an endogenous serum lectin in the immune protection of blue gourami, *Trichogaster trichopterus* (Pallus) against *Aeromonas hydrophila*. **Fish and Shellfish Immunology** 11: 101-113, **2001**.

FRANCESCHINI, V.; LAZZARI, M.; CIANI, F. Lectin cytochemical localization of glycoconjugates in the olfactory system of the lizards *Lacerta viridis* and *Podarcis sicula*. **Anatomy and Embryology** 202: 49-54, **2000**.

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

FROHLICH, J.; KOUSTIANE, C.; KAMPFER, P.; ROSSELLO-MORA, R.; VALENS, M.; BERCHTOLD, M.; KUHNIGK, T.; HERTEL, H.; MAHESHWARI, D. K.; KONIG, H. Occurrence of rhizobia in the gut of the higher termite *Nasutitermes nigriceps*. **Systematic and Applied Microbiology** 30: 68-74, **2007**.

FUKUDA, M.; HINDSGAUL, O. **Molecular and Cellular Glycobiology**. Oxford: Oxford University Press, **2000**.

GABOR, F.; BOGNER, E.; WEISSENBOECK, A.; WIRTH, M. The lectin-cell interaction and its implications to intestinal lectin-mediated drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews** 56: 459-480, **2004**.

GADELHA, C. A. A.; MORENO, F. B. M. B.; SANTI-GADELHA, T.; CAJAZEIRAS, J. B.; ROCHA, B. A. M.; ASSREUY, A. M. S.; MOTA, M. R. L.; PINTO, N. V.; MEIRELES, A. V. P.; BORGES, J. C.; FREITAS, B. T.; CANDURI, F.; SOUZA, E. P.; DELATORRE, P.; CRIDDLE, D. N.; DE AZEVEDO JR., W. F.; CAVADA, B. S. Native crystal structure of a nitric oxide-releasing lectin from the seeds of *Canavalia maritima*. **Journal of Structural Biology** 152: 185-194, **2005**.

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

GALI, H. U.; PERCHELLET, E. M.; KLISH, D. S.; JOHNSON, J. M.; PERCHELLET, J. P. Hydrolyzable tannins: potent inhibitors of hydroperoxide production and tumor promotion in mouse skin treated with 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate *in vivo*. **International Journal of Cancer** 51: 425-432, **1992**.

GAO, Y.; WELLS, L.; COMER, F. I.; PARKER, G. J.; HART, G. W. Dynamic O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins cloning and characterization of a neutral, cytosolic N-acetylglucosaminidase from human brain. **Journal of Biological Chemistry** 276: 9838–9845, **2001**.

GARRET, R. H.; GRISHAM, C. M. **Biochemistry**. New York: Saunders College Publishing, **1995**.

GILLJAN, G.; SIRIDEWA, K.; HAMMAR, L. Purification of simian immunodeficiency virus, SIV_{MAC251}, and of its envelope glycoprotein, gp148. **Journal of Chromatography A** 675: 89-100, **1994**.

GODFREY, C. R. A. **Agrochemicals from natural products**. New York, Dekker, **1995**.

GONZALENZ TORRES, D. M. **Catálogo de plantas medicinales y alimenticias y utiles usadas en Paraguay**. Asunción: Litocolor, **1986**.

GOVINDARAJAN, R.; VIJAYAKUMAR, M.; SINGH, M.; RAO, CH. V.; SHIRWAIKAR, A.; RAWAT, A. K. S.; PUSHPANGADAN, P. Antiulcer and antimicrobial activity of *Anogeissus latifolia*. **Journal of Ethnopharmacology** 106: 57-61, **2006**.

GOZIA, O.; CIOPRAGA, J.; BENTIA, T.; LUNGU, M.; ZAMFIRESCU, I.; TUDOR, R.; ROSEANU, A.; NITU, F. Antifungal properties of lectin and new chitinases from potato tubers. **Comptes Rendus de l'Academie des Sciences III** 316: 788-792, **1993**.

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**.

GUBLER, D. J.; CLARK, G. G. Community-based integrated control of *Aedes aegypti*: a brief overview of current programs. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 50: 50-60, **1994**.

GUPTA, N.; SRIVASTAVA, P. S. Purification and characterization of a lectin from seeds and cotyledonary callus of *Zizyphus mauritiana*. **Plant Cell Reports** 17: 552-556, **1998**.

HABIBI, J.; BACKUS, E. A.; CZAPLA, T. H Subcellular effects and localization of binding sites of phytohemagglutinin in the potato leafhopper, *Empoasca fabae* (Insecta: Homoptera: Cicadellidae). **Cell and Tissue Research** 294: 561-571, **1998**.

HALLIWELL, B.; SUSANNA, C. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. **American Journal of Clinical Nutrition** 57: 715-725, **1996**.

HAQUE, M. A.; NAKAKITA, H.; IKENAGA, H.; SOTA, N. Development-inhibiting activity of some tropical plants against *Sitophilus zeamais* Mots. 1865 (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Stored Products Research** 36: 281-287, **2000**.

HARBORNE, J. B. **Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis**. 2^a ed. London: Chapman/Hall, **1991**.

HARBORNE, J. B. **Introduction to ecological biochemistry**. 4^a ed. London: Academic Press, **1993**.

HARDMAN, K. D.; AGARWAL, R. C.; FREISER, M. J. Manganese and calcium-binding sites of concanavalin A. **Journal of Molecular Biology** 157: 69–86, **1982**.

HARUN, J.; LABOSKY JR., P. Antitermitic and antifungal properties of selected bark extractives. **Wood and Fiber Science** 17: 327-335, **1985**.

HASLAM, E. **Plant polyphenols - Vegetable Tannins Revisited**. Cambridge: Cambridge University Press, **1989**.

HAYASHIDA M.; FUJII, T.; HAMASU, M.; ISHIGURO, M.; HATA, Y. Crystallization and preliminary X-ray analysis of lectin C from the roots of pokeweed (*Phytolacca americana*). **Acta Crystallographica Section D, Biological Crystallography** 59: 1249-1252, **2003**.

HAYUNGA, E. G.; SUMMER, M. P. Characterization of surface glycoprotein on *Schistosoma mansoni* adult worms by lectin affinity chromatography. **Journal of Parasitology** 72: 283-291, **1986**.

HEMINGWAY, J.; RANSON, H. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. **Annual Review of Entomology** 45: 371-391, **2000**.

HIDALGO, A.; BURGOS, V.; VIOLA, H.; MEDINA, J.; ARGIBAY, P. Differential expression of glycans in the hippocampus of rats trained on an inhibitory learning paradigm. **Neuropathology** 26: 501–507, **2006**.

HIRABAYASHI, J.; KASAI, K. Effect of amino acid substitution by sited-directed mutagenesis on the carbohydrate recognition and stability of human 14-kDa beta-galactoside-binding lectin. **Journal of Biological Chemistry** 266: 23648–23653, **1991**.

HOJOA, M.; MORIOKAB, M.; MATSUMOTOA, T.; MIURA, T. Identification of soldier caste-specific protein in the frontal gland of nasute termite *Nasutitermes takasagoensis* (Isoptera: Termitidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 35: 347-354, **2002**.

HOLLIMAN, A. Acorn poisoning in ruminants. **Veterinary Record** 116: 546-552, **1985**.

HUANG, X.; XIE, W.J.; GONG, Z.Z. Characterization and antifungal activity of a chitin binding protein from *Ginkgo biloba*. **FEBS Letters** 478: 123–126, **2000**.

HUNT, G. M.; GARRATT, G. A. **Wood preservation**. 3^a ed. New York: McGraw Hill, **1967**.

HUSSAIN, A. I.; ANWAR, F.; SHERAZI, S. T. H.; PRZYBYLSKI, R. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. **Food Chemistry** 108: 986-995, **2008**.

HWANG, W-J.; KARTAL, S. N.; YOSHIMURA, T.; IMAMURA, Y. Synergistic effect of heartwood extractives and quaternary ammonium compounds on termite resistance of treated wood. **Pest Management Science** 63: 90-95, **2006**.

INGKANINAN, K.; HERMANS-LOKKERBOL, A. C. J.; VERPOORTE, R.; Comparison of some centrifugal partition chromatography systems for a general separation of plant extracts. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies** 22: 885-896, **1999**.

JACOB, M. Scientists target return of infectious diseases. **Genetic Engineering & Biotechnology News** 21: 11-80, **2001**

JACOBS, M. J.; BUGBEE, W. M.; GABRIELSON, D. A. Enumeration, location, and characterization of endophytic bacteria within sugar beet roots. **Canadian Journal of Botany** 63: 1262-1265, **1985**.

JACOBSON, M. Botanical pesticides: past, present and future. In: ARNASON, J. T.; PHILOGENE, B. J. R.; MORAND, P. (eds.). **Insecticides of plant origin**. Washington: American Chemical Society, pp.110-119, **1989**.

JANSON, J. C.; RYDÉN, L. **Protein Purification. Principles, High resolution methods, and applications**. VCH Publishers, **1989**.

JAWETZ, E.; MELNICK, J. L.; ALDELBERG, E. A.; BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; ORNSTON, L. N. **Microbiologia Médica**, 18^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, **1991**.

KABIR, S. Jacalin: a jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seed-derived lectin of versatile applications in immunological research. **Journal of Immunological Methods** 212: 193-211, **1998**.

KAKADE, M. L.; RACKIS, J. J.; MCGHEE, J. G. An evaluation of natural vs synthetic substrates for measuring the anti tryptic activity of soy bean samples. **Cereal Chemistry** 46: 518-526, **1969**.

KAMBHAMPATI, S.; EGGLETON, P. Taxonomy and phylogeny of termites. In: ABE, T.; BIGNELL, D. E.; HIGASHI, M. (eds.). **Termites: evolution, sociality, symbioses, ecology**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p. 1-23, **2000**.

KANATT, S. R.; CHANDER, R.; SHARMA, A. Antioxidant potential of mint (*Mentha spicata* L.) in radiation-processed lamb meat. **Food Chemistry** 100: 451-458, 2007.

KANG, H. Y.; MATSUSHIMA, N.; SAMEISHIMA, K.; TAKAMURA, N. Termite resistance tests of hardwoods of Kochi growth. The strong termiticidal activity of kagonoki (*Litsea coreana* L'everill'e). **Mokuzai Gakkaishi** 36: 78-84, 1990.

KAPADLA, G. J.; PAUL, B. D.; CHUNG, E. B.; GHOSH, B.; PRADHAN, S. N. Carcinogenicity of *Camellia sinensis* (tea) and some tannin-containing folk medicinal herbs administered subcutaneously in rats. **Journal of National Cancer Institute** 57: 207-209, 1976.

KARMALI, A. Cromatografia de afinidade com metal imobilizado e suas variantes. **Boletim de Biotecnologia** 1-7, 2001.

KAUR, A.; SINGH, J.; KAMBOJ, S. S.; SEXANA, A. K.; PANDITA, R. M.; SHAMNUGAVEL M. Isolation of an N-acetyl-D-glucosamine specific lectin from the rhizomes of *Arundo donax* with antiproliferative activity. **Phytochemistry** 66: 1933-1940, 2005.

KAUR, M.; SINGH, K.; RUP, P. J.; SAXENA, A. K.; KHAN, R. H.; ASHRAF, M. T.; KAMBOJ, S. S.; SINGH, J. A tuber lectin from *Arisaema helleborifolium* Schott with anti-insect activity against melon fruit fly, *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) and anti-cancer effect on human cancer cell. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 445: 156-165, 2006.

KAWAGISHI, H.; TAKAGI, J.; TAIRA, T.; MURATA, T.; USUI, T. Purification and characterization of a lectin from the mushroom *Mycoleptodonoides aitchisonii*. **Phytochemistry** 56: 53-58, 2001.

KEIS, A. Mediterranean diet and public health personal reflection. **American Journal of Clinical Nutrition** 61: 1321-1323, 1995.

KENNEDY, J. F.; PAIVA, P. M. G.; CORREIA, M. T. S.; CAVALCANTI, M. S. M.; COELHO, L. C. B. B. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Polymers** 26: 219-30, 1995.

KINO, M.; YAMAGUCHI, K.; UMEKAWA, H.; FUNATSU, G. Purification and characterization of three mitogenic lectins from the roots of pokeweed (*Phytolacca americana*). **Bioscience Biotechnology Biochemistry** 59: 683-688, 1995.

