

MICHELE DALVINA CORREIA DA SILVA

APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DAS LECTINAS

ClaveLL (*Cladonia verticillaris* LICHEN LECTIN) E BmoLL

(*Bauhinia monandra* LEAF LECTIN)

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

MICHELE DALVINA CORREIA DA SILVA

APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DAS LECTINAS ClaveLL
(*Cladonia verticillaris* LICHEN LECTIN) E BmoLL (*Bauhinia monandra*
LEAF LECTIN)

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

Co-orientadores: Prof^a. Maria Tereza dos Santos Correia, M.C., Dr.

Prof. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão, M.C., Dr.

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

APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DAS LECTINAS ClaveLL
(*Cladonia verticillaris* LICHEN LECTIN) E BmoLL (*Bauhinia monandra*
LEAF LECTIN)

**Tese de Doutorado apresentada para o cumprimento
parcial das exigências para a obtenção do título de Doutor
em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de
Pernambuco.**

Silva, Michele Dalvina Correia da

Aplicações biotecnológicas das lectinas ClaveLL (*Cladonia verticillaris* Lichen Lectin) E BmoLL (*Bauhinia monandra* Leaf Lectin). / Michele Dalvina Correia da Silva. – Recife: A Autora, 2008.

211 fls. .: il.

Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – UFPE. CCB

1. Lectina 2. *Cladonia verticillaris* 3. *Bauhinia monandra* 4.Histoquímica I Título

577.1

CDU (2ª. Ed.)

UFPE

572.

CDD (22ª. Ed.)

CCB – 2008 – 171

MICHELE DALVINA CORREIA DA SILVA

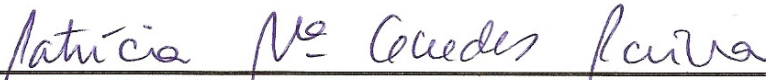
APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DAS LECTINAS ClaveLL
(*Cladonia verticillaris* LICHEN LECTIN) E BmoLL (*Bauhinia monandra*
LEAF LECTIN)

BANCA EXAMINADORA:

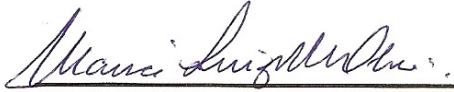
TITULARES


Prof.^a Dr.^a Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho - (Orientadora/UFPE)


Prof.^a Dr.^a Vera Lúcia de Menezes Lima - (UFPE)

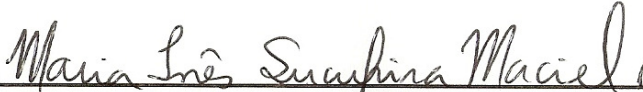

Prof.^a Dr.^a Patrícia Maria Guedes Paiva - (UFPE)


Prof.^a Dr.^a Rita de Cássia Moura do Nascimento - (UPE)


Prof.^a Dr.^a Maria Luiza Vilela Oliva - (UNIFESP)

SUPLENTES


Prof.^a Dr.^a Maria Tereza dos Santos Correia - (UFPE)


Prof.^a Dr.^a Maria Inês Sucupira Maciel - (UFRPE)

Aos meus pais, Arnaldo e Maria das Graças, por tudo o que sou hoje, dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela vida maravilhosa que ele me concede todos os dias e pelas pessoas lindas que fazem parte dela!

À minha família, meus pais, meus irmãos Helen, Arnaldo e meu sobrinho Allan, por estarem sempre presentes em minha vida, pelo verdadeiro sentimento de amor que existe em nosso lar, pela dedicação e compreensão que podemos exercer uns com os outros, pelo constante apoio e força que me dão em todas as minhas decisões na vida e em tudo o que eu faço, obrigada.

À professora Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho, como pessoa, professora e orientadora, por muitos anos de constante orientação científica aliada à confiança e ótima convivência, que me renderam aprendizado e oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

À professora Dra. Maria Tereza dos Santos Correia, pelos muitos anos de orientação, incentivo e apoio constantes.

Aos amigos do Laboratório de Glicoproteínas, pela amizade verdadeira que construímos juntos, apoio, estímulo e ajuda presentes desde sempre. Em especial, agradeço à Amanda, Mariana Cristina, Roberto, Thiago, Francis, Nathaly, Fernando, Neila e Flávia por estarem presentes e disponíveis quando preciso, contribuindo muito para a realização dos trabalhos.

Aos amigos Flávio Veras e Carla Melo pela colaboração, de forma direta ou indireta, pela companhia e momentos de descontração e pelas ótimas amizades que eles representam para mim.

Aos professores Dr. Haroudo Xavier, Dr. Roberto Mello, Dr. Eduardo Beltrão, Dra. Norma Gusmão, Dra. Patrícia Paiva e Dra. Auristela Albuquerque pela oportunidade de

colaboração, pelos valiosos ensinamentos e também pela convivência agradável e simplicidade como pessoas.

Aos amigos do Departamento de Bioquímica Maria Reis, João Virgínio, Neide, Miron, Djalma, Helena, Ademar e Jorge, pela amizade e auxílio em todas as horas que preciso.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, pela aprovação do meu ingresso como aluna e pela oportunidade.

À Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, por me acolher de forma tão especial desde a minha graduação até então, sendo há muito a minha segunda casa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, também ao CNPq e à FACEPE pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABELAS	XII
LISTA DE ABREVIATURAS	XIII
RESUMO	XVII
ABSTRACT	XVIII
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 LECTINAS	3
1.1.1 Histórico e Denominação	3
1.1.2 Distribuição	5
1.1.3 Detecção e Especificidade	8
1.1.4 Características Estruturais	11
1.1.5 Classificação	13
1.1.6 Papéis Fisiológicos	16
1.1.7 Lectinas e Evolução	21
1.1.8 Propriedades Biológicas e Aplicações	22
1.1.9 Purificação	26
1.1.10 Caracterização	30
1.2 OS LIQUENS	33
1.2.1 Constituição e Denominação	33
1.2.2 O Gênero <i>Cladonia</i> e a Espécie <i>Cladonia verticillaris</i>	35
1.2.3 Lectinas de Líquens	36
1.3 AS LEGUMINOSAS	38
1.3.1 Generalidades	38
1.3.2 O Gênero <i>Bauhinia</i> e a Espécie <i>Bauhinia monandra</i>	38

1.3.3 A Lectina de <i>Bauhinia monandra</i>	40
1.4 PROTEÍNAS ANTIMICROBIANAS	41
1.4.1 Distribuição nos Seres Vivos e nas Classes de Proteínas	41
1.4.2 Lectinas com Ação Antimicrobiana contra <i>Fusarium</i> ou Bactérias	43
1.5 OS VEGETAIS E SUAS DEFESAS NATURAIS	45
1.5.1 Defesa Vegetal contra Microrganismos e Animais	45
1.5.2 Lectinas com Ação Inseticida	45
1.5.3 Mecanismos de Ação Inseticida das Lectinas	48
1.5.4 A Biotecnologia e os Inseticidas Naturais	49
1.6 OS CUPINS	50
1.6.1 Classificação dos <i>Nasutitermes</i>	50
1.6.2 Aspectos Gerais e Importância Econômica e Ambiental	50
1.7 DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS	52
1.7.1 A Doença de Alzheimer: Aspectos Clínicos e Histopatológicos	53
1.7.2 Origem dos Fatores Neuropatológicos da Doença de Alzheimer	55
1.7.3 Lectinas como Marcadores em Patologia Forense	57
2 JUSTIFICATIVA	61
3 OBJETIVOS	64
3.1 Objetivo Geral	65
3.2 Objetivos Específicos	65
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
5 ARTIGOS	109
Artigo 1: Purification and characterization of <i>Cladonia verticillaris</i> lichen lectin with antimicrobial activity	110
Artigo 2: Purified <i>Cladonia verticillaris</i> lichen lectin: insecticidal activity on <i>Nasutitermes corniger</i> (Isoptera: Termitidae)	143

Artigo 3: Antimicrobial and insecticidal activities on <i>Nasutitermes corniger</i> (Isoptera: Termitidae) of <i>Bauhinia monandra</i> leaf lectin	168
Artigo 4: Histochemistry of hippocampus from Alzheimer's disease patients with <i>Cladonia verticillaris</i> lichen lectin and <i>Bauhinia monandra</i> leaf lectin	189
6 CONCLUSÕES	209

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1 – Ensaio de Hemaglutinação para detecção de lectinas.	9
Figura 2 – Ensaio de Inibição da Hemaglutinação lectínica.	10
Figura 3 – Estrutura de lectinas vegetais com base em seus domínios funcionais.	15
Figura 4 – Espécie <i>Cladonia verticillaris</i> .	35
Figura 5 – Espécie <i>Bauhinia monandra</i> .	40
Figura 6 – Bioensaio para avaliação inseticida e repelente de amostras protéicas.	47
Figura 7 – Espécie <i>Nasutitermes corniger</i> .	50

ARTIGOS

Artigo 1: Purification and characterization of *Cladonia verticillaris* lichen lectin with antimicrobial activity

Figure 1 – Chromatographies of ClaveLL purification and characterization.	139
Figure 2 – Effect of temperature, ions and pH on ClaveLL HA.	140
Figure 3 – Interaction of F ₁ and ClaveLL with Cramoll 1,4 on radial diffusion and chromatography, and electrophoretic profile of ClaveLL.	141
Figure 4 – Growth inhibition of <i>Fusarium sp.</i> in presence of ClaveLL and Cercobin.	142

Artigo 2: Purified *Cladonia verticillaris* lichen lectin: insecticidal activity on *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae)

Figure 1 – Survival percentile of <i>N. corniger</i> in presence of E and F ₁ .	166
Figure 2 – Survival percentile of <i>N. corniger</i> in presence of ClaveLL.	167

Artigo 3: Antimicrobial and insecticidal activities on *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae) of *Bauhinia monandra* leaf lectin

Figure 1 - Growth inhibition of <i>Fusarium sp.</i> in presence of BmoLL and Cercobin.	187
Figure 2 - Survival percentile of <i>N. corniger</i> in presence of BmoLL.	188

Artigo 4: Histochemistry of hippocampus from Alzheimer's disease patients with

Cladonia verticillaris lichen lectin and *Bauhinia monandra* leaf lectin

Figure 1 – Histochemistry of hippocampus with Alzheimer's disease using ClaveLL. **207**

Figure 2 – Histochemistry of hippocampus with Alzheimer's disease using BmoLL. **208**

LISTA DE TABELAS

ARTIGOS

Artigo 1: Purification and characterization of *Cladonia verticillaris* lichen lectin with antimicrobial activity

Table 1 – Purification of ClaveLL. **136**

Table 2 – Proteins or peptides with antifungal activity against *Fusarium* species. **137**

Table 3 – Antibacterial and agglutinating activities of ClaveLL. **138**

Artigo 3: Antimicrobial and insecticidal activities on *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae) of *Bauhinia monandra* leaf lectin

Table 1 – Antibacterial and agglutinating activities of BmoLL. **186**

LISTA DE ABREVIATURAS

A β 1–40, **A β 1–42**, **A β** : peptídeo β -amilóide, do inglês “ β -amyloid peptide”

AD: Alzheimer’s disease

AH: atividade hemaglutinante

APP: proteína precursora do β -amilóide, do inglês “ β -amyloid precursor protein”

ATD: Alzheimer-type dementia

BmoLL: lectina de folha de *Bauhinia monandra*, do inglês “*Bauhinia monandra* leaf lectin”

BmoLL-HRP: BmoLL conjugate to HRP

BSA-1B4: *Bandeiraea simplicifolia* agglutinin

CFU: colony forming units

ClaveLL: lectina do líquen *Cladonia verticillaris*, do inglês “*Cladonia verticillaris* lichen lectin”

ClaveLL-HRP: ClaveLL conjugate to HRP

CML: *Cordyceps militaris* lectin

CM-celulose: carboximetilcelulose

Con A: *Canavalia ensiformes* agglutinin

CRD: carbohydrate recognition domain

CTLR: C-type lectin receptors

DA: doença de Alzheimer

DAB: diaminobenzidine

DBA: *Dolichos biflorus* agglutinin

DEAE-celulose: dietilaminoetilcelulose

DS: Down’s syndrome

E: crude extract

ECA: *Erythrina cristagalli* agglutinin

ED₅₀: decrease of 50% weight

e-PHA: erythroagglutinating phytohemagglutinin from *Phaseolus vulgaris*

F₁: protein fraction precipitate (0-30 %)

FPLC: fast protein liquid chromatography

Gal-GalNAc: Galactose-N-Acetil-Galactosamina

Gal-GlcNAc: Galactose-N-Acetil-Glicosamina

GalNAc: N-Acetil-Galactosamina

GlcNAc: N-Acetil-Glicosamina

GNA: *Galanthus nivalis* agglutinin

GOL: *Gracilaria ornata* lectin

GSA-IB4: *Griffonia simplicifolia* iso agglutinin B4

GSI: *Griffonia simplicifolia* agglutinin

GS-I: *Griffonia simplicifolia* I lectin

HA: haemagglutinating activity

HeLa: linhagem de células cancerosas da doadora involuntária, Henrietta Lacks

Hep G2: linhagem de células humanas de hepatoma

HIV: human immunodeficiency virus

HPLC-RP: cromatografia líquida de alta performance em fase reversa

HRP: horseradish peroxidase

L1210: linhagem de células humanas de leucemia

LCL: *Lens culinaris* lectin

LC₅₀: lethal dose to kill 50% of insects

LD₅₀: lethal dose to kill 50% of insects

I-PHA: *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinating lectin

MAC: minimum agglutinating lectin concentration

MBV: cerebral microvessels

Molt4: linhagem de células humanas derivada de células T de leucemia

M1: linhagem de células humanas de leucemia

NFT: emaranhados neurofibrilares, do inglês “neurofibrillary tangles”

PAA: *Pisum arvense* agglutinin

PBS: 0.15 M sodium phosphate buffer, pH 7, containing 0.15 M NaCl

PHA: *Phaseolus vulgaris* agglutinin

PNA: *Arachis hypogaea* agglutinin

PSA: *Pisum sativum* agglutinin

RIP: ribosome-inactivating protein

RP-HPLC: reversed-phase high performance liquid chromatography

SD: síndrome de Down

S.D.: standard deviation

SDS-PAGE: polyacrylamide gel electrophoresis containing sodium dodecyl sulphate

SFI1: *Segestria florentina* toxin 1

SFI1/GNA: fusão da lectina GNA à neurotoxina SFI1

SHA: specific HA

SSAP: L-amino acid oxidase from the skin mucus of rockfish *Sebastes schlegelii*

SUCEN: Superintendência de Controle de Endemias

TEL: *Talisia esculenta* lectin

TFA: acid trifluoroacetic

THA: total HA

UEA-I: *Ulex europaeus* isolectin I

WGA: Wheat Germ Agglutinin

XCL: *Xerocomus chrysenteron* lectin

YNB: yeast nitrogen base

RESUMO

Lectinas são proteínas presentes em diferentes organismos, dos quais são isoladas; possuem origem não imune e habilidade para se ligarem a carboidratos ou glicoconjugados, através de sítios específicos; forças de interação eletrostática e a presença de íons metálicos podem influenciar o processo de ligação. Neste trabalho, foram avaliadas a lectina de folhas de *Bauhinia monandra*, BmoLL, e a lectina do líquen *Cladonia verticillaris*, ClaveLL. A investigação e conseqüente emprego biotecnológico de lectinas como proteínas com ação antimicrobiana e inseticida, bem como sua utilidade em histoquímica no estudo e diagnóstico de patologias, estimularam a realização desta Tese. As lectinas foram avaliadas quanto a potencial ação contra bactérias e espécies fúngicas do gênero *Fusarium*, como proteínas inseticidas para a espécie de cupins *Nasutitermes corniger*, e também como ferramentas histoquímicas para a investigação histopatológica dos hipocampus de pacientes com doença de Alzheimer. BmoLL e ClaveLL são ativas contra diferentes espécies de *Fusarium* (*F. solani*, *F. lateritium*, *F. fusarioides*, *F. moniliforme* e *F. verticiloides* com BmoLL; e *Fusarium verticiloides*, *F. descemcellulare*, *F. fusarioides*, *F. oxysporum* e *F. moniliforme* com ClaveLL) e são hábeis em aglutinar, como também inibir a proliferação de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. BmoLL e ClaveLL possuem ação não repelente e inseticida contra *N. corniger*. Em histoquímica de hipocampo, BmoLL (galactose-específica) reconhece o citoplasma neuronal e marca intensamente corpos amiláceos que ocorrem em abundância; ClaveLL (com elevada afinidade por N-acetil-D-glicosamina e glicoproteínas) reconhece intensamente células neuronais e corpos amiláceos e, mais importante, marca neurônios lesionados com emaranhados neurofibrilares ou com degeneração grânulo-vacuolar, degenerações que são típicas da doença de Alzheimer.

Palavras chave: lectina, *Cladonia verticillaris*, *Bauhinia monandra*, ação antimicrobiana, ação inseticida, *Nasutitermes corniger*, histoquímica com lectina, doença de Alzheimer.

ABSTRACT

Lectins are proteins present in different organisms from which are isolated; they have no immune origin and have ability to bind carbohydrates or glycoconjugates through specific sites; electrostatic interaction forces and the presence of metallic ions can influence the binding process. In this work, *Bauhinia monandra* leaf lectin, BmoLL, and *Cladonia verticillaris* lichen lectin, ClaveLL, were evaluated. The investigation and consequent biotechnological lectin utilization as proteins with antimicrobial and insecticide actions as well as its application in histochemistry for pathology studies and diagnosis stimulated the accomplishment of this Thesis. Lectins were evaluated regarding potential action against bacteria and different fungal *Fusarium* species, as insecticide proteins to termite species *Nasutitermes corniger* and also as histochemical tools for the histopathological investigation of hippocampus of patients with Alzheimer's disease. BmoLL and ClaveLL are active against different *Fusarium* species (*F. solani*, *F. lateritium*, *F. fusarioides*, *F. moniliforme* and *F. verticiloides* with BmoLL; and *Fusarium verticiloides*, *F. descemcellulare*, *F. fusarioides*, *F. oxysporum* and *F. moniliforme* with ClaveLL) and are able to agglutinate as well as to inhibit the proliferation of Gram-positive and Gram-negative bacteria. BmoLL and ClaveLL have not repellent and insecticide actions against *N. corniger*. In histochemistry of hippocampus, BmoLL (specific to galactose) recognizes the neuron cytoplasm and label intensely corpora amylacea that occur in abundance; ClaveLL (with elevated affinity for N-acetyl-D-glucosamine and glycoproteins) intensely recognizes neuron cells and corpora amylacea and, more important, stain neurons with neurofibrillary tangles or with granulo-vacuolar degeneration, degeneration lesions that are typical of Alzheimer's disease.

Key words: lectin, *Cladonia verticillaris*, *Bauhinia monandra*, antimicrobial action, insecticidal action, *Nasutitermes corniger*, lectin histochemistry, Alzheimer's disease.

1 INTRODUÇÃO

O universo celular, estrutura básica necessária para a existência da vida em toda a sua diversidade, é constituído por uma infinidade de moléculas diferenciadas umas das outras, tais como lipídeos, proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos, peptídeos, glicoproteínas, proteoglicanos, glicolipídeos, lipoproteínas. Cada uma delas tem seu papel funcional muito bem pré-definido geneticamente, antes mesmo que elas venham a ser construídas por esse mesmo universo celular, a partir do funcionamento de organelas envolvidas em sua construção. Na célula tudo é muito bem controlado, como numa imensa fábrica onde não são admitidos erros de produção. Dentre os quatro grandes grupos das mais variadas macromoléculas, encontram-se as proteínas, competindo com os carboidratos como macromoléculas mais abundantes nos organismos.

No início do século XIX, as proteínas eram ainda desconhecidas quanto ao arranjo complexo que podem possuir para a determinação de sua estrutura. William Astbury (1898-1961) foi um dos pioneiros nos estudos de proteínas através da difração por raios-X. Através de suas pesquisas iniciadas em 1928, esclareceu a estrutura de várias proteínas fibrosas como a queratina, demonstrando que tais macromoléculas eram formadas por um arranjo relativamente simples e repetitivo (Astbury; Street, 1932). A partir de então, as proteínas em geral foram consideradas como sendo constituídas sempre por um mesmo padrão simples, com variações deste padrão de uma molécula para outra. As idéias sobre a estrutura das proteínas na época variaram, mas, em geral, os pesquisadores tinham uma mesma visão simplificada destas macromoléculas, estruturalmente falando. Por exemplo, sugeriram que as proteínas fossem arranjos regulares de aminoácidos dispostos em proporções regulares (Bergmann; Niemann, 1937a; Bergmann; Niemann, 1937b), ou que proteínas como a hemoglobina e a insulina, hoje reconhecidas como estruturas protéicas globulares e complexas, fossem formadas por feixes de fibras paralelas.

Foi somente nos anos 50 em que as pesquisas envolvendo a estrutura de proteínas deram a estas moléculas um novo significado. Após muitas investigações, em 1955, Frederick Sanger e colaboradores já haviam determinado a seqüência completa de aminoácidos da insulina, mostrando uma estrutura protéica constituída por aminoácidos arranjados numa seqüência longa e irregular (Sanger, 1959). Sanger apresentou para o mundo uma nova forma de entender as proteínas, como macromoléculas complexas as quais têm seu papel funcional determinado a partir da seqüência de subunidades. Ainda nos anos 50, a estrutura tridimensional das proteínas foi descoberta (Kendrew *et al.*, 1958), sendo reconhecida como responsável por uma complexidade estrutural e por uma especificidade química de ligação a substratos, cuja função protéica depende dessas duas características, as quais são determinadas pela seqüência aminoacídica que as compõem.

Antes mesmo que a estrutura das proteínas fosse razoavelmente estudada e satisfatoriamente compreendida como complexos arranjos aminoacídicos, em 1888 foram descobertas as lectinas, uma classe intrigante de proteínas. Hoje, as lectinas possuem reconhecidamente um leque de possibilidades de funções e propriedades diversas para os organismos vivos e para a biotecnologia, até então não exploradas (Bies *et al.*, 2004).

1.1 LECTINAS

1.1.1 Histórico e Denominação

As lectinas começaram a ser investigadas desde que a primeira destas moléculas foi descoberta por Stillmark em 1888 que, estudando a toxicidade de extratos de mamona (*Ricinus communis*) observou sua capacidade para aglutinar eritrócitos devido à presença de uma proteína extraída, a ricina (Sharon; Lis, 1988). Este fato marcou o início de muitas pesquisas envolvendo essas moléculas. Um ano depois, em 1889, Hellin observou que o extrato tóxico de jequiriti (*Abrus precatorius*) também aglutinava células sanguíneas devido à

presença de uma proteína denominada abrina (Sharon; Lis, 1991). Essas duas lectinas são hoje reconhecidas como pertencentes ao grupo de proteínas inativadoras de ribossomos, denominadas RIPs (Bradberry, 2007; Olsnes, 2004). Essas proteínas, quando presentes em plantas e capazes de aglutinar eritrócitos, foram inicialmente denominadas como fitohemaglutininas, hemaglutininas, fitoaglutininas ou aglutininas de plantas (Sharon; Lis, 1988).

A descoberta de que algumas proteínas encontradas em sementes apresentavam especificidade para aglutinar grupos sanguíneos humanos foi uma informação importante descrita em pesquisas independentes realizadas por Renkonen em 1948 (Sharon, 1989) e por Boyd e Reguera (1949).

Lectina é um termo originado do latim “lectus”, que significa selecionado, escolhido; Boyd e Shapleigh (1954) utilizaram este termo para designar o grupo de proteínas que apresentam a característica comum de seletividade na interação com carboidratos. Este termo foi generalizado por Sharon e Lis (1972), englobando todas as proteínas presentes em fontes de natureza variada, de origem não imunológica, capazes de ligar-se a carboidratos, com especificidade ou não para eritrócitos de um determinado grupo sanguíneo.

Em 1980, as lectinas foram muito bem definidas por Goldstein *et al.* como proteínas ou glicoproteínas de origem não imunológica, que apresentam dois ou mais sítios de ligação capazes de interagir, de forma reversível, com carboidratos, precipitar glicoconjugados e aglutinar células de origem animal ou vegetal.

Em 1981, Dixon sugeriu uma nova definição para estas moléculas como sendo proteínas que possuem pelo menos um sítio de reconhecimento a carboidratos, desta maneira incluindo as demais proteínas semelhantes às lectinas. Ainda em 1981, Kocourek & Horejsi denominaram-nas como proteínas ou glicoproteínas de origem não imune que se ligam a carboidratos, generalizando o termo para proteínas monovalentes, di ou polivalentes capazes

de interagir com carboidratos. Autores como Barondes (1988) e Sharon e Lis (1990) sugeriram também a existência de um sítio adicional de natureza hidrofóbica nas lectinas, o qual determina algumas interações entre proteínas.

A habilidade de aglutinar células distingue lectinas de outras macromoléculas capazes de ligar carboidratos e é por isso geralmente incluída na definição de lectinas, de acordo com aquela proposta por Goldstein *et al.* (1980). A origem não imune das lectinas é enfatizada porque serve para distingui-las de anticorpos anti-carboidratos 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. Além disso, as lectinas não são apenas encontradas em animais, mas também em outros organismos que não possuem sistema imune, como plantas e bactérias (Moreira *et al.*, 1990).

Outra definição bem aceita para as lectinas foi proposta por Kennedy *et al.* (1995). Estes autores apresentam essas moléculas como uma classe de proteínas de origem não imunológica que reconhecem carboidratos, livres ou conjugados a superfícies celulares, através de seus sítios de ligação reversível.

Peumans e Van Damme (1998; 1995) definiram, de forma mais abrangente, as lectinas de plantas como todas as proteínas que possuem no mínimo um domínio não-catalítico que se liga reversivelmente a um mono ou oligossacarídeo específico, estendendo o conceito para proteínas que se comportam de forma completamente diferente com relação às suas propriedades de aglutinação e/ou precipitação de glicoconjugados.

1.1.2 Distribuição

As primeiras investigações a respeito das lectinas indicaram sua presença em plantas, tanto que elas foram inicialmente chamadas por nomes que mostravam sua origem vegetal.

No entanto, hoje é reconhecida a larga distribuição dessas moléculas na natureza e são já encontradas nos mais diversos organismos.

Lectinas de Fungos e Bactérias

Dentre os microrganismos, os fungos se destacam muitíssimo nas pesquisas envolvendo o isolamento e caracterização de novas lectinas, presentes em espécies produtoras de corpos de frutificação ou cogumelos (Li *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2008; Wälti *et al.*, 2008; Goldstein *et al.*, 2007; Jung *et al.*, 2007; Thakur *et al.*, 2007; Candy *et al.*, 2003; Trigueros *et al.*, 2003; Wang; Ng, 2003a; Wang *et al.*, 2003; Kawagishi *et al.*, 2001; Mo *et al.*, 2000) ou, mais raramente, em leveduras (Al-Mahmood *et al.*, 1988). Eles representam uma extensa fonte biológica para muitos grupos de lectinólogos em todo o mundo. Mas além dos fungos, também alguns outros microrganismos como as bactérias e cianobactérias têm sido avaliadas quanto à detecção e obtenção de lectinas (Syed *et al.*, 1999; Yamaguchi *et al.*, 1999; Yamaguchi *et al.*, 1998), porém com menor representatividade.

Lectinas Animais

A presença das lectinas no corpo dos animais invertebrados ocorre em representantes de quase todos os filos; elas são encontradas muito freqüentemente na hemolinfa destes organismos, mas também presentes em fluido celômico. Dentre muitas lectinas isoladas de invertebrados, alguns exemplos são aquelas de protozoários (Babal; Russel, 1999), insetos (Ourth *et al.*, 2005; Pace *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 1999), moluscos (Takahashi *et al.*, 2008; Banerjee *et al.*, 2004), crustáceos (Sun *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2007; Alpuche *et al.*, 2005; Nagai *et al.*, 1999), pepinos-do-mar (Gowda *et al.*, 2008a), poliquetas (Molchanova *et al.*, 2007) e esponjas (Moura *et al.*, 2006).

Em animais vertebrados, as lectinas têm sido isoladas e/ou caracterizadas de bovinos (Ye; Ng, 2000), de peixes (Bazil; Entlicher, 1999; Murayama *et al.*, 1997), de anfíbios (Lerivray *et al.*, 1985) e outros organismos. No homem em especial, existem hoje inúmeras

lectinas já bem caracterizadas, presentes em diferentes tecidos e células do corpo, como no pulmão (Sorensen *et al.*, 2007; Kishore *et al.*, 2006; Dunphy *et al.*, 2002), no soro (Wallis, 2007; Bouwman *et al.*, 2006), em placenta (Soilleux; Coleman, 2003), em dendritos (Kanazawa 2007; Kanazawa *et al.*, 2004) entre outras.

Lectinas Vegetais

Lectinas são comumente detectadas em plantas, em especial em sementes de representantes da família *Leguminosae* (Spilatro *et al.*, 1996). Os vegetais têm constituído uma fonte rica de lectinas, servindo como principais materiais de análise, objetivando o isolamento dessas moléculas.

Em geral, a maior fonte de lectinas vegetais são as sementes, nas quais essas moléculas podem representar um percentual significativo da matéria seca (Lis; Sharon, 1981). Sementes quiescentes constituem a principal fonte de lectinas de leguminosas, podendo corresponder a 10 % da proteína total presente nesse tecido (Sharon; Lis, 1990). No entanto, a localização e a maior quantidade de lectinas nas plantas não se restringe a um só tecido, nem a maior concentração está necessariamente nas sementes. Outros tecidos de muitos vegetais apresentam-se como principais fontes de lectinas. Em *Bauhinia monandra*, por exemplo, as folhas constituem um dos principais tecidos que são fontes de purificação lectínica (Coelho; Silva, 2000).

Muitas lectinas são freqüentemente detectadas e purificadas de sementes (Singha *et al.*, 2007; Sitohy *et al.*, 2007; Susseeland *et al.*, 2007; Konozy *et al.*, 2003; Freire *et al.*, 2002; Rego *et al.*, 2002; Machuka *et al.*, 1999; Cavada *et al.*, 1998; Gupta; Srivastava, 1998; Moreira *et al.*, 1998) justamente por esse ser um tecido geralmente rico na sua presença. No entanto, elas também são detectadas em outros tecidos ou órgãos vegetais, embora de forma menos freqüente, como em cascas de árvores (Wititsuwannakul *et al.*, 1998), no cerne (Sá *et al.*, 2008a), em folhas (Rameshwaram; Nadimpalli, 2008; Ooi *et al.*, 2004; Coelho; Silva,

2000), em frutos (Wang; Ng, 2006; Benito *et al.*, 1998; Peumans *et al.*, 1998), em raízes (Naeem *et al.*, 2001), em tubérculos (Kaur *et al.*, 2006), em bulbos (Bertrand *et al.*, 1998; Parisi *et al.*, 2008), em rizomas (Chu; Ng, 2006; Kaur *et al.*, 2005; Citores *et al.*, 1997; Peumans *et al.*, 1997), em coleóptilos (Martinez; Cordoba, 2000), em cotilédones (Oliveira *et al.*, 2002; Gupta; Srivastava, 1998; Nomura *et al.*, 1998), no látex de algumas espécies (Seshagirirao; Prasad, 1995; Stirpe *et al.*, 1993) e outras partes dos vegetais.