KLAYMAN, D. L.; LIN, A. J.; ACTON, N.; SCOVILL, J. P.; HOCK, J. M.; MILHOUS, W. K.; THEOHARIDES, A. D. Isolation of artemisinin (qinghaosu) from *Artemisia annua* growing in the United States. **Journal of Natural Products**, 47: 715-717, 1984.

KOBATA, A.; ENDO, T. Immobilized lectin columns: useful tools for the fractionation and structural analysis of oligosaccharides. **Journal of Chromatography** 597: 111-122, 1992.

KOIKE, T.; BEPPU, H.; KUZUYA, H.; MARUTA, K.; SHIMPO, K.; SUZUKI, M.; TITANI, K.; FUJITA, K. A 35 kDa mannose-binding lectin with hemagglutinating and mitogenic activities from "Kidachi Aloe" (*Aloe arborescens* Miller var. *natalensis* Berger). **The Journal of Biochemistry** 118: 1205-1210, **1995**.

KOMATH S. S.; KAVITHA M.; SWAMY, M. J. Beyond carbohydrate binding: new directions in plant lectin research. **Organic Biomolecules Chemistry** 4 (6): 973-988, **2006**.

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

KORUNIC, Z. Rapid assessment of the insecticidal value of diatomaceous earths without conducting bioassays. **Journal of Stored Products Research** 33: 219-229, **1997**.

KOSHIKAWA, S.; MATSUMOTO, T.; MIURA, T. Morphometric changes during soldier differentiation of the damp-wood termite *Hodotermopsis japonica* (Isoptera, Termopsidae). **Insectes Sociaux** 49: 245-250, **2002**.

KREPEL, L. K., BLOMBERG, M. A., AND HART, G. W. Dynamic glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Cloning and characterization of a unique O-GlcNAc transferase with multiple tetratricopeptide repeats. **Journal of Biological Chemistry** 272: 9308-9315, **1997**.

KUK, Y. I.; SHIN, J. S.; BURGOS, N. R.; HWANG, T. E.; HAN, O.; CHO, B. H.; JUNG, S. Y.; GUH, J. O. 2003. Antioxidative enzymes offer protection from chilling damage in rice plants. **Crop Science** 43: 2109-2117, **2003**.

KUNSTFELD, R.; PETZELBAUER, P. A unique case of a benign disseminated angioproliferation combining features of Kaposi's sarcoma and diffuse dermal angioendotheliomatosis. **Journal of the American Academy of Dermatology** 45: 601-605, **2001**.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; HEINS-VACCARI, E. M.; DE MELO, N. T. **Guia para identificação de fungos, actinomiceto e algas de interesse médico**. São Paulo, Sarvier, FAPESP, **1998**.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. **Nature** 227: 680-685, **1970**.

LAFUENTE, J. V.; URIGUEN, M.; CERVÓS-NAVARRO, J. Changes in glucidic radicals in contused human brains. **Neuropathology** 19: 28-32, **1999**.

LAKS, P. E. Flavanoid biocides: Phytoalexin analogues from condensed tannins. **Phytochemistry** 26: 1617-1621, **1987**.

LALONDE, L.; FOUNTAIN, D. W.; KERMODE, A.; OUELLETTE, F. B.; SCOTT, K.; BEWLEY, J. D.; GIFFORD, D. J. A comparative study of the insoluble storage proteins and the lectins of seeds of the Euphorbiaceae. **Canadian Journal of Botany** 62: 1671-1677, **1984**.

LAM, Y. M.; WANG, H. X.; NG, T. B. A robust cysteine-deficient chitinase-like antifungal protein from inner shoots of the edible chive *Allium tuberosum*. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 279: 74-80, **2000**.

LELLES, J. G.; REZENDE, J. L. P. Considerações gerais sobre tratamento preservativo da madeira de eucalipto. **Informe Agropecuário** 12: 83-90, **1986**.

LEPAGE, E. S.; GERALDO, F. C.; ZANOTTO, P. A.; MILANO, S. Métodos de tratamento. In: LEPAGE, E. S.; OLIVEIRA, A. M. F.; LELIS, A. T.; CARBALLEIRA LOPEZ, G. A.; CHIMELO, J. P.; OLIVEIRA, L. C. S.; CANEDO, M. P.; CAVALCANTE, M. S.; IELO, P. K. Y.; ZANATTO, P. A.; MILANO, S. **Manual de preservação de madeiras**, v. 2. São Paulo: IPT, p.343-419. **1986**.

LIMA, V. L. M. CORREIA, M. T. S. CECHINEL, Y. M. N.; SAMPAIO, C. A.; OWEN, J. S.; COELHO, L. C. B. B. Immobilized *Cratylia mollis* lectin as potential matrix to isolate plasma glycoproteins including lecithin cholesterol acyltransferase. **Carbohydrate Polymers** 33: 27-32, **1997**.

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

LIPWORTH, L.; MARTINEZ, M. E.; ANGELL, J.; HSIEN, C. C.; TRICHOPOULOS, D. Olive oil and human cancer: an assessment of evidence. **Preventive Medicine** 26: 181-190, **1997**.

LIS, H.; SHARON, N. Lectins in higher plants. In: MARCUS, A. The Biochemistry of Plants, a Comprehensive Treatise. **Proteins and nucleic acids** v.6 New York: Academic Press, pp. 371-447, **1981**.

LIS, H.; SHARON, N. Biological properties of lectins. In: LIENER, I. E.; SHARON, N.; GOLDSTEIN, I. J. (eds). **The Lectins: Properties, Functions, and Applications in Biology and Medicine**, New York: Academic Press. pp. 265-291, **1986**.

LIS, H.; SHARON, N. Lectins: Carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. **Chemistry Review** 98: 637-674, **1998**.

LIU, Z. L.; HO, S. H. Bioactivity of essential oil extracted from *Evodia rutaecarpa* Hook f. et Thomas against the grain storage insects, *Sitophilus zeamais* Mots., 1865. and *Tribolium castaneum* (Herbst). **Journal of Stored Products Research** 35: 317-328, **1999**.

LIU, F.; IQBAL, K.; GRUNDKE-IQBAL, I.; HART, G. W.; GONG, C. X. O-GlcNAcylation regulates phosphorylation of tau: a mechanism involved in Alzheimer's disease. **Proceedings of the National Academy Science of United States of America** 101: 10804-10809, **2004**.

LIU, J.; WANG, Y.; PENG, S.; HAN, G.; DONG, Y.; YANG, H.; YAN, C.; WANG, G. Toxic effects of *Fusarium* mycotoxin butenolide on rat myocardium and primary culture of cardiac myocytes. **Toxicon** 50: 357-364, **2007**.

LORENC-KUKULA, K.; WRÓBEL-KWIATKOWSKA, M.; STARZYCKI, M.; SZOPA, J. Engineering flax with increased flavonoid content and thus *Fusarium* resistance. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 70: 38-48, **2007**.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, **2000**.

LOWRY, O. H., ROSEMBROUGH, N. J., FARRR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemiistry** 193: 265-275, **1951**.

LU, R.; HARIGAYA, S.; ISHIMURA, T.; NAGASE, K.; MIYAKOSHI, T. Development of a fast drying lacquer based on raw lacquer sap. **Progress in Organic Coatings** 51: 238-243, **2004**.

MACEDO, M. L. R.; FREIRE, M. G. M.; NOVELLO, J. C.; MARANGONI S. *Talisia esculenta* lectin and larval development of *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Biochimica et Biophysica Acta** 1571: 83–88, **2002**.

MACEDO, M. L. R.; FREIRE, M. G. M.; CASTRO, M. M. Mechanisms of the insecticidal action of TEL (*Talisia esculenta* lectin) against *Callosobruchus maculates* (Coleoptera: Bruchidae). **Archives of Insect Biochemistry and Physiology** 56: 84–96, **2004**.

MACEDO, M. L. R.; FREIRE, M. G. M.; SILVA, M. B. R.; COELHO, L. C. B. B. Insecticidal action of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Comparative Biochemistry and Physiology A** 146: 486-498, **2007**.

MACHUKA, J. S.; OKEOLA, O.G.; ELS, J. M. V. D.; CHRISPEELS, M. J.; LEUVEN, F. V.; PEUMANS, W. J. Isolation and partial characterization of galactose-specific lectins from African yam beans, *Sphenostyles stenocarpa* Harms. **Phytochemistry** 51: 721 -728, **1999**.

MACIEL, M. I. S. **Purificação e caracterização parciais da lectina de entrecasca do cajueiro roxo (*Anacardium occidentale* L.) e sua aplicação**. Dissertação de Mestrado. Bioquímica. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, **2000**.

MACIEL, E. V. M.; ARAUJO-FILHO, V. S.; NAKAZAWA, M.; GOMES, Y. M.; COELHO, L. C. B. B.; CORREIA, M. T. S. Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. **Biologicals** 32: 57-60, **2004**.

MAINIERI, C.; CHIMELO, J. P. **Fichas de características das madeiras brasileiras**. São Paulo: IPT, 1989.

MAN, E. R. Protein oxidation and aging. **Science** 257: 1220-1224, 1992.

MANN, J.; DAVIDSON, R. S.; HOBBS, J. B.; BANTHORPE, D. V.; HARBORNE, J. B. **Natural Products: their Chemistry and Biological Significance**. 1^a ed. New York: Prentice Hall, 1994.

MARGIS-PINHEIRO, M.; SANDRONI, M.; LUMMERZHEIM, L.; OLIVEIRA, D. E. A defesa das plantas contra as doenças. **Ciência Hoje** 147, 1999.

MARKESBERRY, W. R. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. **Free Radical Biology Medicine** 23: 134-147, 1997.

MARKHAN, K. R. **Techniques of flavonoid identification**. London: Academic Press, 1982.

MARTINEZ, M.; CORDOBA, F. Isolation of fully active and stable corn coleoptile lectins. **Preparative Biochemistry and Biotechnology** 30: 199-208, 2000.

MARTTILA, A. T.; LAITINEN, O. H.; AIRENNE, K. J.; KULIK, T.; BAYER, E. A.; WILCHEK, M.; KULOMAA, M. S. Recombinant NeutraLite Avidin: A non-glycosylated, acidic mutant of chicken avidin that exhibits high affinity for biotin and low nonspecific-binding properties. **FEBS Letters** 467: 31-36, 2000.

MATSUI, T.; HAMAKO, J.; OZEKI, Y.; TITANI, K. Comparative study of blood group-recognizing lectins toward ABO blood group antigens on neoglycoproteins, glycoproteins and complex-type oligosaccharides. **Biochimica et Biophysica Acta** 1525: 50-57, 2001.

MCLAUGHLIN, J.; CHANG, C. J.; SMITH, D. Simple bench-top bioassay (brine shrimp and potato discs) for the discovery of plant antitumor compounds: reviews of recent progress. In: KINGHORN, A.; BALANDRIN, M. (eds.), **Human Medicinal Agents from Plants**, ACS Series 534. New York: American Chemical Society, 1993.

McMANUS, M. T.; BURGESS, E. P. J. Effects of the soybean (Kunitz) trypsin inhibitor on growth and digestive proteases of larval of *Spodoptera litura*. **Journal of Insect Physiology** 41: 731-738, 1995.

MELLO, M. O.; SILVA-FILHO, M. C. Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. **Brazilian Journal of Plant Physiology** 14(2): 71-81, 2002.

MERCURE, E. W.; KUNOH, H.; NICHOLSON, R. L. Visualization of materials released from adhered ungerminated conidia of *Colletotrichum graminicola*. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 46: 121-135, 1995.

MEYER, W.; BOLLHORN, M.; STEDE, M. Aspects of general antimicrobial properties of skin secretions in the common seal *Phoca vitulina*. **Diseases of Aquatic Organisms** 41: 77-79, **2000**.

MILANO, S.; FONTES, L. R. **Cupim e cidade – Implicações ecológicas e controle**. São Paulo: Edição dos Autores, **2002**.

MISHRA, V.; SHARMA, R. S.; YADAV, S.; BABU, C. R.; SINGH, T. Purification and characterization of four isoforms of *Himalayan mistletoe* ribosome-inactivating protein from *Viscum album* having unique sugar affinity. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 423: 288-301, **2004**.

MITRA, N.; SRINIVAS, V. R.; RAMYA, T. N. C.; AHMAD, N.; REDDY, G. B.; SUROLIA, A. Conformational stability of legume lectins reflect their different modes of quaternary association: solvent denaturation studies on Concanavalina A and winged bean acidic agglutinin. **Biochemistry** 41: 9256-9263, **2002**.