Espécies criptogâmicas também têm sido exploradas quanto ao isolamento de lectinas, especialmente as algas (Leite *et al.*, 2005; Ambrosio *et al.*, 2003; Hori *et al.*, 2000; Sato *et al.*, 2000; Sampaio *et al.*, 1998a; Sampaio *et al.*, 1998b;) e, em menores proporções, os líquens (Elifio *et al.*, 2000; Molina; Vicente, 2000; Lehr *et al.*, 1995; Kardish *et al.*, 1991; Ingram, 1982; Lockhart *et al.*, 1978; Howe; Barrett, 1970; Barrett; Howe, 1968; Estola; Vartia, 1955).

1.1.3 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 estão ligadas à membrana celular (Flemming *et al.*, 1992). Devido a esta habilidade, a presença de lectinas numa amostra pode ser facilmente detectada a partir de ensaios de aglutinação, nos quais estas interagem com células, através de seus sítios de ligação, formando diversas ligações reversíveis entre células. O ensaio de hemaglutinação (Figura 1) é o mais comumente utilizado por promover a fácil visualização desta propriedade aglutinante de eritrócitos pelas lectinas. Os eritrócitos utilizados no ensaio podem ser de origem humana ou de outros animais, tratados enzimaticamente (Jung *et al.*, 2007; Leite *et al.*, 2005) ou quimicamente (Coelho; Silva, 2000; Nomura *et al.*, 1998) assim como não tratados (Mo *et al.*, 2000; Sampaio *et al.*, 1998a; Sampaio *et al.*, 1998b; Wititsuwannakul *et al.*, 1998).

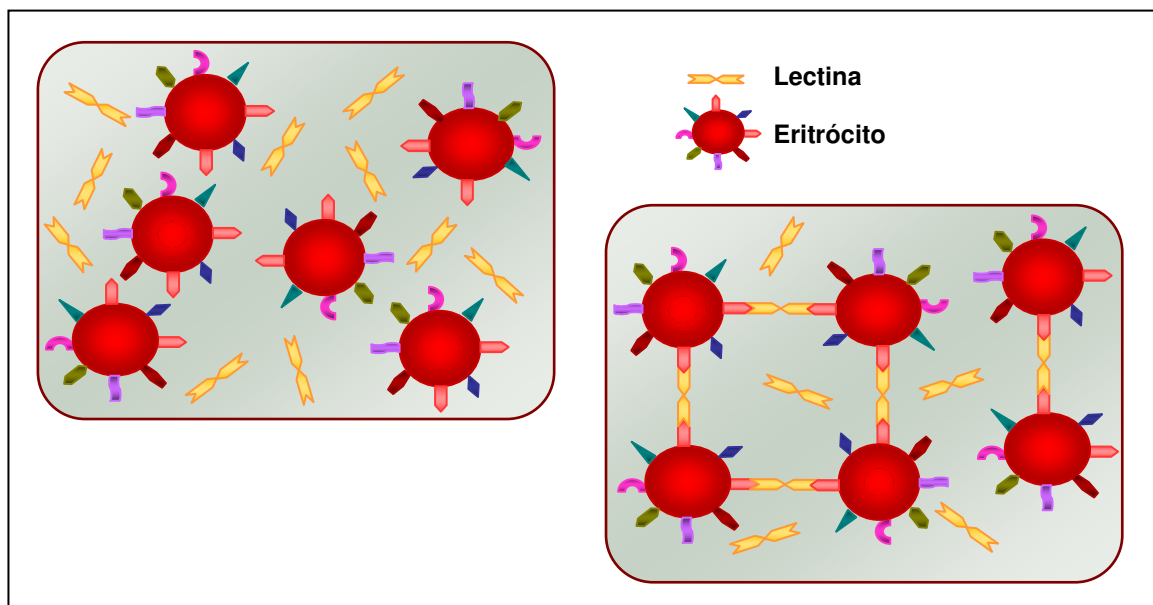


Figura 1 – Ensaio de Hemaglutinação para detecção de lectinas.

Landsteiner e Raubitschek (1908) observaram que vários extratos de sementes apresentavam diferentes atividades hemaglutinantes com eritrócitos de diferentes fontes animais e que aglutininas vegetais eram específicas para determinados tipos sanguíneos. Boyd e Reguera (1949), estudando a aglutinina de *Phaseolus limenses*, descobriram sua especificidade para eritrócitos do tipo A, determinando que algumas aglutininas têm especificidade para determinado grupo do sistema ABO. Portanto, lectinas podem apresentar especificidade para eritrócitos de diferente origem animal ou de diferente tipagem, como a lectina de *Zizyphus mauritiana* (Gupta; Srivastava, 1998) que só aglutina eritrócitos humanos, as lectinas de *Charybdis japonica* (Umetsu, 1991) e do cogumelo *Marasmius oreades* (Winter *et al.*, 2002) específicas para eritrócitos humanos tipo B, e a lectina de *Tachypleus tridentatus* (Nagai, 1999) específica para eritrócitos humanos tipo A. Diferentemente, uma lectina fúngica da espécie *Cordyceps militaris*, denominada CML, aglutina eritrócitos de camundongos e ratos, mas não é capaz de aglutinar eritrócitos do grupo ABO (Jung *et al.*, 2007); também uma lectina de *Gracilaria ornata* (GOL) aglutina eritrócitos animais (de coelho e de galinha), mas não de humanos (Leite *et al.*, 2005). Outras lectinas, no entanto, são

caracterizadas como não específicas para grupos sanguíneos (Liu *et al.*, 2008; Banerjee *et al.*, 2004).

A detecção de lectinas através do ensaio de hemaglutinação é confirmada pelo fenômeno de inibição desta hemaglutinação (Figura 2) na presença de um (ou mais) carboidrato(s) em concentração determinada na solução do ensaio. Outra forma de avaliar a presença de lectinas numa amostra é através de ensaios de precipitação de polissacarídeos ou glicoproteínas (Goldstein *et al.*, 2007; Moreira *et al.*, 1998; Yamaguchi *et al.*, 1998).

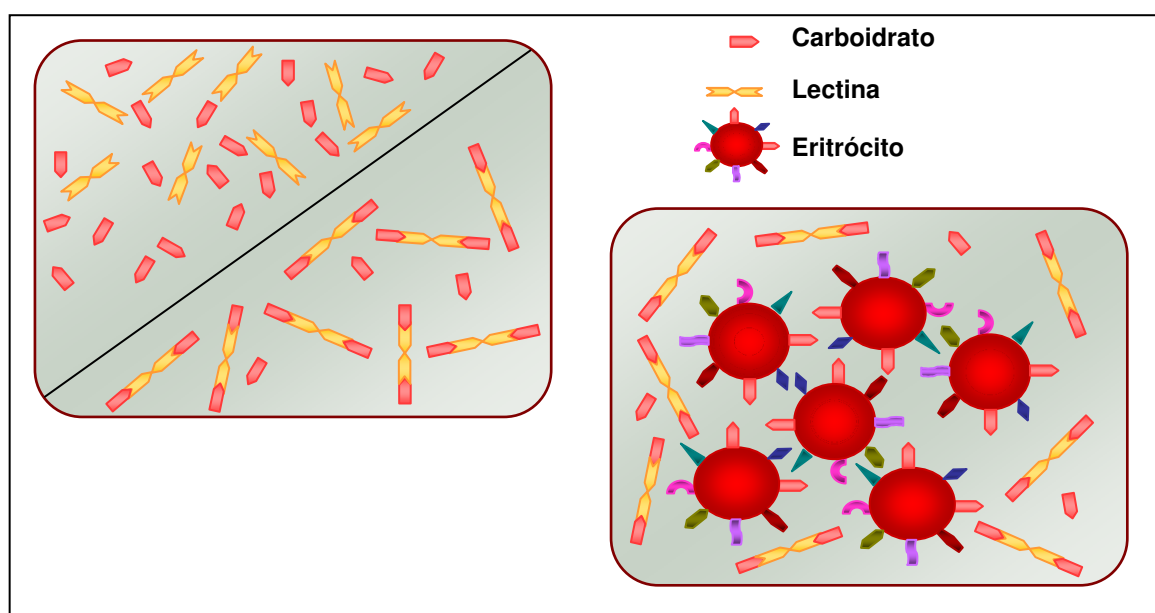


Figura 2 – Ensaio de Inibição da Hemaglutinação lectínica.

De acordo com Sharon e Lis (1990) algumas lectinas apresentam interações mais fortes com oligossacarídeos em comparação com monossacarídeos, outras são quase exclusivas para oligossacarídeos. Assim, as lectinas podem ser classificadas com especificidade para monossacarídeo ou para oligossacarídeo. A determinação da especificidade de uma lectina é dada pelo monossacarídeo que, em menor concentração, possua maior habilidade para inibir sua atividade de hemaglutinação ou de precipitação de polissacarídeos ou glicoproteínas; no entanto, algumas lectinas não apresentam um

monossacarídeo inibidor e são inibidas apenas por oligossacarídeos (Wälti *et al.*, 2008), glicoproteínas e/ou polissacarídeos (Thakur *et al.*, 2007).

Muitas lectinas de plantas ou mesmo de outros seres podem ser inibidas por mono ou dissacarídeos, como é o caso da lectina de ovos do peixe *Scomberomorous niphonius*, uma lectina representante da família das lectinas animais ligadoras de raminose, um monossacarídeo (Terada *et al.*, 2007), e de lectinas dos cogumelos *Agrocybe cylindracea*, específica para lactose (Liu *et al.*, 2008) e *Lyophyllum decastes*, com especificidade para galabiose, um dissacarídeo raro em tecidos humanos (Goldstein *et al.*, 2007); geralmente as concentrações de tais carboidratos necessárias para inibição são relativamente altas, quando comparadas às concentrações de oligossacarídeos complexos, inibidores de outras lectinas. Essa elevada capacidade de reconhecer oligossacarídeos como inibidores é devido ao fato de que o sítio de ligação das lectinas é mais complementar para oligossacarídeos (Peumans; Van Damme, 1998).

1.1.4 Características Estruturais

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). Essas moléculas exibem uma elevada similaridade em seus resíduos de aminoácidos, incluindo aqueles envolvidos na ligação a monossacarídeos 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).

As diferenças estruturais entre as lectinas ocorrem desde a estrutura primária até o último grau de organização molecular; elas podem ser diferentes na seqüência aminoacídica, na variação do número de subunidades por molécula e na natureza dos polipeptídeos. Pontes

dissulfeto, pontes de hidrogênio e também as interações hidrofóbicas podem estar presentes na associação de 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 associados são alcançadas 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.

Algumas lectinas apresentam íons metálicos ligados à sua estrutura; tais ligações são coordenadas por moléculas de água, que também servem para mediar interações das lectinas com carboidratos (Sharon; Lis, 2002). As lectinas podem conter de 2 a 12 sítios de interação, dependendo da natureza da molécula e do seu estado de oligomerização (Balzarini, 2006).

Hoje, simulações de dinâmica molecular apresentam lectinas estruturalmente flexíveis às diferenças experimentais de análise, como moléculas adaptáveis. Estes estudos comprovam que a presença de íons divalentes no meio pode determinar se há ou não interação da lectina com o carboidrato (a concentração pode determinar a reunião de monômeros de carboidratos formando micelas no sítio hidrofóbico da lectina) e se esta é melhorada ou não por um íon específico; o complexo de ligação das moléculas é estabilizado por muitas pontes de hidrogênio, ou pelo menos por uma ponte hidrogênio. Esses ensaios demonstram que as interações eletrostáticas específicas e favoráveis entre os resíduos de aminoácidos da lectina e os monômeros do ligante facilitam a ligação do complexo; as interações específicas (como pontes de hidrogênio e interações eletrostáticas) ou não específicas (interações de van der Waals) são as principais contribuições de força para a estabilidade do complexo molecular formado (Konidala; Niemeyer, 2007).

1.1.5 Classificação

Lectinas de Fungos e Bactérias

Lectinas de bactérias são raramente isoladas e não se tem relatos sobre sua classificação; uma lectina da cianobactéria *Microcystis viridis* é chamada de lectina ligadora de manana, por apresentar afinidade por esse tipo de polímero (Yamaguchi *et al.*, 1999). Os fungos apresentam lectinas, as quais podem ser classificadas de acordo com a estrutura molecular; por exemplo, a lectina de *Psathyrella velutina* é chamada lectina do tipo integrina, por apresentar similaridades estruturais com o domínio extracelular dessa classe de moléculas de adesão celular (Cioci *et al.*, 2006). Mas as lectinas de fungos também podem ser classificadas como as lectinas animais, ainda de acordo com sua estrutura, como é o caso da lectina de *Coprinopsis cinerea* que é considerada uma lectina relacionada às galectinas, classe de lectinas caracterizada por apresentar muitos resíduos conservados (Wälti *et al.*, 2008). Finalmente, várias lectinas de fungos têm sido classificadas de acordo com a especificidade (como as lectinas vegetais), em lectinas arabinose (Wang; Ng, 2005), N-acetil-D-galactosamina (Chumkhunthod *et al.*, 2006), melibiose e xilose (Zheng *et al.*, 2007) específicas, ou ligadoras de lactose (Liu *et al.*, 2008).

Lectinas Animais

Nos animais vertebrados, estão presentes duas classes de lectinas, com base em sua localização: as lectinas integrais de membrana e as lectinas solúveis presentes nos fluidos intra e intercelulares (Barondes, 1984). Assim, são lectinas integrais de membrana aquelas que se localizam dentro de membranas como constituintes estruturais; essa classe é constituída de lectinas que diferem quanto à especificidade a carboidratos e a propriedades físico-químicas. Já as lectinas do meio extracelular são solúveis, ou seja, podem mover-se livremente nos meios intra e intercelulares.

Drickamer (1988) subdividiu lectinas animais em dois grupos: as lectinas tipo-C (Ca^{++} dependentes, com especificidades diversas) e as lectinas tipo-S (tiol dependentes). Sharon (1993) inclui no grupo das lectinas tipo-C, os receptores endocíticos tais como lectinas hepáticas; os receptores macrofágicos que podem atuar na fagocitose de microorganismos patogênicos; as selectinas que medeiam a adesão de leucócitos às células endoteliais e os carreiam para tecidos linfóides e sítios de inflamação; e moléculas secretadas presentes na matriz extracelular e no soro.

Gabius (1997) apresentou as lectinas de origem animal divididas em cinco principais grupos, de acordo com seus caracteres estruturais. São eles: lectinas tipo-C; lectinas tipo-I; galectinas (ou tipo-S); pentranxinas e lectinas tipo-P. Lectinas tipo-C são aquelas que dependem da presença de íons Ca^{2+} para ligarem-se ao carboidrato, e que possuem domínios de reconhecimento a carboidratos conservados. Lectinas tipo-I são aquelas que possuem domínios de reconhecimento a carboidratos (CRD) semelhantes a imunoglobulinas. As galectinas ou lectinas tipo-S são dependentes de tiol, possuem também CRD conservados e são específicas para β -galactosídeos. As pentranxinas são as lectinas que apresentam um arranjo pentamérico de subunidades. As lectinas tipo-P são aquelas constituídas de CRD similares, mas não bem definidos; são específicas para glicoproteínas contendo manose-6-fosfato.

Lectinas Vegetais

As lectinas de plantas têm sido mais recentemente classificadas dentro de sete famílias de proteínas relacionadas entre si do ponto de vista estrutural e evolutivo (Van Damme *et al.*, 1998); são elas as lectinas de floema de cucurbitáceas, lectinas quitina-ligantes contendo domínios de heveína, lectinas de leguminosas (Garcia-Pino *et al.*, 2006), proteínas inativadoras de ribossomos tipo 2 (Stirpe *et al.*, 2007; Pelosi *et al.*, 2005; Hartley; Lord 2004), lectinas manose-ligantes de monocotiledôneas, lectinas relacionadas à jacalina (Barre *et al.*,

2004; Rougé *et al.*, 2003) e a família das amarantinas. As três últimas compartilham características estruturais semelhantes e apresentam exclusivamente β estrutura (Wright, 1997). A família de lectinas de leguminosas é a mais bem estudada e caracterizada.

Baseando-se na estrutura global das lectinas de plantas, estas podem ser divididas (Figura 3) em quatro principais tipos distintos: as merolectinas, as hololectinas, as quimerolectinas (Peumans; Van Damme, 1995) e as superlectinas (Van Damme *et al.*, 1996). As merolectinas são proteínas formadas exclusivamente por um domínio de ligação a carboidrato; são proteínas pequenas, formadas por um único polipeptídeo e, por conta de sua natureza monovalente, são incapazes de precipitar glicoconjugados ou aglutinar células. As hololectinas também são exclusivamente formadas de domínios de ligação a carboidratos, mas contêm dois ou mais destes domínios que são idênticos ou muito semelhantes; este grupo compreende todas as lectinas que possuem múltiplos sítios de ligação, sendo capazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados. As quimerolectinas correspondem à fusão de proteínas contendo um domínio de ligação a carboidrato com um domínio não relacionado (que possui uma atividade catalítica definida ou não apresenta atividade biológica) que atua de forma independente. As superlectinas consistem de moléculas com pelo menos dois domínios de interação a carboidratos distintos.

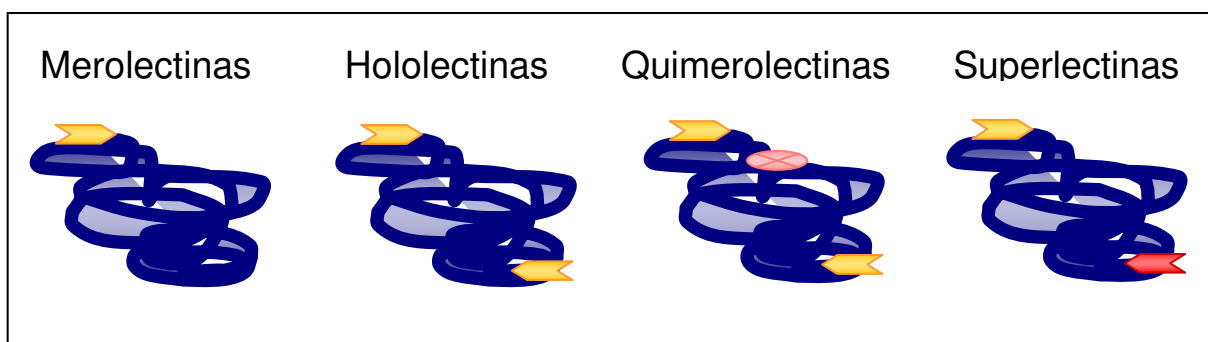


Figura 3 – Estrutura de lectinas vegetais com base em seus domínios funcionais.

As proteínas vegetais ligantes de carboidratos podem ainda ser classificadas de acordo com sua especificidade de interação, em lectinas manose/glicose (Nomura *et al.*, 1998; Correia; Coelho, 1995), manose/maltose, galactose/N-acetilgalactosamina, N-acetilglicosamina/(N-acetilglicosamina)_n, galactose (Coelho; Silva, 2000; Machuka *et al.*, 1999; Cavada *et al.*, 1998), manose (Koike *et al.*, 1995; Mo *et al.*, 1993), fucose, ácido siálico, entre outras.

1.1.6 Papéis Fisiológicos

Com base nas suas propriedades gerais e localização em diferentes tecidos, muitas funções fisiológicas para lectinas já foram sugeridas. A existência de sítios ligantes a carboidratos específicos, característica principal das lectinas é, sem dúvida, um fator importante para a determinação do seu papel fisiológico.

Lectinas de Fungos e Bactérias

As lectinas em microorganismos parecem desempenhar vários papéis importantes; parecem atuar na ligação destes às células hospedeiras, parecem atuar como determinantes no reconhecimento em processos imunológicos, fagocitose e adesão celular (Ponchel; Irache, 1998).

Lectinas de superfície bacteriana e estruturas semelhantes a lectinas parecem estar envolvidas na iniciação da infecção mediando a aderência bacteriana a células epiteliais, como ocorre em infecções dos tratos urinário e gastrointestinal. O padrão de distribuição de actinomicetes contendo lectinas galactose (lactose)-específicas na superfície epitelial oral apóia a hipótese de que essas lectinas são os principais mediadores da aderência, colonização e estabelecimento de comunidades microbianas específicas na cavidade oral (Lis; Sharon, 1986a).

Lectinas de fungos podem estar envolvidas na biossíntese da parede celular e diferenciação do micélio, na adesão de esporos de espécies patogênicas a insetos e a nematodos, no reconhecimento fungo-micoparasitas (Kellens; Peumans, 1990), atuar como proteínas estoque, e apresentar atividade pesticida (Trigueros *et al.*, 2003). A lectina presente em *Rhizoctonia solani* parece desempenhar um papel fisiológico de proteína de estocagem, além de atuar no reconhecimento específico desse fungo aos micoparasitas *Trichoderma* (Kellens; Peumans, 1990).

Em líquens, tem sido sugerido que as lectinas de origem fúngica podem estar envolvidas no estabelecimento da simbiose entre o fungo e a alga, servindo como fator de reconhecimento interespecífico (Elifio *et al.*, 2000; Molina; Vicente, 2000; Kardish *et al.*, 1991; Petit *et al.*, 1983; Petit, 1982; Lockhart *et al.*, 1978). Lectinas micobiontes têm sido implicadas no reconhecimento do cianobionte por um micobionte. Porém, pesquisas englobando observações diretas, experimentos sobre lectina-ligante e análises de intron de tRNA^{Leu} indicam a especificidade cianobionte-micobionte (Raí; Bergman, 2002).

Lectinas Animais

As lectinas encontradas em tecidos de animais parecem estar envolvidas com o mecanismo de endocitose e translocação intracelular de glicoproteínas (Yamashita *et al.*, 1999), na ligação a glicoconjugados (Barondes, 1984), com o processo de apoptose (Rabinovich *et al.*, 1999), parecem ainda possuir papéis na defesa contra microorganismos, na regulação dos processos de migração e adesão celular e no processo de ligação de bactérias a células epiteliais (Rudiger *et al.*, 2000; Ponchel; Irache, 1998). Possuem também uma função no sistema imune de aves e mamíferos (Holmskov *et al.*, 1994).

Em animais vertebrados, a classe de lectinas integrais de membrana parece estar envolvida com a ligação de glicoconjugados a membranas, na superfície celular ou no interior de vesículas, resultando na localização desses glicoconjugados em sítios específicos da

membrana (endocitose), ou no transporte dos mesmos para outros compartimentos celulares (translocação intracelular) (Barondes, 1984); já a classe de lectinas solúveis move-se nos compartimentos aquosos dentro e entre as células, interagindo com glicoconjugados solúveis e ligados a membranas. O fato de que essas proteínas parecem estar inicialmente concentradas no interior das células, e serem secretadas por estas, sugere que tais moléculas possuem uma função comum de ligar-se a glicoconjugados complementares presentes sobre e em torno das células que as liberam (Barondes, 1984).

Dentre as lectinas tipo-C, as moléculas mais estudadas são as proteínas manose-específicas presentes no soro de mamíferos, que atuam contra patógenos; elas se ligam a oligomanosídeos da superfície celular de bactérias e fungos, neutralizando-os por lise celular ou opsonização (Sharon, 1993). Já as lectinas dessa classe que atuam como receptores, chamadas CTLR, funcionam como moléculas de sinalização da superfície celular, capazes de reconhecer uma gama de moléculas de patógenos altamente conservadas e estimulam uma resposta imune adequada (Willcocks *et al.*, 2006).

Outros organismos, tais como insetos e protozoários (animais invertebrados), apresentam em suas estruturas celulares as lectinas; em alguns protozoários essas proteínas parecem estar relacionadas com o mecanismo de reconhecimento desses organismos aos seus hospedeiros parasitados. Ensaios imunohistoquímicos e imunocitoquímicos com tecidos de bovinos para detectar lectinas de parasitas *Tritrichomonas sp* e seus sítios de ligação nos tecidos, comprovam a influência da lectina como mediadora da adesão de tais parasitas ao tecido hospedeiro (Babal; Russel, 1999).

Lectinas Vegetais

Lectinas vegetais podem desempenhar importantes papéis tais como proteínas de reserva de nitrogênio, como fatores de reconhecimento específico, como proteínas envolvidas no mecanismo de defesa contra vírus e microrganismos fitopatogênicos, insetos, nematóides e

animais herbívoros predadores interagindo com glicoconjugados presentes nesses organismos e interferindo no crescimento, desenvolvimento e fisiologia dos mesmos (Ripoll *et al.*, 2003; Wang; Ng, 2003b; Chen *et al.*, 2002; Freire *et al.*, 2002; Bandyopadhyay *et al.*, 2001; Machuka *et al.*, 1999; Ponchel; Irache, 1998; Peumans; Van Damme, 1995). Lectinas de plantas podem ainda atuar como mediadores da simbiose planta-microrganismo (Limpens; Bisseling, 2003; Naeem *et al.*, 2001; Rudiger, 1998).

Outras funções já foram indicadas para lectinas, como por exemplo, fenômenos relacionados à defesa e/ou à regulação e sinalização celulares (Jiang *et al.*, 2006), moléculas participantes na organização celular, na embriomorfogênese, na fagocitose, na proteção celular, no mecanismo de crescimento da parede celular, na mitose induzida, no reconhecimento polínico e, especialmente, são consideradas ativamente envolvidas no transporte de carboidratos e fixação destes nos tecidos vegetais. Através de análise ultraestrutural, diferentes formas moleculares, isolectinas que se diferenciam na especificidade de ligação e no padrão de glicosilação, têm se mostrado presentes num mesmo compartimento celular sugerindo diferentes funções para essas moléculas dentro da organela (Santos *et al.*, 2004).

O metabolismo de lectinas parece estar relacionado com o ciclo de vida do vegetal, uma vez que o desaparecimento destas moléculas nos órgãos de reserva é, em geral, semelhante ao padrão de degradação protéica.

As diferentes especificidades de ligação a carboidratos de diferentes lectinas para reconhecer uma grande diversidade de carboidratos ou glicoproteínas presentes em microorganismos e outros animais, assim como sua dupla função de estocagem/defesa contra predadores podem ser consideradas características resultantes de uma grande evolução adaptativa de plantas (Peumans; Van Damme, 1998).

As lectinas já foram ditas como únicas proteínas de origem vegetal com capacidade para reconhecer e se ligar a glicoconjugados presentes na superfície de microorganismos ou no trato intestinal de insetos e mamíferos herbívoros (Peumans; Van Damme, 1998). Tais moléculas parecem desempenhar 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 a sua toxicidade, tais como a lectina de *Sambucus sieboldiana* (Rojo *et al.*, 1997), a aglutinina de *Phaseolus vulgaris* (PHA), a lectina de *Robinia pseudoacacia* e a lectina de *Sambucus nigra* (Peumans; Van Damme, 1998). As lectinas de arroz, de *Urtica dioica* e a WGA (wheat germ agglutinin) apresentam uma atividade inseticida sobre *Callosobruchus maculatus*; experimentos mostraram que estas lectinas atuam causando altos níveis de mortalidade no inseto (Huesing *et al.*, 1991). Este fato é um indicativo de que tais moléculas atuam de fato, no mecanismo de proteção contra o ataque de predadores.

De acordo com alguns estudos, lectinas de plantas são potentes inibidores *in vitro* de viroses animais e de humanos. Dessa forma, algumas delas podem ter um papel antiviral indireto; por exemplo, a presença de lectinas inseticidas pode prevenir e/ou reduzir a difusão de doenças virais transmitidas por insetos (Peumans; Van Damme, 1995).

Lectinas de plantas 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-o, de modo que há um prolongamento do período latente que precede a germinação (Lis; Sharon, 1981).

1.1.7 Lectinas e Evolução

Dentre os argumentos indicativos de que as lectinas possuem um papel de defesa nas plantas, o mais importante é a capacidade de ligação dessas moléculas a glicoconjugados de outros organismos. Tais moléculas, em geral, se ligam a carboidratos simples; no entanto, elas possuem uma afinidade muito alta por oligossacarídeos que são incomuns ou totalmente ausentes em plantas. Exemplos deste fato são as lectinas de plantas quitina-ligantes, como a lectina de *Viscum album* (Peumans *et al.*, 1996), e as lectinas ácido-siálico-ligantes. As primeiras reconhecem um carboidrato típico da parede celular de fungos e do exoesqueleto de invertebrados; as segundas reconhecem um carboidrato que é ausente em plantas, mas que é o principal componente de glicoproteínas animais. Além dessa capacidade característica de ligação, lectinas de plantas possuem estabilidade elevada, mesmo quando submetidas a condições desfavoráveis como mudanças de pH, de temperatura ou exposição a proteases de insetos e animais. Essas moléculas parecem ainda estar preferencialmente associadas com determinadas partes vegetais que são mais suscetíveis ao ataque de outros organismos (geralmente órgãos de estocagem e sementes) e que necessitam de um sistema de defesa (Peumans; Van Damme, 1995).

As lectinas, em especial aquelas de sementes e outros tecidos de estocagem, parecem desempenhar um papel como proteínas de reserva devido a suas propriedades bioquímicas, sua abundância e seu papel na regulação do desenvolvimento vegetal. No entanto, como proteínas de reserva, essas moléculas parecem ainda desempenhar uma dupla função: elas atuam como proteínas de defesa, sendo tóxicas contra diversos organismos predadores, ao mesmo tempo em que estocam nitrogênio. As diferentes especificidades de ligação a carboidratos de diferentes lectinas para reconhecer uma grande diversidade de carboidratos ou glicoproteínas presentes em microrganismos e outros animais, assim como sua dupla função de estocagem e defesa contra predadores, podem ser consideradas características resultantes

de uma grande evolução adaptativa de plantas (Peumans; Van Damme, 1998). Um estudo estrutural da lectina de sementes de *Parkia platycephala* demonstrou um arranjo circular de domínios do tipo β -prisma que conferem adaptabilidade à molécula; sua ligação ao carboidrato é flexível e a estrutura cíclica da molécula indica uma evolução convergente na construção de lectinas relacionadas com funções de defesa do hospedeiro contra patógenos e ataque aos organismos predadores (del Sol *et al.*, 2005).

1.1.8 Propriedades Biológicas e Aplicações

As lectinas, por suas propriedades características, principalmente por sua habilidade em ligar glicoconjugados, destacam-se como importantes ferramentas em pesquisas englobando diversas áreas da ciência, em especial, na Bioquímica, Biologia Celular e Molecular, Imunologia, Farmacologia, Medicina e em Análises Clínicas. Tais moléculas desempenham os mais variados efeitos sobre as células, dentre os quais aglutinação, estimulação mitogênica, redistribuição de componentes de superfície celular, modificação da atividade de enzimas de membrana, inibição de crescimento fúngico e bacteriano, toxicidade, imunomodulação, entre outros (Li *et al.*, 2008; Takahashi *et al.*, 2008; Sitohy *et al.*, 2007; Kaur *et al.*, 2006).