MIURA, T.; ROISIN, Y.; MATSUMOTO, T. Molecular Phylogeny and Biogeography of the Nasute Termite Genus *Nasutitermes* (Isoptera: Termitidae) in the Pacific Tropics. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 17: 1-10, **2000**.

MONTINE, K. S.; KIM, P. J.; OLSON, S. J.; MARKESBERY, W. R.; MONTINE, T. J. 4-hydroxy-2-nonenal pyrrole adducts in human neurodegenerative disease. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology** 56: 866-871, **1997**.

MONZAVI-KARBASSI, B.; CUNTO-AMESTY, G.; LUO, P.; KIEBER-EMMONS, T. Use of surrogate antigens as vaccines against cancer. **Hybrid Hybridomics** 21: 103-109, **2002**.

MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A.; QUEIROZ, C. R. A. A. Studies on polyphenols of *Myracrodruon urundeuva* wood. **Journal of the Brazilian Chemical Society** 10: 447-452, **1999**.

MORALES, E.; POLO, L. A.; PASTOR, L. M.; SANTAMARÍA, L.; CALVO, A.; ZUASTI, A.; FERRER, C. Characterization of corpora amylacea glycoconjugates in normal and hyperplastic glands of human prostate. **Journal of Molecular Histology** 36: 235-242, **2005**.

MOREIRA, R. A.; OLIVEIRA J. T. A. Comparative studies of seed proteins of the genus *Artocarpus* with respect to lectins. **Biologia Plantarum** 25: 336-342, **1983**.

MOREIRA, R. A.; CAVADA, B. S.; OLIVEIRA, J. T. A.; AINOUS, I. L. Plant lectins. In: OLIVEIRA, B.; SGARBIERI, V. **Proceedings of the First Brazilian Congress on Proteins**. Campinas: Editora da UNICAMP. pp. 71-96, **1990**.

MOREIRA, M. S. A.; MEDEIROS, C. L. C.; AGRA, M. F.; THOMAS, G. Avaliação da atividade espasmolítica da fase aquosa dos extratos etanólicos de Plantas do cariri. In: **XIII Simpósio de Plantas medicinais do Brasil**, Resumos de Temáticas livres. Fortaleza: UVFC, **1994**.

MOREIRA, R. A.; MONTEIRO, A. C. O.; HORTA, A. C. G.; OLIVEIRA, J. T. A.; CAVADA, B. S. Isolation and characterization of *Dioclea altissima* var. megacarpa seed lectin. **Phytochemistry** 46: 139-144, **1997**.

MOREIRA, R. A.; CASTELO-BRANCO, C. C.; MONTEIRO, A. C. O.; TAVARES, R. O.; BELTRAMINI, L. M. Isolation and partial characterization of a lectin from *Artocarpus incisa* L. seeds. **Phytochemistry** 47: 1183-1188, **1998**.

MOURE, A.; FRANCO, D.; SINEIRO, J.; DOMINGUEZ, H.; NÚÑES, M. J.; LEMA, J. M. Antioxidant activity of extracts from *Gevuina avellana* and *Rosa rubiginosa* defatted seeds. **Food Research International** 34: 103-109, **2001**.

MÜLLER, K. O.; BÖRGER, H. Experimentelle Untersuchungen über die *Phytophthora*-Resistenz den Kartoffel. **Arbeiten aus der Biologischen Bundesanstalt für Land-und Fortswirtschaft** 23: 189-231. **1940**.

MURDOCK, L. L.; HUESING, J. E.; NIELSEN, S. S.; PRATT, R. C.; SHADE, R. E. Biological effects of plant lectins on the cowpea weevil. **Phytochemistry** 29: 85-89, **1990**.

NAEEM, A.; KHAN, R. H.; VIKRAM, H.; AKIF, M. Purification of *Cajanus cajan* root lectin and its interaction with rhizobial lipopolysaccharide as studied by different spectroscopic techniques. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 396: 99-105, **2001**.

NANGIA-MAKKER, P.; CONKLIN, J.; HOGAN, V.; RAZ, A. Carbohydrate-binding proteins in cancer, and their ligands as therapeutic agents. **Molecular Medicine** v.8, 187-192, **2002**.

NAPRALERT. **Natural Products Alert Database**. Chicago: Universidade de Illinois, **2001**.

NAVARRO, D. M. A. F.; OLIVEIRA, P. E. S.; POTTING, R. J. P.; BRITO, A. C.; FITAL, S. J. F.; SANT'ANA, A. E. G. The potential attractant or repellent effects of different water types on oviposition in *Aedes aegypti* L. (Dipt., Culicidae). **Journal of Applied Entomology** 127: 46-50, **2003**.

NEU, R. A. A new reagent for differentiating and determining flavones on paper chromatograms. **Naturwissenschaften** 43: 82, **1956**.

NG, T. B.; LAM, Y. W.; WOO, N. Y. S. The immunostimulatory activity and stability of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) roe lectin. **Veterinary Immunology and Immunopathology** 94: 105-112, **2003**.

NISHI, K.; TANEGASHIMA, A.; YAMAMOTO, Y.; USHIYAMA, I.; IKEMOTO, K.; OGINO, M.; YOSHIMATSU, K.; EBIHARA, H.; ARIKAWA, J. N-acetylgalactosamine (GalNAc)-specific lectins mediate enhancement of Hantaan virus infection. **Archives of Virology** 144: 1765-1777, **1999**.

NISHIMURA, A.; SAWADA, S.; USHIYAMA, I.; YAMAMOTO, Y.; NAKAGAWA, T.; TANEGASHIMA, A. et al. Lectin-histochemical detection of degenerative glycoconjugate deposits in human brain. **Forensic Science International** 113: 265-269, **2000**.

NOMURA, K.; ASHIDA H.; UEMURA, N.; KUSHIBE, S.; OZAKI, T.; YOSHIDA, M. Purification and characterization of a mannose/glucose-specific lectin from *Castanea crenata*. **Phytochemistry** 49: 667-673, **1998**.

OLIVA, M. L. V.; SOUZA-PINTO, J. C.; BATISTA, I. F. C.; ARAÚJO, M. S.; SILVEIRA, V. F.; AUERSWALD, E. A.; MENTELE, R.; ECKERSKORN, C.; SAMPAIO, U. M.; SAMPAIO, C. A. M. *Leucaena leucocephala* serine proteinase inhibitor: primary structure and action on blood coagulation, kinin release and rat paw edema. **Biochimica et Biophysica Acta** 7: 64-74, **2000**.

OLIVEIRA, A. M. F.; LELIS, A. T. ; LEPAGE, E. S.; CARBALLEIRA LOPEZ, G. A.; CHIMELO, J. P.; OLIVEIRA, L. C. S.; CANEDO, M. P. MILANO, S. Agentes destruidores de madeira. In: LEPAGE, E. S.; OLIVEIRA, A. M. F.; LELIS, A. T. ; CARBALLEIRA LOPEZ, G. A.; CHIMELO, J. P.; OLIVEIRA, L. C. S.; CANEDO, M. P.; CAVALCANTE, M. S.; IELO, P. K. Y.; ZANATTO, P. A.; MILANO, S. **Manual de preservação de madeiras**, v.1. São Paulo: IPT, p. 99-278. **1986**.

OLIVEIRA, J. T. A.; MELO, V. M. M.; CÂMARA, M. F. L.; VASCONCELOS, I. M.; BELTRAMINI, L. M.; MACHADO, O. L. T.; GOMES, V. M.; PEREIRA, S. P.; FERNANDES, C. F.; NUNES, E. P.; CAPISTRANO, G. G. G.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O. Purification and physicochemical characterization of a cotyledonary lectin from *Luetzelburgia auriculata*. **Phytochemistry** 61: 301 – 310, **2002**.

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

OLIVEIRA, J. V.; VENDRAMIM, J. D. Repelência de óleos essenciais e pós vegetais sobre adultos de *Zabrotes subfasciatus* (Boh.) (Coleoptera: Bruchidae) em sementes de feijoeiro. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil** 28: 549-555, **1999**.

ORDÓÑEZ, R. M., ORDÓÑEZ, A. A. L., SAYAGO, J. E., MORENO, M. I. N., ISLA, M. I. Antimicrobial activity of glycosidase inhibitory protein isolated from *Cyphomandra betacea* Sendt. fruit. **Peptides** 27: 1187-1191, **2006**.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides. **WHO/VBC/81.807**, pp. 1–6, **1981**.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Dengue and dengue haemorrhagic fever**. Fact sheet N°117. Geneva: World Health Organization, **2002**.

ORNTOFT, T. F.; VESTERGAARD, E. M. Clinical aspects of altered glycosylation of glycoproteins in cancer. **Electrophoresis** 20: 362-371, **1999**.

OTTINGER, C. A.; JOHNSON, S. C.; EWART K. V.; BROWN L. L.; ROSS N. W. Enhancement of anti-*Aeromonas salmonicida* activity in Atlantic salmon (*Salmo salar*) macrophages by a mannose-binding lectin. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C** 123: 53-59, 1999.

PAES, J. B.; VITAL, B. R. Resistência natural da madeira de cinco espécies de eucalipto a cupins subterrâneos, em testes de laboratório. **Revista Árvore** 24: 97-104, 2000.

PAES, J. B.; MORAIS, V. M.; LIMA, C. R. Resistência natural de nove madeiras do semi-árido brasileiro a cupins subterrâneos, em ensaio de preferência alimentar. **Brasil Florestal** 20: 59-69, 2001.

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

PAIVA, P. M. G.; SOUZA, A. F.; OLIVA, M. L. V.; KENNEDY, J. F.; CAVALCANTI, M. S. M.; COELHO, L. C. B. B.; SAMPAIO, C. A. M. Isolation of a trypsin inhibitor from *Echinodorus paniculatus* seeds by affinity chromatography on immobilized *Cratylia mollis* isolectins. **Bioresource Technology** 88: 75-79, 2003.

PARIJS, J. V., BROEKAERT, W. F., GOLDSTEIN, I. J.; PEUMANS, W. J. Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. **Planta** 183: 258-264, 1991.

PEDINI, V.; SCOCCO, P.; GARGIULO, A. M.; CECCARELLI, P.; LORVIK, S. Glycoconjugate characterization in the intestine of *Umbrina cirrosa* by means of lectin histochemistry. **Journal of Fish Biology** 61: 1363-1372, 2002.

PEREIRA, E. C.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; SILVA, N. H.; VICENTE, C.; LEGAZ, M. E.; XAVIER-FILHO, L. Fractionation of *Cladonia substellata* crude extracts and detection of antimicrobial activity. **Boletim da Sociedade Broteriana** 64: 173-186, 1991.

PEUMANS, W. J.; DE LEY, M.; BROEKAERT, M. An unusual lectin from stinging nettle (*Urtica dioica*) rhizomes. **FEBS Letters** 177: 99-103, 1984.

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

PHARMACIA FINE CHEMICALS. **Laboratory Techniques**. Pharmacia, Uppsala, 1980.

PISO, G. História Natural e Médica da Índia Ocidental. Rio de Janeiro: MEC/INL, 1957. Tradução de Mário Lobo Leal. Título Original: **De indiae utriusque re naturali et medica libri qvatvordecim**. Amstelaedami: Ludovicum et Danielelem Elzevirios, 1658.

PLETSCH, M. A aplicação da biotecnologia à produção de compostos naturais biologicamente ativos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento** 4: 12-15, **1998**.

PODSEDEK, A. Natural antioxidants and antioxidant capacity of *Brassica vegetables*: A review. **LWT** 40: 1–11, **2007**.

POLANCZYK, R. A.; GARCIA, M. O.; ALVES, S. B. Potencial de *Bacillus thuringiensis israelensis* Berliner no controle de *Aedes aegypti*. **Revista de Saúde Pública** 37: 813-816, **2003**.

PONCHEL, G.; IRACHE, J. M. Specific and non-specific bioadhesive particulate systems for oral delivery to the gastrointestinal tract. **Advanced Drug Delivery Reviews** 34: 191-219, **1998**.

POWELL, K. S.; GATEHOUSE, A. M. R.; HILDER, V. A.; GATEHOUSE, J. A. Antifeedant effects of plant-lectins and an enzyme on the adult stage of the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 75: 51-59, **1995**.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, **2004**.

REGO, E. J. L.; CARVALHO, D. D.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; NOVELLO, J. C. Lectins from seeds of *Crotalaria pallida* (smooth rattlebox). **Phytochemistry** 60: 441-446, **2002**.