As lectinas, em especial aquelas com especificidade a manose ou a N-acetilglicosamina, apresentam uma habilidade anti-HIV (Human Immunodeficiency Virus) marcante em ensaios de cultura de células (Molchanova *et al.*, 2007), não somente inibindo a infecção celular como também prevenindo a infecção viral de células infectadas para linfócitos T não infectados (Balzarini, 2006). Algumas lectinas podem também atuar inibindo a atividade da transcriptase reversa HIV-1 (Li *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2007; Wang; Ng, 2006). Uma ação aparentemente contrária em relação aos vírus é observada na aglutinina de *Dolichos biflorus* e a aglutinina de soja, que podem promover o aumento da infecção de

algumas células por determinados vírus, quando estas são tratadas antes ou durante a inoculação viral (Ogino *et al.*, 1999).

Ações de diferentes lectinas contra células bacterianas (Gowda *et al.*, 2008b; Takahashi *et al.*, 2008; Wellman-Labadie *et al.*, 2008; Santi-Gadelha *et al.*, 2006; Gaidamashvili; van Staden, 2002) e protozoários (Moura *et al.*, 2006), contra fungos (Sitohy *et al.*, 2007; Trindade *et al.*, 2006; Yan *et al.*, 2005; Freire *et al.*, 2002) ou nematodos (Ripoll *et al.*, 2003) têm sido avaliadas, indicando que estas proteínas podem ser viáveis na terapêutica clínica do futuro.

Lectinas apresentam atividade mitogênica sobre células mononucleares sanguíneas, e antiproliferativa sobre linhagens celulares de câncer humano (Kaur *et al.*, 2006; Kaur *et al.*, 2005), como células de leucemia (L1210 e M1) e de hepatoma (Hep G2) (Ngai; Ng, 2004). A atividade mitogênica é uma propriedade comum para muitas lectinas, especialmente àquelas de origem fúngica, atuando sobre esplenócitos (Li *et al.*, 2008; Wong *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2007; Wang; Ng, 2006; Ho *et al.*, 2004; Ngai; Ng, 2004) e linfócitos T humanos (Banerjee *et al.*, 2004; Maciel *et al.*, 2004), entre outros tipos celulares.

A ação antitumoral de lectinas tem sido observada sobre o sarcoma 180 (Li *et al.*, 2008; Andrade *et al.*, 2004) e sobre algumas linhagens de células tumorais humanas (Liu *et al.*, 2006; Karasaki *et al.*, 2001). O efeito modulador da resposta imune é uma propriedade observada em algumas lectinas (Gavrovic-Jankulovic *et al.*, 2008; Ghosh; Maiti, 2007).

Outras lectinas, em especial as lectinas de plantas e, dentre elas, principalmente as RIPs tipo 2, podem apresentar atividade citotóxica *in vitro*, induzindo apoptose (Stirpe *et al.*, 2007). Exemplos de lectinas comerciais com ação citotóxica para células de mamíferos são a ricina, a abrina e, em menor intensidade, a aglutinina de *Canavalia ensiformes* (Concanavalina A - Con A) e a WGA, entre outras. 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, 1986b). A sielboldina-b, uma lectina presente em *Sambucus sieboldiana*, foi avaliada quanto a sua toxicidade *in vivo* em camundongos suíços, e citotoxicidade *in vitro* sobre células HeLa (linhagem de célula cancerosa cujo nome deriva de sua doadora involuntária, Henrietta Lacks); não apresentou ação tóxica *in vivo* quanto à síntese protéica, mas foi fortemente citotóxica *in vitro*, com a habilidade de uma proteína ribossomo-inativadora (Rojo *et al.*, 1997). Outra lectina, isolada de *Viscum album*, também apresentou propriedade citotóxica sobre células Molt4 de humanos, uma linhagem celular derivada de células T de leucemia (Peumans *et al.*, 1996). A lectina de *Phaseolus acutifolius* foi testada *in vivo* em camundongos e mostrou possuir baixa toxicidade, podendo ser utilizada em estudos carcinogênicos que possam levar a terapia do câncer (Reynoso-Camacho *et al.*, 2003).

As lectinas, além de seus efeitos sobre células, também têm habilidade para atuar como moléculas inseticidas contra uma variedade de espécies (Sá *et al.*, 2008a; Sá *et al.*, 2008b; Kaur *et al.*, 2006; Dutta *et al.*, 2005; Leite *et al.*, 2005) sendo seus genes utilizados na produção de transgênicos de plantas de interesse econômico (McCafferty *et al.*, 2008; Ramesh *et al.*, 2004; Kanrar *et al.*, 2002).

Uma lectina de *Galanthus nivalis*, GNA, foi fusionada a uma neurotoxina de aranha, SFI1 (*Segestria florentina* toxin 1) inseto-específica; a lectina atuou como carreadora da neurotoxina, levando-a para a hemolinfa das larvas de lepidópteros; a fusão SFI1/GNA mostrou potencial utilização da lectina como pesticida em cultivos de plantas (Fitches *et al.*, 2004).

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; BmoLL (lectina de folhas de *Bauhinia monandra*) e

LCL (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).

A detecção de glicoproteínas por lectinas envolve a ligação da lectina a um carboidrato, presente no glicoconjugado de interesse sobre células, seções teciduais ou isolados. Tal ligação é detectada pela visualização direta através de técnicas utilizando lectinas marcadas (Tazaki, 1997), ou de forma indireta através da aplicação de técnicas imunológicas. Lectinas radioativamente marcadas e lectinas conjugadas são reagentes sensíveis e específicos para detecção de glicoproteínas e outros glicoconjugados presentes em diferentes substratos (Szöke *et al.*, 2007; Thöm *et al.*, 2007; Beltrão *et al.*, 2003).

Lectinas têm sido utilizadas em Histologia e Patologia como ferramentas em ensaios citoquímicos, histoquímicos ou imunohistoquímicos para localização de glicoconjugados em diferentes tecidos animais (Franceschini *et al.*, 2000), para detecção e caracterização de resíduos glicosilados e diferentes composições de glicoconjugados na superfície de células e tecidos humanos e animais, relacionadas a muitos estágios fisiológicos e patológicos distintos (Fiedler *et al.*, 2007; Hemmoranta *et al.*, 2007; Szöke *et al.*, 2007; Thöm *et al.*, 2007; Babál *et al.*, 2006; Beltrão *et al.*, 2003; Barou *et al.*, 2002; Pardini *et al.*, 2002; Meyer *et al.*, 2000). 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), como inflamação e alterações associadas à neoplasia (Brinck *et al.*, 1998).

As lectinas são também úteis na medicina forense, caracterizando patologias cerebrais (Ulfig *et al.*, 2004), auxiliando na investigação, prognóstico ou diagnóstico de patologias cerebrais em circunstâncias de pós-morte em seres humanos (Arendash *et al.*, 2007; Uryu *et al.*, 2007; Ishikawa *et al.*, 2006; Ulfig *et al.*, 2004; Lefebvre *et al.*, 2003; Minnasch *et al.*, 2003; Nishi *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2002; Ng'walali *et al.*, 2002; Nishimura *et al.*, 2000; Cummings *et al.*, 1992) e em animais (Medina-Flores *et al.*, 2004;).

1.1.9 Purificação

Devido à amplitude de propriedades e aplicações, lectinas têm sido purificadas por métodos convencionais que se baseiam nos seus aspectos moleculares gerais, como proteínas que são, e seus aspectos particulares, como um grupo de proteínas com afinidade por carboidratos e glicoconjugados.

O primeiro passo no processo de purificação de lectinas, em especial aquelas de origem vegetal, é a extração dessas proteínas em solução salina (Kawagishi *et al.*, 2001) ou solução tampão (Trigueros *et al.*, 2003). Tal solução é misturada ao triturado do vegetal de forma a constituir um extrato com concentração determinada. O material é submetido à extração em período de tempo e condições de temperatura definidos, sob agitação constante. O método de extração utilizando tais soluções resulta num aumento de solubilidade das proteínas do triturado e, portanto, é um passo importante ao processo de purificação protéica. O material extraído é filtrado e o extrato sobrenadante é centrifugado em centrífuga refrigerada para obtenção do extrato bruto, livre do triturado.

Após extração dessas moléculas, em geral é procedida purificação parcial utilizando o método de precipitação protéica por fracionamento salino com sulfato de amônio (Elifio *et al.*, 2000); tal processo baseia-se na separação de moléculas de acordo com suas diferenças de solubilidade. A precipitação utilizando sais neutros é possível porque estes sais, em função de

sua força iônica, afetam a solubilidade de proteínas globulares; em concentrações reduzidas, eles aumentam a solubilidade de proteínas (salificação, ou *salting in*), mas quando a força iônica é aumentada, há uma redução da solubilidade protéica e estas podem chegar a ser quase completamente precipitadas (dessalificação, ou *salting out*); proteínas precipitadas são capazes de manter sua conformação nativa e podem ser dissolvidas sem sofrer desnaturação (Lehninger, 1976). Assim, diferentes fracionamentos são procedidos para purificação parcial de várias lectinas presentes num extrato, já que proteínas diferentes apresentam reações diferentes em resposta a concentrações salinas.

As lectinas parcialmente purificadas são geralmente submetidas ao processo de diálise exaustiva (Plumer, 1978) em membranas seletivas, método baseado na separação de moléculas por diferenças de peso molecular; as proteínas ficam retidas enquanto que moléculas menores - como carboidratos ou sais - presentes na amostra passam para a solução solvente no exterior da membrana.

Geralmente as últimas etapas de isolamento, após extração e precipitação salina, consistem no emprego de técnicas cromatográficas. Há uma variedade de tais métodos úteis para purificação de lectinas, entre eles, a cromatografia por troca iônica (Wang *et al.*, 2003), a cromatografia por exclusão molecular e cromatografia por afinidade (Candy *et al.*, 2003). Alguns protocolos de purificação podem combinar os três métodos cromatográficos para a purificação total da lectina (Wang; Ng, 2003a).

A cromatografia por troca iônica possui uma fase estacionária altamente carregada à qual, solutos ou moléculas (como proteínas) com carga de sinais contrários a esta são seletivamente adsorvidas da fase móvel. As moléculas adsorvidas podem então ser eluídas, por deslocamentos com outros íons, com o mesmo tipo de carga, porém com maior força de interação com a fase estacionária. Este método de separação baseia-se na adsorção reversível e diferencial dos íons da fase móvel pelo grupo trocador da matriz; essa diferença de afinidade

se deve a diferenças de carga, e pode ser controlada por fatores como pH e força iônica (Spadaro, 1997). A cromatografia por troca iônica está associada à purificação de lectinas, tais como a de *Viscum album* (Peumans *et al.*, 1996), e a de *Hevea brasiliensis* (Wititsuwannakul *et al.*, 1998); esse método cromatográfico permite também a separação de isoformas de preparações lectínicas, pela utilização de gradiente salino crescente (Mishra *et al.*, 2004).

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 à celulose como trocador (Spadaro, 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.

A técnica cromatográfica de exclusão molecular, também conhecida como filtração em gel, permeação em gel, ou peneira molecular de fusão restrita, promove uma distribuição seletiva e dinâmica das moléculas entre fases líquidas distintas e dependentes de uma estrutura estacionária composta por poros de tamanho controlado. Esse tipo de cromatografia, quando aplicada a uma série homóloga de polímeros, tais como lectinas e misturas de proteínas, tendo densidade e formas semelhantes é um método importante que pode, de forma rápida e útil, determinar a massa molecular (Cavada *et al.*, 1998; De Simone *et al.*, 1994) e a forma destas macromoléculas, permitindo purificá-las (Freire *et al.*, 2002; Cavada *et al.*, 1998) e também defini-las como estruturas mono, di, tri ou tetraméricas, quando os resultados são comparados a corridas eletroforéticas (Kawagishi *et al.*, 2001). Uma matriz de exclusão molecular é composta por um gel constituído de macromoléculas que têm ligações cruzadas, com afinidade pelos solventes, mas que neles são insolúveis. As partículas estacionárias compõem um gel com características de inércia química, estabilidade e baixo teor de íons. O

espaço entre as partículas é ocupado pelo líquido que flui pelo material levando, ou não, as substâncias a serem separadas. A fase estacionária controla o movimento das substâncias que por ela passam, variando suas velocidades e promovendo a separação (Rothschild, 1997).

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 (ou seja, um 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 (Spadaro; Fonseca, 1997). Seu tratamento com substâncias químicas produz ligações cruzadas nas cadeias polissacarídicas, fornecendo um material que, em água, produz um gel com estrutura tridimensional (Rothschild, 1997), útil para sua utilização em processos de purificação de lectinas.

O princípio da cromatografia por bioafinidade (ou biosseletividade) baseia-se no isolamento seletivo de macromoléculas biológicas, pela utilização das propriedades dessas moléculas de se ligarem de forma reversível a ligantes específicos. Esses ligantes são covalentemente imobilizados à matriz, promovendo uma fase estacionária seletiva. A amostra é aplicada à coluna; as moléculas sem afinidade passam sem ligar à matriz, enquanto as moléculas específicas para o mesmo são retidas. Estas podem ser eluídas pela alteração de pH e/ou força iônica do meio, que tornam o complexo molécula-ligante menos estável levando à dissociação do mesmo, ou ainda pelo emprego de substâncias com maior afinidade ao ligante (Spadaro; Fonseca, 1997). No caso de purificação de lectinas, o ligante a ser imobilizado é um carboidrato ou um glicoconjugado específico. Em alguns tipos de matriz, o ligante não precisa ser imobilizado, pois já se caracteriza pela própria matriz como é o caso do Sephadex, um biopolímero produzido pela ação bacteriana sobre a sacarose.

Vários suportes podem ser úteis em cromatografia de afinidade, como a matriz de celulose, a matriz de gel de guar (ou guaran), a agarose, a Sepharose e o dextrano. Essas matrizes têm sido amplamente utilizadas como processo de purificação de muitas lectinas, tais como o Sephadex (Bazil; Entlicher, 1999; Gupta; Srivastava, 1998; Moreira *et al.*, 1997) para lectinas com afinidade por glicose/manose, o gel de guar (Coelho; Silva, 2000; Cavada *et al.*, 1998; Sampaio *et al.*, 1998a), e a Sepharose (Candy *et al.*, 2003; Arreguín-Espinosa; Arreguín-Lozano, 1997) ambas para lectinas galactose específicas também para lectinas com afinidade por galactose. Algumas lectinas são ainda purificadas em suportes de afinidade contendo glicoconjugados específicos imobilizados, como as lectinas de *Ulva lactuca* (Sampaio *et al.*, 1998b) e de *Castanea crenata* (Nomura *et al.*, 1998).

1.1.10 Caracterização

A caracterização de lectinas envolve, entre outros métodos, o ensaio de hemaglutinação, utilizado para detecção e útil para caracterizá-las quanto à especificidade dentro do sistema ABO ou entre eritrócitos de animais. Ensaio de atividade hemaglutinante e de inibição por carboidratos e/ou glicoconjugados são excelentes meios de caracterização lectínica, promovendo a descoberta da especificidade de ligação a eritrócitos (Nagai *et al.*, 1999) a mono, di ou oligossacarídeos e quanto à capacidade de interação da lectina a outras moléculas como glicoproteínas, glicolipídeos ou polissacarídeos (Machuka *et al.*, 1999; Gupta; Srivastava, 1998; Moreira *et al.*, 1998; Yamaguchi *et al.*, 1998), contribuindo para a determinação do suporte de afinidade ideal para a sua purificação.

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 (Sampaio *et al.*, 1998a). Muitas lectinas são metaloproteínas; precisam de cátions divalentes tais como Ca^{2+} e Mn^{2+} para exibir atividade.

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 altíssima* (Moreira *et al.*, 1997) e a lectina de *Pitilota filicina* (Sampaio *et al.*, 1998a).

O teste de temperatura para determinação da estabilidade protéica constitui outro passo na caracterização. Algumas lectinas são termossensíveis, e outras, termoestáveis; isso significa que tais proteínas têm sua atividade biológica otimizada em determinadas temperaturas e ausente em temperaturas desfavoráveis à manutenção da estrutura nativa. Algumas lectinas apresentam uma atividade acentuada, depois de submetidas a temperaturas relativamente altas (Correia; Coelho, 1995); outras lectinas, como a lectina do líquen *Dictyonema glabratum* (Elifio *et al.*, 2000) e a lectina do fungo *Polyporus adusta* (Wang *et al.*, 2003), apresentam uma perda gradual desde temperaturas relativas até a perda total em valores mais elevados, ou mesmo são extremamente sensíveis, perdendo totalmente a atividade em temperaturas relativamente baixas (55 °C, Jung *et al.*, 2007; 50 °C, Kawagishi *et al.*, 2001).

Lectinas podem ser estáveis dentro de diferentes soluções com valores de pH variáveis, como é observado para as lectinas dos fungos *Mycoleptodonoides aitchisonii* (Kawagishi *et al.*, 2001) e *Ganoderma capense* (Ngai; Ng, 2004), ativas em valores de pH variando de 4 a 9 e de 4 a 11, respectivamente; esta é uma avaliação importante, uma vez que estas proteínas devem ser mantidas em soluções que apresentem condições ideais a sua manutenção nativa e conseqüente utilização nos diferentes experimentos a que podem ser submetidas. As proteínas em geral podem sofrer desnaturação em pH desfavorável. Por isso, o conhecimento do comportamento da molécula frente à variação do pH pode ser determinante para a purificação e estabilização de uma lectina.

Técnicas eletroforéticas (Laemmli, 1970; Davis, 1964; Reisfeld *et al.*, 1962) que servem para indicar basicidade ou acidez de uma lectina, assim como para determinar sua estrutura quanto ao número de subunidades, massa molecular (Rego *et al.*, 2002) ou ainda para caracterizá-la como uma glicoproteína (Coelho; Silva, 2000), são importantes na caracterização lectínica. Outro importante método eletroforético, é o método de eletrofocalização ou focalização isoeletrica, útil para determinar o ponto isoeletrico da proteína de interesse.

A cromatografia de filtração em gel aliada à eletroforese permite caracterizar bem as lectinas em homotetrâmeros (Kawagishi *et al.*, 2001), trímeros, dímeros de subunidades idênticas (Mo *et al.*, 2000) ou não, ou monômeros (Banerjee *et al.*, 2004). Muitos outros métodos e ensaios, tais como a imunodifusão, a difusão dupla, e especialmente o seqüenciamento aminoacídico também são ferramentas importantes na caracterização de lectinas; o seqüenciamento expõe informações valiosas sobre a estrutura e função das moléculas, avalia a pureza e a concentração protéica, é capaz de detectar erros na sua formação e modificações estruturais, servindo também de base para o entendimento de outras questões, incluindo aquelas ligadas à evolução das espécies de onde as diferentes lectinas são isoladas.

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 (Candy *et al.*, 2003; Trigueros *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 cromatografia líquida de alta resolução em fase reversa (HPLC-RP) constitui um meio útil de obter lectinas puras que já tenham sido pré-purificadas, de estimar

massas moleculares, caracterizar e fracionar proteínas e peptídeos muito semelhantes. A cromatografia líquida de alta resolução (FPLC) tem sido amplamente utilizada como um passo final de purificação mais refinada 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 puras, para separar estruturas em subunidades, assim como determinar se essas moléculas são monoméricas ou não (Wang *et al.*, 2001).

A cristalografia, outra ferramenta de caracterização molecular, permite estudar a estrutura quaternária de lectinas verificando o arranjo de seus domínios, como se comportam nas interações e levantar questões relacionando tais estruturas com a função e evolução molecular (del Sol *et al.*, 2005). O estudo molecular através de simulações de dinâmica permite avaliar de maneira mais refinada a influência de íons divalentes e interações eletrostáticas específicas (ou seja, pontes de hidrogênio e interações eletrostáticas) ou não específicas (como interações de van der Waals) sobre a determinação de interação com ligantes e a intensidade e estabilidade dessas interações (Konidala; Niemeyer, 2007). Essas duas formas de caracterização molecular trazem informações sobre a adaptabilidade e flexibilidade das lectinas.

1.2 OS LIQUENS

1.2.1 Constituição e Denominação

Os líquens são organismos simbiontes e mutualistas que resultam da associação entre uma ou mais espécies de algas, fotobiontes, e uma espécie de fungo, micobionte (Harksworth; Hill, 1984). As algas que compõem a associação líquênica são unicelulares, clorofíceas ou cianofíceas. Em torno de 20 % das espécies fúngicas bem conhecidas são formadoras de líquens; dentre elas, a maioria pertence aos ascomicetos (98 %), e algumas poucas espécies

são deuteromicetos (1,6 %) e basidiomicetos (0,4 %) (Raí; Bergman, 2002; Alexopoulos; Mims, 1979; Xavier-Filho; Rizzini, 1976). Num talo líquênico, encontram-se camadas sucessivas de alga e fungo; o córtex superior é composto por hifas entrelaçadas que protegem a camada gonidial formada por algas. A terceira camada, a medula, é formada por um feixe de hifas frouxas e, logo abaixo, está o córtex inferior, formado por outro feixe de hifas (Nash, 1996).

Esse tipo de associação entre organismos é dito mutualista, benéfica para ambos os seres constituintes. Em geral, cada membro de uma associação mutualista é especializado para executar uma função complementar ao outro. No líquen, uma alga fotossintética se junta ao fungo e pode obter nutrientes de substratos difíceis, tais como cascas de árvores ou superfícies rochosas (Ricklefs, 1996). Os líquens são capazes de fixar alimentos do ar atmosférico e absorver sais minerais de substratos, para sua alimentação.

Em geral, as espécies fotobiontes formadoras de líquens são poucas, podendo uma mesma alga ser encontrada constituindo vários líquens diferentes. No entanto, para cada líquen há uma espécie de fungo e, por isso, a classificação desses organismos é baseada no micobionte constituinte. As características observadas para a classificação são o talo líquênico e os órgãos reprodutivos.

Os organismos líquênicos são amplamente distribuídos por todo o mundo; eles são capazes de suportar condições climáticas severas, mas também são extremamente sensíveis à poluição atmosférica sendo bem conhecidos como bio-indicadores.

Espécies líquênicas despertam interesses de muitos pesquisadores por suas contribuições para o estudo da qualidade do ar, como também pelo fato de que seus extratos e preparações contêm componentes que apresentam várias atividades, tais como antioxidante (Behera *et al.*, 2006; Halici *et al.*, 2005; Odabasoglu *et al.*, 2005) e antibacteriana (Behera *et al.*, 2008; Gulluce *et al.*, 2006), antifúngica (Manojlovic *et al.*, 2005), antimicrobiana (Saenz

et al., 2006; Pereira *et al.*, 1991), antiinflamatória (Muhammad *et al.*, 2005), anti-ulcerogênica (Bayir *et al.*, 2006; Odabasoglu *et al.*, 2006), imunomoduladora (Omarsdottir *et al.*, 2007; Omarsdottir *et al.*, 2006; Olafsdottir *et al.*, 2003) e mitogênica (Omarsdottir *et al.*, 2005), anti-mitótica e anti-proliferativa (Bucar *et al.*, 2004; Campanella *et al.*, 2002), citotóxica (Bézivin *et al.*, 2003; Nascimento *et al.*, 1994), antitrombótica (Kim; Lee, 2006) e anticoagulante (Martinichen-Herrero *et al.*, 2005a; Martinichen-Herrero *et al.*, 2005b), dentre outros efeitos. No entanto, poucos princípios ativos de origem líquênica já foram isolados e caracterizados.

1.2.2 O Gênero *Cladonia* e a Espécie *Cladonia verticillaris*

A espécie *Cladonia verticillaris* (Figura 4) é classificada dentro do Reino Fungi, Divisão Eumycota, Subdivisão Ascomycotina, Ordem Lecanorales, Família Cladoniaceae, Gênero *Cladonia*.



Figura 4 – Espécie *Cladonia verticillaris*.

C. verticillaris é um líquen autóctone; é encontrado em quantidade abundante sobre os solos arenosos de tabuleiros costeiros no Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil, como também em outras regiões mundiais. Esse líquen tem sido utilizado como uma espécie

biomonitora para detecção de poluentes atmosféricos (Mota Filho *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2007; Villarouco *et al.*, 2007).

Dentre as substâncias produzidas nos líquens pela simbiose, há depsídios, depsidomas, dibenzofuranos e ácido úsnico. Alguns destes produtos originados do metabolismo secundário dos líquens, possivelmente desempenham um papel importante na sua fisiologia, além do papel de defesa característico (Yano-Melo *et al.*, 1999). Sessenta e cinco espécies do gênero *Cladonia* foram analisadas quanto à composição em ácidos aromáticos; um número significativo desses organismos apresentou alto teor do ácido fumarprotocetrárico aromático; *C. verticillaris* apresenta uma proporção relativa desse ácido, de 79,9/95,7% (Huovinen *et al.*, 1990) e de 78,57% em extração total (Yano-Melo *et al.*, 1999). Esse ácido é considerado um metabólito secundário biologicamente ativo e presente em diferentes espécies de líquens, com atividade antimicrobiana (Yılmaz *et al.*, 2004) e, em *C. verticillaris*, efeito alelopático (Yano-Melo *et al.*, 1999). Outras propriedades, tais como a atividade antitumoral e citotóxica, também têm sido atribuídas a esse ácido e estão sob avaliação em laboratórios de pesquisas. Vários líquens pertencentes à família Cladoniaceae têm apresentado extratos com atividade citotóxica (Nascimento *et al.*, 1994). Extratos e frações de *C. verticillaris* foram avaliados contra o sarcoma-180, apresentando efeito antitumoral sobre o crescimento de tumores; os resultados indicaram que a atividade antitumoral é influenciada pela sazonalidade e que o material coletado no período mais seco contém maior teor de princípios ativos antitumorais (Santos, 1996).

1.2.3 Lectinas de Líquens

Em relação à sua ampla distribuição, as lectinas podem ser encontradas e isoladas de organismos liquênicos (Elifio *et al.*, 2000; Molina; Vicente, 2000; Ingram, 1982; Lockhart *et al.*, 1978; Howe; Barrett, 1970).

As primeiras pesquisas relacionadas à detecção de lectinas em espécies de líquens foram iniciadas por Estola e Vartia (1955); estes pesquisadores utilizaram 100 espécies e observaram que apenas 8 destas apresentavam atividade lectínica, 6 das quais pertencentes ao mesmo gênero. Em seguida, Barret e Howe (1968) avaliaram extratos salinos de líquens e verificaram que 22 espécies de gêneros diferentes apresentaram atividade hemaglutinante e que não mostraram especificidade para os vários tipos de eritrócitos testados. Em 1970, estes mesmos autores conseguiram isolar uma lectina de líquen, inespecífica para um tipo sanguíneo. Desde então vem crescendo o interesse quanto ao isolamento de lectinas presentes em espécies liquênicas, organismos estes que apresentam inúmeras atividades biológicas já avaliadas.

As pesquisas objetivando purificar lectinas de líquens continuaram e, em 1978, Lockhart *et al.* observaram que as espécies *Peltigera canina* e *P. polydactyla* apresentavam lectinas, as quais pareciam estar envolvidas no processo de estabelecimento da associação simbiótica entre fungo e alga. Desde então, outras lectinas têm sido isoladas de espécies de líquens (Elifio *et al.*, 2000; Molina; Vicente, 2000; Kardish *et al.*, 1991; Petit *et al.*, 1983; Ingram, 1982; Petit, 1982) e têm contribuído para o esclarecimento do seu papel na relação de simbiose destes organismos.

No entanto, lectinas de líquens não são frequentemente purificadas; em geral, quando purificadas, elas são avaliadas estruturalmente ou mesmo a respeito de suas potenciais funções orgânicas, mas poucas aplicações biológicas e tecnológicas têm sido descritas para essas moléculas de natureza exótica. O envolvimento dessas moléculas no estabelecimento da simbiose vem sendo estudado e sugerido por alguns autores como sendo seu possível papel fisiológico nestes organismos (Elifio *et al.*, 2000; Molina; Vicente, 2000; Kardish *et al.*, 1991; Petit *et al.*, 1983; Petit, 1982; Lockhart *et al.*, 1978).

1.3 AS LEGUMINOSAS

1.3.1 Generalidades

A família das leguminosas (Leguminosae) representa o terceiro maior grupo de plantas superiores, perdendo em número de espécies apenas para as famílias das Orchidaceae e Compositae. As leguminosas são conhecidas principalmente por serem produtoras de grãos, muitas delas com extrema importância para a economia, como o amendoim, a lentilha, os feijões, o grão de bico, a ervilha, a fava, a soja, entre outros. Esses vegetais têm grande representação para a alimentação, porque constituem uma base alimentar bastante rica em carboidratos (necessários para a produção de energia para o corpo assim como para o bom funcionamento do sistema nervoso), proteínas (responsáveis pela constituição de tecidos e órgãos) e outros compostos importantes para a manutenção da saúde, como o ferro, as vitaminas e as fibras.

Além de suas propriedades nutricionais e medicinais, que conferem a exploração de seus produtos renováveis, como óleos, sementes e frutos, as leguminosas são amplamente exploradas também devido à produção de madeiras nobres ou com valor comercial, como o pau-brasil (*Caesalpinia echinata*), angelim vermelho (*Dinizia excelsa*), angico, jacarandá do Pará (*Dalbergia paraense*) e cedrorana (*Cedrelinga catenaeformis*). As plantas pertencentes à família das Leguminosae representam um dos principais recursos utilizados como fonte de descobertas de novas proteínas, tais como as lectinas. Hoje existe um amplo conhecimento sobre lectinas provenientes das leguminosas, em caráter funcional (Bezerra *et al.*, 2007) e estrutural (Moreno *et al.*, 2008; del Sol *et al.*, 2007; Garcia-Pino *et al.*, 2006).

1.3.2 O Gênero *Bauhinia* e a Espécie *Bauhinia monandra*

As Bauhinias foram assim denominadas pelo botânico francês Charles Plumier, em homenagem aos irmãos Johann Bauhin e Caspard Bauhin, dois importantes botânicos suícos

do século XVI; conhecidas por muitos nomes vulgares, como asas de anjo, flor borboleta, pata de vaca, orquídea dos pobres, pluma de Napoleão, as Bauhinias são plantas arbustivas cujas folhas bilobadas e arredondadas constituem uma característica marcante das espécies.

Algumas espécies do gênero *Bauhinia* apresentam propriedades interessantes que vêm sendo avaliadas. Por exemplo, *B. variegata* produziu efeito antitumoral sobre linfoma ascítico de Dalton em ratos albinos suíços (Raj Kapoor *et al.*, 2003), *B. forficata* foi capaz de atuar como hipoglicemiante em ratos normais e em ratos com diabetes induzida (Silva *et al.*, 2002), assim como apresentou efeito antidiabético em ratos (Pepato *et al.*, 2002) e *B. megalandra* mostrou propriedade de redução da absorção intestinal de glicose (Mujica *et al.*, 2003). Essas atividades biológicas têm posto o gênero *Bauhinia* em destaque como plantas popularmente conhecidas com potencial medicinal contra alguns tipos de câncer e, especialmente, com poder curativo da hiperglicemia e diabetes.

A espécie *Bauhinia monandra* (Figura 5) é classificada dentro do Reino Plantae, Divisão Magnoliophyta, Classe Magnoliopsida, Ordem Fabales, Família Fabaceae, Subfamília Caesalpinioideae, Tribo Cercideae, Gênero *Bauhinia*. *B. monandra* (e também *B. variegata* e *B. forficata*) é hoje amplamente utilizada pela medicina popular; suas folhas são conhecidas por possuírem ações antioxidante (Argolo *et al.*, 2004), hipoglicemiante, diurética e no emagrecimento e, por isso, são adotadas na alimentação diária de muitas pessoas, sob a forma de chá.



Figura 5 – Folhas, flores e vagens da espécie *Bauhinia monandra*.

1.3.3 A Lectina de *Bauhinia monandra*

Uma lectina galactose específica, denominada BmoLL, foi isolada das folhas de *B. monandra* em quantidades de miligramas (300 mg/kg) (Coelho; Silva, 2000); estudos estão sendo procedidos para avaliar a sua ação hipoglicemiante, sendo de grande importância o conhecimento mais aprofundado de suas características estruturais e seu potencial de ligação a superfícies celulares de tecidos diferenciados. O comportamento interfacial de BmoLL e sua interação com monocamadas lipídicas são aspectos estruturais que têm sido estudados por medidas de tensão superficial (Rosilio *et al.*, 2004); BmoLL também tem sido avaliada quanto às suas propriedades dielétricas em monocamadas (Andrade *et al.*, 2005 parte I) e em monocamadas misturadas com fosfolipídeos (Andrade *et al.*, 2005 parte II). Além de seu estudo estrutural, BmoLL também tem sido aplicada em ensaios biológicos apresentando atividade inseticida contra diferentes insetos (Macedo *et al.*, 2007). Esta lectina revelou ainda ter habilidade para interagir com isolados endofíticos presentes nas folhas de *B. monandra* (Ramos, 2003).

1.4 PROTEÍNAS ANTIMICROBIANAS

As proteínas antimicrobianas, dentre elas as lectinas, prendem o interesse de muitos pesquisadores por elas poderem servir como ferramentas contra infecções fúngicas e bacterianas em organismos vegetais ou mesmo em patologias humanas. Tais proteínas podem ser incorporadas em plantas transgênicas conferindo resistência a estas contra patógenos; as lectinas podem, ainda, servir futuramente como princípios ativos para produção de antifúngicos ou antibacterianos de uso clínico.

1.4.1 Distribuição nos Seres Vivos e nas Classes de Proteínas

Proteínas ou peptídeos com ação antifúngica são ubíquos na natureza e são expressos em diferentes estruturas ou órgãos de muitos vegetais e animais (Ng, 2004). Além disso, essas moléculas são distribuídas em diferentes classes de proteínas, tais como as quitinases (Ye; Ng, 2005; Ye; Ng, 2002b; Young; Byung, 1996), as proteínas tipo-quitinase (Ye; Ng, 2002a), as glucanases, as proteínas tipo-taumatina, as tioninas, proteínas tipo-ciclofilina, as lectinas (Sitohy *et al.*, 2007; Trindade *et al.*, 2006; Wang; Ng, 2003b; Freire *et al.*, 2002; Ye *et al.*, 2001; Ciopraga *et al.*, 1999), as proteínas inativadoras de ribossomo, ribonucleases, desoxirribonucleases, peroxidases e inibidores de proteases (Joshi *et al.*, 1998).

Muitas proteínas e peptídeos têm demonstrado atividade contra fungos, em especial, aqui apresentados exemplos de inibidores de espécies do gênero *Fusarium*. Um exemplo é o inibidor de protease cisteína, uma molécula com 24 kDa isolada de milho que tem forte ação antifúngica contra muitas espécies fúngicas incluindo espécies de *Fusarium* (Joshi *et al.*, 1998).

Alguns outros exemplos são os peptídeos, muito presentes nos organismos e com ação antimicrobiana. Dois peptídeos antifúngicos foram avaliados por Huang *et al.* (2000) e por Duvick *et al.* (1992), um ligador de quitina (de folhas de *Ginkgo biloba*) que exerceu

atividade antifúngica contra *F. graminearum* e *F. moniliforme* dentre outros fungos e outro isolado de milho (com apenas 4 kDa) que exibiu uma ação supressora na germinação de esporos ou na elongação de hifas de *F. moniliforme*, *F. graminearum* e também contra várias bactérias, respectivamente. Ainda entre os peptídeos, dois deles, um com homologia para defensina, isolado de *Vigna sesquipedalis* (Wong; Ng, 2005a), e outro isolado de *Phaseolus lunatus* com apenas 7 kDa, denominado lunatusina (Wong; Ng, 2005b), atuaram ambos contra *F. oxysporum* e outros fungos ou bactérias apresentando um amplo espectro de utilização contra microrganismos.

As quitinases também estão bem representadas entre as macromoléculas antimicrobianas; duas isoformas básicas, b1 (32 kDa) e b2 (22 kDa), purificadas de *Capsicum annuum* mostraram atividade contra *F. oxysporum* e outras espécies de fungos (Young; Byung, 1996). Outras duas proteínas do feijão *P. vulgaris*, uma antifúngica e outra do tipo quitinase (utilizando 300 µg, mais potente que a primeira) apresentaram efeito antifúngico frente a *F. oxysporum* (Ye; Ng, 2002a). Esses mesmos autores identificaram duas quitinases, uma em *Delandia umbellata*, chamada delandina com ação também contra *F. oxysporum* (Ye; Ng, 2002b) e outra (isolada de *Phaseolus mungo*) com efeito sobre *F. solani* e *F. oxysporum*, utilizando 60 µg (Ye; Ng, 2005).

Do mesmo modo que as macromoléculas antifúngicas mostram ampla distribuição na natureza, as proteínas antibacterianas ou peptídeos são encontrados em diferentes organismos; são enzimas ou representam muitos grupos protéicos, tais como as L-aminoácido oxidases ou proteínas presentes em peixes (Kitani *et al.*, 2008; Nagashima, 2003), as crustinas presentes em crustáceos (Smith *et al.*, 2008; Supungul *et al.*, 2008), catelicidinas (Daly *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2005) e fosfolipases A₂ (Nevalainen *et al.*, 2007) ambas presentes em mamíferos, defensinas de fungos, plantas, insetos e animais (Lundy *et al.*, 2008; Zhu, 2008), lectinas tipo-

C presentes em camarões, vieiras (Sun *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2007a) e lectinas de plantas (Santi-Gadelha *et al.*, 2006; Gaidamashvili; van Staden, 2002) entre outras proteínas.

Como exemplo de molécula antibacteriana, a L-aminoácido oxidase de peixe, denominada SSAP, é uma proteína interessante; ela mostrou ser seletiva ao atuar sobre bactérias Gram-negativas, enquanto outras enzimas de seu grupo possuem uma ampla ação contra bactérias Gram-positivas ou Gram-negativas (Kitani *et al.*, 2008). Outro exemplo é a Crustina Pm1, uma isoforma da crustina (proteína do camarão *Penaeus monodon* que foi super expressa em *E. coli*); exibiu efeito antibacteriano contra bactérias Gram-positivas e foi potente inibidora sobre *S. aureus* e *Streptococcus iniae* (Supungul *et al.*, 2008).

Entre as moléculas com ação contra bactérias, os peptídeos são muito bem representados, sendo generosamente encontrados na natureza; dois peptídeos com propriedades antifúngicas (isolados de *Vigna sesquipedalis* cv. e *Phaseolus lunatus*) mostraram também possuir atividade contra bactérias quando avaliados em *E. coli*, *Bacillus megaterium* (Wong; Ng, 2005a), *B. megaterium*, *B. subtilis* (Wong; Ng, 2005b) dentre outras. Kacprzyk *et al.* (2007) obtiveram resultados interessantes ao avaliar a ação de um peptídeo sintético rico em histidina sobre bactérias Gram-negativas e Gram-positivas; os dados provaram que tais peptídeos possuem uma ação contra *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* e *S. aureus* que está relacionada com as condições de acidez. Chen *et al.* (2005) investigando o efeito de β -defensinas humanas, catelicidina LL-37 e lisozima de pele sobre *S. aureus* e *E. coli*, utilizando diferentes condições de pH, concluiu que estas moléculas apresentam um efeito antibacteriano sinergista contra essas bactérias, em condições de acidez.

1.4.2 Lectinas com Ação Antimicrobiana contra *Fusarium* ou Bactérias

A vasta oferta de lectinas hoje comercializadas, assim como as possibilidades de isolamento de novas moléculas biologicamente ativas com potente ação para uso em amplo

espectro, apresenta as lectinas como sendo continuamente avaliadas quanto às várias atividades biológicas, dentre elas, a ação contra microrganismos.

Alguns exemplos de lectinas com atividade antimicrobiana contra os microrganismos utilizados nesse trabalho são citados. Três lectinas, isoladas de sementes de *Talisia esculenta* (Freire *et al.*, 2002), de *Pisum sativum* (Sitohy *et al.*, 2007) e de *Astragalus mongholicus* (Yan *et al.*, 2005) mostraram ser inibidoras do crescimento de *F. oxysporum*; outra lectina, um homodímero com 67 kDa isolada de um feijão (*Phaseolus vulgaris*) possui propriedades antifúngicas com atividade moderada contra *F. oxysporum*, entre outras espécies fúngicas (Ye *et al.*, 2001). A aglutinina de gérmen de trigo (WGA) isolada de uma variedade de *Romanian dihaploid*, mostrou habilidade para inibir o crescimento de duas espécies de *Fusarium* patogênicas, o *F. graminearum* e o *F. oxysporum* (Ciopraga *et al.*, 1999). Outros exemplos são duas lectinas ligadoras de quitina, isoladas a partir de sementes da jaca (*Artocarpus heterophyllus*) e da fruta-pão (*Artocarpus altilis*), que inibiram o crescimento de *F. moniliforme* quando utilizadas em elevada concentração (Trindade *et al.*, 2006).

Com relação a bactérias, algumas pesquisas têm sido realizadas avaliando potenciais efeitos lectínicos; uma lectina do invertebrado marinho *Holothuria scabra*, mostrou um amplo espectro de forte atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Gowda *et al.*, 2008b). A lectina de sementes de *Araucaria angustifolia* também é ativa contra os dois grupos de bactérias (Santi-Gadelha *et al.*, 2006). Duas outras lectinas, tipo C, purificadas de ovos de galinha e ganso, são bactericidas contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (Wellman-Labadie *et al.*, 2008). Gaidamashvili e van Staden (2002) realizaram um estudo utilizando diferentes aglutininas vegetais com o objetivo de avaliar suas possíveis interações com *S. aureus* e *B. subtilis*; eles observaram que as aglutininas de *Hypoxis hemerocallidea* e de *Combretum mkhuzense* foram capazes de agregar células de *S. aureus* (utilizando 4 e 5 µg/ml, respectivamente); outras aglutininas de *C. mkhuzense*,

Kniphofia spp. e *Tulbaghia violacea* agregaram células de *B. subtilis* somente em altas concentrações.

1.5 OS VEGETAIS E SUAS DEFESAS NATURAIS

1.5.1 Defesa Vegetal contra Microrganismos e Animais

Na defesa contra microrganismos, insetos, herbívoros ou em resposta a estresse abiótico, as plantas utilizam-se de seus metabólitos secundários ou de macromoléculas resultantes do metabolismo primário. Acredita-se que as principais funções dos metabólitos secundários seja proteger os vegetais contra o ataque de patógenos ou predadores e também garantir a sobrevivência frente a outros estresses bióticos ou abióticos posteriores (Zhao *et al.*, 2005). Estes metabólitos são, em geral, moléculas de baixo peso molecular como alcalóides, terpenóides, saponinas, iridóides, polifenóis e taninos. Carlini e Grossi-de-Sá (2002) apresentam bem em uma revisão que, entre as muitas proteínas envolvidas nos mecanismos de defesa das plantas, estão as lectinas, as proteínas inativadoras de ribossomo (tipos 1 e 2) (He; Liu, 2003), inibidores de enzimas proteolíticas (inibidores de proteases) (Lalitha *et al.*, 2005) e glicohidrolases (inibidores de α -amilase) (Kluh *et al.*, 2005), arcelinas (encontradas somente nos tipos selvagens de feijão comum, *Phaseolus vulgaris*) (Rougé *et al.*, 1993), quitinases (Fitches *et al.*, 2004), hemilectinas também denominadas quimerolectinas (proteínas do tipo lectinas monovalentes), proteínas tipo canatoxina (ureases, proteínas do tipo hemilectinas) (Stanisçuaski *et al.*, 2005) bem como ureases (Follmer, 2008) e formas modificadas de proteínas de estocagem.

1.5.2 Lectinas com Ação Inseticida

As lectinas, proteínas de ampla distribuição e de origem não imune, apresentam a habilidade de reconhecer variados carboidratos ou outras moléculas glicosiladas

(glicoconjugados) livres ou presentes sobre a superfície celular, através de seus sítios de reconhecimento reversível (Kennedy *et al.*, 1995), distinguem-se na biotecnologia devido a suas muitas aplicações já bem definidas e assim como outras utilizações potenciais que são continuamente avaliadas e estudadas por pesquisadores da área da lectinologia. Muitas lectinas de plantas têm apresentado ação inseticida com efeitos em diferentes estágios de vida dos insetos como nos estágios larval (Coelho *et al.*, 2007; Macedo *et al.*, 2007; Leite *et al.*, 2005; Macedo *et al.*, 2002; Fitches *et al.*, 2001) de ninfa (Bandyopadhyay *et al.*, 2001) e adulto (Sauvion *et al.*, 2004) assim como também na oviposição (Sadeghi *et al.*, 2006), indicando ação inseticida contra representantes das ordens Coleoptera (Sadeghi *et al.*, 2006; Leite *et al.*, 2005; Macedo *et al.*, 2002; Machuka *et al.*, 2000), Homoptera (Dutta *et al.*, 2005; Bandyopadhyay *et al.*, 2001), Hemiptera (Sauvion *et al.*, 2004), Diptera (Kaur *et al.*, 2006), Diptera e Hemiptera (Trigueros *et al.*, 2003), Lepidoptera (Coelho *et al.*, 2007; Fitches *et al.*, 2001), Coleoptera e Lepidoptera (Macedo *et al.*, 2007), Hymenoptera (Couty *et al.*, 2001) dentre outras. *Nasutitermes corniger* são insetos que possuem a habilidade de construir túneis e galerias e, numa condição de estresse pela presença de possíveis substâncias tóxicas, eles podem reagir fechando esses espaços para evitar o contato físico (Su *et al.*, 1982). Desta forma, a possível ação repelente de lectinas frente a esses insetos pode ser avaliada através de um bioensaio específico apresentado por esses autores, que permite a observação do comportamento dos cupins frente à presença de lectinas ou soluções controle (Figura 6a).

Os efeitos das lectinas sobre os insetos como moléculas inseticidas são avaliados geralmente através de bioensaios onde há incorporação da lectina numa dieta artificial oferecida (Kang *et al.*, 1990) (Figura 6b e c). A toxicidade das lectinas parece depender tanto de uma resistência necessária dessas moléculas contra proteínas assimiladoras e degradação proteolítica pelas enzimas digestivas do inseto quanto da sua ligação às estruturas na membrana peritrófica e/ou estruturas quitinosas na região do intestino médio (Coelho *et al.*,

2007; Macedo *et al.*, 2007). A ação inseticida de lectinas ainda é desconhecida, mas é provável que envolva sua ligação às glicoproteínas das células epiteliais do intestino médio; sugere-se que existem vários modos de ação para diferentes lectinas nos níveis celulares (Sauvion *et al.*, 2004), não implicando necessariamente na interrupção da função celular e lise. O mecanismo de ação das lectinas como moléculas tóxicas, pode também estar relacionado às enzimas digestivas e proteínas assimiladoras nas quais as lectinas podem interferir com suas funções, dessa forma inibindo a digestão e absorção e causando a privação nutricional (Coelho *et al.*, 2007; Leite *et al.*, 2005; Eisemann *et al.*, 1994).

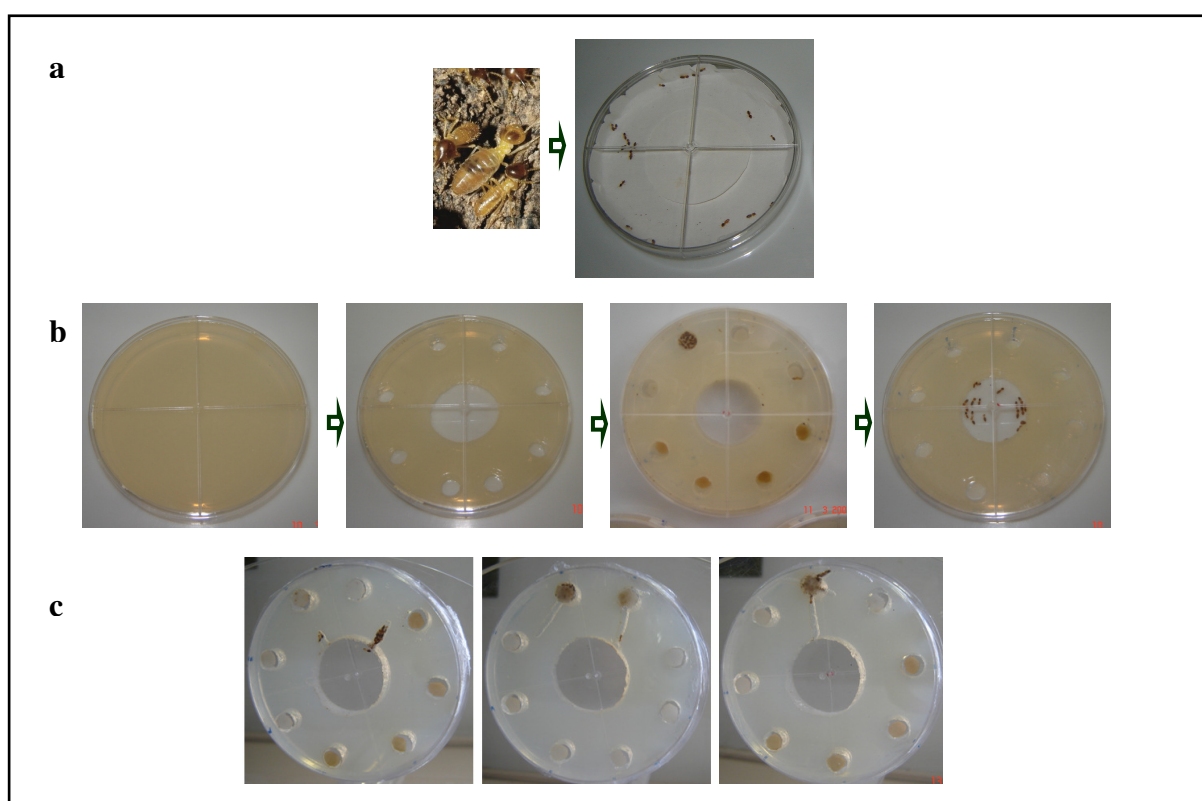


Figura 6 – (a) Bioensaio para avaliação inseticida utilizando cupins submetidos a uma alimentação artificial (papel de filtro embebido com amostra lectínica). (b, c) Bioensaio para avaliação repelente utilizando cupins submetidos ao meio agar 2 %, com perfurações periféricas contendo papél de filtro embebido com amostras protéicas; em (b) montagem do experimento (preparação de placas, perfurações e inclusão de amostras e insetos); em (c) observação de abertura de túneis e galerias pelos insetos, em direção às amostras protéicas).

Geralmente, lectinas N-acetil-D-glicosamina específicas ou com habilidade para ligar à quitina parecem possuir propriedade inseticida; no entanto, as lectinas de origem vegetal com diferentes especificidades para açúcares também têm mostrado habilidade como moléculas inseticidas sugerindo que essa propriedade não é exclusividade de lectinas GlcNAc específicas. Por exemplo, XCL, uma lectina do cogumelo *Xerocomus chrysenteron* que apresenta afinidade para D-galactose e lactose (e uma menor afinidade para N-acetil-D-galactosamina) teve efeito sobre *Drosophila melanogaster* e o afídio da ervilha *Acyrtosiphon pisum* apresentando uma LC₅₀ de 0,4 mg/ml e 0,023 mg/ml respectivamente (Trigueros *et al.*, 2003). Outra lectina da alga vermelha *Gracilaria ornata* denominada GOL (inibida somente por algumas glicoproteínas) causou uma redução significativa na sobrevivência de larvas (em torno de 65 % utilizando 1% (p/p) em relação ao grupo controle, utilizando um bioensaio onde os insetos receberam uma dieta de sementes artificiais. A lectina GOL também afetou de forma significativa o percentual de emergência de insetos adultos em relação ao grupo controle (Leite *et al.*, 2005). Em outra avaliação, Sadeghi *et al.* (2006) utilizando 14 lectinas de plantas (pertencentes a 4 famílias de lectinas) com diferentes especificidades, numa concentração de 0,05% (p/v) em solução, mostraram que todas as lectinas tiveram efeito deterrente na oviposição de *C. maculatus* variando de 36 a 78 %. A lectina isolada das sementes de *Talisia esculenta*, TEL (que tem propriedades de ligação à quitina e que é inibida por manose e glicose) promoveu cerca de 90% de mortalidade de larvas de *Callosobruchus maculatus* e *Zabrotes subfasciatus* com LD₅₀ e ED₅₀ (diminuição de 50% do peso) de cerca de 1% (p/p) para os dois insetos (Macedo *et al.*, 2002).

1.5.3 Mecanismos de Ação Inseticida das Lectinas

Alguns possíveis mecanismos de ação das lectinas para promover a mortalidade de insetos já foram propostos pela literatura; dependendo dos alvos subcelulares da lectina, pode

haver uma diminuição do influxo alimentar através de sua ligação ao epitélio do intestino médio ou à matriz peritrófica (Fitches *et al.*, 1997; Eisemann *et al.*, 1994); a lectina pode também cruzar a barreira epitelial do intestino médio e passar para dentro do sistema circulatório do inseto resultando numa ação tóxica, interferindo com lectinas endógenas envolvidas na autodefesa, presentes na hemolinfa (Fitches *et al.*, 2001); outro mecanismo proposto é que as lectinas podem ser internalizadas pelas vesículas endocitóticas presentes nas células epiteliais e bloquear a localização nuclear e a importação nuclear de proteínas seqüência-dependente, inibindo a proliferação celular (Yu *et al.*, 1999).

1.5.4 A Biotecnologia e os Inseticidas Naturais

Hoje é crescente o interesse biotecnológico e industrial na descoberta de novos pesticidas naturais para promover um controle biológico que evite o impacto ambiental. É nesta concepção que a pesquisa em biotecnologia vem utilizando cada vez mais as ferramentas da genética molecular para criar vegetais transgênicos portadores de genes codificadores de inibidores de enzimas digestivas, inibidores de amilases, peptídeos, lectinas e outras moléculas. Genes que codificam lectinas entomotóxicas vêm sendo amplamente introduzidos na produção de plantas de interesse econômico e vêm rendendo transgênicos menos suscetíveis ao ataque de microrganismos (Prasad *et al.*, 2008) e insetos (McCafferty *et al.*, 2008; Dutta *et al.*, 2005; Ramesh *et al.*, 2004; Hilder; Boulter, 1999; Schuler *et al.*, 1998). Neste sentido, novas lectinas inseticidas podem ser consideradas como possíveis estratégias biotecnológicas para a preservação de espécies em extinção e para a indústria madeireira (visando às madeiras de importância industrial), sendo incorporadas a plantas transgênicas para servir como controle nas pragas de insetos, por exemplo, contra espécies de térmitas parasitas de madeira, causadores de grande prejuízo às madeiras e consumidores em todo o mundo.

1.6 OS CUPINS

1.6.1 Classificação dos *Nasutitermes*

A espécie *Nasutitermes corniger* (Figura 7) está classificada dentro do gênero *Nasutitermes* pertencente à família Termitidae, mundialmente a mais rica família em espécies (somando em torno de 70-75 % de todas as espécies de térmitas catalogadas, encontrados em madeira, grama ou solo) (Inward *et al.*, 2007; Tokuda *et al.*, 1999) dentro da ordem Isoptera, subfamília Nasutitermitinae (que possui 93 gêneros); o gênero é representado por mais de 240 espécies, formando o maior gênero de insetos comedores de madeira da ordem Isoptera (Bergamaschi *et al.*, 2007). Representantes destes insetos podem ser encontrados distribuídos no planeta principalmente nas regiões tropicais.



Figura 7 – Espécie *Nasutitermes corniger*.

1.6.2 Aspectos Gerais e Importância Econômica e Ambiental

Os cupins são insetos essencialmente sociais e extremamente organizados. Vivem geralmente em ninhos que podem ser dos tipos mais diversos, de acordo com as espécies; assim, os cupins podem ser xilófagos (vivendo isolados do solo, em troncos de árvores ou madeiras tratadas), arborícolas (construindo os ninhos em troncos de árvore ou madeira podre,

com comunicação com o solo por galerias superficiais) ou humívoros (cujos ninhos são construídos no chão). Os organismos de um ninho se organizam em castas de forma que cada casta diferente é responsável por desempenhar funções específicas para a manutenção e sobrevivência do ninho como um todo; desta forma, existem os indivíduos alados e reprodutores (temporários) e as castas de indivíduos ápteros sexuados férteis (com função de substituição do rei e da rainha) ou estéreis, os operários (construtores do ninho e responsáveis pela prole e pelo alimento) e soldados (defensores da colônia) ambos podendo ser machos ou fêmeas. Com relação à alimentação, a casta de operários é responsável por manter os reprodutores e soldados nutridos; para isso os cupins realizam a troca de alimentos pela boca, chamado de alimento estomodéico, um líquido claro, utilizado pelos operários para alimentar as outras castas.

No Brasil, podem ocorrer representantes de quatro famílias de cupins: Kalotermitidae (considerados primitivos, não constroem ninhos nem possuem operárias; só atacam e alimentam-se exclusivamente de madeira seca), Rhinotermitidae (são alados, constroem ninhos subterrâneos e atacam plantas vivas ou madeira morta), Serritermitidae (formada por uma única espécie, *Serritermes serrifer*, exclusiva do Brasil) e Termitidae (principal família entre os cupins, alados, construtores de diferentes tipos de ninhos e com hábito alimentar bem diversificado, podendo atacar madeiras, folhas e húmus).

Na família Termitidae destacam-se quatro gêneros, por representarem as principais pragas de mudas no campo; são eles *Cornitermes*, *Syntermes*, *Anoplotermes* e *Nasutitermes*. Essa família é encontrada em todo o Brasil; é muito diversificada e corresponde a 85 % de todas as espécies de térmitas que ocorrem no território brasileiro. Suas espécies são em geral, humívoras; o gênero *Nasutitermes*, no entanto, pode nidificar em raízes de árvores, sobre troncos, sob o solo e também sobre o solo, formando montículos. Os *Nasutitermes* destacam-se também entre os gêneros de maior interesse à economia do homem por causarem prejuízos

elevados nas áreas urbanas e peridomiciliares. A espécie *Nasutitermes corniger* é neotropical, formadora de colônias monogênicas ou poligênicas, com uma ou várias rainhas, respectivamente (Adams *et al.*, 2007) e bem adaptada à área urbana.

Cupins ou térmitas constituem um grande grupo de insetos eusociais. Eles são responsáveis pelo prejuízo causado pelos danos em árvores ou produtos da madeira e em plantações; no entanto, esses insetos também são benéficos do ponto de vista ecológico desde que eles são os maiores responsáveis pela decomposição de celulose, o polímero de carboidrato mais presente no mundo, atuando como biorecicladores na produção de carbono e hidrogênio para o meio ambiente.

Os térmitas possuem a habilidade de digerir a celulose utilizando três tipos diferentes de celulasas (que podem ser de origem endógena ou simbiótica), as endoglucanases, as exoglucanases e as β -glicosidases (Breznak; Brune, 1994); as enzimas de origem endógena são aquelas codificadas por genes do genoma do próprio inseto enquanto que as enzimas de origem simbiótica são aquelas produzidas por simbiontes existentes no intestino posterior (Zhou *et al.*, 2008). Toda a ordem Isoptera é constituída por sete famílias cujos representantes (exceto os da família Termitidae) apresentam protozoários celulolíticos no intestino posterior (Tokuda *et al.*, 1999), sendo a família Termitidae (de acordo com características morfológicas e moleculares) aceita como a família mais recentemente evoluída derivada dos Isoptera (Miura *et al.*, 1998).

1.7 DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS

As doenças neurodegenerativas como a Doença de Alzheimer (DA), de Parkinson, de Huntington, doenças neuromotoras e doenças de Prion envolvem importantes perdas de sinapse e de axônio, antes mesmo do aparecimento dos sintomas e da perda de neurônios (Saxena; Caroni, 2007); no entanto, não está claro ainda até que ponto os processos que levam

à perda axonal e sináptica constituem a principal causa das perdas funcionais nessas neuropatologias.

Alguns fatores parecem ser predisponentes para o desenvolvimento de neuropatologias. Pode-se considerar a mitocôndria como tendo importante papel na função celular, sendo ela a principal fonte de produção de energia na célula e, qualquer defeito na função mitocondrial irá ter papel importante na patofisiologia de doenças, tais como a diabetes, a obesidade, as miopatias e as doenças neurodegenerativas em geral (Nisoli *et al.*, 2008). Dentre as doenças neurodegenerativas, existem evidências com relação às demências de que inflamações cerebrais funcionam como co-fatores essenciais no desenvolvimento dessas doenças, em especial a DA (Evin; Weidemann, 2002); dados sugerem que há também uma estreita ligação entre disregulação lipídica e demência, sendo a hipercolesterolemia considerada como um fator de risco inicial para o desenvolvimento da DA (Dufouil *et al.*, 2005; Pappolla *et al.*, 2003). Há uma preocupação geral em se definir as possíveis formas de se proteger contra o desenvolvimento da DA; nesse sentido, os hábitos de exercícios físicos regulares assim como o exercício mental são sempre ditos como fatores protetores contra a DA. O estabelecimento de uma dieta alimentar adequada também parece atuar como fator na prevenção ou pelo menos no desenvolvimento tardio do início da DA (Florent-Bécharde *et al.*, 2007). Os fatores intrínsecos do indivíduo que estão associados a um risco maior para adquirir a DA, especificamente, incluem uma história familiar da DA, ser portador de outras doenças, tais como hipertensão, doenças cardíacas, doenças cardiovasculares, diabetes, elevada ingestão de álcool e danos cerebrais anteriores (Findeis, 2007).

1.7.1 A Doença de Alzheimer: Aspectos Clínicos e Histopatológicos

DA é uma doença neurodegenerativa caracterizada por demência lenta e progressiva que ocorre ainda no início, podendo estar relacionada à perda neuronal (Kobayashi *et al.*,

1989), à deposição extracelular de placas senis e presença de emaranhados neurofibrilares (NFT) denominados degeneração neurofibrilar (Bonifati; Kishore, 2007) todas essas, provas patológicas da DA (Bonifati; Kishore, 2007; Findeis, 2007; Yoon *et al.*, 2007; Ng'walali *et al.*, 2002).