REISFELD, R. A.; LEWIS, U. J.; WILLIAMS, D. E. Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrilamide gels. **Nature** 195: 281-283, **1962**.

REMANI, P.; PILLAI, K. R.; HASEENABEEVI, V. M.; ANKATHIL, R.; BHATTATHIRI, V. N.; NAIR, M. K.; VIJAYAKUMAR T. Lectin cytochemistry in the exfoliative cytology of uterine cervix. **Neoplasma** 41: 39-42, **1994**.

RICE, E. L. Allelopathy: an update. **The Botanical Review** 45: 15-109, **1979**.

RICE, E. L. **Allelopathy**. 2ª ed. New York: Academic Press, **1984**.

ROBERTS, L. Mosquitoes and disease. **Science** 298 (5591): 82-83, **2002**.

ROBERTSON, E. H.; CARTWRIGHT, R. A.; WOOD, D. J. The flavones of tea. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 7: 637-646, **1956**.

RODRIGUES, L. V.; FERREIRA, F. V.; REGADAS, F. S. P.; MATOS, D.; VIANA, G. S. B. Morphologic and morphometric analyses of acetic acid-induced colitis in rats after treatment with enemas from *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. (Aroeira-do-Sertão). **Phytoterapy Research** 16 267- 272, **2002**.

RODRIGUES, J. S.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; COELHO, L. C. B. B.; COUVREUR, P.; PONCHEL, G.; GREF, R. Novel core (polyester)-

shell(polysaccharide) nanoparticles: protein loading and surface modification with lectins. **Journal of Controlled Release** 92: 103-112, **2003**.

ROJO, M. A.; YATO, M.; ISHII-MINAMI, N.; MINAMI, E.; KAKU, H.; CITORES, L.; GIRBÉS, T.; SHIBUYA, N. Isolation, cDNA cloning, biological properties, and carbohydrate binding specificity of sieboldin-b, a type II ribosome-inactivating protein from the bark of japanese elderberry (*Sambucus sieboldiana*). **Archives of Biochemistry and Biophysics** 340: 185-194, **1997**.

ROTHEMUND, D. L.; THOMAS, T. M.; RYLATT, D. B. Purification of the basic protein avidin using gradiflow technology. **Protein Expression and Purification** 26: 149-152, **2002**.

ROUGÉ, C.; CAMBILLAU, C.; BOURNE, Y. The three-dimensional structure of legume lectins. In: KILPATRICK, D. C.; VAN DRIESSCHE, E.; BOG-HANSEN, T. C. (eds). **Lectin Reviews**. St Louis: **Sigma Chemical Company**, pp. 143-159, **1991**.

ROUGÉ, P.; PEUMANS, W. J.; BARRE, A.; VAN DAMME, E. J. M. A structural basis for the difference in specificity between the two jacalin-related lectins from mulberry (*Morus nigra*) bark. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 304: 91-97, **2003**.

RUDIGER, H. Plant lectins – More than just tools for glycoscientists: Occurrence, structure, and possible functions of plant lectins. **Acta Anatomica** 161: 130-152, **1998**.

RUDIGER, H.; SIEBERT, H. C.; SOLIS, D.; JIMÉNEZ-BARBERO, J.; ROMERO, A.; VON DER LEITH, C. W.; DIAZ-MARINO, T.; GABIUS, H. J. Medicinal chemistry based on the sugar code: fundamentals of lectinology and experimental strategies with lectins as targets. **Current Medical Chemistry** 7: 389 - 416, **2000**.

RYALS, J.; UKNES, S.; WARD, E. Systemic acquired resistance. **Plant Physiology** 104: 1109-1112, **1994**.

RYAN, C. A. Proteinase inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. **Annual Review of Phytopathology** 28: 425-449, **1990**.

SAHA, P.; MAJUMDER, P.; DUTTA, I.; RAY, T.; ROY, S. C.; DAS, S. Transgenic rice expressing *Allium sativum* leaf lectin with enhanced resistance against sap-sucking insect pests. **Planta** 223: 1329–1343, **2006**.

SAMPAIO, A. H.; ROGERS, D. J.; BARWELL, C. J. A galactose-specific lectin from the red marine alga *Ptilota filicina*. **Phytochemistry** 48: 765-769, **1998a**.

SAMPAIO, A. H.; ROGERS, D. J.; BARWELL, C. J. Isolation and characterization of the lectin from the green marine alga *Ulva lactuca* L. **Botanica Marina** 41: 427-433, **1998b**.

SAMUELSSON, G. Nature as a source of new drugs. **Acta Pharmaceutica Nordica**, 1(3): 111-116, **1989**.

SANDES, A. R. R.; DI BLASI, G. Biodiversidade e diversidade química e genética; aspectos relacionados com a propriedade intelectual no Brasil. In: **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento** 13: 29-32, **2000**.

SANGUINETTI, E. E. **Plantas que curam**. 2ª ed. Porto Alegre: Rigel, **1989**.

SANTOS, S. C.; MELLO, C. P. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O. (org). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4ª ed. pp. 517-544. Porto Alegre / Florianópolis: Editora Universitária UFRGS, Editora da UFSC, **1999**.

SANTOS, A. F. S.; ARGOLO, A. C. C.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G. Detection of water soluble lectin and antioxidant component from *Moringa oleifera* seeds. **Water Research** 39: 975–980, **2005**.

SANTOS FILHO, T. G. **Isolamento de glicoproteínas através de cromatografia de afinidade em colunas contendo lectinas imobilizadas**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, **2001**.

SARKAR, M.; MAJUMDER, G. C. E.; CHATERJEE, T. Goat sperm membrane lectin binding sites of sperm surface and lectin affinity-chromatography of the mature sperm membrane antigens. **Biochemistry and Biophysical Acta** 1070 (1): 196-204, **1991**.

SAUVION, N.; NARDONB, G.; FEBVAY, G.; GATEHOUSE, A. M. R.; RAHBÉ, Y. Binding of the insecticidal lectin Concanavalin A in pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Harris) and induced effects on the structure of midgut epithelial cells. **Journal of Insect Physiology** 50, 1137–1150, **2004**.

SAXENA, R. C. Insecticides from neem. In: ARNASON, J. T.; PHILOGENE, B. J. R.; MORAND, P. (eds.). **Insecticides of plant origin**. Washington: American Chemical Society, pp.120-135, **1989**.

SCHEFFRAHN, R. H.; CABRERA, B. J. KERN JR., W. J.; SU, N. Y. *Nasutitermes costalis* (Isoptera: Termitidae) in Florida: first record of a non-endemic establishment by a higher termite. **Florida Entomologist** 85: 273-275, **2002**.

SCHULTZ, T. P.; NICHOLAS, D. D. Development of environmentally-benign wood preservatives based on the combination of organic biocides with antioxidants and metal chelators. **Phytochemistry** 61: 55-560, **2002**.

SCHULTZ, T. P.; NICHOLAS, D. D.; KIRKER, G. T.; PREWITT, M. L.; DIEHL, S. V. Effect of the antioxidant BHT on reducing depletion of chlorothalonil in treated wood after 54 months of ground-contact exposure. **International Biodeterioration & Biodegradation** 57: 45-50. **2006**.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Balanço Dengue Janeiro a Novembro de 2007**. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br>. Ministério da Saúde, Brasília, **2007**.

SELITRENNIKOFF, C. P. Antifungal proteins. **Applied and Environmental Microbiology** 67: 2883-2894, **2001**.

SHARON, N.; LIS, H. Legumes lectins – a large family of homologous proteins. **FASEB J** 4: 3198-3208, **1990**.

SHARON, N. Lectin-carbohydrate complexes of plants and animals: an atomic view. **Trends in Biochemical Science** 18: 221-226, **1993**.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology** 14: 53-62, **2004**.

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

SHIOMI, K.; KAMIYA, H.; SHIMIZU, Y. Purification and characterization of an agglutinin in the red alga *Agardhiella tenera*. **Biochimica et Biophysica Acta** 576: 118-127, **1979**.

SIDDHURAJU, P.; MOHAN, P. S.; BECKER, K. Studies on the antioxidant activity of Indian Laburnum (*Cassia fistula* L.): a preliminary assessment of crude extracts from stem bark, leaves, flowers and fruit pulp. **Food Chemistry** 79: 61–67, **2002**.

SIDDIQUI, S.; HASAN, S.; SALAHUDDIN, A. Isolation and characterization of *Cajanus cajan* lectin. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 319: 426-431, **1995**.

SILVA, Z. L. Alelopatia e defesa em plantas. **Boletim Geográfico** 36: 90-96, **1978**.

SILVA, L. B. L. **Preparação e Avaliação Biofarmacêutica de Formas semi-sólidas da Aroeira da Praia (*Schinus terebinthifolius* Raddi.)**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Pernambuco. Recife, **1999**.

SILVA, A. C. **Madeiras da Amazônia: características Gerais, nome vulgar e usos**. Manaus: Sebrae, **2002**.

SILVA, M. D. C. **Uma lectina do líquen *Cladonia verticillaris*: purificação e caracterização parcial**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco, **2004**.

SILVA, C. A.; BRAGA, M. R. Liberação e atividade de moléculas indutoras de fitoalexinas em rubiáceas tropicais: influência da metilesterificação de pectinas. **Revista Brasileira de Botânica** 27: 379-393, **2004**.

SIMAS, N. K.; LIMA, E. C.; CONCEIÇÃO, S. R.; KUSTER, R. M.; OLIVEIRA FILHO, A. M. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue – atividade larvicida de *Myroxylon Balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. **Química Nova** 27: 46-49, **2004**.

SISTI, M.; DE SANTI, M.; FRATERNALE, D.; NINFALI, P.; SCOCCIANI, V.; BRANDI, G. Antifungal activity of *Rulbus ulmifolius* Schott standardized in vitro culture. **LWT – Food Science and Technology** 41: 946-950, **2008**.

SOLER-RIVAS, C.; ESPÍN, J. C.; WICHES, H. J. An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs. **Phytochemical Analysis** 11: 1-9, **2000**.

SOUZA FILHO, A. P. S.; ALVES, S. M. (orgs). **Alelopatia: Princípios Básicos e Aspectos Gerais**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, **2002**.

SPICER, S. S. Advantages of histochemistry for the study of cell biology. **Histochemistry Journal** 25: 531-547, **1993**.

SPILATRO, S. R.; COCHRAN, G. R.; WALKER, R. E.; CABLISH, K. L.; BITTNER, C. C. Characterization of a new lectin of soybean vegetative tissues. **Plant Physiology** 110: 825-834, **1996**.

STIASNY, E. **The qualitative detection and differentiation of vegetable tannins**. Haltingen: Collegium, **1912**.

SU, N.; TAMASHIRO, M.; YATES, J. R.; HAVERTY, M. I. Effects of behavior in the evaluation of insecticides for prevention of or remedial control of the Formosan subterranean termite. **Journal of Economical Entomology** 75: 188-193, **1982**.

SU, N. Y.; SCHEFFRAHN, R. H. Economically important termites in the United States and their control. **Sociobiology** 17: 77-94, **1990**.

SUMNER, J. B.; HOWELL, S. F. The identification of the hemagglutinin of the jack bean with concanavalin A. **Journal of Bacteriology** 32: 227-237, **1936**.

SUSEELAN, K. N.; MITRA, R.; PANDEY, R.; SAINIS, K. B.; KRISHNA, T. G. Purification and characterization of a lectin from wild sunflower (*Helianthus tuberosus* L.) tubers. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 407: 241-247, **2002**.

TANG, S. Z.; KERRY, J. P.; SHEEHAN, D.; BUCKLEY, D. J. Antioxidative mechanisms of tea catechins in chicken meat systems. **Food Chemistry** 76: 45-51, **2002**.

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

TAUIL, P. L. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública** 18: 867-871, **2002**.

TAYLOR, M. E.; DRICKAMER, K. **Introduction to Glycobiology**; Oxford: Oxford University Press, **2002**.

THALER, J. S.; FIDANTSEF, A. L.; DUFFEY, S. S.; BOSTOCK, R.M. Trade-offs in plant defense against pathogens and herbivores: a field demonstration of chemical elicitors of induced resistance. **Journal of Chemical Ecology** 25: 1597-1609, **1999**.

TRABULSI, R. **Microbiologia**. 3^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, **2000**.