A DA está entre várias doenças neurodegenerativas e é caracterizada por causar demência de forma lenta e progressiva desde o início da idade adulta. Esta neuropatologia tem sido diagnosticada em todos os países e o número de pacientes tem aumentado de forma exponencial. Estima-se que 5% da população com idade superior a 65 anos apresente a DA, e que a partir desta idade, o número de pacientes dobre a cada 5 anos. Sugere-se que aproximadamente 50 % da população acima de 85 anos sofre deste mal (Florent-Bécharde *et al.*, 2007).

Os principais sintomas de DA são a perda de memória progressiva e o envolvimento de outras funções cerebrais superiores tais como deficiência cognitiva e o funcionamento da linguagem e de funções motoras. Fatores neuropatológicos, representados por perda neuronal e lesões microscópicas, são do tipo deposição extracelular de placas amilóides (ou placas senis) e presença de NFT (Bonifati; Kishore, 2007; Wang *et al.*, 2007b) que podem estar associados à demência na DA. Neurites distróficas, degeneração neuronal, astrócitos e micróglia ativados, em especial ao redor das placas senis, também caracterizam cérebros com DA.

NFT são acúmulos intraneuronais de filamentos helicoidais pareados, constituídos de proteína tau hiperfosforilada de maneira anormal. Já as placas senis são caracterizadas por deposição extracelular de agregados de peptídeo β -amilóide, do tipo A β 1–40 ou A β 1–42 (sendo o último mais neurotóxico, mais agregado e mais envolvido com a DA); o peptídeo pode conter 39 a 42 resíduos de aminoácidos resultantes da clivagem proteolítica da maior proteína precursora de β -amilóide neuronal (amyloid precursor protein - APP), uma proteína

trans-membrana glicosilada; NFT e placas senis são a prova histológica da patologia da DA (Bonifati; Kishore, 2007; Findeis, 2007; Yoon *et al.*, 2007; Ng'walali *et al.*, 2002). No entanto, nem as placas senis nem NFT são evidências inequívocas para responder pela patologia da DA desde que o mesmo padrão de distribuição destes achados histológicos em indivíduos com DA é observado também em indivíduos com síndrome de Down (SD) e, em menor número, em indivíduos não dementes, mas com idade avançada; o papel neuropatológico de ambas as lesões está relacionado às disfunções cognitivas dos indivíduos que apresentam demência (Nishi *et al.*, 2003; Ng'walali *et al.*, 2002). Li *et al.* (2007) enfatizam o significado do peptídeo A β intracelular como sendo uma explicação complementar para a fisiologia neuronal defeituosa e para a perda neuronal na DA. Várias evidências sugerem que o acúmulo do peptídeo A β intraneuronal é um evento inicial na DA associada à disfunção neuronal (Arbel; Solomon, 2007). As mitocôndrias constituem um local de agregação intracelular para o peptídeo A β ; ambos os monômeros e oligômeros do peptídeo A β estão presentes dentro das mitocôndrias; os níveis mitocondriais do peptídeo A β no cérebro com DA podem desempenhar um papel patológico induzindo uma disfunção mitocondrial através de muitos fatores e interações dentre as várias vias de sinalização celular (Wang *et al.*, 2007b).

1.7.2 Origem dos Fatores Neuropatológicos da Doença de Alzheimer

Os carboidratos localizados na superfície das células são encontrados como glicolipídeos ou glicoproteínas na face externa da membrana celular, onde estão envolvidos na maioria dos grandes eventos biológicos e podem servir também como marcadores (Boullanger *et al.*, 2008). As cadeias de carboidratos são modificações co-translacionais ou pós-translacionais sofridas pelas proteínas e podem também ocorrer em formas lipídicas constituindo glicoconjugados. Tais modificações são executadas por ações consecutivas de

glicosiltransferases e outras moléculas celulares. Muitas modificações pós-translacionais, tais como *N*- e *O*-glicosilações, fosforilações, *O*-sulfações de tirosina e ϵ glicações têm sido descritas em APP trans-membrana (Schmitt, 2006).

Cadeias de glicano podem alterar de forma significativa a conformação protéica e, conseqüentemente, podem modular a atividade funcional de uma proteína como também modular as interações proteína/proteína (Geyer; Geyer, 2006). Por exemplo, modificações do tipo *O*-GlcNAc são envolvidas com muitas funções celulares (Kneass *et al.*, 2004; Zachara *et al.*, 2004) e enzimas de adição (*O*-GlcNAc transferase, OGT) e remoção (*O*-glicoproteína 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosidase) de modificações do tipo *O*-GlcNAc apresentam intensa expressão em tecidos cerebrais (Gao *et al.*, 2001; Kreppel *et al.*, 1997). Deste modo, é evidente que tal modificação atua em importantes funções cerebrais.

Modificações do tipo *O*-GlcNAc e fosforilação, quando ocorrem simultaneamente, parecem estar envolvidas com a regulação da participação da proteína tau hiperfosforilada na formação de NFT intracelular (Liu *et al.*, 2004). A proteína tau pertence à família de proteínas cerebrais associadas aos microtúbulos, as quais são envolvidas na polimerização e estabilidade dos microtúbulos neuronais, e podem ser modificadas por fosforilação pós-translacional, glicosilação *N*- e *O*-ligadas, ubiquitinação, glicação, proteólise e outros eventos (Buée *et al.*, 2000). A fosforilação anormal da proteína tau ocorre em algumas doenças neurodegenerativas tais como a DA, e essa forma anormal da proteína tau é o principal componente dos filamentos (previamente citados como NFT) que se acumulam nos neurônios degenerando. Além disso, moléculas de proteína tau de cérebros com DA são glicosiladas com sacarídeos *N*- e *O*-ligados.

A glicosilação final de moléculas celulares é um dos processos chave pelos quais as células modificam suas proteínas e lipídeos constituintes, e podem mudar várias propriedades físicas e químicas, reatividade e funções biológicas dessas moléculas (Babál *et al.*, 2006). Os

glicoconjugados encontrados nas células cerebrais são importantes moléculas de reconhecimento nas interações de mediação célula-célula durante o desenvolvimento do sistema nervoso central (Nishi *et al.*, 2003; Nishimura *et al.*, 2000), atuam como indutores no desenvolvimento e migração de neurônios, na adesão de células neurais e outras funções. Assim, um desequilíbrio no metabolismo glicídico pode deliberar desordens cerebrais resultando em modificações protéicas anormais e pode produzir o acúmulo ou deposição de glicoconjugados no espaço intracelular e/ou na matriz intercelular (Nishimura *et al.*, 2000).

1.7.3 Lectinas como Marcadores em Patologia Forense

As lectinas, através da análise histoquímica, são moléculas capazes de detectar e caracterizar diferentes composições de glicoconjugados na superfície de células e tecidos, detectando a expressão diferenciada dos constituintes, relacionada a muitos estágios fisiológicos e patológicos distintos (Fiedler *et al.*, 2007; Hemmoranta *et al.*, 2007; Szöke *et al.*, 2007; Thöm *et al.*, 2007; Babál *et al.*, 2006; Beltrão *et al.*, 2003; Barou *et al.*, 2002).

A medicina forense está envolvida, dentre muitas tarefas, com a investigação de predisposições do indivíduo a condições fatais em consequência de traumas e doenças. Então, a avaliação de mudanças degenerativas no cérebro é significativa, desde que muitas doenças degenerativas estão intimamente relacionadas a disfunções cerebrais, como o déficit cognitivo e a perda de memória. Dessa forma, os ensaios histológicos e imunohistoquímicos são importantes para investigar ou diagnosticar anormalidades cerebrais e doenças após óbito em humanos (Uryu *et al.*, 2007; Ishikawa *et al.*, 2006; Ulfig *et al.*, 2004; Minnasch *et al.*, 2003; Nishi *et al.*, 2003; Ng'walali *et al.*, 2002; Nishimura *et al.*, 2000; Cummings *et al.*, 1992) e animais (Arendash *et al.*, 2007; Medina-Flores *et al.*, 2004), alguns destes ensaios utilizando lectinas como marcadores. Hoje, o diagnóstico clínico da DA ainda é limitado, necessitando da análise histológica pós-morte do cérebro para um diagnóstico definitivo. A presença de

placas senis, NFT e outras lesões características é que define a DA, pelo menos no estado mais avançado (Findeis, 2007).

A aplicação da histoquímica com lectinas em neuropatologia forense é um método econômico para detectar mudanças degenerativas relacionadas a carboidratos em diferentes regiões do cérebro, tais como depósitos de carboidrato (por exemplo, placas senis e NFT) que são marcadores patológicos predominantes de DA e SD (corpos amiláceos que são relevantes na hipóxia cerebral repetida e dano mitocondrial, depósitos amilóides e outras lesões) e que estão presentes nessas e outras condições neurodegenerativas.

Placas senis e NFT estão presentes no córtex cerebral e hipocampo de algumas pessoas com idade mais avançada, de pacientes com SD e/ou demência do tipo DA. As lesões foram marcadas pelas lectinas PSA (*Pisum sativum* agglutinin), GS-I (*Griffonia simplicifolia* I lectin} e Con A (mas não mostraram reatividade com outras lectinas testadas) não sendo detectadas em tecido de pessoas mais jovens (Nishimura *et al.*, 2000). NFT no córtex cerebral com SD foram fracamente marcadas com WGA, GSI (*Griffonia simplicifolia* agglutinin), GSA-IB4 (*Griffonia simplicifolia* iso agglutinin B4), Con A, e PSA; as placas senis foram marcadas difusamente com essas lectinas, fortemente com Con A e PSA, e moderadamente com WGA e GSA-IB4 (Nishi *et al.*, 2003). Mann *et al.* (1988), estudando a composição oligossacarídica das placas senis e de NFT, observaram que diferentes grupos de lectinas marcaram placas senis e NFT, e que o pré-tratamento com neuraminidase aboliu a marcação de NFT com algumas lectinas (mas não com todas), sugerindo que os oligossacarídeos contribuem de forma diferente com os resíduos de glicoconjugados que formam parte da estrutura das placas senis e NFT. WGA reconheceu a proteína tau e esse reconhecimento foi específico para resíduos GlcNAc *O*-ligados (Lefebvre *et al.*, 2003); outras técnicas confirmaram que proteínas tau humanas são glicosiladas somente com resíduos *O*-GlcNAc. No entanto, *in vivo*, as proteínas tau hiperfosforiladas que se agregam em NFT durante as

doenças neurodegenerativas são destituídas de resíduos *O*-GlcNAc. Liu *et al* (2002), analisando a composição monossacarídica e *blots* específicos de lectina, sugeriram que a proteína tau na DA seja glicosilada principalmente por *N*-ligações, que a glicosilação dessa proteína é uma anormalidade inicial da degeneração neurofibrilar e pode facilitar a sua hiperfosforilação anormal no cérebro com DA.

Além dessas duas lesões, outras características histológicas podem ser observadas, como o material ao redor dos vasos sanguíneos na formação hipocampal. São depósitos amilóides do tipo vascular, encontrados principalmente em pacientes com DA apresentando demência; esses depósitos, também presentes no cerebelo de pacientes com SD, foram fortemente marcados com algumas lectinas (*Ulex europaeus* isolectin I - UEA-I; GS-I; e *Dolichos biflorus* agglutinin - DBA), mas não reagiram com Con A e PSA (Nishimura *et al.*, 2000). Mann *et al* (1992) utilizaram 14 lectinas para analisar diferenças de expressão de sacarídeos nos microvasos cerebrais, em grupos diferentes: pessoas com DA, com SD e pessoas idosas sem quadro demencial; eles observaram aumentos específicos de reatividade em relação às doenças, à idade e às diferentes lectinas utilizadas, sugerindo que podem existir mudanças seletivas relacionadas à doença na membrana basal, que podem se originar da perda de neurônios que inervam os microvasos cerebrais. Essas mudanças podem indicar prejuízos na função e na integridade da barreira cérebro-sangue.

Os corpos amiláceos, encontrados com frequência em doenças neurológicas, reagiram bem com GS-I (lectina específica para galactose e GalNAc), UEA-I (específica para fucose), DBA (específica para GalNAc), *Arachis hypogaea* agglutinin - PNA (específica para Gal-GalNAc) e *Erythrina cristagalli* agglutinin - ECA (específica para Gal-GlcNAc), mas não foram marcados por lectinas específicas para manose (PSA e Con A) (Nishimura *et al.*, 2000).

As lectinas, moléculas com diferentes especificidades para carboidratos, são poderosas armas histoquímicas para uma caracterização detalhada de estágios celulares fisiológicos,

doenças metabólicas e patologias, traçando as mudanças que ocorrem nas células e tecidos. No entanto, o uso de lectinas no estudo da DA (Nishi *et al.*, 2003; Nishimura *et al.*, 2000; Cummings *et al.*, 1992; Mann *et al.*, 1992; Kobayashi *et al.*, 1989; Mann *et al.*, 1988) ainda não é expressivo, considerando as potenciais contribuições que essas moléculas podem trazer para uma melhor compreensão da patologia, colaborando com informações sobre mudanças celulares e teciduais nos processos de glicosilação alterados.

2 JUSTIFICATIVA

Os líquens são organismos estudados em todo o mundo, devido aos seus muitos efeitos biológicos; eles apresentam ação antioxidante, antibiótica, antimicrobiana, antiinflamatória, anti-proliferativa, anti-mitótica, mitogênica, anti-ulcerogênica, antitumoral, imunomoduladora, antifúngica, antitrombótica, anticoagulante e citotóxica (Behera *et al.*, 2008; Omarsdottir *et al.*, 2007; Bayir *et al.*, 2006; Behera *et al.*, 2006; Gulluce *et al.*, 2006; Kim; Lee, 2006; Odabasoglu *et al.*, 2006; Omarsdottir *et al.*, 2006; Saenz *et al.*, 2006; Halici *et al.*, 2005; Manojlovic *et al.*, 2005; Muhammad *et al.*, 2005; Odabasoglu *et al.*, 2005; Omarsdottir *et al.*, 2005; Bucar *et al.*, 2004; Bézivin *et al.*, 2003; Olafsdottir *et al.*, 2003; Campanella *et al.*, 2002; Nascimento *et al.*, 1994; Pereira *et al.*, 1991). A família das Cladoniaceae, o gênero *Cladonia* e a espécie *C. verticillaris* (Figura 4) têm sido avaliados em sua composição química (Yano-Melo *et al.*, 1999; Huovinen *et al.*, 1990) e propriedades biológicas, apresentando atividade citotóxica e antimicrobiana (Nascimento *et al.*, 1994; Pereira *et al.*, 1991); *C. verticillaris* em especial, apresenta propriedade alelopática (Yano-Melo *et al.*, 1999) e antitumoral (Santos, 1996).

C. verticillaris (bem como outras espécies do gênero) é encontrada crescendo de forma abundante em várias regiões do Nordeste do Brasil. A fácil obtenção desta espécie devidamente identificada, assim como o interesse na purificação de lectinas de líquens permitiu o desenvolvimento de parte desse trabalho. A obtenção da lectina do líquen *C. verticillaris* (ClaveLL) por um protocolo relativamente barato e simplificado, rendendo quantidades razoáveis da lectina (aproximadamente 930 mg/kg), estimulou a avaliação dessa proteína em ensaios biológicos de interesse biotecnológico.

Algumas Bauhinias (como a *B. monandra*) são conhecidas pelo uso popular como plantas de poder antidiabético e curativo do câncer. Por isso, algumas delas estão sendo avaliadas e têm apresentado atividade antioxidante (Argolo *et al.*, 2004), antitumoral

(Raj Kapoor *et al.*, 2003), hipoglicemiante (Silva *et al.*, 2002), antidiabética (Pepato *et al.*, 2002), redutora da absorção intestinal de glicose (Mujica *et al.*, 2003) entre outras.

B. monandra, cujo chá das folhas é popularmente utilizado como hipoglicemiante, diurético e emagrecedor, é fonte de isolamento da lectina presente nas folhas, BmoLL (Coelho; Silva, 2000), com provável ação hipoglicemiante, com efeito inseticida (Macedo *et al.*, 2007) e afinidade por endofíticos (Ramos, 2003). A espécie, conhecida como pata de vaca, é amplamente encontrada na região Nordeste e também em outras regiões do Brasil, presente em áreas urbanas como planta ornamental de praças, jardins e vias públicas. Ela é aparentemente resistente ao ataque de pragas, pois em seus tecidos, em geral, não são observados danos causados por herbívoros, insetos ou microrganismos. A avaliação de BmoLL nesse sentido torna-se extremamente atraente e válida cientificamente.

A importância desse trabalho se reflete no uso das lectinas propostas, ClaveLL (*Cladonia verticillaris* lichen lectin) e BmoLL (*Bauhinia monandra* leaf lectin), com três diferentes objetivos: 1- como proteínas com ação antimicrobiana de utilidade para pesquisas e aplicações na área da saúde humana e resistência vegetal; 2- como proteínas inseticidas contra espécies de interesse para a indústria e preservação de espécies; 3- como marcadores histoquímicos para caracterização, estudo e contribuição no diagnóstico da DA através da análise histoquímica de hipocampus. O trabalho encontra diretrizes quanto à ampla utilização de lectinas, por suas propriedades características, como ferramentas em biologia molecular e produção de plantas transgênicas resistentes a fitopatógenos, microrganismos e insetos (McCafferty *et al.*, 2008; Prasad *et al.*, 2008; Dutta *et al.*, 2005; Ramesh *et al.*, 2004; Hilder; Boulter, 1999; Schuler *et al.*, 1998) e como ferramentas histoquímicas para o estudo, caracterização, prognóstico ou diagnóstico de tecidos humanos normais, com transformações benignas ou malignas (Ulfig *et al.*, 2004; Basu *et al.*, 2003; Nischi *et al.*, 2003; Kunstfeld; Petzelbauer, 2001; Brinck *et al.*, 1998; Danguy *et al.*, 1998; Kabir, 1998;).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Purificar e caracterizar uma lectina presente no líquen *C. verticillaris* (ClaveLL), purificar uma lectina presente em folhas de *B. monandra* (BmoLL, através de um protocolo pré-estabelecido), bem como avaliar ClaveLL e BmoLL quanto às suas propriedades biotecnológicas, como lectinas com ação antimicrobiana e inseticida e aplicáveis na histoquímica de patologias cerebrais.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Purificar as lectinas ClaveLL e BmoLL através de métodos de extração, precipitação protéica e cromatografia;

Com *C. verticillaris*:

- Quantificar a presença protéica nas preparações obtidas do líquen;
- Determinar a presença lectínica nas preparações através de ensaios de AH e de inibição da AH;
- Caracterizar a lectina purificada através de métodos cromatográficos de elevada resolução utilizando os sistemas de FPLC e HPLC;
- Caracterizar a lectina através de ensaios de AH com variação de temperatura, pH, presença de íons ou carboidratos;
- Avaliar a interação com outras macromoléculas através de ensaios de AH utilizando glicoconjugados, difusão radial e colunas de afinidade (utilizando amostras pré-purificadas);
- Avaliar o perfil eletroforético da lectina e seu possível caráter glicoprotéico.

Com as lectinas ClaveLL e BmoLL:

- Avaliar a interação lectínica com células bacterianas, bem como sua atividade antibacteriana utilizando diferentes metodologias;
- Avaliar a possível atividade antifúngica contra diferentes espécies do gênero *Fusarium*;

- Avaliar potenciais atividades repelente e inseticida contra cupins da espécie *Nasutitermes corniger*;
- Avaliar as lectinas como marcadores histoquímicos com potencial afinidade por degenerações histopatológicas típicas da doença de Alzheimer e como moléculas úteis para a observação e estudo das histopatologias.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, ES; Atkinson, L; Bulmer, MS. Relatedness, recognition errors, and colony fusion in the termite *Nasutitermes corniger*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, v. 61, p. 1195–201, 2007.
- Alexopoulos, CJ; Mims, CW. *Introductory micology*, New York, J. Wiley & Sons, 1979, p. 632.
- Al-Mahmood, S; Guimmelly, P; Bonally, R; Delmotte, F; Monsigny, M. *Kluyveromyces bulgaricus* yeast lectins. Isolation of N-acetylglucosamine and galactose-specific lectins: their relation with flocculation. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 263, p. 3930-4, 1988.
- Alpuche, J; Pereyra, A; Agundis, C; Rosas, C; Pascual, C; Slomianny, M-C; Vázquez, L; Zenteno, E. Purification and characterization of a lectin from the white shrimp *Litopenaeus setiferus* (*Crustacea decapoda*) hemolymph. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v. 1724, p. 86-93, 2005.
- Ambrosio, AL; Sanz, L; Sánchez, EI; Wolfenstein-Todel, C; Calvete, JJ. Isolation of two novel mannan- and L-fucose-binding lectins from the alga *Enteromorpha prolifera*: biochemical characterization of EPL-2. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 415, p. 245-50, 2003.
- Andrade, CAS; Baszkin, A; Santos-Magalhães, NS; Coelho, LCB; Melo, CP. Dielectric properties of *Bauhinia monandra* and Concanavalin A lectin monolayers, part I. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 289, p.371-8, 2005.
- Andrade, CAS; Baszkin, A; Santos-Magalhães, NS; Coelho, LCB; Melo, CP. Mixed monolayers of *Bauhinia monandra* and Concanavalin A lectins with phospholipids, part II. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 289, p. 379-85, 2005.
- Andrade, CAS; Correia, MTS; Coelho, LCB; Nascimento, SC; Santos-Magalhães, NS. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 278, p. 435-45, 2004.

- Arbel, M; Solomon, B. Immunotherapy for Alzheimer's disease: attacking amyloid- β from the inside. *Trends in Immunology*, v. 28, p. 511-3, 2007.
- Arendash, GW; Jensen, MT; Salem Jr., N; Hussein, N; Cracchiolo, J; Dickson, A; Leighty, R; Potter, H. A diet high in omega-3 fatty acids does not improve or protect cognitive performance in Alzheimer's transgenic mice. *Neuroscience*, v. 149, p. 286–302, 2007.
- Argolo, ACC; Sant'Ana, AEG; Pletsch, M; Coelho, LCBB. Antioxidant activity of leaf extracts from *Bauhinia monandra*. *Bioresource Technology*, v. 95, p. 229-33, 2004.
- Arreguín-Espinosa, R; Arreguín-Lozano, B. Biochemical properties of hemagglutinins in the mollusk *Pomacea flagellata*. *Biochemistry and Molecular Biology International*, v. 43, p. 1241-51, 1997.
- Astbury, WT; Street, A. X-ray studies of the structure of hair, wool, and related fibres. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, v. 230, p. 75-101, 1932.
- Babál, P; Janega, P; Cerná, A; Kholová, I; Brabencová, E. Neoplastic transformation of the thyroid gland is accompanied by changes in cellular sialylation. *Acta Histochem.*, v. 108, p. 133-40, 2006.
- Babal, P; Russell, LC. Sialic acid-specific lectin-mediated adhesion of *Tritrichomonas foetus* and *Tritrichomonas mobilensis*. *The Journal of Parasitology*, v. 85, p. 33-40, 1999.
- Balzarini, J. Inhibition of HIV entry by carbohydrate-binding proteins. *Antiviral Research*, v. 71, p. 237-47, 2006.
- Bandyopadhyay, S; Roy, A; Das, S. Binding of garlic (*Allium sativum*) leaf lectin to the gut receptors of homopteran pests is correlated to its insecticidal activity. *Plant Science*, v. 161, p. 1025–33, 2001.
- Banerjee, S; Chaki, S; Bhowal, J; Chatterjee, BP. Mucin binding mitogenic lectin from freshwater Indian *Belamya bengalensis*: purification and molecular characterization. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 421, p. 125-34, 2004.

- Barondes, SH. Bifunctional properties of lectins: lectins redefined. Trends in Biochemical Sciences, Amsterdam, v. 13, p. 480-2, 1988.
- Barondes, SH. Soluble lectins: a new class of extracellular proteins. Science, v. 223, p. 1259-64, 1984.
- Barou, O; Mekraldi, S; Vico, L; Boivin, G; Alexandre, C; Lafage-Proust, MH. Relationships between trabecular bone remodeling and bone vascularization: a quantitative study. Bone, v. 30, p. 604-12, 2002.
- Barre, A; Peumans, WJ; Rossignol, M; Borderies, G; Culerrier, R; Van Damme, EJM; Rougé, P. Artocarpin is a polyspecific jacalin-related lectin with a monosaccharide preference for mannose. Biochimie, v. 86, p. 685-91, 2004.
- Barrett, JT; Howe, ML. Hemagglutination and hemolysis by lichen extracts. Applied Microbiology, v. 16, p. 1137-9, 1968.
- Basu, PS; Majhi, R; Batabyal, SK. Lectin and serum-PSA interaction as a screening test for prostate cancer. Clinical Biochemistry, v. 36, p. 373-6, 2003.
- Bayir, Y; Odabasoglu, F; Cakir, A; Aslan, A; Suleyman, H; Halici, M; Kazaz, C. The inhibition of gastric mucosal lesion, oxidative stress and neutrophil-infiltration in rats by the lichen constituent diffractaic acid. Phytomedicine, v. 13, p. 584-90, 2006.
- Bazil, V; Entlicher, G. Complexity of lectins from the hard roe of perch (*Perca fluviatilis* L.). The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, v. 31, p. 431-42, 1999.
- Behera, BC; Verma, N; Sonone, A; Makhija, U. Determination of antioxidative potential of lichen *Usnea ghattensis* in vitro. LWT - Food Science and Technology, v. 39, p. 80-5, 2006.
- Behera, BC; Verma, N; Sonone, A; Makhija, U. Antioxidant and antibacterial properties of some cultured lichens. Bioresource Technology, v. 99, p. 776-84, 2008.

- Beltrão, EIC; Medeiros, PL; Rodrigues, OG; Figueredo-Silva, J; Valença, MM; Coelho, LCBB; Carvalho Jr., LB. *Parkia pendula* lectin as histochemistry marker for meningothelial tumor. *European Journal of Histochemistry*, v. 47, p. 139-42, 2003.
- Beltrão, EIC; Correia, MTS; Figueredo-Silva, J; Coelho, LCBB. Binding evaluation of isoform 1 from *Cratylia mollis* lectin to human mammary tissues. *Appl. Biochem. Biotech.*, v. 74, p. 125-34, 1998.
- Benito, FM; Iglesias, R; Ferreras, JM; Citores, L; Camafeita, E; Méndez, E; Gírbés, T. Constitutive and inducible type 1 ribosome-inactivating proteins (RIPs) in elderberry (*Sambucus nigra* L.). *FEBS Letters*, v. 428, p. 75-9, 1998.
- Bergamaschi, S; Dawes-Gromadzki, TZ; Luchetti, A; Marini, M; Mantovani, B. Molecular taxonomy and phylogenetic relationships among Australian *Nasutitermes* and *Tumulitermes* genera (Isoptera, Nasutitermitinae) inferred from mitochondrial COII and 16S sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 45, p. 813–21, 2007.
- Bergmann, M; Niemann, C. On the structure of silk fibroin. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 122, p. 577-96, 1937.
- Bergmann, M; Niemann, C. On the structure of proteins: cattle hemoglobin, egg albumin, cattle fibrin, and gelatin. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 118, p. 301-14, 1937b.
- 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*, v. 822, p. 19-28, 1998.
- Bezerra, GA; Oliveira, TM; Moreno, FBMB; Souza, EP; Rocha, BAM; Benevides, RG; Delatorre, P; Azevedo Jr., WF; Cavada, BS. Structural analysis of *Canavalia maritima* and *Canavalia gladiata* lectins complexed with different dimannosides: New insights into the understanding of the structure–biological activity relationship in legume lectins. *Journal of Structural Biology*, v. 160, p. 168-76, 2007.

Bézivin, C; Tomasi, S; Dévéhat, FL-L; Boustie, J. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. *Phytomedicine*, v. 10, p. 499-503, 2003.

Bies, C; Lehr, CM; Woodley, JF. Lectin-mediated drug targeting: history and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 56, p. 425-35, 2004.

Bonifati, DM; Kishore, U. Role of complement in neurodegeneration and neuroinflammation. *Mol. Immunol.*, v. 44, p. 999-1010, 2007.

Boullanger, P; Lafont, D; Bouchu, M-N; Jiang, L; Liu, T; Lu, W; Guo, CX; Li, J. The use of glycolipids inserted in color-changeable polydiacetylene vesicles, as targets for biological recognition. *Comptes Rendus Chimie*, v. 11, p. 43-60, 2008.

Bouwman, LH; Roep, BO; Roos, A. Mannose-Binding Lectin: Clinical Implications for Infection, Transplantation, and Autoimmunity. *Human Immunology*, v. 67, p. 247-56, 2006.

Boyd, WC; Reguera, RM. Hemagglutinating substances for human cells in various plants. *J. Immunol.*, v. 62, p. 333- 9, 1949.

Boyd, WC; Shapleigh, E. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). *Science, Washington*, v. 119, p. 419, 1954.

Breznak, JA; Brune, A. Role of microorganisms in the digestion of lignocellulose by termites. *Annual Review of Entomology*. v. 39, p. 453-87, 1994.

Brinck, U; Korabiowska, M; Bosbach, R; Gabius, HJ. Detection of inflammation - and Neoplasia – associated alterations in human large intestine using plant/invertebrate lectins, galectin-1 and neoglycoproteins. *Acta Anatomica*, v. 161, p. 219-33, 1998.

Bradberry, S. Ricin and Abrin. *Medicine*, v. 35, p. 576-577, 2007.

Buée, L; Bussière, T; Buée-Scherrer, V; Delacourte, A; Hof, PR. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res. Rev.*, v. 33, p. 95-130, 2000.

- Campanella, L; Delfini, M; Ercole, P; Iacoangeli, A; Risuleo, G. Molecular characterization and action of usnic acid: a drug that inhibits proliferation of mouse polyomavirus in vitro and whose main target is RNA transcription. *Biochimie*, v. 84, p. 329-34, 2002.
- Candy, L; Van Damme, EJM; Peumans, WJ; 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*, v. 308, p. 396-402, 2003.
- Carlini, CR; Grossi-de-Sá, MF. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon*, v. 40, p. 1515-39, 2002.
- Cavada, BS; Santos, CF; Grangeiro, TB; Nunes, EP; Sales, PVP; Ramos, RL; Bucar, F; Schneider, I; Ögmundsdóttir, H; Ingólfssdóttir, K. Anti-proliferative lichen compounds with inhibitory activity on 12(S)-HETE production in human platelets. *Phytomedicine*, v. 11, p. 602-6, 2004.
- Chen, C; Rowley, AF; Newton, RP; Ratcliffe, NA. Identification, purification and properties of a β -1,3-glucan-specific lectin from the serum of the cockroach, *Blaberus discoidalis* which is implicated in immune defence reactions. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, v. 122, p. 309-19, 1999.
- Chen, X; Niyonsaba, F; Ushio, H; Okuda, D; Nagaoka, I; Ikeda, S; Okumura, K; Ogawa, H. Synergistic effect of antibacterial agents human β -defensins, cathelicidin LL-37 and lysozyme against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Journal of Dermatological Science*, v. 40, p. 123-32, 2005.
- Chen, Y; Peumans, WJ; Van Damme, EJM. The *Sambucus nigra* type-2 ribosome-inactivating protein SNA-IP exhibits in planta antiviral activity in transgenic tobacco. *FEBS Letters*, v. 516, p. 27-30, 2002.

- Choudhary, MI; Azizuddin; Jalil, S; Atta-ur-Rahman. Bioactive phenolic compounds from a medicinal lichen, *Usnea longissima*. *Phytochemistry*, v. 66, p. 2346-50, 2005.
- Chu, KT; Ng, TB. Smilaxin, a novel protein with immunostimulatory, antiproliferative, and HIV-1-reverse transcriptase inhibitory activities from fresh *Smilax glabra* rhizomes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 340, p. 118-24, 2006.
- Chumkhunthod, P; Rodtong, S; Lambert, SJ; Fordham-Skelton, AP; Rizkallah, PJ; Wilkinson, MC; Reynolds, CD. Purification and characterization of an *N*-acetyl-d-galactosamine-specific lectin from the edible mushroom *Schizophyllum commune*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v. 1760, p. 326-32, 2006.
- Cioci, G; Mitchell, EP; Chazalet, V; Debray, H; Oscarson, S; Lahmann, M; Gautier, C; Breton, C; Perez, S; Imberty, A. β -Propeller crystal structure of *Psathyrella velutina* lectin: an integrin-like fungal protein interacting with monosaccharides and calcium. *Journal of Molecular Biology*, v. 357, p. 1575-91, 2006.
- Ciopraga, J; Gozia, O; Tudor, R; Brezuica, L; Doyle, RJ. *Fusarium* sp. growth inhibition by wheat germ agglutinin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v. 1428, p. 424-32, 1999.
- Citores, L; Benito, FM; Iglesias, R; Ferreras, JM; Argüeso, P; Jiménez, P; Testera, A; Camafeita, E; Méndez, E; Girbés, T. Characterization of a new non-toxic two-chain ribosome-inactivating protein and a structurally-related lectin from rhizomes of dwarf Elder (*Sambucus ebulus* L.). *Cellular and Molecular Biology*, v. 43, p. 485-99, 1997.
- Coelho, LCBB; Silva, MBR. Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. *Phytochemical Analysis*, v. 11, p. 295-300, 2000.
- Coelho, MB; Marangoni, S; Macedo, MLR. Insecticidal action of *Annona coriacea* lectin against the flour moth *Anagasta kuehniella* and the rice moth *Corcyra cephalonica*

(Lepidoptera: Pyralidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 146, p. 406-14, 2007.

Correia, M.T.S; Coelho, LCBB. Purification of a glucose/mannose specific lectin, Isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart (camaratu bean). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 55, p. 261-73, 1995.

Couty, A; de la Vinã, G; Clark, SJ; Kaiser, L; Pham-Delègue, M-H; Poppy, GM. Direct and indirect sublethal effects of *Galanthus nivalis* agglutinin (GNA) on the development of a potato-aphid parasitoid, *Aphelinus abdominalis* (Hymenoptera: Aphelinidae). *Journal of Insect Physiology*, v. 47, p. 553–61, 2001.

Cummings, BJ; Su, JH; Geddes, JW; Van Nostrand, WE; Wagner, SL; Cunningham, DD; Cotman, CW. Aggregation of the amyloid precursor protein within degenerating neurons and dystrophic neurites in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, v. 48, p. 763-77, 1992.

Daly, KA; Digby, MR; Lefèvre, C; Nicholas, KR; Deane, EM; Williamson, P. Identification, characterization and expression of cathelicidin in the pouch young of tammar wallaby (*Macropus eugenii*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, v. 149, p. 524-33, 2008.

Danguy, A; Decaestecker, C; Genten, F; Salmon, I; Kiss, R. Applications of lectins and Neoglycoconjugates in histology and pathology. *Acta Anatomica*, v. 161, p. 206-18, 1998.

Davis, BJ. Disc electrophoresis II: Method and application to human serum proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 121, p. 404-27, 1964.

del Sol, FG; Cavada, BS; Calvete, JJ. Crystal structures of *Cratylia floribunda* seed lectin at acidic and basic pHs. Insights into the structural basis of the pH-dependent dimer–tetramer transition. *Journal of Structural Biology*, v. 158, p. 1-9, 2007.

del Sol, FG; Nagano, C; Cavada, BS; Calvete, JJ. The first crystal structure of a mimosoideae lectin reveals a novel quaternary arrangement of a widespread domain. *Journal of Molecular Biology*, v. 353, p. 574-83, 2005.

De Simone, SG; Santos, R; Araujo, MF; Pinho, RT. Preparative isolation of the lectin jacalin by anion-exchange high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 688, p. 357-62, 1994.

De Sousa, FAM; Crisostomo, CV; Calvete, JJ. Purification and characterization of a lectin from seeds of *Vatairea macrocarpa* Duke. *Phytochemistry*, v. 49, p. 675-80, 1998.

Dixon, HBF. Defining a lectin. *Nature*, v. 292, p. 192, 1981.

Dufouil, C; Richard, F; Fiévet, N; Dartigues, JF; Ritchie, K; Tzourio, C; Amouyel, P; Alpérovitch, A. APOE genotype, cholesterol level, lipid-lowering treatment, and dementia: the Three-City Study. *Neurology*, v. 64, p. 1531–8, 2005.

Dunphy, JL; Barcham, GJ; Bischof, RJ; Young, AR; Nash, A; Meeusen, ENT. Isolation and characterization of a novel eosinophil-specific galectin released into the lungs in response to allergen challenge. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 277, p. 14916-24, 2002.

Dutta, I; Majumder, P; Saha, P; Ray, K; Das, S. Constitutive and phloem specific expression of *Allium sativum* leaf agglutinin (ASAL) to engineer aphid (*Lipaphis erysimi*) resistance in transgenic Indian mustard (*Brassica juncea*). *Plant Science*, v. 169, p. 996–1007, 2005.

Duvick, JP; Rood, T; Rao, AG; Marshak, DR. Purification and characterization of a novel antimicrobial peptide from maize (*Zea mays* L.) kernels. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 267, p. 18814–20, 1992.

Eisemann, CH; Donaldson, RD; Pearson, RD; Cadogan, LC; Vuocolo, T; Tellam, RL. Larvicidal activity of lectins on *Lucilia cuprina*: mechanism of action. *Entomologia Experimentales et Applicata*, v. 72, p. 1-10, 1994.

- Elifio, SL; Silva, MLCC; Iacomini, M; Gorin, PAJ. A Lectin from the lichenized Basidiomycete *Dictyonema glabratum*. New Phytologist, v. 148, p. 327-34, 2000.
- Estola, E; Vartia, KO. Phytagglutinins in lichens. Annales Medicinae Experimentalis et Biologiae Fenniae, v. 33, p. 392-5, 1955.
- Evin, G; Weidemann, A. Biogenesis and metabolism of Alzheimer's disease A β -amyloid peptides. Peptides, v. 23, p. 1285-97, 2002.
- Fiedler, A; Reinert, T; Morawski, M; Brückner, G; Arendt, T; Butz, T. Intracellular iron concentration of neurons with and without perineuronal nets. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms, v. 260, p. 153-8, 2007.
- Findeis, MA. The role of amyloid β peptide 42 in Alzheimer's disease. Pharmacology & Therapeutics, v. 116, p. 266-86, 2007.
- Fitches, E; Gatehouse, AMR; Gatehouse, JA. Effects of snowdrop lectin (GNA) delivered via artificial diet and transgenic plants on the development of tomato moth (*Lacanobia oleracea*) larvae in laboratory and glasshouse trials. Journal of Insect Physiology, v. 14, p. 727– 39, 1997.
- Fitches, E; Woodhouse, SD; Edwards, JP; Gatehouse, JA. In vitro and in vivo binding of snowdrop (*Galanthus nivalis* agglutinin; GNA) and jackbean (*Canavalia ensiformis*; Con A) lectins within tomato moth (*Lacanobia oleracea*) larvae; mechanisms of insecticidal action. Journal of Insect Physiology, v. 47, p. 777-87, 2001.
- Fitches, E; Edwards, MG; Mee, C; Grishin, E; Gatehouse, AMR; Edwards, JP; Gatehouse, JA. Fusion proteins containing insect-specific toxins as pest control agents: snowdrop lectin delivers fused insecticidal spider venom toxin to insect haemolymph following oral ingestion. Journal of Insect Physiology, v. 50, p. 61-70, 2004.

- Flemming, C; Ulrich, M; Schwall, G; Schroder, HC; Muller, WEGW. Determination of lectin characteristics by a novel agglutination technique. *Analytical Biochemistry*, v. 205, p. 251-6, 1992.
- Florent-Béchar, S; Malaplate-Armand, C; Koziel, V; Kriem, B; Olivier, J-L; Pillot, T; Oster, T. Towards a nutritional approach for prevention of Alzheimer's disease: Biochemical and cellular aspects. *Journal of the Neurological Sciences*, v. 262, p. 27–36, 2007.
- Follmer, C. Insights into the role and structure of plant ureases. *Phytochemistry*, v. 69, p. 18-28, 2008.
- 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*, v. 202, p. 49-54, 2000.
- Freire, MGM; Gomes, VM; Corsini, RE; Machado, OLT; De Simone, SG; Novello, JC; Marangoni, S; Macedo, MLR. Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 40, p. 61-8, 2002.
- Gabius, HJ. Animal lectins. *European Journal of Biochemistry*, v. 243, p.543-576, 1997.
- 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*, v. 56, p. 459-80, 2004.
- Gaidamashvili, M; van Staden, J. Interaction of lectin-like proteins of South African medicinal plants with *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 80, p. 131-5, 2002.
- Gao, Y; Wells, L; Comer, FL; Parker, GJ; Hart, GW. Dynamic *O*-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Cloning and characterization of a neutral, cytosolic b-*N*-acetylglucosaminidase from human brain. *J. Biol. Chem.*, v. 276, p. 9838–45, 2001.

- Garcia-Pino, A; Buts, L; Wyns, L; Loris, R. Interplay between metal binding and *cis/trans* isomerization in legume lectins: structural and thermodynamic study of *P. angolensis* lectin. *Journal of Molecular Biology*, v. 361, p. 153-67, 2006.
- Gavrovic-Jankulovic, M; Poulsen, K; Brckalo, T; Bobic, S; Lindner, B; Petersen, A. A novel recombinantly produced banana lectin isoform is a valuable tool for glycoproteomics and a potent modulator of the proliferation response in CD3⁺, CD4⁺, and CD8⁺ populations of human PBMCs. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 40, p. 929-41, 2008.
- Geyer, H; Geyer, R. Strategies for analysis of glycoprotein glycosylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics*, v. 1764, p. 1853-69, 2006.
- Ghosh, D; Maiti, TK. Immunomodulatory and anti-tumor activities of native and heat denatured Abrus agglutinin. *Immunobiology*, v. 212, p. 589-99, 2007.
- Goldstein, IJ; Hughes, RC; Monsigny, M; Osawa, T; Sharon, N. What should be called a lectin? *Nature*, v. 285, p. 66, 1980.
- Goldstein, IJ; Winter, HC; Aurandt, J; Confer, L; Adamson, JT; Hakansson, K; Remmer, H. A new α -galactosyl-binding protein from the mushroom *Lyophyllum decastes*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 467, p. 268-74, 2007.
- Gowda, NM; Goswami, U; Khan, MI. Purification and characterization of a T-antigen specific lectin from the coelomic fluid of a marine invertebrate, sea cucumber (*Holothuria scabra*). *Fish & Shellfish Immunology*, v. 24, p. 450-8, 2008a.
- Gowda, NM; Goswami, U; Khan, MI. T-antigen binding lectin with antibacterial activity from marine invertebrate, sea cucumber (*Holothuria scabra*): Possible involvement in differential recognition of bacteria. *Journal of Invertebrate Pathology*, *in press*, 2008b.
- Gulluce, M; Aslan, A; Sokmen, M; Sahin, F; Adiguzel, A; Agar, G; Sokmen, A. Screening the antioxidant and antimicrobial properties of the lichens *Parmelia saxatilis*, *Platismatia*

glauca, *Ramalina pollinaria*, *Ramalina polymorpha* and *Umbilicaria nylanderiana*.

Phytomedicine, v. 13, p. 515-21, 2006.

Gupta, N; Srivastava, PS. Purification and characterization of a lectin from seeds and cotyledonary callus of *Zizyphus mauritiana*. Plant Cell Reports, v. 17, p. 552-6, 1998.

Halici, M; Odabasoglu, F; Suleyman, H; Cakir, A; Aslan, A; Bayir, Y. Effects of water extract of *Usnea longissima* on antioxidant enzyme activity and mucosal damage caused by indomethacin in rats. Phytomedicine, v. 12, p. 656-62, 2005.

Harksworth, DL; Hill, DJ. The Lichen Forming Fungi, New York, Chapman & Hall, 1984. cap. 1, p. 1-15. The liquen habit.

Hartley, MR; Lord, JM. Cytotoxic ribosome-inactivating lectins from plants. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics, v. 1701, p. 1-14, 2004.

Hemmoranta, H; Satomaa, T; Blomqvist, M; Heiskanen, A; Aitio, O; Saarinen, J; Natunen, J; Partanen, J; Laine, J; Jaatinen, T. N-glycan structures and associated gene expression reflect the characteristic N-glycosylation pattern of human hematopoietic stem and progenitor cells. Experimental Hematology, v. 35, p. 1279-92, 2007.

Hilder, VA; Boulter, D. Genetic engineering of crop plants for insect resistance – a critical review. Crop Protection, v. 18, p. 177-91, 1999.

Ho, JCK; Sze, SCW; Shen, WZ; Liu, WK. Mitogenic activity of edible mushroom lectins. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, v. 1671, p. 9-17, 2004.

Holmskov, U; Malhotra, R; Sim, RB; Jensenius, JC. Collectins: callagenous C-type lectins of the innate immune defense system. Immunology Today, v. 15, p. 67-74, 1994.

Hori, K; Matsubara, K; Miyazawa, K. Primary structures of two hemagglutinins from the marine red alga, *Hypnea japonica*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, v. 1474, p. 226-36, 2000.

- Howe, ML; Barrett, JT. Studies on a hemagglutinin from the lichen *Parmelia michauxiana*. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 215, p. 97-104, 1970.
- Huang, X; Xie, W-j; Gong Z-z. Characteristics and antifungal activity of a chitin binding protein from *Ginkgo biloba*. *FEBS Letters*, v. 478, p.123-6, 2000.
- Huesing, JE; Murdock, LL; Shade, RE. Rice and stinging nettle lectins: insecticidal activity similar to wheat germ agglutinin. *Phytochemistry*, v. 30, p. 3565-8, 1991.
- Huovinen, K; Ahti, T; Stenroos, S. The Composition and contents of aromatic lichen substances in *Cladonia* section *Cladonia* and group *Furcatae*. *Bibliotheca Lichenologica*, v. 38, p. 209-41, 1990.
- Ingram, GA. Haemagglutinins and haemolysins in selected lichen species. *The Bryologist*, v. 85, p. 389-93, 1982.
- Inward, DJG; Vogler, AP; Eggleton, PA comprehensive phylogenetic analysis of termites (Isoptera) illuminates key aspects of their evolutionary biology. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 44, p. 953–67, 2007.
- Ishikawa, T; Zhu, B-L; Li, D-R; Zhao, D; Michiue, T; Maeda, H. Age-dependent increase of clusterin in the human pituitary gland. *Legal Med.*, v. 8, p. 28-33, 2006.
- Jiang, J-F; Han, Y; Xing, L-J; Xu, Y-Y; Xu, Z-H; Chong, K. Cloning and expression of a novel cDNA encoding a mannose-specific jacalin-related lectin from *Oryza sativa*. *Toxicon*, v. 47, p. 133-9, 2006.
- Joshi, BN; Sainani, MN; Bastawade, KB; Gupta, VS; Ranjekar, PK. Cysteine protease inhibitor from pearl millet: a new class of antifungal protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 246, p. 382–7, 1998.
- Jung, EC; Kim, KD; Bae, CH; Kim, JC; Kim, DK; Kim, HH. A mushroom lectin from ascomycete *Cordyceps militaris*. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1770, p. 833–8, 2007.

- Kabir, S. Jacalin: a jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seed-derived lectin of versatile applications in immunological research. *Journal of Immunological Methods*, v. 212, p. 193-211, 1998.
- Kacprzyk, L; Rydengard, V; Mörgelin, M; Davoudi, M; Pasupuleti, M; Malmsten, M; Schmidtchen, A. Antimicrobial activity of histidine-rich peptides is dependent on acidic conditions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, v. 1768, p. 2667-80, 2007.
- Kanazawa, N. Dendritic cell immunoreceptors: C-type lectin receptors for pattern-recognition and signaling on antigen-presenting cells. *Journal of Dermatological Science*, v. 45, p. 77-86, 2007.
- Kanazawa, N; Tashiro, K; Miyachi, Y. Signaling and immune regulatory role of the dendritic cell immunoreceptor (DCIR) family lectins: DCIR, DCAR, dectin-2 and BDCA-2. *Immunobiology*, v. 209, p. 179-90, 2004.
- Kanrar, S; Venkateswari, JC; Kirti, PB; Chopra, VL. Transgenic expression of hevein, the rubber tree lectin, in Indian mustard confers protection against *Alternaria brassicae*. *Plant Science*, v. 162, p. 441-8, 2002.
- Karasaki, Y; Tsukamoto, S; Mizusaki, K; Sugiura, T; Gotoh, S. A garlic lectin exerted an antitumor activity and induced apoptosis in human tumor cells. *Food Research International*, v. 34, p. 7-13, 2001.
- Kardish, N; Silberstein, L; Fleminger, G; Galun, M. Lectin from the lichen *Nephroma laevigatum* Ach. Localization and function. *Symbiosis*, v. 11, p. 47-62, 1991.
- Kaur, M; Singh, K; Rup, PJ; Saxena, AK; Khan, RH; Ashraf, MT; Kamboj, SS; 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 lines. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 445, p. 156-65, 2006.

- Kaur, A; Singh, J; Kamboj, SS; Sexana, AK; Pandita, RM; Shamnugavel, M. Isolation of an *N*-acetyl-d-glucosamine specific lectin from the rhizomes of *Arundo donax* with antiproliferative activity. *Phytochemistry*, v. 66, p. 1933-40, 2005.
- Kawagishi, H; Takagi, J; Taira, T; Murata, T; Usui, T. Purification and characterization of a lectin from the mushroom *Mycoleptodonoides aitchisonii*. *Phytochemistry*, v. 56, p. 53-8, 2001.
- Kellens, JTC; Peumans, WJ. Developmental accumulation of lectin in *Rhizoctonia solani*: a potential role as a storage protein. *Journal of General Microbiology*, v. 136, p. 2489-95, 1990.
- Kendrew, JC; Boda, G; Dintzis, HM; Parrish, RG; Wyckoff, H. A Three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis. *Nature*, v. 181, p. 662-6, 1958.
- Kennedy, JF; Paiva, PMG; Correia, MTS; Cavalcanti, MSM; Coelho, LCBB. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. *Carbohydrate Polymers*, v. 26, p. 219-30, 1995.
- Kim, M-S; Lee, K-A. Antithrombotic activity of methanolic extract of *Umbilicaria esculenta*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 105, p. 342-5, 2006.
- Kishore, U; Greenhough, TJ; Waters, P; Shrive, AK; Ghai, R; Kamran, MF; Bernal, AL; Reid, KBM; Madan, T; Chakraborty, T. Surfactant proteins SP-A and SP-D: Structure, function and receptors. *Molecular Immunology*, v. 43, p. 1293-315, 2006.
- Kitani, Y; Kikuchi, N; Zhang, GH; Ishizaki, S; Shimakura, K; Shiomi, K; Nagashima, Y. Antibacterial action of L-amino acid oxidase from the skin mucus of rockfish *Sebastes schlegelii*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, v. 149, p. 394-400, 2008.
- Kneass, ZT; Marchase, RB. Neutrophils exhibit rapid agonist induced increases in protein-associated *O*-GlcNAc. *J. Biol. Chem.*, v. 279, p. 45759-65, 2004.
- Kobayashi, K; Emson, PC; Mountjoy, CQ. *Vicia villosa* lectin-positive neurones in human cerebral cortex. Loss in Alzheimer-type dementia. *Brain Research*, v. 498, p. 170-4, 1989.

- Kocourek, J; Horejsi , V. Defining a lectin. *Nature*, v. 290, p. 188, 1981.
- Koike, T; Beppu, H; Kuzuya, H; Maruta, K; Shimpō, 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*, v.118, p. 1205-10, 1995.
- Konidala, P; Niemeyer, B. Molecular dynamics simulations of pea (*Pisum sativum*) lectin structure with octyl glucoside detergents: The ligand interactions and dynamics. *Biophysical Chemistry*, v. 128, p. 215–30, 2007.
- Konozy, EHE; Bernardes, ES; Rosa, C; Faca, V; Greene, LJ; Ward, RJ. Isolation, purification, and physicochemical characterization of a D-galactose-binding lectin from seeds of *Erythrina speciosa*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 410, p. 222-29, 2003.
- Kreppel, LK; Blomberg, MA; Hart, GW. Dynamic glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Cloning and characterization of a unique *O*-GlcNAc transferase with multiple tetratricopeptide repeats. *J. Biol. Chem.*, v. 272, p. 9308-15, 1997.
- 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*, v. 45, p. 601-5, 2001.
- Laemmli, UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, p. 680-5, 1970.
- Lalitha, S; Shade, RE; Murdock, LL; Bressan, RA; Hasegawa, PM; Nielsen, SS. Effectiveness of recombinant soybean cysteine proteinase inhibitors against selected crop pests. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 140, p. 227-35, 2005.
- Landsteiner, K; Raubitschek, H. Beobachtungen über hamolyse und hamagglutination. *Cbl. Bakt.*, vol. 45, p. 660-7, 1908.

- Lefebvre, T; Ferreira, S; Dupont-Wallois, L; Bussière, T; Dupire, M-J; Delacourte, A; Michalski, J-C; Caillet-Boudin, M-L. Evidence of a balance between phosphorylation and O-GlcNAc glycosylation of Tau proteins - a role in nuclear localization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, v. 1619, p. 167-76, 2003.
- Lehninger, AL. *Bioquímica*. 2. ed. São Paulo, Edgard Blucher, 1976. v. 1, cap. 7, p. 109-25. Proteínas: purificação e caracterização.
- Lehr, H; Fleminger, G; Galun, M. Lectin from the lichen *Peltigera-membranacea* (Ach) Nyl - Characterization and Function. *Symbiosis*, v. 18, p. 1-13, 1995.
- Leite, YFMM; Silva, LMCM; Amorim, RCN; Freire, EA; Jorge, DMM; Grangeiro, T.B; Benevides, NMB. 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*, v. 1724, p. 137-45, 2005.
- Lerivray, H; Chesnel, A; Jegou, P. Identification and localization of lectin in the oviduct of various urodele amphibians. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 81B, p. 385-91, 1985.
- Li, M; Chen, L; Lee, DHS; Yu, L-C; Zhang, Y. The role of intracellular amyloid b in Alzheimer's disease. *Prog. Neurobiol.*, v. 83, p. 131-9, 2007.
- Li, YR; Liu, QH; Wang, HX; Ng, TB. A novel lectin with potent antitumor, mitogenic and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from the edible mushroom *Pleurotus citrinopileatus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v. 1780, p. 51-7, 2008.
- Limpens, E; Bisseling, T. Signaling in symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 6, p. 343-50, 2003.
- Lis, H; Sharon, N. Lectins as molecules and as tools. *Annual Review of Biochemistry*, v. 55, p. 35-67, 1986a.

- Lis, H; Sharon, N. Biological properties of lectins. In: Liener, I.E., Sharon, N., Goldstein I.J. editors. *The Lectins: Properties, Functions, and Applications in Biology and Medicine*, New York, Academic Press, p. 265-91, 1986b.
- Lis, H; Sharon, N. Lectins in higher plants. In: Marcus, A. *The Biochemistry of Plants, a Comprehensive Treatise. Proteins and nucleic acids*, New York, Academic Press, v. 6, p. 371-447, 1981.
- Liu, C; Zhao, X; Xu, X-C; Li, L-R; Liu, Y-H; Zhong, S-D; Bao, J-K. Hemagglutinating activity and conformation of a lactose-binding lectin from mushroom *Agrocybe cylindracea*. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 42, p. 138-44, 2008.
- Liu, F; Iqbal, K; Grundke-Iqbal, I; Hart, GW; Gong, CX. O-GlcNAcylation regulates phosphorylation of Tau: a mechanism involved in Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 101, p. 10804-9, 2004.
- Liu, F; Zaidi, T; Iqbal, K; Grundke-Iqbal, I; Merkle, RK; Gong, C-X. Role of glycosylation in hyperphosphorylation of tau in Alzheimer's disease. *FEBS Letters*, v. 512, p. 101-6, 2002.
- Liu, Q; Wang, H; Ng, TB. First report of a xylose-specific lectin with potent hemagglutinating, antiproliferative and anti-mitogenic activities from a wild ascomycete mushroom. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v. 1760, p. 1914-9, 2006.
- Lockhart, CM; Rowell, P; Stewart, WDP. Phytohaemagglutinins from the nitrogen-fixing lichens *Peltigera canina* and *P. polydactyla*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 3, p. 127-30, 1978.
- Lundy, FT; Nelson, J; Lockhart, D; Greer, B; Harriott, P; Marley, JJ. Antimicrobial activity of truncated α -defensin (human neutrophil peptide (HNP)-1) analogues without disulphide bridges. *Molecular Immunology*, v. 45, p. 190-3, 2008.

- Macedo, MLR; Freire, MGM; Silva, MBR; Coelho, LCBB. Insecticidal action of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). Comp. Biochem. Physiol. A, v. 146, p. 486–98, 2007.
- Macedo, MLR; Freire, MGM; Novello, JC; Marangoni, S. *Talisia esculenta* lectin and larval development of *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera:Bruchidae). Biochimica et Biophysica Acta, v. 1571, p. 83–8, 2002.
- Machuka, JS; Okeola, OG; Chrispeels, MJ; Jackai, LEN. The African yam bean seed lectin affects the development of the cowpea weevil but does not affect the development of larvae of the legume pod borer. Phytochemistry, v. 53, p. 667-74, 2000.
- Machuka, JS; Okeola, OG; Van Damme, EJM; Chrispeels, MJ; Leuven, FV; Peumans, WJ. Isolation and partial characterization of galactose-specific lectins from African yam beans, *Sphenostyles stenocarpa* Harms. Phytochemistry, v. 51, p. 721-8, 1999.
- Maciel, EVM; Araujo-Filho, VS; Nakazawa, M; Gomes, YM; Coelho, LCBB; Correia, MTS. Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. Biologicals, v. 32, p. 57-60, 2004.
- Mann, DMA; Bonshek, RE; Marcyniuk, B; Stoddart, RW; Torgerson, E. Saccharides of senile plaques and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. Neurosci. Lett., v. 85, p. 277-82, 1988.
- Mann, DMA; Purkiss, MS; Bonshek, RE; Jones, D; Brown, AMT; Stoddart, RW. Lectin histochemistry of cerebral microvessels in ageing, Alzheimer's disease and Down's syndrome. Neurobiol. Aging, v. 13, p. 137-43, 1992.
- Manojlovic, NT; Solujic, S; Sukdolak, S; Milosev, M. Antifungal activity of *Rubia tinctorum*, *Rhamnus frangula* and *Caloplaca cerina*. Fitoterapia, v. 76, p. 244-6, 2005.

- Martinez, M; Cordoba, F. Isolation of fully active and stable corn coleoptile lectins. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, v. 30, p. 199-208, 2000.
- Martinichen-Herrero, JC; Carbonero, ER; Gorin, PAJ; Iacomini, M. Anticoagulant and antithrombotic activity of a sulfate obtained from a glucan component of the lichen *Parmotrema mantiqueirens* Hale. *Carbohydrate Polymers*, v. 60, p. 7-13, 2005a.
- Martinichen-Herrero, JC; Carbonero, ER; Sasaki, GL; Gorin, PAJ; Iacomini, M. Anticoagulant and antithrombotic activities of a chemically sulfated galactoglucomannan obtained from the lichen *Cladonia ibitipocae*. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 35, p. 97-102, 2005b.
- McCafferty, HRK; Moore, PH; Zhu, YJ. Papaya transformed with the *Galanthus nivalis* GNA gene produces a biologically active lectin with spider mite control activity. *Plant Science*, v. 175, p. 385-93, 2008.
- Medina-Flores, R; Wang, G; Bissel, SJ; Murphey-Corb, M; Wiley, CA. Destruction of extracellular matrix proteoglycans is pervasive in simian retroviral neuroinfection. *Neurobiol. Dis.*, v. 16, p. 604-16, 2004.
- Meyer, W; Bollhorn, M; Stede, M. Aspects of general antimicrobial properties of skin secretions in the common seal *Phoca vitulina*. *Diseases of Aquatic Organisms*, v. 41, p. 77-9, 2000.
- Minnasch, P; Yamamoto, Y; Ohkubo, I; Nishi, K. Demonstration of puromycin-sensitive alanyl aminopeptidase in Alzheimer disease brain. *Legal Medicine*, v. 5, p. S285-7, 2003.
- Mishra, V; Sharma, RS; Yadav, S; Babu, CR; Singh, TP. Purification and characterization of four isoforms of Himalayan mistletoe ribosome-inactivating protein from *Viscum album* having unique sugar affinity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 423, p. 288-301, 2004.

- Mitra, N; Srinivas, VR; Ramya, TNC; Ahmad, N; Reddy, GB; 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*, v. 41, p. 9256-63, 2002.
- Miura, T; Maekawa, K; Kitade, O; Abe, T; Matsumoto, T. Phylogenetic relationships among subfamilies in higher termites (Isoptera: Termitidae) based on Mitochondrial COII gene sequences, *Ann. Ent. Soc. Am.*, v. 91, p. 515-23, 1998.
- Mo, H; Winter, HC; Goldstein, IJ. Purification and characterization of a Neu5Acalpha2-6Galbeta1-4Glc/GlcNAc-specific lectin from the fruiting body of the polypore mushroom *Polyporus squamosus*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 275, p. 10623-9, 2000.
- Mo, H; Van Damme, EJM; Peumans, WJ; Goldstein, IJ. Purification and characterization of a mannose-specific lectin from shallot (*Allium ascalonicum*) bulbs. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 306, p. 431-8, 1993.
- Molchanova, V; Chikalovets, I; Chernikov, O; Belogortseva, N; Li, W; Wang, J-H; Yang, D-YO; Zheng, Y-T; Lukyanov, P. A new lectin from the sea worm *Serpula vermicularis*: Isolation, characterization and anti-HIV activity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 145, p. 184-93, 2007.
- Molina, MC; Vicente, C. Purification and characterization of two isolectins with arginase activity from the lichen *Xanthoria parietina*. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, v. 33, p. 300-7, 2000.
- Moreira, RA; Castelo-Branco, CC; Monteiro, ACO; Tavares, RO; Beltramini, LM. Isolation and partial characterization of a lectin from *Artocarpus incisa* L. seeds. *Phytochemistry*, v. 47, p. 1183-8, 1998.