TRINDADE, M. B.; LOPES, J. L. S.; SOARES-COSTA, A.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C.; MOREIRA, R. A.; OLIVA, M. L. V.; BELTRAMINI, L. M. Structural characterization of novel chitin-binding lectins from the genus *Artocarpus* and their antifungal activity. **Biochimica et Biophysica Acta** 1764: 146-152, **2006**.

ULFIG, N.; BOHL, J.; NEUDORFER, F.; REZAIE, P. Brain macrophages and microglia in human fetal hydrocephalus. **Brain & Development**, **2003**.

UMETSU, K.; YAMASHITA, K.; SUZUKI, T. Purification and carbohydrate-binding specificities of a blood type B binding lectin from hemolymph of a crab (*Charybdis japonica*). **Journal of Biochemistry** 109: 718-721, **1991**.

VAN DAMME, E. J. M.; WILLEMS, P.; TORREKENS, S.; VAN LEUVEN, F.; PEUMANS, W. J. Garlic (*Allium sativum*) chitinases: characterization and molecular cloning. **Physiologia Plantarum** 87: 177-186, 1993.

VAN DAMME, E. J. M.; BARRE, A.; ROUGÉ, P.; LEUVEN, F. V.; PEUMANS, W. J. The NeuAc(α -2,6)-GalNAc-binding lectin from elderberry (*Sambucus nigra*) bark type-2 ribosome-inactivating protein with an unusual specificity and structure. **European Journal of Biochemistry** 235: 128-137, **1996**.

VAN DAMME, J. M.; PEUMANS, W. J.; BARRE, A. J.; ROUGÉ, P. J. Plant Lectins: A Composite of Several Distinct Families of Structurally and Evolutionary Related Proteins with Diverse Biological Roles. **Critical Reviews in Plant Sciences** 17(6): 575-592, **1998**.

VAN DEN BERGH, K. P.; ROUGE, P.; PROOST, P.; COOSEMANS, J.; KROUGLOVA, T.; ENGELBORGH, Y.; PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. Synergistic antifungal activity of two chitin-binding proteins from spindle tree (*Euonymus europaeus* L.). **Planta** 219: 221-232, **2004**.

VAN ETEN, R. L.; SAINI, M. Preparation of homogeneous human prostatic acid phosphatase using concanavalin A-Sepharose 4-B. **Biochimica et Biophysica Acta** 484: 487-492, **1977**.

VARANKA, Z.; ROJIK, I.; VARANKA, I.; NEMESÓK, J.; ÁBRAHÁM, M. Biochemical and morphological changes in carp (*Cyprinus carpio* L.) liver following exposure to copper sulfate and tannic acid. **Comparative Biochemistry and Physiology** 128: 467-478, **2001**.

VASCONCELLOS, A.; MELO, A. C. S.; VASCONCELOS SEGUNDO, E. M.; BANDEIRA, A. G. Cupins de duas florestas de restinga do nordeste brasileiro. **Iheringia - Série Zoologia** 95: 127-131, **2005**.

VASCONCELOS, I. M.; OLIVEIRA, J. T. A. Antinutritional properties of plant lectins. **Toxicon** 44: 1737–1747, **2004**.

VERGAUWEN, R.; VAN LEUVEN, F.; VAN LAERE, A. Purification and characterization of strongly chitin-binding chitinase from salicylic acid-treated leek (*Allium porrum*). **Physiologia Plantarum** 104: 175–182, **1998**.

VIANA, G. S. B.; MATOS, F. J. A.; BANDEIRA, M. A. M.; RAO, V. S. N. **Aroeira do Sertão (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.): estudo botânico, farmacognóstico, químico e farmacológico**. 2ª ed. Fortaleza: Edições UFC, **1995**.

VIANA, G. S. B.; RA, C.; RAO, V. S. N.; MATOS, F. J. A. Estudos clínicos preliminares sobre *Astronium urundeuva* na ulceração péptica. **X Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**. São Paulo, **1988**.

VIANA, G. S. B.; BANDEIRA, M. A.; MATOS, F. J. A. Analgesic and antiinflammatory effects isolated from *Myracrodruon urundeuva* Allemão. **Phytomedicine** 10: 189–195. **2003**.

VIANA, A. M. A. **Isolamento, caracterização parcial e atividades biológicas da lectina de entrecasca de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi.)**. Dissertação de Mestrado. Bioquímica. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, **2002**.

VICKERY, M. L.; VICKERY, B. **Secondary Plant Metabolism**. London: The Macmillan Press, **1981**.

WANG, X.; BUNKERS, G. J. Potent heterologous antifungal proteins from cheeseweed (*Malva parviflora*). **Biochemical and Biophysical Research Communications** 279: 669–673, **2000**.

WANG, R.; KONG, C.; KOLATKAR, P.; CHUNG, M. C. M. A novel dimer of a C-type lectin-like heterodimer from the venom of *Calloselasma roddostoma* (Malayan pit viper). **FEBS Letters** 508: 447–453, **2001**.

WANG, H. X.; NG, T. B. Purification of Castamollin, a novel antifungal protein from Chinese chestnuts. **Protein Expression & Purification** 32: 44–51, **2003**.

WANI, M. C.; TAYLOR, H. L.; WALL, M. E.; COGGON, P.; McPHAIL, A. T. Plant antitumor agents. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. **Journal of The American Chemical Society**, 93: 2325–2327, **1971**.

WATSON, L.; DALLWITZ, M. J. **The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval**, **1992**.

WAUTERS, G.; CHARLIER, J.; JANSSENS, M. Agglutination of pYV1 *Yersinia enterocolitica* strains by agglutinin from *Mangifera indica*. **Journal of Clinical Microbiology** 33: 772–774, **1995**.

WINTER, H. C.; MOSTAFAPOUR, K.; GOLDSTEIN, I. J. The mushroom *Marasmius oreades* lectin is a blood group type B agglutinin that recognizes the Gal α 1,3Gal and Gal α 1,3Gal β 1,4GlcNAc porcine xenotransplantation epitopes with high affinity. **Journal of Biological Chemistry** 277: 14996-15001, **2002**.

WITITSUWANNAKUL, R.; WITITSUWANNAKUL, D.; SAKULBORIRUG, C. A lectin from the bark of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*). **Phytochemistry** 47: 183-187, **1998**.

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

XAVIER, H. S. Plantas Medicinais do Brasil. **Revista Portuguesa de Farmácia** 41: 31-32, **1991**.

XAVIER, H. S.; BARRETO, S. L. B.; RANDAU, K. P.; ARAÚJO, E. L. Contribuição à caracterização de taninos hidrolisáveis. **Anais do 53º Congresso Nacional de Botânica**, Resumo 042, p.20, Recife, **2002**.

XIMENES, N. C. A. **Purificação e caracterização de duas formas moleculares da lectina de vagem de *Caesalpinia ferrea***. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco, **2004**.

YE, X. Y.; NG, T. B. Peptides from pinto bean and red bean with sequence homology to cowpea 10-KDA protein precursor exhibit antifungal, mitogenic, and HIV-1 reverse transcriptase-inhibitory activities. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 285: 424-429, **2001**.

YE, X. Y.; NG, T. B. A new antifungal protein and a chitinase with prominent macrophage-stimulating activity from seeds of *Phaseolus vulgaris* cv. pinto. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 290: 813-819, **2002**.

YE, X.; NG, T. B. A chitinase with antifungal activity from the mung bean. **Protein Expression & Purification** 40: 230-236, **2005**.

YE, X. Y.; WANG, H. X.; NG, T. B. Dolichin, a new chitinase-like antifungal protein isolated from field beans (*Dolichos lablab*). **Biochemical and Biophysical Research Communications** 269: 155-159, **2000**.

YOSHIDA, K. I.; HONA, M.; ARAI, K.; HOSOYA, Y.; MORIGUCHI, H.; SUMI, S.; UEDA, Y.; KITAHARA, S. Serial lectin affinity chromatography with concanavalin A and wheat germ agglutinin demonstrates altered asparagine-linked sugar-chain structures of prostatic acid phosphatase in human prostate carcinoma. **Journal of Chromatography B** 695: 439-443, **1997**.

YOUNG, N. M.; OOMEN, R. P. Analysis of sequence variation among legume lectins. A ring of hypervariable residues forms the perimeter of the carbohydrate-binding site. **Journal of Molecular Biology** 228: 924-934, **1992**.

ZANETTI, R. **Manejo de pragas florestais**. Notas de Aula de ENT 115. Departamento de Entomologia, UFLA, Lavras, MG, **2002**.

ZENG, X.; NAKAAKI, Y.; MURATA, T.; USUI, T. Chemoenzymatic synthesis of glycopolypeptides carrying α -Neu5Ac-(2 $\rightarrow$ 3)- β -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 3)- α -D-GalNAc, β -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 3)- α -D-GalNAc, and related compounds and analysis of their specific interactions with lectins. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 383: 28-37, **2000**.

ZENTENO, E.; OCHOA, J. L. Isolation and purification of *Amaranthus leucocarpus* lectin on stroma column. **Phytochemistry** 27: 313–317, **1988**.

ZENTENO, E.; VASQUEZ, R.; CORDOBA, F.; WIERUSZESKI, J. M.; MONTREUIL, J.; DEBRAY, H. Specificity of the isolectins from the plant cactus *Machaerocereus eruca* for oligosaccharides from porcine stomach mucin. **Glycoconjugate Journal** 12: 699–706, **1995**.

ZHANG, H.; WANG, L. Theoretical elucidation on structure-antioxidant activity relationships for indolinonic hydroxylamines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** 12: 225-227, **2002**.

ZHANG, P-F.; CHEN, P.; HU, W-J.; LIANG, S-P. Huwentoxin-V, a novel insecticidal peptide toxin from the spider *Selenocosmia huwena* and a natural mutant of the toxin: indicates the key amino acid residues related to the biological activity. **Toxicon** 42: 15-20, **2003**.

ZHU-SALZMAN, K.; SHADE, R. E.; KOIWA, H.; SALZMAN, R. A.; NARASIMHAN, M.; BRESSAN, R. A.; HASEGAWA, P. M.; MURDOCK, L. L. Carbohydrate binding and resistance to proteolysis control insecticidal activity of *Griffonia simplicifolia* lectin II (GSII). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 95: 15123–15128, **1998**.

ZHU-SALZMAN, K.; SALZMAN, R. A. Functional mechanics of the plant defensive *Griffonia simplicifolia* lectin II: resistance to proteolysis is independent of glycoconjugate binding in the insect gut. **Journal of Economic Entomology** 94: 1280–1284, **2001**.

ANEXOS

ANEXO A

CERTIFICADO DE MENÇÃO HONROSA concedido pela Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq) durante a *VIII Reunião Regional da SBBq e 3rd International Symposium in Biochemistry of Macromolecules and Biotechnology*

**VIII Reunião Regional da SBBq
3rd International Symposium in Biochemistry of
Macromolecules and Biotechnology**

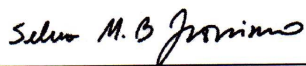
Certificado

Certificamos que o trabalho

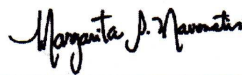
**ANTIFUNGAL ACTIVITY OF A LECTIN PREPARATION FROM
MYRACRODRUON URUNDEUVA HEARTWOOD**

recebeu MENÇÃO HONROSA entre os 25 melhores painéis científicos na VIII Reunião Regional da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq, realizada em Natal, Rio Grande do Norte, no período de 6 a 8 de dezembro de 2006.

Natal, 8 de dezembro de 2006



Prof.^a Dr.^a Selma M. Bezerra Jerônimo
Presidente da VIII Reunião Regional - SBBq



Margarita A. Mavromatis
1^a Secretária da VIII Reunião Regional - SBBq



**Sociedade Brasileira de Bioquímica e
Biologia Molecular - SBBq**

ANEXO B

CERTIFICADO DE HONRA AO MÉRITO concedido pela Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE) durante a *II Reunião Regional da FeSBE*



ANEXO C

INDUCTION OF MORTALITY ON *Nasutitermes corniger* (ISOPTERA, TERMITIDAE) BY *Myracrodruon urundeuva* HEARTWOOD LECTIN

ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO NO PERIÓDICO “International Biodeterioration and Biodegradation”

Date: Apr 30, 2008
To: "Patrícia Maria Guedes Paiva" ppaivaufpe@yahoo.com.br
From: cgaylarde@yahoo.com
Subject: Your Submission IBB-D-07-00204

Ms. Ref. No.: IBB-D-07-00204

Title: Induction of mortality on *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae) by *Myracrodruon urundeuva* heartwood lectin
International Biodeterioration & Biodegradation

Dear Dr. Patrícia Maria Guedes Paiva,

I am pleased to confirm that your paper "Induction of mortality on *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae) by *Myracrodruon urundeuva* heartwood lectin" has been accepted for publication in International Biodeterioration & Biodegradation. I must apologise for the delay in sending this notification. I had considerable difficulty finding suitable referees who were both willing and able to review the manuscript.