- Moreira, RA; Cavada, BS; Oliveira, JTA; Ainouz, IL. Plant lectins. In: Oliveira, B. & Sgarbieri, V. Proceedings of the First Brazilian Congress on Proteins. Campinas, SP: Editora da UNICAMP. p. 71-96. 1990.
- Moreira, RA; Monteiro, ACO; Horta, ACG; Oliveira, JTA; Cavada, BS. Isolation and characterization of *Dioclea altissima* Var. *megacarpa* seed lectin. Phytochemistry, v. 46, p. 139-44, 1997.
- Moreno, FBMB; Oliveira, TM; Martil, DE; Viçoti, MM; Bezerra, GA; Abrego, JRB; Cavada, BS; Azevedo Jr., WF. Identification of a new quaternary association for legume lectins. Journal of Structural Biology, v. 161, p. 133-43, 2008.
- Mota Filho, FO; Pereira, EC; Lima, ES; Silva, NH; Figueiredo, RCB. Influência de Poluentes atmosféricos em Belo Jardim (PE) utilizando *Cladonia verticillaris* (líquen) como biomonitor. Química Nova, v. 30, p. 1072-6, 2007.
- Moura, RM; Queiroz, AFS; Fook, JMSLL; Dias, ASF; Monteiro, NKV; Ribeiro, JKC; Moura, GEDD; Macedo, LLP; Santos, EA; Sales, MP. CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*: Isolation, characterization and its effects on pathogenic bacteria and Leishmania promastigotes. Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology, v. 145, p. 517-23, 2006.
- Mujica, FG; Motta, N; Márquez, AH; Zulueta, JC. Effects of *Bauhinia megalandra* aqueous leaf extract on intestinal glucose absorption and uptake by enterocyte brush border membrane vesicles. Fitoterapia, v. 74, p. 84-90, 2003.
- Murayama, K; Taka, H; Kaga, N; Fujimura, T; Mineki, R; Shindo, N; Morita, M; Hosono, M; Nitta, K. The Structure of *Silurus asotus* (Catfish) Roe Lectin (SAL): Identification of a Noncovalent Trimer by Mass Spectrometry and Analytical Ultracentrifugation. Analytical Biochemistry, v. 247, p. 319-26, 1997.

- Naeem, A; Khan, RH; 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, v. 396, p. 99-105, 2001.
- Nagai, T; Kawabata, S; Shishikura, F; Sugita, H. Purification, characterization, and amino acid sequence of an embryonic lectin in perivitelline fluid of the horseshoe crab. The Journal of Biological Chemistry, v. 274, p. 37673-8, 1999.
- Nagashima, Y; Kikuchi, N; Shimakura, K; Shiomi, K. Purification and characterization of an antibacterial protein in the skin secretion of rockfish *Sebastes schlegeli*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, v. 136, p. 63-71, 2003.
- Nascimento, SC; Pereira, EC; Oliveira, AFM; Silva, NH; Boitard, M; Beriel, H. Screening de atividade citotóxica de extratos liquênicos: *Cladoniaceae*. Acta Botanica Brasilica, v. 8, p. 97-108, 1994.
- Nash, TH. Lichen Biology. Cambridge University Press, 1996. 303 p.
- Nevalainen, TJ; Graham, GG; Scott, KF. Antibacterial actions of secreted phospholipases A₂. Review. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids, v. 1781, p. 1-9, 2008.
- Ngai, PHK; Ng, TB. A mushroom (*Ganoderma capense*) lectin with spectacular thermostability, potent mitogenic activity on splenocytes, and antiproliferative activity toward tumor cells. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 314, p. 988-93, 2004.
- Ng, TB. Antifungal proteins and peptides of leguminous and non-leguminous origins. Peptides, v. 25, p. 1215-22, 2004.
- Ng, TB; Lam, YW; Woo, NYS. The immunostimulatory activity and stability of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) roe lectin. Veterinary Immunology and Immunopathology, v. 94, p. 105-12, 2003.

- Ng'walali, PM; Yonemitsu, K; Kibayashi, K; Tsunenari, S. Neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease in forensic autopsy of elderly persons with fatal accident. *Legal Medicine*, v. 4, p. 223-31, 2002.
- Nishi, K; Tanegashima, A; Yamamoto, Y; Ushiyama, I; Ikemoto, I; Yamasaki, S; Nishimura, A; Rand, S; Brinkmann, B. Utilization of lectin-histochemistry in forensic neuropathology: lectin staining provides useful information for postmortem diagnosis in forensic neuropathology. *Legal Medicine*, v. 5, p. 117-31, 2003.
- Nishimura, A; Sawada, S; Ushiyama, I; Yamamoto, Y; Nakagawa, T; Tanegashima, A; Nishi, K. Lectin-histochemical detection of degenerative glycoconjugate deposits in human brain. *Forensic Science International*, v. 113, p. 265-9, 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*, v. 49, p. 667-73, 1998.
- Odabasoglu, F; Aslan, A; Cakir, A; Suleyman, H; Karagoz, Y; Bayir, Y; Halici, M. Antioxidant activity, reducing power and total phenolic content of some lichen species. *Fitoterapia*, v. 76, p. 216-19, 2005.
- Odabasoglu, F; Cakir, A; Suleyman, H; Aslan, A; Bayir, Y; Halici, M; Kazaz, C. Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 103, p. 59-65, 2006.
- Ogino, M; Yoshimatsu, K; Ebihara, H; Arikawa, J. N-acetylgalactosamine (GalNAc)-specific lectins mediate enhancement of Hantaan virus infection. *Archives of Virology*, v. 144, p. 1765-77, 1999.
- Olafsdottir, ES; Omarsdotti, S; Paulsen, BS; Wagner, H. Immunologically active O6-branched (1→3)-β-glucan from the lichen *Thamnolia vermicularis* var. *subuliformis*. *Phytomedicine*, v. 10, p. 318-24, 2003.

Oliveira, JTA; Melo, VMM; Câmara, MFL; Vasconcelos, IM; Beltramini, LM; Machado, OLT; Gomes, VM; Pereira, SP; Fernandes, CF; Nunes, EP; Capistrano, GGG; Monteiro-Moreira, ACO. Purification and physicochemical characterization of a cotyledonary lectin from *Luetzelburgia auriculata*. *Phytochemistry*, v. 61, p. 301-10, 2002.

Olsnes, S. The history of ricin, abrin and related toxins. *Toxicon*, v. 44, p. 361-70, 2004.

Omarsdottir, J; Olafsdottir, ES; Freysdottir, J. Immunomodulating effects of lichen-derived polysaccharides on monocyte-derived dendritic cells. *International Immunopharmacology*, v. 6, p. 1642-50, 2006.

Omarsdottir, S; Freysdottir, J; Barsett, H; Paulsen, BS; Olafsdottir, ES. Effects of lichen heteroglycans on proliferation and IL-10 secretion by rat spleen cells and IL-10 and TNF- α secretion by rat peritoneal macrophages *in vitro*. *Phytomedicine*, v. 12, p. 461-7, 2005.

Omarsdottir, S; Freysdottir, J; Olafsdottir, ES. Immunomodulating polysaccharides from the lichen *Thamnolia vermicularis* var. *subuliformis*. *Phytomedicine*, v. 14, p.179-84, 2007.

Ooi, LSM; Sun, SSM; Ooi, VEC. Purification and characterization of a new antiviral protein from the leaves of *Pandanus amaryllifolius* (Pandanaceae). *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 36, p. 1440-6, 2004.

Ourth, DD; Narra, MB; Chung, KT. Isolation of mannose-binding C-type lectin from *Heliothis virescens* pupae. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 335, p. 1085-9, 2005.

Pace, KE; Lebestky, T; Hummel, T; Arnoux, P; Kwan, K; Baum, LG. Characterization of a novel *Drosophila melanogaster* galectin. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 277, p. 13091-8, 2002.

Pappolla, MA; Bryant-Thomas, TK; Herbert, D; Pacheco, J; Garcia, MF; Manjon, M; Girones, X; Henry, TL; Matsubara, E; Zambon, D; Wolozin, B; Sano, M; Cruz-Sanchez, FF;

- Thal, LJ; Petanceska, SS; Refolo, LM. Mild hypercholesterolemia is an early risk factor for the development of Alzheimer amyloid pathology. *Neurology*, v. 61, p. 199–205, 2003.
- Parisi, MG; Moreno, S; Fernández, G. Isolation and characterization of a dual function protein from *Allium sativum* bulbs which exhibits proteolytic and hemagglutinating activities. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 46, p. 403-13, 2008.
- Pedini, V; Scocco, P; Gargiulo, AM; Ceccarelli, P; Lorvik, S. Glycoconjugate characterization in the intestine of *Umbrina cirrosa* by means of lectin histochemistry. *Journal of Fish Biology*, v. 61, p. 1363-72, 2002.
- Pelosi, E; Lubelli, C; Polito, L; Barbieri, L; Bolognesi, A; Stirpe, F. Ribosome-inactivating proteins and other lectins from *Adenia* (Passifloraceae). *Toxicon*, v. 46, p. 658-63, 2005.
- Pepato, MT; Keller, EH; Baviera, AM; Kettelhut, IC; Vendramini, RC; Brunetti, IL. Anti-diabetic activity of *Bauhinia forficata* decoction in streptozotocin-diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 81, p. 191-7, 2002.
- Pereira, EC; Campos-Takaki, GM; Silva, NH; Vicente, C; Legaz, ME; Xavier-Filho, L. Fractionation of *Cladonia substellata* crude extracts and detection of antimicrobial activity. *Boletim da Sociedade Broteriana*, v. 64, p. 173-86, 1991.
- Petit, P. Phytolectins from the nitrogen-fixing lichen *Peltigera horizontalis*: the binding pattern of primary protein extract. *New Phytologist*, v. 91, p. 705-10, 1982.
- Petit, P; Lallemand, R; Savoye, D. Purified phytolectin from the lichen *Peltigera canina* var *canina* which binds to the phycobiont cell walls and its use as cytochemical marker in situ. *New Phytologist*, v. 94, p. 103-10, 1983.
- Peumans, WJ; Van Damme, EJM. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiology, Rockville*, v. 109, p. 347-52, 1995.
- Peumans, WJ; Van Damme, EJM. Plant lectins: versatile proteins with important perspectives in biotechnology. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, v. 15, p. 199-228, 1998.

Peumans, WJ; Verhaert, P; Pfüller, U; Van Damme, EJM. Isolation and partial characterization of a small chitin-binding lectin from mistletoe (*Viscum album*). FEBS Letters, v. 396, p. 261-5, 1996.

Peumans, WJ; Winter, HC; Bemer, V; Van Leuven, F; Goldstein, IJ; Truffa-Bachi, P; Van Damme, EJM. Isolation of a novel plant lectin with an unusual specificity from *Calystegia sepium*. Glycoconjugate Journal, v. 14, p. 259-65, 1997.

Plumer, DT. An introduction to practical biochemistry. 2. ed. London: McGraw-Hill, 1978. cap. 3, p. 47-98. Separation Methods.

Ponchel, G; Irache, JM., Specific and non-specific bioadhesive particulate systems for oral delivery to the gastrointestinal tract. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 34, p. 191-219, 1998.

Prasad, BD; Jha, S; Chattoo, BB. Transgenic *indica rice* expressing *Mirabilis jalapa* antimicrobial (Mj-AMP2) protein shows enhanced resistance to the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. Plant Science, v. 175, p. 364-71, 2008.

Rabinovich, GA; Riera, CM; Sotomayor, CE. Galectin-1, an alternative signal for cell death, is increased in activated macrophages. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v. 32, p. 557-67, 1999.

Rai, AN; Bergman, B. Cyanolichens. Biology and Environment: Proceedings of the Royal Irish Academy, v. 102B, p. 19-22, 2002.

Rajkapoor, B; Jayakar, B; Muruges, N. Antitumour activity of *Bauhinia variegata* on Dalton's ascitic lymphoma. Journal of Ethnopharmacology, v. 89, p. 107-9, 2003.

Ramesh, S; Nagadhara, D; Reddy, VD; Rao, KV. Production of transgenic *indica rice* resistant to yellow stem borer and sap-sucking insects, using super-binary vectors of *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Science, v. 166, p. 1077-85, 2004.

- Rameshwaram, NR; Nadimpalli, SK. An efficient method for the purification and quantification of a galactose-specific lectin from vegetative tissues of *Dolichos lablab*. *Journal of Chromatography B*, v. 861, p. 209–17, 2008.
- Ramos, SAF. Endofíticos de folhas de *Bauhinia monandra*: isolamento, atividades antimicrobianas e aglutinação com a lectina da folha. Dissertação de Mestrado, UFPE, 2003. 24 p.
- Rego, E JL; Carvalho, DD; Marangoni, S; Oliveira, B; Novello, JC. Lectins from seeds of *Crotalaria pallida* (smooth rattlebox). *Phytochemistry*, v. 60, p. 441-6, 2002.
- Reisfeld, RA; Lewis, UJ; Williams, DE. Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. *Nature*, v. 195, p. 281-3, 1962.
- Reynoso-Camacho, R; De Mejía, EG; Loarca-Piña, G. Purification and acute toxicity of a lectin extracted from tepary bean (*Phaseolus acutifolius*). *Food and Chemical Toxicology*, v. 41, p. 21-7, 2003.
- Ricklefs, RE. A Economia da Natureza. 3. ed. Rio de Janeiro, RJ: Editora Guanabara Koogan S. A., 1996. parte 5, p. 259-329. Interações das espécies.
- Ripoll, C; Favery, B; Lecomte, P; Van Damme, E; Peumans, W; Abad, P; Jouanin, L. Evaluation of the ability of lectin from snowdrop (*Galanthus nivalis*) to protect plants against root-knot nematodes. *Plant Science*, v. 164, p. 517-23, 2003.
- Rodrigues, JS; Santos-Magalhães, NS; Coelho, LCB; Couvreur, P; Ponchel, G; Gref, R. Novel core(polyester)-shell(polysaccharide) nanoparticles: protein loading and surface modification with lectins. *Journal of Controlled Release*, v. 92, p. 103-12, 2003.
- Rojo, MA; 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*, v. 340, p. 185-94, 1997.

- Rosilio, V; Boissonnade, M-M, Coelho, LCBB; Santos-Magalhães, NS; Andrade, CAS; Baszkin, A. Interaction of *Bauhinia monandra* lectin (BmoLL) with lipid monolayers. Colloid Surface A, v. 250, p. 491-7, 2004.
- Rothschild, Z. Cromatografia por exclusão. In: Collins, C.H., Braga, G.L., Bonato, P.S. (coordenadores). Introdução a Métodos Cromatográficos. 7. ed. Campinas, SP: Editora da UNICAMP. cap. 6, p. 95-115, 1997.
- Rougé, P; Peumans, WJ; Barre, A; Van Damme, EJM. A structural basis for the difference in specificity between the two jacalin-related lectins from mulberry (*Morus nigra*) bark. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 304, p. 91-7, 2003.
- Rudiger, H. Plant lectins-more than just tools for glycoscientists: occurrence, structure, and possible functions of plant lectins. Acta Anatomica, v. 161, p. 30-152, 1998.
- Rudiger, H; Siebert, HC; Solis, D; Jiménez-Barbero, J; Romero, A; Von der Lieth, CW; Diaz-Marino, T; Gabius, HJ. Medicinal chemistry based on the sugar code: fundamentals of lectinology and experimental strategies with lectins as targets. Current Medicinal Chemistry, v. 7, p. 389-416, 2000.
- Sá, RA; Napoleão, TH; Santos, NDL; Gomes, FS; Albuquerque, AC; Xavier, HS; Coelho, LCBB; Bieber, LW; Paiva, PMG. Induction of mortality on *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae) by *Myracrodruon urundeuva* heartwood lectin. International Biodeterioration & Biodegradation, *in press*, 2008a.
- Sá, RA; Santos, NDL; Silva, CSB; Napoleão, TH; Gomes, FS; Cavada, BS; Coelho, LCBB; Navarro, DMAF; Bieber, LW; Paiva, PMG. Larvicidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* on *Aedes aegypti*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, *in press*, 2008b.
- Sadeghi, A; Van Damme, EJM; Peumans, WJ; Smagghe, G. Deterrent activity of plant lectins on cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (F.) oviposition. Phytochemistry, v. 67, p. 2078-

84, 2006.

Saenz, MT; Garcia, MD; Rowe, JG. Antimicrobial activity and phytochemical studies of some lichens from south of Spain. *Fitoterapia*, v. 77, p. 156-9, 2006.

Sampaio, AH; Rogers, DJ; Barwell, CJ. A galactose-specific lectin from the red marine alga *Ptilota filicina*. *Phytochemistry*, v. 48, p. 765-9, 1998a.

Sampaio, AH; Rogers, DJ; Barwell, CJ. Isolation and characterization of the lectin from the green marine alga *Ulva lactuca* L. *Botanica Marina*, v. 41, p. 427-33, 1998b.

Sanger, F. Chemistry of insulin; determination of the structure of insulin opens the way to greater understanding of life processes. *Science*, v. 129, p. 1340-4, 1959.

Santi-Gadelha, T; Gadelha, CAA; Aragão, KS; Oliveira, CC; Mota, MRL; Gomes, RC; Pires, AF; Toyama, MH; Toyama, DO; Alencar, NMN; Criddle, DN; Assreuy, AMS; Cavada, BS. Purification and biological effects of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) seed lectin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 350, p. 1050-5, 2006.

Santos, ACO; Peixoto, CA; Coelho, LCBB. Ultrastructural analysis and immunocytochemical localization of isolectins in *Cratylia mollis* seeds. *Micron*, v. 35, p. 613-8, 2004.

Santos, NP. Estudo comparativo da atividade antitumoral dos extratos e frações purificadas de *Cladonia verticillaris* (líquen) contra diferentes tumores sólidos experimentais. Dissertação de Mestrado, UFPE, 1996. 112 p.

Sato, Y; Murakami, M; Miyazawa, K; Hori, K. Purification and characterization of a novel lectin from a freshwater cyanobacterium, *Oscillatoria agardhii*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, v. 125, p. 169-77, 2000.

Sauvion, N; Nardon, C; Febvay, G; Gategouse, AMR; 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*, v. 50, p. 1137-50, 2004.

- Saxena, S; Caroni, P. Mechanisms of axon degeneration: From development to disease. *Progress in Neurobiology*, v. 83, p. 174–91, 2007.
- Schmitt, HP. ϵ -Glycation, APP and A β in ageing and Alzheimer disease: A hypothesis. *Medical Hypotheses*, v. 66, p. 898-906, 2006.
- Schuler, TH; Poppy, GM; Kerry, BR; Denholm, I. Insect-resistant transgenic plants. *Trends in Biotechnology*, v. 16, p. 168-75, 1998.
- Seshagirirao, K; Prasad, MNV. Purification and partial characterization of a lectin from *Euphorbia neriifolia* latex. *Biochemistry and Molecular Biology International*, v. 35, p. 1199-204, 1995.
- Sharon, N. A centenary of lectins: impact on immunology. *Cellular Basis of Immune Modulation*, p. 609-20, 1989.
- Sharon, N. Lectin-carbohydrate complexes of plants and animals: an atomic view. *Trends in Biochemical Science*, v. 18, p. 221-6, 1993.
- Sharon, N; Lis, H. A Century of lectin research. *Trends in Biochemical Science*, v. 12, p. 488-91, 1988.
- Sharon, N; Lis, H. How proteins bind carbohydrates: lessons from legume lectins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, p. 6586-91, 2002.
- Sharon, N; Lis., H. Lectins: cell-agglutinating and sugar-specific proteins. *Science*, v. 177, p. 949-59, 1972.
- Sharon, N; Lis, H. Legume lectins – a large family of homologous proteins. *Federation American Societies Experimental Journal*, Bethesda, v. 4, p. 3198-208, 1990.
- Silva, FRMB; Szpoganicz, B; Pizzolatti, MG; Willrich, MAV; Sousa, E. Acute effect of *Bauhinia forficata* on serum glucose levels in normal and alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 83, p. 33-7, 2002.

- Silva, JM; Cunha, MHA; Pereira, ECG; Mota Filho, FO. *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr., para diagnostico da salubridade do ar decorrente da extração e beneficiamento de calcário em Vertente do Lério, Pernambuco (Brasil). *Caminhos de Geografia*, v. 8, p. 49-65, 2007.
- Singha, B; Adhya, M; Chatterjee, BP. Multivalent II [β -d-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)- β -d-GlcpNAc] and T α [β -d-Galp-(1 $\rightarrow$ 3)- α -d-GalpNAc] specific Moraceae family plant lectin from the seeds of *Ficus bengalensis* fruits. *Carbohydrate Research*, v. 342, p. 1034-43, 2007.
- Sitohy, M; Doheim, M; Badr, H. Isolation and characterization of a lectin with antifungal activity from Egyptian *Pisum sativum* seeds. *Food Chemistry*, v. 104, p. 971-9, 2007.
- Smith, VJ; Fernandes, JMO; Kemp, GD; Hauton, C. Crustins: Enigmatic WAP domain-containing antibacterial proteins from crustaceans. *Developmental & Comparative Immunology*, v. 32, p. 758-72, 2008.
- Soilleux, EJ; Coleman, N. Medicine in focus. Transplacental transmission of HIV: a potential role for HIV binding lectins. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 35, p. 283-7, 2003.
- Sorensen, GL; Husby, S; Holmskov, U. Surfactant protein A and surfactant protein D variation in pulmonary disease. *Immunobiology*, v. 212, p. 381-416, 2007.
- Spadaro, ACC. Cromatografia por troca iônica. In: Collins, C.H., Braga, G.L., Bonato, P.S. (coordenadores). *Introdução a Métodos Cromatográficos*. 7. ed. Campinas, SP: Editora da UNICAMP. cap. 5, p. 71-94, 1997.
- Spadaro, ACC; Fonseca, MJV. Cromatografia por bioafinidade. In: Collins, CH; Braga, GL; Bonato, PS. (coordenadores) *Introdução a Métodos Cromatográficos*. 7. ed. Campinas, SP: Editora da UNICAMP. cap. 7, p. 117-40, 1997.
- Spilatro, SR; Cochran, GR; Walker, RE; Cablish, KL; Bittner, CC. Characterization of a new lectin of soybean vegetative tissues. *Plant Physiology*, v. 110, p. 825-34, 1996.

- Stirpe, F; Bolognesi, A; Bortolotti, M; Farini, V; Lubelli, C; Pelosi, E; Polito, L; Dozza, B; Strocchi, P; Chambery, A; Parente, A; Barbieri, L. Characterization of highly toxic type 2 ribosome-inactivating proteins from *Adenia lanceolata* and *Adenia stenodactyla* (Passifloraceae). *Toxicon*, v. 50, p. 94-105, 2007.
- Stirpe, F; Licastro, F; Morini, MC; Parente, A; Savino, G; Abbondanza, A; Bolognesi, A; Falasca, AI; Rossi, CA. Purification and partial characterization of a mitogenic lectin from the latex of *Euphorbia marginata*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v. 1158, p. 33-9, 1993.
- Su, N; Tamashiro, M; Yates, JR; Haverty, MI. Effects of behavior in the evaluation of insecticides for prevention of or remedial control of the Formosan subterranean termite. *Journal of Economical Entomology*, v. 75, p. 188-93, 1982.
- Sun, J; Wang, L; Wang, B; Guo, Z; Liu, M; Jiang, K; Luo, Z. Purification and characterisation of a natural lectin from the serum of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, v. 23, p. 292-9, 2007.
- Sun, W-D; Fu, L-D; Jia, Y-P; Du, XJ; Wang, Q; Wang, Y-H; Zhao, X-F; Yu, X-Q; Wang, J-X. A hepatopancreas-specific C-type lectin from the Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* exhibits antimicrobial activity. *Molecular Immunology*, v. 45, p. 348-61, 2008.
- Supungul, P; Tang, S; Maneeruttanarungroj, C; Rimphanitchayakit, V; Hirono, I; Aoki, T; Tassanakajon, A. Cloning, expression and antimicrobial activity of crustin *Pm1*, a major isoform of crustin, from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Developmental & Comparative Immunology*, v. 32, p. 61-70, 2008.
- Suseelan, KN; Bhagwath, A; Pandey, R; Gopalakrishna, T. Characterization of Con C, a lectin from *Canavalia cathartica* Thouars seeds. *Food Chemistry*, v. 104, p. 528-35, 2007.

- Syed, FBF; Joshi, BN; Sivaraman, H; Khire, JM; Khan, MI. Purification and characterization of a cell-surface lectin (lectin II) from *Agrobacterium radiobacter* NCIM 2443. *Biochemistry and Molecular Biology International*, v. 47, p. 361-7, 1999.
- Szőke, T; Kayser, K; Trojan, I; Kayser, G; Furak, J; Tiszlavicz, L; Baumhäkel, J-D; Gabius, H-J. The role of microvascularization and growth/adhesion-regulatory lectins in the prognosis of non-small cell lung cancer in stage II. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, v. 31, p. 783-7, 2007.
- Takahashi, KG; Kuroda, T; Muroga, K. Purification and antibacterial characterization of a novel isoform of the Manila clam lectin (MCL-4) from the plasma of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, v. 150, p. 45-52, 2008.
- Tazaki, K. Radiolabeling of lectin from *Robinia pseudoacacia* by reductive methylation. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1334, p. 19-22, 1997.
- Terada, T; Watanabe, Y; Tateno, H; Naganuma, T; Ogawa, T; Muramoto, K; Kamiya, H. Structural characterization of a rhamnose-binding glycoprotein (lectin) from Spanish mackerel (*Scomberomorus niphonius*) eggs. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1770, p. 617-29, 2007.
- Thakur, A; Rana, M; Lakhanpal, TN; Ahmad, A; Khan, MI. Purification and characterization of lectin from fruiting body of *Ganoderma lucidum*: Lectin from *Ganoderma lucidum*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v. 1770, p. 1404-12, 2007.
- Thöm, I; Schult-Kronefeld, O; Burkholder, I; Goern, M; Andritzky, B; Blonski, K; Kugler, C; Edler, L; Bokemeyer, C; Schumacher, U; Laack, E. Lectin histochemistry of metastatic adenocarcinomas of the lung. *Lung Cancer* 2007; v. 56, p. 391-7, 2007.
- Tokuda, G; Lo, N; Watanabe, H; Slaytor, M; Matsumoto, T; Noda, H. Metazoan cellulase genes from termites: intron/exon structures and sites of expression. *Biochimica et Biophysica*

Acta - Gene Structure and Expression, v. 1447, p. 146-59, 1999.

Trigueros, V; Lougarre, A; Ali-Ahmed, D; Rahbé, Y; Guillot, J; Chavant, L; Fournier, D; Paquereau, L. *Xerocomus chrysenteron* lectin: identification of a new pesticidal protein. Biochimica et Biophysica Acta, v. 1621, p. 292-8, 2003.

Trindade, MB; Lopes, JLS; Soares-Costa, A; Monteiro-Moreira, AC; Moreira, RA; Oliva, MLV; Beltramini, LM. Structural characterization of novel chitin-binding lectins from the genus *Artocarpus* and their antifungal activity. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics, v. 1764, p. 146-52, 2006.

Ulfig, N; Bohl, J; Neudorfer, F; Rezaie, P. Brain macrophages and microglia in human fetal hydrocephalus. Brain and Development, v. 26, p. 307-15, 2004.

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*). The Journal of Biochemistry, v. 109, p. 718-21, 1991.

Uryu, K; Chen, X-H; Martinez, D; Browne, KD; Johnson, VE; Graham, DI; Lee, VM-Y; Trojanowski, JQ; Smith, DH. Multiple proteins implicated in neurodegenerative diseases accumulate in axons after brain trauma in humans. Experimental Neurology, v. 208, p. 185-92, 2007.

Van Damme, EJM; Barre, A; Bemer, V; Rougé, P; Van Leuven, F; Peumans, WJ. A lectin and a lectin-related protein are the two most prominent proteins in the bark of yellow wood (*Cladrastis lutea*). Plant Molecular Biology, v. 29, p. 579-98, 1995.

Van Damme, EJM; Briké, F; Winter, HC; Van Leuven, F; Goldstein, IJ; Peumans, WJ. Molecular cloning of two different mannose-binding lectins from tulip bulbs. European Journal of Biochemistry, v. 236, p. 419-27, 1996.

- Villarouco, FMO; Freire, EVC; Pereira, ECG; Pérez, REU. Análise do líquen *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr., em condições de laboratório sob efeito do estireno e ciclohexano. *Interciencia*, v. 32, p. 242-6, 2007.
- Wallis, R. Interactions between mannose-binding lectin and MASPs during complement activation by the lectin pathway. *Immunobiology*, v. 212, p. 289-99, 2007.
- Wälti, MA; Walser, PJ; Thore, S; Grünler, A; Bednar, M; Künzler, M; Aebi, M. Structural Basis for Chitotetraose Coordination by CGL3, a Novel Galectin-Related Protein from *Coprinopsis cinerea*. *Journal of Molecular Biology*, v. 379, p. 146-59, 2008.
- Wang, H; Ng, TB. A lectin with some unique characteristics from the samta tomato. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 44, p. 181-5, 2006.
- Wang, H; Ng, TB. First report of an arabinose-specific fungal lectin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 337, p. 621-5, 2005.
- Wang, H; Ng, TB. Isolation of a novel N-acetylglucosamine-specific lectin from fresh sclerotia of the edible mushroom *Pleurotus tuber-regium*. *Protein Expression and Purification*, v. 29, p. 156-60, 2003a.
- Wang, HX; Ng, TB. Purification of castamollin, a novel antifungal protein from Chinese chestnuts. *Protein Expression and Purification*, v. 32, p. 44-51, 2003b.
- Wang, H; Ng, TB; Liu, Q. A novel lectin from the wild mushroom *Polyporus adusta*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 307, p. 535-9, 2003.
- Wang, H; Song, L; Li, C; Zhao, J; Zhang, H; Ni, D; Xu, W. Cloning and characterization of a novel C-type lectin from Zhikong scallop *Chlamys farreri*. *Molecular Immunology*, v. 44, p. 722-31, 2007a.
- Wang, R; Kong, C; Kolatkar, P; Chung, MCM. A novel dimer of a C-type lectin-like heterodimer from the venom of *Calloselasma roddostoma* (Malayan pit viper). *FEBS Letters*, v. 508, p. 447-53, 2001.

- Wang, X; Su, B; Perry, G; Smith, MA; Zhu, X. Insights into amyloid- β -induced mitochondrial dysfunction in Alzheimer disease. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 43, p. 1569-73, 2007b.
- Wellman-Labadie, O; Lakshminarayanan, R; Hincke, MT. Antimicrobial properties of avian eggshell-specific C-type lectin-like proteins. *FEBS Letters*, v. 582, p. 699-704, 2008.
- Willcocks, S; Yamakawa, Y; Stalker, A; Coffey, TJ; Goldammer, T; Werling, D. Identification and gene expression of the bovine C-type lectin Dectin-1. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 113, p. 234-42, 2006.
- Winter, HC; Mostafapour, K; Goldstein, IJ. 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. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 277, p. 14996-15001, 2002.
- Wititsuwannakul, R; Wititsuwannakul, D; Sakulborirug, C. A lectin from the bark of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Phytochemistry*, v. 47, p. 183-7, 1998.
- Xavier-Filho, L; Rizzini, CT. *Manual de Liquenologia Brasileiro*, Recife, Editora U.F.PE, 1976, p. 431.
- Wong, JH; Ng, TB. Purification of a trypsin-stable lectin with antiproliferative and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 301, p. 545-50, 2003.
- Wong, JH; Ng, TB. Sesquin, a potent defensin-like antimicrobial peptide from ground beans with inhibitory activities toward tumor cells and HIV-1 reverse transcriptase. *Peptides*, v. 26, p. 1120-6, 2005a.
- Wong, JH; Ng, TB. Lunatusin, a trypsin-stable antimicrobial peptide from lima beans (*Phaseolus lunatus* L.). *Peptides*, v. 26, p. 2086-92, 2005b.