Thank you for submitting your work to this journal.

With kind regards,

Christine Gaylarde, Ph.D.
Special Issue Editor
International Biodeterioration & Biodegradation

Induction of mortality on *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae) by *Myracrodruon urundeuva* heartwood lectin

Roberto A. Sá^a; Thiago H. Napoleão^b; Nataly D. L. Santos^b; Francis S. Gomes^b; Auristela C. Albuquerque^c; Haroudo S. Xavier^d; Luana C. B. B. Coelho^b; Lothar W. Bieber^a; Patrícia M. G. Paiva^{b,*}.

¹Departamento de Química Fundamental-CCEN, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brazil.

²Departamento de Bioquímica-CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil.

³Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Dois Irmãos, 52171-030, Recife, Pernambuco, Brazil.

⁴Departamento de Ciências Farmacêuticas-CCS, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50740-521, Recife, Pernambuco, Brazil.

*Corresponding author. Tel: +558121268540; fax: +558121268576. E-mail: ppaivaufpe@yahoo.com.br.

Scientific relevance: This is the first report of lectin action on termite. The effect of *M. urundeuva* lectin on *N. corniger* survival points out the possibility of participation of this bioactive peptide in the resistance of *M. urundeuva* heartwood to termites. The investigation of the termiticidal activity of the lectin is an important step in the search for new natural insecticide agents.

ABSTRACT

Termites are eusocial insects that can promote severe damages in wood. The presence of lectins, carbohydrate-binding proteins that have shown entomotoxic activities, was detected in the saline extract from *Myracrodruon urundeuva*, a termite-resistant heartwood. The purpose of this work was to evaluate the effect of *M. urundeuva* heartwood lectin on termites of *Nasutitermes corniger*. The lectin isolated by affinity chromatography (chitin column) was submitted to trypsin treatment and analyzed for the presence of non-protein contaminants. Lectin's effect on *N. corniger* was evaluated by termiticidal and repellence assays. Lectin activity was inhibited by N-acetylglucosamine monosaccharide and adsorbed on a chitin column. The lectin preparation obtained was free of secondary plant metabolites that can promote insect mortality. Contact with lectin in all concentrations induced mortality of termites. The values of LC₅₀ were 0.248 mg ml⁻¹ for workers and 0.199 mg ml⁻¹ for soldiers, after 4 days. Repellence assay indicated that the lectin did not induce a rejection effect. The lectin remained active after incubation with bovine trypsin. This is the first report of lectin's toxic effect on termites. The effect of *M. urundeuva* lectin on *N. corniger* survival points out the possibility of using this bioactive peptide to aid resistance of *M. urundeuva* heartwood to termites.

KEY WORDS: Heartwood; Lectin; *Myracrodruon urundeuva*; *Nasutitermes corniger*; Trypsin resistance

1. Introduction

Termites constitute the main group of eusocial insects. They are able to feed on woods because of the presence of symbiotic cellulose decomposing bacteria in the gut of many species (Breznak, 1982; Hojo et al., 2005). Termites have been responsible for the major damage in wood, and biodegradation by termites is economically one of the most serious problems for wood utilization (Hunt and Garratt, 1967; Deka et al., 2002; Cheng et al., 2007).

Termitidae is the main family of termites and the subfamily Nasutiterminae is the most diversified group in Isoptera (Kambhampati and Eggleton, 2000). *Nasutitermes* is a genus broadly distributed in the tropics and can build nests in trees, roots, or soil. *Nasutitermes* species worldwide are known to damage several wooden parts in buildings. They preferentially build their nests in roofs, linings and structural spans (Edwards and Mill 1986; Scheffrahn et al., 2002). *N. corniger* is one of the most dominant and broadly distributed species of the genus (Scheffrahn et al., 2005) and woods can be a component of its diet (Vasconcellos et al., 2005).

Myracrodruon urundeuva (aroeira-do-sertão, Anacardiaceae) is broadly distributed in Brazil. Considered a hardwood, it is very dense, elastic, and resistant to termites (Mainieri and Chimelo, 1989). The physical and chemical protections of the very resistant wood of *M. urundeuva* have been investigated by evaluation of extractives (Paes et al., 2002) but the isolation of compounds responsible for this resistance is still lacking. The elucidation of the biochemical processes involved in natural resistance of durable woods is very important if we are to prevent additional expenses with the replacement of spoiled pieces, increase the durability of other woods that are less resistant through chemical treatments or biotechnological applications and reduce the impacts on hardwoods in remaining forests (Chang et al., 2000; Paes et al., 2002).

Plant resistance to insect pests can be mediated by primary (e.g., proteinase and amylase inhibitors, thionins and lectins) and secondary metabolites (e.g., alkaloids, tannins and rotenoids) (Chrispeels and Raikhel, 1991; Peumans and Van Damme, 1995). Several organic substances extracted from vegetal tissues as essential oils, tannins, flavanoids and proteins have been evaluated for their repellent, deterrent, inhibitory, and toxic properties against pest and invader insets (Cavalcante et al., 2006) as termites (Arihara et al., 2004), weevils (Sadeghi et al., 2006) and mosquitoes (Dharmagadda et al., 2005). Jacobson (1989) included Anacardiaceae species among the promising botanical sources of insecticide substances due to the diversity of allelopathic effects that are described for this botanical family. The impact of inorganic and synthetic chemical insecticides on the environment has stimulated the search for compounds that occur naturally and can act as termite toxicants (Chen et al., 2004).

Lectins, proteins that agglutinate cells by carbohydrate recognition (Santos et al., 2005), are widely distributed among plants and are included among the best known plant proteins supposedly involved in defense mechanisms (Gatehouse et al., 1995; Peumans and Van Damme, 1995; Carlini and Grossi-de-Sá, 2002). Lectins have shown entomotoxic activities on larvae of cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (Macedo et al., 2004) and melon fruit fly *Bactrocera cucurbitae* (Kaur et al., 2006), developing stages of *C. maculatus* (Leite et al., 2005), and mature forms of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* (Sauvion et al., 2004), and it has been suggested that lectins may be explored for pest control or by genetic engineering

aiming to increase plant resistance to insects (Carlini and Grossi-de-Sá, 2002; Saha et al., 2006).

Lectin activity was detected in *M. urundeuva* heartwood. In this report termiticidal and repellent effects of *M. urundeuva* lectin on *Nasutitermes corniger* were evaluated.

2. Materials and Methods

2.1. Isolation of lectin from *M. urundeuva* heartwood

M. urundeuva heartwood was collected in the state of Maranhão in northeastern Brazil. A representative specimen is archived under number 054 at the Herbarium Aluisio Bittencourt, Centro de Estudos Superiores de Caxias (CESC), Universidade Estadual do Maranhão, Brazil.

Powdered heartwood (10 g) was suspended in 0.15 M NaCl (100 ml). After homogenisation in a magnetic stirrer (16 h at 4°C), followed by filtration through gauze and centrifugation (3,000 $\times g$, 15 min), the supernatant (crude extract) was taken as starting material. Soluble proteins in the crude extract were fractionated with ammonium sulphate and the fraction 40–60% (40-60F) containing 20.6 mg of protein was then loaded onto a chitin (Sigma, USA) column (7.5 $\times$ 1.5 cm) equilibrated (20 ml h^{-1} flow rate) with 0.15 M NaCl. The washing step used 0.15 M NaCl (100 ml). The lectin was recovered by eluting the column with 1.0 M acetic acid (80 ml) and submitted to dialysis (4°C, 4 h) against 0.15 M NaCl (1 l) for eluent elimination. Protein concentration was determined according to Lowry et al. (1951) using bovine serum albumin as standard.

2.2. Hemagglutinating activity assay

Hemagglutinating activity (HA) was carried out in microtitre plates (Kartell S.P.A., Italy) according to Paiva and Coelho (1992) using human (A, AB, and B) or rabbit erythrocytes treated with glutaraldehyde (Bing et al., 1967). The evaluated preparations (50 μ l) were serially two-fold diluted in 0.15 M NaCl before addition of 2.5% (v/v) suspension of erythrocytes (50 μ L). The HA inhibitory assay used 200 mM N-acetyl-glucosamine monosaccharide solution. The lectin (50 μ l) was serially two-fold diluted in monosaccharide solution and incubation (45 min, 27 °C) was performed before addition of 2.5% (v/v) suspension of rabbit erythrocytes (50 μ l). HA (titer) was defined as the lowest lectin concentration in the sample that showed hemagglutination. Specific HA was defined as the ratio between the titer and protein concentration ($mg\ ml^{-1}$).

2.3. Phytochemical evaluation in thin layer chromatography (TLC)

The isolated lectin (15 μ l containing 15 μ g of protein) was submitted to phytochemical evaluation using silica gel TLC sheets (Merck, Germany). Different systems of development and adequate visualization techniques were used: 1% iron alum for hydrolisable tannins (Stiasny, 1912); vanillin-hydrochloric acid for condensed tannins and leucoanthocyanidins (Robertson et al., 1957); Dragendorff's reagent for alkaloids (Wagner and Bladt, 1996); sulphuric vanillin for terpenes and iridoids (Wagner and Bladt, 1996), Lieberman-Burchard reagent for steroids (Harbone, 1991); anisaldehyde for saponins (Wagner and Bladt, 1996); Neu's

reagent for gallic acid (Neu, 1956) and flavonoids (Markhan, 1982); UV light for coumarins (Wagner and Bladt, 1996).

2.4. *Termiticidal assay*

Nasutitermes corniger identification was performed by Dr. Luiz Roberto Fontes (Superintendência de Controle de Endemias, SUCEN, Brasil). Termite colonies were maintained in vegetation house at the Departamento de Agronomia of Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Termiticidal activity was evaluated by a no-choice bioassay based on the method described by Kang et al. (1990). Each experimental unit consisted of a petri plate (90 x 15 mm) with the deep plate covered by filter paper. A filter paper disk of 4 cm diameter soaked with 200 μ l of lectin (0.1, 0.2, 0.4 or 0.8 mg ml⁻¹) or 0.15 M NaCl (negative control) solutions were put in each plate. A total of 20 active termites (workers and soldiers, in proportion of 4:1, respectively) were transferred to each plate. Plates were maintained at 28 °C in darkness. Evaluation of insect survival was made daily until the death of all insects. Bioassay was achieved in quintuplicate and survival rates were obtained for each treatment and expressed as mean $\pm$ SD. Student's t-test were established using Origin™ 6.0 (Microcal, USA). Significant differences between groups were at $p < 0.05$. The concentration required to kill 50% of insects in each treatment (LC₅₀) after 4 days was determined from the data obtained with a concentration range between 0.1 and 0.8 mg ml⁻¹ using the Probit Analysis method (Statplus, 2006) with a reliability interval of 95%.

2.6. *Repellence assay*

An assay based on Su et al. (1982) was used for evaluation of repellent activity. Petri plates (100 x 15 mm) were filled up with 2% agar solution until there was no space between the superior surface of agar and plate covers. After solidification, wells are made in agar by removal of a central cylinder 25 mm in diameter and eight peripherals cylinders (6 mm diameter). In each peripheral well a filter paper soaked with 15 μ l of lectin (0.2, 0.4 and 0.8 mg mL⁻¹) or 0.15 M NaCl (negative control) solutions was placed. Each treatment solution was present in duplicate in a plate. Termites (16 workers and 4 soldiers) were then transferred to the central well. Assays were made in triplicate. The plates were maintained at 28 °C in darkness and followed for 15 days for: absence or presence of termites in lectin and 0.15 M NaCl treated wells, standards of tunnel construction in agar, and closing by insects of constructed galleries.

2.7. *Evaluation of lectin activity after trypsin treatment*

Bovine trypsin (0.1 mg ml⁻¹ in 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0; 500 μ l) was incubated (37°C, 60 min) with the lectin (0.2 mg ml⁻¹ in 0.15 M NaCl; 500 μ l). The enzyme reaction was stopped by heating (100 °C during 20 min). A control tube containing lectin (0.2 mg ml⁻¹ in 0.15 M NaCl; 500 μ l) in 0.1 M Tris, pH 8.0 (500 μ l) was submitted to the same two steps. Control and test tubes were evaluated by HA. The enzyme activity was also evaluated before and after tube test heating according to Kakade et al. (1969) by incubation (30 min at 37°C) of tube test aliquot (100 μ l) with 4 mM N- α -benzoyl-DL-arginyl-p-nitroanilide substrate (30 μ l) dissolved in dimethyl

sulfoxide and diluted with Tris buffer. The enzyme reaction was stopped with 10% (v/v) acetic acid (50 μ l). The substrate hydrolysis was followed by measurement of absorbance at 405 nm (Oliva et al., 2000).

3. Results

Table 1 shows the summary of lectin isolation from *M. urundeuva* heartwood. In the first step of lectin isolation approach, proteins of *M. urundeuva* were solubilized with 0.15 M NaCl. From 10 g of powder, 952 mg of proteins were detected by Lowry's method. The next step corresponded to salting-out using ammonium sulphate and the most active fraction 40-60% (40-60F) contained 146 mg of protein.

HA of 40-60F was adsorbed on chitin and was eluted from the column with 1.0 M acetic acid. The lectin (1.3 mg) isolated by chromatography was active with all tested erythrocytes. Specific HA detected were: rabbit (2,560), human A (1,280), B (2,560), and AB (2,560) erythrocytes. When the HA of lectin in the presence of N-acetylglucosamine was determined, the specific HA for rabbit erythrocytes was 49.7.

A sample of isolated lectin was submitted to TLC to evaluate the presence of non-protein contaminants. The chromatograms revealed a total absence of flavanoids, condensed proanthocyanidins, leucoanthocyanidins, alkalis, polyphenols, coumarins, cinamic derivatives, hydrolysable tannins, saponins, steroids, iridoids, and terpenes (monoterpenes, sesquiterpenes, diterpenes and triterpenes).

Resistance of lectin to proteolytic degradation was evaluated by determination of HA after incubation of lectin with bovine trypsin. The same titer (32^{-1}) was detected with lectin incubated or not with the enzyme. HA was not affected by heating to 100 °C (titer of 32^{-1}). The enzyme activity assay showed that active enzyme (A405 nm=0.175) was not able to hydrolyze the substrate after heating (A405 nm= 0.046).

Termiticidal activity of lectin on *N. corniger* (Fig. 1) was evaluated. Contact with lectin in all concentrations induced mortality of termites. For workers (Fig. 1A), treatments with the highest lectin concentrations (0.4 and 0.8 mg ml⁻¹) induced death of all insects after 8 days, while 0.1 and 0.2 mg ml⁻¹ concentrations promoted 100% of mortality after 10 and 9 days, respectively. The relation between lectin concentration and termiticidal effect was also detected when the survival rate was observed day to day. The 0.4 and 0.8 mg ml⁻¹ concentrations promoted a survival rate of 50% at the second day, while with 0.2 and 0.1 mg ml⁻¹ did so at the 2 and 3 days, respectively. In negative control 100% of mortality was detected only after 18 days and survival lower than 50% was observed after 13 days. Statistical analysis using Student's t-test ($p<0.05$) showed that effects of 0.4 and 0.2 mg ml⁻¹ on workers were not significantly different after the sixth day. LC₅₀ of 0.248 mg ml⁻¹ was determined after 4 days.

Figure 1B shows lectin's effect on soldiers. The termiticidal activity was higher on soldiers than on workers since 100% of mortality was observed in less time at all lectin concentrations tested: at 4 (0.8 mg ml⁻¹), 5 (0.4 and 0.2 mg ml⁻¹) and 7 days (0.1 mg ml⁻¹) as well as by determination of LC₅₀ of 0.199 mg ml⁻¹. In the negative control, soldiers showed high resistance in an artificial environment since a survival rate of 50% was determined after 14 days. Statistical analysis using Student's t-test ($p<0.05$) showed that results were significantly different.

In the repellence assay, tunnels were built by *N. corniger* with no relation to the presence of lectin or negative control. No gallery was closed and termites were observed exploring treated and non-treated wells, indicating that lectin does not induce a rejection effect.

4. Discussion

M. urundeuva heartwood characteristics such as durability and resistance to deteriorative biological agents have stimulated its use in Brazilian civil construction. This paper reports the termiticidal activity of a lectin from *M. urundeuva* heartwood. The purification protocol yielded lectin in milligram quantities and with high HA stimulating evaluation of lectin as a bioactive component of heartwood.

Chemical plant defence involves secondary metabolites of low molecular weight as well as lectins. HA of *M. urundeuva* heartwood was inhibited by N-acetylglucosamine monosaccharide. Linkage of monosaccharide or glycoprotein to lectin carbohydrate binding sites avoids binding of lectin to cell surface glycoconjugates and HA is not detected (Kennedy et al., 1995). Lectin activity was adsorbed on chitin matrix. Plant lectins with N-acetyl-glucosamine specificity and chitin binding property mainly act by interaction with peritrophic membranes of insects. They show toxic effect on Coleoptera (Murdock et al., 1990; Zhu-Salzman et al., 1998), Homoptera (Powell et al., 1995), Hemiptera (Habibi et al., 1998) and Lepidoptera (Czapla and Lang, 1990).

Termites consume many types of food, for example humus and cellulosic materials such as paper and wood. The evaluation of *M. urundeuva*'s lectin effect on *N. corniger* was performed using filter paper soaked with the protein. The assay revealed a termiticidal effect of lectin and yielded different LC₅₀ values for soldier and worker castes. Insecticide action on the *Coptotermes formosanus* termite was detected for plant constituents. Oils isolated from leaves of *Calocedrus formosana* and from *Calocedrus macrolepis* heartwood showed anti-termite activity with LC₅₀ of 27.6 mg g⁻¹ and 1.7 mg g⁻¹, respectively (Cheng et al., 2004; Cheng et al., 2007). This is the first report of the action of lectin on termite. The insecticidal effect of plant lectins generally is evaluated by bioassays that include the lectin in artificial diets offered to insects and it has been suggested that the toxic action of lectins is related to their binding to glycoproteins present in the digestive tract of insects (Macedo et al., 2007). The lectins from *Talisia esculenta* and *Galanthus nivalis* showed insecticidal effect on *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera) and three aphid predators – *Chrysoperla carnea* (Neuroptera), *Adalia bipunctata*, and *Coccinella septempunctata* (Lepidoptera) – respectively, when the insects were fed with seeds (*T. esculenta*) or a sucrose solution (*G. nivalis*) containing these lectins at 1% (w/w) concentration (Macedo et al., 2002; Hogervorst et al., 2006).

M. urundeuva heartwood lectin was active after incubation with bovine trypsin. The detection of HA after contact with a protease found in similar forms in the digestive system of insects (Coelho et al., 2007) may indicate that the termiticidal effect of heartwood may be due to the presence of active lectin. The insecticide lectin from *Bauhinia monandra* was resistant to digestion by trypsin (Macedo et al., 2007) and it has been suggested that entomotoxic lectins resistant to proteolytic degradation in the insect gut may interfere with the digestive and nutrient absorption processes (Zhu-Salzman et al., 1998; Zhu-Salzman and Salzman, 2001; Macedo et al., 2004; Macedo et al., 2007).

Aiming to investigate if lectin's effect on termites was due to repellent action, assay in agarose gel evaluated the building of tunnels and closing of galleries by insects. Tunneling termites can react to the presence of possibly toxic substances by closing galleries to avoid contact with these substances (Su et al., 1982). The lectin of *M. urundeuva* showed no repellent property suggesting that the anti-termite activity was due to its toxicity.

The lectin preparation that was tested was free of alkalis, saponins, polyphenolic substances, and terpenoid compounds, plant secondary metabolites that can promote insect mortality (Cavalcante et al., 2006). This result corroborates the important role of the lectin described in the resistance of *M. urundeuva* heartwood to termites.

Due to intense exploitation, *M. urundeuva* is cited in the Brazilian Threatened Flora Red List of IUCN (The World Conservation Union). The danger of extinction is one of the stimuli for a chemical evaluation of *M. urundeuva* chemical properties. The effect of *M. urundeuva* lectin on *N. corniger* survival suggests the possibility of participation of this bioactive peptide in the resistance of *M. urundeuva* heartwood to termites. The investigation of termiticidal activity is a positive step in the search for new natural insecticidal agents. Genes coding for entomotoxic lectins have been introduced, rendering transgenic plants less susceptible to the insect attack (Schuler et al., 1998; Hilder & Boulter, 1999). The elucidation of the mechanism of action of the lectin, including the possible resistance to degradation by enzymes of the termite digestive system, is in progress.

Acknowledgements

The authors express their gratitude to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for research grants. They are also deeply grateful to Maria Barbosa Reis da Silva (for technical assistance), Msc. Gonçalo Mendes da Conceição (for identification of the botanical material), and Dr. Luiz Roberto Fontes (for termite species identification).

References

- Arihara, S., Umeyama, A., Bando, S., Kobuke, S., Imoto, S., Ono, M., Yoshikawa, K., Amita, K., Hashimoto, S., 2004. Termiticidal constituents of the black-heartwood of *Cryptomeria japonica*. *Mokuzai Gakkaishi* 50, 413–421.
- Bing, D.H., Weyand, J.G., Stavinsky, A.B., 1967. Hemagglutination with aldehyde-fixed erythrocytes for assay of antigens and antibodies. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 124, 1166–1170.
- Breznak, J.A., 1982. Intestinal microbiota of termites and other xylophagous insects. *Annual Review of Microbiology* 36, 323–343.
- Carlini, C.R., Grossi-de-Sá, M.F., 2002. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon* 40, 1515–1539.
- Cavalcante, G.M., Moreira, A.F.C., Vasconcelos, S.D., 2006. Potencialidade inseticida de extratos aquosos de essências florestais sobre mosca-branca. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 41, 9–14.
- Chang, S., Wang, S., Cheng, S., 2000. Environmental effects on the color of sugi (*Cryptomeria japonica* D. Don) heartwood. *Journal of Wood Science* 46, 390–394.
- Cheng, S., Chang, H., Wu, C., Chang, S., 2007. Anti-termite activities of essential oils from coniferous trees against *Coptotermes formosanus*. *Bioresource Technology* 98, 456–459.
- Cheng, S., Wu, C., Chang, H., Kao, Y., Chang, S., 2004. Antitermitic and antifungal activities of essential oil of *Calocedrus formosana* leaf and its composition. *Journal of Chemical Ecology* 30, 1957–1967.

- Chen, K., Ohmura, W., Doi, S., Aoyama, M., 2004. Termite feeding deterrent from Japanese larch wood. *Bioresource Technology* 95, 129-134.
- Chrispeels, M.J., Raikhel, N.V., 1991. Lectins, lectin genes and their role in plant defense. *Plant Cell* 3, 1-9.
- Coelho, M.B., Marangoni, S., Macedo, M.L.R., 2007. Insecticidal action of *Annona coriacea* lectin against the flour moth *Anagasta kuehniella* and the rice moth *Corcyra cephalonica* (Lepidoptera: Pyralidae). *Comparative Biochemistry and Physiology C* 146, 406-414.
- Czapla, T.H., Lang, B.A., 1990. Effect of plant lectins on the larval development of european corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) and southern corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Economic Entomology* 83, 2480-2485.
- Deka, M., Saikia, C.N., Baruah, K.K., 2002. Studies on thermal degradation and termite resistant properties of chemically modified wood. *Bioresource Technology* 84, 151-157.
- Dharmagadda, V.S.S., Naik, S.N., Mittal, P.K., Vasudevan, P., 2005. Larvicidal activity of *Tagetes patula* essential oil against three mosquito species. *Bioresource Technology* 96, 1235-1240.
- Edwards, R., Mill, A.E., 1986. *Termites in buildings: their biology and control*. Rentokil, London.
- Gatehouse, A.M.R., Powell, K.S., Van Damme, E.J.M., Peuman, W.J., Gatehouse, J.A., 1995. Insecticidal properties of plant lectins: their potential in plant protection. In: Pustzai, A., Bardocz, S., (Eds.), *Lectins: Biomedical Perspectives*, Taylor and Francis, London, pp. 35-58.
- Habibi, J., Backus, E.A., Czapla, T.H., 1998. Subcellular effects and localization of binding sites of phytohemagglutinin in the potato leafhopper, *Empoasca fabae* (Insecta: Homoptera: Cicadellidae). *Cell and Tissue Research* 294, 561-571.
- Harbone, J.B., 1991. *Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis*. Chapman & Hall, London.
- Hilder, V.A., Boulter, D., 1999. Genetic engineering of crop plants for insect resistance - a critical review. *Crop Protection* 18, 177-191.
- Hogervorst, P.A.M., Ferry, N., Gatehouse, A.M.R., Wäckers, F.L., Romeis, J., 2006. Direct effects of snowdrop lectin (GNA) on larvae of three aphid predators and fate of GNA after ingestion. *Journal of Insect Physiology* 52, 614-624.
- Hojo, M., Morioka, M., Matsumoto, T., Miura, T., 2005. Identification of soldier-caste specific protein in the frontal gland of nasute termite *Nasutitermes takasagoensis* (Isoptera: Termitidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35, 347-354.
- Hunt, G.M., Garratt, G.A., 1967. *Wood preservation*. Mc Graw Hill, New York.
- Jacobson, M., 1989. Botanical pesticides: past, present and future. In: Arnason, J.T., Philogene, B.J.R., Morand, P., (Eds.), *Insecticides of plant origin*, American Chemical Society, Washington, pp.110-119.
- Kakade, M.L., Rackis, J.J., Mcghee, J.G., 1969. An evaluation of natural vs synthetic substrates for measuring the anti tryptic activity of soy bean samples. *Cereal Chemistry* 46, 518-526.
- Kambhampati, S., Eggleton, P., 2000. Taxonomy and phylogeny of termites. In: Abe, T., Bignell, D.E., Higashi, M., (Eds.), *Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 1-23.
- Kang, H.Y., Matsushima, N., Sameshima, K., Takamura, N., 1990. Termite resistance tests of hardwoods of Kochi growth. The strong termiticidal activity of kagonoki (*Litsea coreana* L'everill'e). *Mokuzai Gakkaishi* 36, 78-84.

- Kaur, M., Singh, K., Rup, P.J., Saxena, A.K., Khan, R.H., Ashraf, M.T., Kamboj, S.S., Singh, J., 2006. A tuber lectin from *Arisaema helleborifolium* Schott with anti-insect activity against melon fruit fly, *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) and anti-cancer effect on human cancer cell. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 445, 156-165.
- Kennedy, J.F., Paiva, P.M.G., Correia, M.T.S., Cavalcanti, M.S.M., Coelho, L.C.B.B., 1995. Lectins: versatile proteins of recognition. *Carbohydrate Polymers* 26, 219-230.
- Leite, Y.F.M.M., Silva, L.M.C.M., Amorim, R.C.N., Freire, E.A., Jorge, D.M.M., Grangeiro, T.B., Benevides, N.M.B., 2005. Purification of a lectin from the marine red alga *Gracilaria ornata* and its effect on the development of the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Biochimica et Biophysica Acta* 1724, 137-145.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265-275.
- Macedo, M.L.R., Freire, M.G.M., Novello, J.C., Marangoni, S., 2002. *Talisia esculenta* lectin and larval development of *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Biochimica et Biophysica Acta* 1571, 83-88.
- Macedo, M.L.R., Freire, M.G.M., Castro, M.M., 2004. Mechanisms of the insecticidal action of TEL (*Talisia esculenta* lectin) against *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 56, 84-96.
- Macedo, M.L.R., Freire, M.G.M., Silva, M.B.R., Coelho, L.C.B.B., 2007. Insecticidal action of Bauhinia monandra leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Comparative Biochemistry and Physiology A* 146, 486-498.
- Mainieri, C., Chimelo, J.P., 1989. Fichas de características de madeiras brasileiras. IPT, São Paulo.
- Markhan, K.R., 1982. Techniques of flavonoid identification. Academic Press, London.
- Murdock, L.L., Huesing, J.E., Nielsen, S.S., Pratt, R.C., Shade, R.E., 1990. Biological effects of plant lectins on the cowpea weevil. *Phytochemistry* 29, 85-89.
- Neu, R.A., 1956. A new reagent for differentiating and determining flavones on paper chromatograms. *Naturwissenschaften* 43, 82.
- Oliva, M.L.V., Souza-Pinto, J.C., Batista, I.F.C., Araújo, M.S., Silveira, V.F., Auerswald, E.A., Mentele, R., Eckerskorn, C., Sampaio, U.M., Sampaio, C.A.M., 2000. *Leucaena leucocephala* serine proteinase inhibitor: primary structure and action on blood coagulation, kinin release and rat paw edema. *Biochimica et Biophysica Acta* 7, 64-74.
- Paes, J.B., Morais, V.M., Lima, C.R., 2002. Resistência das madeiras de aroeira (*Myracrodruon urundeuva*), cássia (*Senna siamea*) e ipê (*Tabebuia impetiginosa*) a fungos e cupins xilófagos em condições de laboratório. *Floresta e Ambiente* 9, 135-144.
- Paiva, P.M.G., Coelho, L.C.B.B., 1992. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (camaratu bean). *Applied Biochemistry and Biotechnology* 36, 113-118.
- Peumans, W.J., Van Damme, E.J.M., 1995. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiology* 109, 347-352.
- Powell, K.S., Gatehouse, A.M.R., Hilder, V.A., Gatehouse, J.A., 1995. Antifeedant effects of plant-lectins and an enzyme on the adult stage of the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 75, 51-59.

- Robertson, E.H., Cartwright, R.A., Wood, D.J., 1957. The flavones of tea. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 7, 637-646.
- Sadeghi, A., Van Damme, E.J.M., Peumans, W.J., Smagghe, G., 2006. Deterrent activity of plant lectins on cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (F.) oviposition. *Phytochemistry* 67, 2078-2084.
- Saha, P., Majumder, P., Dutta, I., Ray, T., Roy, S.C., Das, S., 2006. Transgenic rice expressing *Allium sativum* leaf lectin with enhanced resistance against sap-sucking insect pests. *Planta* 223, 1329-1343.
- Santos, A.F.S., Argolo, A.C.C., Coelho, L.C.B.B., Paiva, P.M.G., 2005. Detection of water soluble lectin and antioxidant component from *Moringa oleifera* seeds. *Water Research* 39, 975-980.
- Sauvion, N., Nardonb, G., Febvay, G., Gatehouse, A.M.R., Rahbé, Y., 2004. Binding of the insecticidal lectin Concanavalin A in pea aphid *Acyrtosiphon pisum* (Harris) and induced effects on the structure of midgut epithelial cells. *Journal of Insect Physiology* 50, 1137-1150.
- Scheffrahn, R.H., Cabrera, B.J., Kern Jr, W.J., Su, N.Y., 2002. *Nasutitermes costalis* (Isoptera: Termitidae) in Florida: first record of a non-endemic establishment by a higher termite. *Florida Entomologist* 85, 273-275.
- Scheffrahn, R.H., Krecek, J., Szalanski, A.L., Austin, J.W., 2005. Synonymy of Neotropical Arboreal Termites *Nasutitermes corniger* and *N. costalis* (Isoptera: Termitidae: Nasutitermitinae), with Evidence from Morphology, Genetics, and Biogeography. *Annals of the Entomological Society of America* 98, 273-281.
- Schuler, T.H., Poppy, G.M., Kerry, B.R., Denholm I., 1998. Insect resistant transgenic plants. *Trends in Biotechnology* 16, 168-175.
- Stiasny, E., 1912. The qualitative detection and differentiation of vegetable tannins, Collegium, Haltingen.
- Su, N., Tamashiro, M., Yates, J.R., Haverty, M.I., 1982. Effects of behavior in the evaluation of insecticides for prevention of or remedial control of the Formosan subterranean termite. *Journal of Economical Entomology* 75, 188-193.
- Vasconcellos, A., Mélo, A.C.S., Segundo, E.M.V., Bandeira, A.G., 2005. Cupins de duas florestas de restinga do nordeste brasileiro. *Iheringia, Série Zoologia* 95, 127-131.
- Wagner, H., Bladt, S., 1996. *Plant drug analysis* (2nd edn). Springer, New York.
- Zhu-Salzman, K., Shade, R.E., Koiwa, H., Salzman, R.A., Narasimhan, M., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., Murdock, L.L., 1998. Carbohydrate binding and resistance to proteolysis control insecticidal activity of *Griffonia simplicifolia* lectin II (GSII). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 15123-15128.
- Zhu-Salzman, K., Salzman, R.A., 2001. Functional mechanics of the plant defensive *Griffonia simplicifolia* lectin II: resistance to proteolysis is independent of glycoconjugate binding in the insect gut. *Journal of Economic Entomology* 94, 1280-1284.

Table 1. Summary of lectin isolation from *M. urundeuva* heartwood

Sample	Total protein (mg)	HA (titer ⁻¹)	SHA	Purification (times)
Extract	952	32,768	2,409	1.0
40-60F	146	32,768	3,181	1.3
Lectin	9.3	1,024	2,560	1.1

Hemagglutinating activity (HA) titre was defined as the lowest lectin concentration able to produce visible hemagglutination. SHA (specific HA) was calculated from the ratio of titer to protein concentration (mg/ml). Purification was measured as the ratio between the SHA in the stage and SHA of extract.

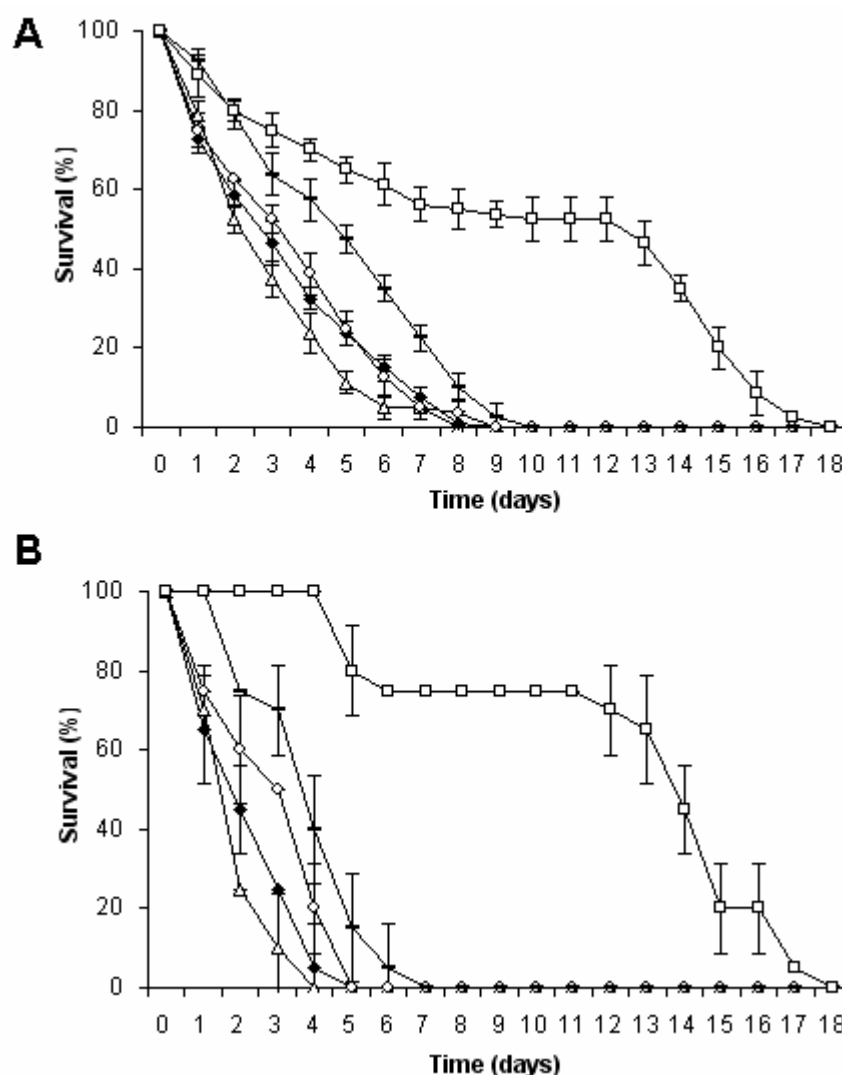


Figure 1. Effect of contact with *M. urundeuva* heartwood lectin on *N. corniger* workers (A) and soldiers (B). Treatments were lectin at concentration of 0.1 (—), 0.2 (○), 0.4 (●) and 0.8 mg ml⁻¹ (△). 0.15 M NaCl was used as negative control (□). Each point represents the mean ± S.D. of five experiments.