- Wong, JH; Chan, EHY; Ng, TB. A mannose/glucose-specific lectin from Chinese evergreen chinkapin (*Castanopsis chinensis*). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v. 1780, p. 1017-22, 2008.
- Wright, S. New folds of plant lectins. *Current Opinion in Structural Biology*, v. 7, p. 631-6, 1997.
- Yamaguchi, M; Jimbo, M; Sakai, R; Muramoto, K; Kamiya, H. Purification and characterization of *Microcystis aeruginosa* (freshwater cyanobacterium) lectin. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, v. 119, p. 593-7, 1998.
- Yamaguchi, M; Ogawa, T; Muramoto, K; Kamio, Y; Jimbo, M; Kamiya, H. Isolation and Characterization of a Mannan-Binding Lectin from the Freshwater Cyanobacterium (Blue-Green Algae) *Microcystis viridis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 265, p. 703-8, 1999.
- Yamashita, K; Hara-Kuge, S; Ohkura, T. Intracellular lectins associated with N-linked glycoprotein traffic. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1473, p. 147-60, 1999.
- Yan, Q; Jiang, Z; Yang, S; Deng, W; Han, L. A novel homodimeric lectin from *Astragalus mongholicus* with antifungal activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 442, p. 72-81, 2005.
- Yang, H; Luo, T; Li, F; Li, S; Xu, X. Purification and characterisation of a calcium-independent lectin (PjLec) from the haemolymph of the shrimp *Penaeus japonicus* *Fish & Shellfish Immunology*, v. 22, p. 88-97, 2007.
- Yano-Melo, AM; Vicente, C; Xavier-Filho, L. Allelopathic effect of the *Cladonia verticillaris* lichen extracts and fumarprotocetraric acid on the early growth of germinated seedlings in *Allium cepa* L. *Tropical Bryology*, v. 17, p. 133-9, 1999.

- Ye, XY; Ng, TB; Tsang, PWK; Wang, J. Isolation of a homodimeric lectin with antifungal and antiviral activities from red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. *Journal of Protein Chemistry*, v. 20, p. 367–75, 2001.
- Ye XY; Ng, TB. A chitinase with antifungal activity from the mung bean. *Protein Expression and Purification*, v. 40, p.230-6, 2005.
- Ye, XY; Ng, TB. A new antifungal protein and a chitinase with prominent macrophage-stimulating activity from seeds of *Phaseolus vulgaris* cv. *pinto*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 290, p. 813–9, 2002a.
- Ye, XY; Ng, TB. Delandin, a Chitinase-like Protein with Antifungal, HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitory and Mitogenic Activities from the Rice Bean *Delandia umbellata*. *Protein Expression and Purification*, v. 24, p. 524-9, 2002b.
- Ye, XY; Ng, TB. Purification and characterization of glycolactin, a novel glycoprotein from bovine milk. *Life Science*, v. 66, p. 1177-86, 2000.
- Yılmaz, M; Türk, AO; Tay, T; Kıvanç, M. The antimicrobial activity of extracts of the lichen *Cladonia foliacea* and its (-)-usnic acid, atranorin, and fumarprotocetraric acid constituents. *Der Zeitschrift für Naturforschung Section C: A Journal of Biosciences*, v. 59, p. 249-54, 2004.
- Yoon, SY; Choi, HI; Choi, JE; Sul, CA; Choi, JM; Kim, DH. Methotrexate decreases PP2A methylation and increases tau phosphorylation in neuron. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 363, p. 811-6, 2007.
- Young, JK; Byung, KH. Purification, N-terminal amino acid sequencing and antifungal activity of chitinases from pepper stems treated with mercuric chloride. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 48, p. 417-32, 1996.
- Yu, LG; Fernig, DG; White, MRH; Spiller, DG; Appleton, P; Evans, RC; Grierson, I; Smith, JA; Davies, H; Gerasimenko, OV; Petersen, OH; Milton, JD; Rhodes, JM. Edible mushroom

(*Agaricus bisporus*) lectin, which reversibly inhibits epithelial cell proliferation, blocks nuclear localization sequence-dependent nuclear protein import. The Journal of Biological Chemistry, v. 274, p. 4890-9, 1999.

Zachara, NE; O'Donnell, N; Cheung, WD; Mercer, JJ; Marth, JD; Hart, GW. Dynamic O-GlcNAc modification of nucleocytoplasmic proteins in response to stress. A Survival response of mammalian cells. The Journal of Biological Chemistry, v. 279, p. 30133-42, 2004.

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, v. 42, p. 15-20, 2003.

Zhao, J; Davis, LC; Verpoorte, R. Research review paper: Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnology Advances, v. 23, p. 283-333, 2005.

Zheng, S; Li, C; Ng, TB; Wang, HX. A lectin with mitogenic activity from the edible wild mushroom *Boletus edulis*. Process Biochemistry, v. 42, p. 1620-4, 2007.

Zhou, X; Wheeler, MM; Oi, FM; Scharf, ME. Inhibition of termite cellulases by carbohydrate-based cellulase inhibitors: Evidence from *in vitro* biochemistry and *in vivo* feeding studies. Pesticide Biochemistry and Physiology, v. 90, p 31-41, 2008.

Zhu, S. Discovery of six families of fungal defensin-like peptides provides insights into origin and evolution of the CS $\alpha\beta$ defensins. Molecular Immunology, v. 45, p. 828-38, 2008.

5 ARTIGOS

Artigo 1: a ser submetido ao periódico *Biologicals*

**PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF *Cladonia verticillaris* LICHEN
LECTIN WITH ANTIMICROBIAL ACTIVITY**

**PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF *Cladonia verticillaris* LICHEN
LECTIN WITH ANTIMICROBIAL ACTIVITY**

**Silva, M. D. C.¹; Oliva, M. L. V.²; Silva, M. C. C.¹; Paiva, P. M. G.¹; Melo, C. M. L.³;
Gusmão, N. B.³; Correia, M. T. S.¹; Coelho, L. C. B. B.^{1*}**

¹Laboratório de Glicoproteínas, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco. ²Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de São Paulo. ³Laboratório de Ensaaios Biotecnológicos, Departamento de Antibióticos, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco.

***Corresponding author: Luana C. B. B. Coelho**

e-mail address: micheledalvina@ig.com.br

Abstract

Cladonia verticillaris lichen lectin (ClaveLL) was purified from an extract (E) ammonium sulphate fractionation (F₁), followed by Sephadex G-100 gel filtration chromatography. ClaveLL samples were assayed to haemagglutinating activity (HA) and analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis containing sodium dodecyl sulphate (SDS-PAGE) and by FPLC and HPLC systems. ClaveLL was submitted to carbohydrate/glycoprotein inhibition, thermal stability, ion assay and HA stability under distinct pH values. ClaveLL was totally inhibited by glycoproteins contained in rabbit serum, colostrum and bovine fetal serum, fetuin, asialofetuin, casein and asocasein. The lectin was sensible to temperature (70 °C, 30 min), not ion dependent and ion solutions stimulated HA. ClaveLL was pH stable (5.5 to 12) and most active in acidic (5.5) pH value. SDS-PAGE resolved ClaveLL as an unique polypeptide band (glycosylated) with molecular weight smaller than 14 kDa. F₁ contains glycoprotein with glucose/mannose residues since it did bind to *Cratylia mollis* seed lectin (Cramoll 1,4) in radial diffusion assays and Cramoll 1,4-Sepharose affinity matrix. Gel filtration chromatography was resolved in three distinct active peaks to native lectin. ClaveLL on C4 RP-HPLC system showed a main homogeneous peak and hydrophobic profile. Highly purified glycosylated ClaveLL at low protein concentration (0.75 µg) showed antifungal effect to *Fusarium verticiloides*, *F. descemcellulare*, *F. fusarioides*, *F. oxysporum* and *F. moniliforme*; ClaveLL (0.225 µg, disk diffusion method; 1.5 µg/ml, microdilution assay) had antibacterial effect to Gram-positive (*Bacillus subtilis*, *Corynebacterium callunae*, *Streptococcus faecalis*, *Micrococcus luteus* and *Staphylococcus aureus*) and Gram-negative (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia sp.*) bacteria. Therefore, ClaveLL showed to be a potential agent against pathogenic fungi and bacteria species of economic interest for agriculture and health.

Key words: lichen lectin, *Cladonia verticillaris*, glycoprotein, antimicrobial activity.

Introduction

Lichens are symbiont organisms that result from the association between algae species (fotobionts) and one fungal species (mycobiont). Around 20 % of the well-known fungal species form lichens, among these most are ascomycetes (98 %), and a few are deuteromycetes and basidiomycetes (Rai and Bergman, 2002). Lichens have been awaking interest since its extracts and substances showed activities such as antimicrobial (Saenz *et al.*, 2006; Pereira *et al.*, 1991), antifungal (Manojlovic *et al.*, 2005), cytotoxic (Bézivin *et al.*, 2003; Nascimento *et al.*, 1994), antioxidant (Behera *et al.*, 2006; Halici *et al.*, 2005; Odabasoglu *et al.*, 2005) and antibacterial (Behera *et al.*, 2008; Gulluce *et al.*, 2006), immunomodulatory (Omarsdottir *et al.*, 2007; Omarsdottir *et al.*, 2006; Olafsdottir *et al.*, 2003) and mitogenic (Omarsdottir *et al.*, 2005), antiulcerogenic (Bayir *et al.*, 2006; Odabasoglu *et al.*, 2006), antithrombotic (Kim and Lee, 2006) and anticoagulant (Martinichen-Herrero *et al.*, 2005a; Martinichen-Herrero *et al.*, 2005b), anti-inflammatory (Muhammad *et al.*, 2005), antimitotic and anti-proliferative (Bucar *et al.*, 2004; Campanella *et al.*, 2002).

Lectins are proteins of non immune origin with wide distribution in nature that recognize carbohydrates or glycoconjugates free or linked to cell surfaces through specific recognition sites containing hydrophobic interaction force (Kennedy *et al.*, 1995), hydrogen bridges and van der Waals forces (Sharon, 1993). Some lectins own metallic ions linked to its structure; such links are coordinated by water molecules, which also serve to mediate the interactions of lectins with carbohydrates (Sharon and Lis, 2002). Lectins have been isolated from seeds (Singha *et al.*, 2007; Sitohy *et al.*, 2007; Susseeland *et al.*, 2007; Freire *et al.*, 2002), vertebrate (Dunphy *et al.*, 2002), invertebrate (Yang *et al.*, 2007; Pace *et al.*, 2002), bacteria (Syed *et al.*, 1999), yeasts, algae (Ambrosio *et al.*, 2003), mushrooms (Jung *et al.*, 2007; Trigueros *et al.*, 2003) and lichens (Elifio *et al.*, 2000; Molina and Vicente, 2000;

Ingram, 1982; Lockhart *et al.*, 1978; Howe and Barrett, 1970). Some authors have reported that lichen lectins can have an important role in the establishment of symbiosis, as a recognition factor between species (Elifio *et al.*, 2000; Molina and Vicente, 2000; Kardish *et al.*, 1991; Petit *et al.*, 1983; Petit, 1982; Lockhart *et al.*, 1978). However, very little has been done with respect to lichen lectins biological properties and potential biotechnological applications.

Antimicrobial proteins arrest the interest of many researchers as tools against fungal and bacterial infections to plants or human pathologies. Such proteins can be incorporated in transgenic plants checking resistance against pathogens; also, lectins can serve as active principles of antifungal or antibacterial clinical use. Antifungal proteins or peptides are ubiquitous in nature and expressed in different structures or organs of many vegetables and animals (Ng, 2004). Moreover, these molecules are distributed in different protein classes such as chitinases (Ye and Ng, 2005; Ye and Ng, 2002b; Young and Byung, 1996), chitinase-like proteins (Ye and Ng, 2002a), glucanases, thaumatin-like proteins, thionins, cyclophilin-like proteins, lectins (Sitohy *et al.*, 2007; Trindade *et al.*, 2006; Wang and Ng, 2003; Freire *et al.*, 2002; Ye *et al.*, 2001; Ciopraga *et al.*, 1999), ribosome inactivating proteins, ribonucleases, deoxyribonucleases, peroxidases, and protease inhibitors (Joshi *et al.*, 1998) all exhibiting antifungal activity. Also, antibacterial proteins or peptides are found in different organisms and they are enzymes or represent many protein groups such as L-amino acid oxidase or proteins present in fishes (Kitani *et al.*, 2008; Nagashima, 2003), crustins present in crustaceans (Smith *et al.*, 2008; Supungul *et al.*, 2008), cathelicidins (Daly *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2005) and phospholipases A₂ (Nevalainen *et al.*, 2007) both present in mammalian, defensins from fungus, plants, insects and animals (Lundy *et al.*, 2008; Zhu, 2008), C-type lectins present in shrimps, scallops (Sun *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2007) and

plant lectins (Santi-Gadelha *et al.*, 2006; Gaidamashvili and van Staden, 2002) among other proteins.

A simple protocol was developed to isolate *Cladonia verticillaris* lichen lectin, ClaveLL, active and highly purified, with high molecular weights that suggested molecular aggregates forms to the native lectin (170, 110 principal peak and 82 kDa), great affinity for glycoproteins and antimicrobial effect, inhibiting the growth of *Fusarium* species and bacteria, phytopathogen and/or animal and human pathogens.

Material and Methods

ClaveLL Purification *C. verticillaris* was collected in the State of Paraíba, Northeastern Brazil and gently identified by Dr. Eugênia Cristina Gonçalves Pereira (Departamento de Ciências Geográficas, Centro de Filosofia e Ciências Humanas, UFPE). Lichen flour was submitted to extraction (10 %, w/v) in 0.15 M sodium phosphate buffer containing 0.15 M NaCl, pH 7.0 (selected buffer) for 16 h at room temperature, followed by filtration and centrifugation on refrigerated centrifuge (8.000 rpm, 20 min). The crude extract (E) was ammonium sulphate treated for 4 h at room temperature, followed by centrifugation (8.000 rpm at 4 °C for 20 min), F₁ (0-30 %). Proteins were determined (Lowry *et al.*, 1951) using a bovine serum albumin standard curve. F₁ (18 mg) was applied to Sephadex G-100 column (1.4 x 63 cm) containing 100 ml of gel. The molecular exclusion column was eluted with selected buffer (flow rate of 20 ml/h); collected fractions were monitored by absorbance (UV 280 nm) and haemagglutinating activity (HA). The homogeneity of ClaveLL isolated by molecular exclusion as well as its molar mass under native or denatured conditions was evaluated by gel filtration chromatography through HPLC and FPLC systems. ClaveLL sample (1 mg/2 ml of 0.5 M NaCl) was injected to gel filtration Hiprep 16/60 Sephacryl S-300 column connected to ÄKTA-FPLC system (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden) pre-

equilibrated with 0.5 M NaCl; the column was eluted with 0.5 M NaCl (240 ml and flow rate 36 ml/h); collected fractions (2.6 ml) were monitored by absorbance (UV 280 nm) and HA. The standards (Sigma, USA) used were bovine serum albumin (66,000 Da), fetuin (64,000 Da), ovalbumin (45,000 Da), trypsin inhibitor type III-O chicken (28,000 Da) and trypsin (25,000 Da). Following the lectin was chromatographed on a C4 column connected to RP-HPLC system (model LC-10AD from Shimadzu, Japan) equilibrated in 0.1 % acid trifluoroacetic solution (TFA) in water (solvent A); elution was made with 90 % acetonitrile gradient (5 to 100 %) in 0.1 % TFA (solvent B).

HA Assays Samples (E, F₁ and ClaveLL) were submitted to HA assays in microtiter plates (Correia and Coelho, 1995) with two-fold serial dilutions in 0.15 M NaCl followed by addition of glutaraldehyde-treated (rabbit, quail, chicken and ABO system) 2.5 % erythrocyte suspension in 0.15 M NaCl (v/v); HA title was determined as the inverse of largest dilution with total agglutination, after 45 min of rest. Specific HA (SHA) was determined as HA/protein concentration (mg/ml). For the other HA assays were used glutaraldehyde-treated rabbit erythrocytes. ClaveLL samples were incubated in increasing temperatures from 30 to 100 °C for 30 min, followed by immediate cooling at room temperature and HA determination; sample aliquots were submitted to continuous heating in all temperatures. ClaveLL was incubated in solutions containing divalent ions (MnCl₂, MgCl₂, CaCl₂, BaCl₂, HgCl₂, CdCl₂ and CoCl₂) with concentrations between 5 and 40 mM; ClaveLL was also submitted to incubation with ions (MnCl₂, MgCl₂, CaCl₂ and MnCl₂-CaCl₂) with the same concentrations, after dialysis for 16 h in 5 mM EDTA solution. In microtiter plates, for each assay, were placed 50 µl of ion concentration solutions in all wells except in the second well, which received twice the ion concentration; ClaveLL (50 µl) was added and after two-fold serial dilutions and rest for 15 min the HA was determined. ClaveLL was incubated in

different buffers and pH range solutions (5.5 to 12), in microtiter plates, after two-fold serial dilutions, for 15 min; HA was determined.

HA Inhibition Assays Using Carbohydrates and Glycoproteins Inhibition assays followed the same procedure used for the ion incubation assays; several carbohydrate (1.56 to 200 mM in 0.15 M NaCl) or glycoprotein (1.95 to 500 µg/ml, in 0.15 M NaCl) solutions were used.

Radial Diffusion Assays In small Petri plates containing 4 ml of agar gel (1 %, w/v) in 0.15 M NaCl wells drillings of 3 mm (1 central and 4 peripheric) were done; the samples F₁ and ClaveLL (20 µl with 397 and 3.3 µg, respectively) were applied in central wells of plates and glycoproteins or proteins were applied in peripheric wells. After rest in humid chamber at 4 °C for 72 h, plates were washed and stained according to Ashford *et al.* (1982).

Electrophoresis F₁ and ClaveLL samples (100 µg) were applied in PAGE containing sodium dodecyl sulphate (SDS-PAGE) for denatured proteins (Laemmli, 1970) with or without β-mercaptoethanol treatment. Proteins were detected with Coomassie Brilliant blue or Schiff's reagent.

Antifungal Activity ClaveLL antifungal effect was evaluated with *Fusarium* species according to a modified assay based on Wong and Ng (2005a). ClaveLL was filtered to sterilization and applied (50 µl with 0.75 µg of protein) on sterile Petri plate (90 x 15 mm) surfaces containing 10 ml of Yeast Nitrogen Base (YNB) agar medium; a fungal mycelium disk (6 mm in diameter) containing different *Fusarium* species (*F. solani*, URM-2480; *F. oxysporum*, URM-2489; *F. moniliforme*, URM-3226; *F. decemcellulare*, URM-3006; *F. lateritium*, URM-2491) obtained from the Culture Collections from the Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil and (*F. fusarioides* and *F. verticiloides*) from the Laboratório de Fungos do Solo, Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil were placed in the middle of plates. Lectin

buffer and commercial antifungal Cercobin (10 ppm) constituted negative and positive controls, respectively. Plates were incubated at 28 °C for 72 h and fungi growth halos were measured in millimeters. The effect of ClaveLL on *Fusarium sp.* was defined by comparison with fungal growth in the negative control and antifungal activity of positive control. All assays were carried out in triplicate. Antifungal effect was evaluated by growth halos reduction. Inhibition percentage data were expressed as a mean $\pm$ standard deviation (S.D.).

Antibacterial Activity ClaveLL antibacterial effect was evaluated using a disk diffusion method; inoculum preparations were made according to Bauer et al. (1966). Stationary cultures from different Gram-positive (*Bacillus subtilis*, ATCC-6633; *Corynebacterium callunae*, ATCC-5991; *Staphylococcus aureus*, ATCC-6538; *Streptococcus faecalis*, ATCC-6057) or Gram-negative (*Escherichia coli*, ATCC-25922; *Klebsiella pneumoniae*, ATCC-29665; *Pseudomonas aeruginosa*, ATCC-27853) bacterial strains obtained from the Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil, were maintained into Nutrient agar medium and stored at 4 °C. Bacteria were cultured in Nutrient broth medium and incubated under permanent shaking overnight at 37 °C. Bacterial culture concentrations were adjusted turbidimetrically at a wavelength of 600 nm to 10^6 colony forming units (CFU).ml⁻¹ constituting the inoculum working concentration. Each inoculum (0.5 ml) was added to warm Nutrient agar medium (100 ml) at 43 °C and solutions (10 ml) were distributed in sterile Petri plates (90 x 15 mm). After medium solidification, sterile paper disks (with 6 mm in diameter) impregnated with ClaveLL filtered to sterilization (15 μ l equivalent to 0.225 μ g) were placed on Petri plate surfaces containing bacteria in solidified agar medium. Lectin buffer and commercial antibacterial amoxicilin (1 mg/ml) constituted the negative and positive controls, respectively. Plates were incubated at 37 °C for 24 h and transparent rings around each paper disk that revealed antimicrobial activity (zones of growth inhibition) were measured in millimeters. The effect of ClaveLL on bacterial strains

was defined by comparison with the negative control that should not have any effect on growth bacteria. All assays were carried out in triplicate. Zone of growth inhibition data were expressed as a mean $\pm$ S.D.

Bacterial Agglutination Assay Minimum agglutinating lectin concentration (MAC) able to promote bacterial agglutination was quantitatively determined through agglutination assays in microtiter plates with two-fold serial dilutions of ClaveLL (0.180 mg/ml) in 0.15 M NaCl. Overnight bacterial cultures were diluted with Nutrient broth medium (at a ratio of 1:100) and an aliquot (100 μ l) was added to each well for a final volume of 200 μ l; after overnight incubation of plates at 37 °C, MAC was determined through visual observation of agglutination. All assays were carried out in triplicate.

Quantitative Antibacterial Microdilution Assay Quantitative antibacterial effect of ClaveLL was evaluated with bacterial strains (Gram-positive *B. subtilis*, UFPEDA 16; *Micrococcus luteus*, UFPEDA 06; *S. aureus*, UFPEDA 01; or Gram-negative *E. coli*, UFPEDA 224; *P. aeruginosa*, UFPEDA 39; *Serratia sp.*, UFPEDA 398; obtained from Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil) through microassay using sterile microplates for culture cell. Pre-inoculum of bacteria were used for inoculum preparation (10^6 colony forming units (CFU).ml⁻¹) through strong agitation in sterile water containing glass pearls. Nutrient broth medium (180 μ l) was added to microplates followed by ClaveLL filtered to sterilization (20 μ l with 0.3 μ g of protein), which was thus ten times diluted (final 1.5 μ g/ml). To each well inoculum was added using a platinum handle (10 μ l). The wells first sequence of plates were free of bacteria for control of medium sterility. Wells were monitored by absorbance (visible light 600 nm) in time 0; plates were sealed and incubated for 18 h at 35 °C followed by a new absorbance. Last absorbances were subtracted from the first absorbances and resultant absorbances with ClaveLL were compared to

resultant absorbances in lectin buffer (control). All assays were carried out in triplicate. Growth inhibition percentage data were expressed as a mean $\pm$ S.D.

Results and Discussion

Lichens are widely distributed in the world; they support severe climatic terms but are extremely sensible to atmospheric pollution being well-known as bioindicators. Lichen preparations contain components with antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory, cytotoxic, mitogenic, antimitotic, anti-proliferative, antiulcerogenic, immunomodulatory, antithrombotic and anticoagulant effects. However, few active principles have already been isolated and characterized. A few lichen lectins were isolated and had its potential properties evaluated. Autochthons *C. verticillaris* is abundantly found on sandy soils of coastal boards in the State of Paraíba, Northeast Brazil. This lichen has been used as biomonitor to detect atmospheric pollutants (Mota Filho *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2007; Villarouco *et al.*, 2007). In this work a new lichen lectin was purified from *C. verticillaris*; the purification protocol established for ClaveLL is summarized in the Table 1. E and F₁ agglutinated glutaraldehyde-treated human erythrocytes from all ABO system as well as glutaraldehyde-treated erythrocytes from rabbit, chicken and quail; the highest HA was obtained with rabbit erythrocytes. F₁ was chosen for lectin purification and characterization since it showed the highest HA, Total HA (THA), protein concentration (mg/ml) and specific HA (SHA).

Molecular exclusion chromatography separated F₁ in two peaks: the first clarified and with HA, denominated ClaveLL; the second, without activity, contained a strong color, like F₁ (Figure 1a). Sephadex G-100 molecular exclusion constituted an economic protocol since the same matrix was efficiently reused at least 30 times for ClaveLL purification.

Gel filtration chromatography on Sephacryl S-300 resolved ClaveLL in three distinct peaks with HA and molecular weights of 170, 110 (main peak) and 82 kDa; a peak without

HA had molecular weight of 44 kDa (Figure 1b). SDS-PAGE revealed a unique polypeptide to ClaveLL (Figure 3c) with molecular weight of approximately 14 kDa, glycosylated (Figure 3d). The active peaks from gel filtration chromatography suggest molecular aggregate forms for native lectin, composed by subunits with low molecular identical or distinct weights. The lectin isolated from the mushroom *Polyporus squamosus* (Mo *et al.*, 2000) showed molecular mass of 52 kDa through gel filtration, and 28 kDa in SDS-PAGE showing to be a homodimer of identical subunits; *Mycoleptodonoides aitchisonii* lectin (Kawagishi *et al.*, 2001) showed to be a homotetramer with molecular weight of the native protein estimated around 64 kDa by gel filtration. ClaveLL chromatographed in C4 revealed a strong hydrophobic character and homogeneous profile characteristic of a highly purified protein (Figure 1c and 1d).

ClaveLL was sensible to temperature with a gradual fall of HA from 40 °C; activity was abolished at 70 °C (Figure 2a). Lichen lectin from *Dictyonema glabratum* (Elifio *et al.*, 2000) incubated by 30 min, also lost gradually activity from 40 °C with total lost at 80 °C. Mushroom lectins such as *Mycoleptodonoides aitchisonii* lectin (Kawagishi *et al.*, 2001) and *Cordyceps militaris* lectin (Jung *et al.*, 2007) were sensible to temperature losing totally activity at 50 °C and over 55 °C, respectively. Differently, the lectin from the mushroom *Polyporus adusta* (Wang *et al.*, 2003) was stable until 70 °C; activity was lost at 90 °C.

ClaveLL activity increased with $MnCl_2$, $BaCl_2$, $CaCl_2$ and $MgCl_2$ (Figure 2b); previous treatment of lectin with EDTA through exhaustive dialysis did not abolish totally its HA which still was partially recovered when incubated with tested ions. ClaveLL was not dependent, but activity was stimulated by these ions.

ClaveLL was active in all evaluated pH values (Figure 2c), but it was most active at pH 5.5. ClaveLL stability under different solutions was comparable to lectins from the mushrooms *Mycoleptodonoides aitchisonii* (Kawagishi *et al.*, 2001) and *Ganoderma capense* (Ngai and Ng, 2004), active in pH values 4 to 9 and 4 to 11, respectively.

F₁ and ClaveLL activities were inhibited by carbohydrates or glycoproteins. F₁ was totally inhibited by glycoproteins presents in rabbit serum (1.95 µg/ml) and in bovine fetal serum (62.5 µg/ml); carbohydrates (N-acetylglucosamine, ramnose, arabinose, xylose and mannose) or glycoproteins (fetuin, casein, ovalbumin and peroxidase) were partial inhibitors of F₁. Glycoproteins presents in rabbit serum, colostrum and bovine fetal serum, fetuin, asialofetuin, casein and asocasein (1.95 µg/ml) totally inhibited ClaveLL; ovalbumin, N-acetylglucosamine, galactose, ramnose, mannose, glucose and trealose were partial inhibitors of ClaveLL. Inhibition of ClaveLL HA by N-acetylglucosamine (one of the main components of fungi cell wall) and glycoproteins created the interest about its potential antimicrobial activity towards plant and human pathogenic fungi or bacteria species.

Radial diffusion assays revealed protein/glycoprotein interaction among F₁ and ClaveLL with lectin from the seeds of *Cratylia mollis*, Cramoll 1,4 (Figure 3a) as well as with rabbit serum glycoproteins and avidin (an egg glycoprotein). F₁ also recognized other glycoprotein samples (human serum from type A⁺ blood, rabbit serum and total or delipided human plasma).

F₁ and ClaveLL were mostly inhibited by glycoproteins. The high affinity for glycoproteins was confirmed with radial diffusion assay, with strong recognition of F₁ and ClaveLL to glycoproteins presents in rabbit serum; the recognition of Cramoll 1,4 (a not glycosylated glucose/mannose specific lectin) indicates that protein samples contain glucose/mannose residues. F₁ can have glucose/mannose residues, since its chromatography on Cramoll 1,4-Sepharose (an affinity matrix with Cramoll, isoforms 1 and 4 glucose/mannose specific, immobilized to Sepharose CL-4B) presented an adsorved peak eluted with 0.3 M mannose (Figure 3b).

ClaveLL showed antifungal activity against *F. verticiloides* (20 %), *F. descemcellulare* (20 %), *F. fusarioides* (17.4 %), *F. oxysporum* (11.1 %) and *F. moniliforme*

(11.1 %); *F. solani* and *F. lateritium* were not lectin inhibited (Figure 4); the best lectin inhibitory effect was observed after 72 h. The lectin was as efficient as the commercial antifungal Cercobin against *F. fusarioides* or more effective than the same against *F. moniliforme*. Other proteins and peptides also demonstrated antifungal activity against *Fusarium* species using different protein concentrations (Table 2).

ClaveLL showed inhibition halos (zones of growth inhibition) in plates with Gram-positive *B. subtilis*, *C. callunae* and *S. faecalis*, and Gram-negative *E. coli*, *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* bacteria. The antibacterial effect of ClaveLL obtained in this assays were summarized in Table 3. *S. aureus* growth was not affected by ClaveLL at assayed protein concentration. L-Amino acid oxidase from fish, named SSAP, acted of selective form on Gram-negative bacteria strains (but other enzymes of this group own wide action against Gram-positive or Gram-negative bacteria) (Kitani *et al.*, 2008).

ClaveLL showed cellular agglutination with all tested bacteria and a better MAC for *C. callunae* promoting cellular agglutination in very low protein concentration. MAC values were summarized in Table 3. A study using different plant agglutinins to evaluate its possible interactions with *S. aureus* and *B. subtilis* showed that *Hypoxis hemerocallidea* and *Combretum mkhuzense* agglutinins were able to aggregate *S. aureus* (at 4 and 5 µg/ml, respectively); *C. mkhuzense*, *Kniphofia* spp. and *Tulbaghia violacea* agglutinins aggregated *B. subtilis* only in high concentrations (Gaidamashvili and van Staden, 2002).

Quantitative microassay to evaluate antibacterial effect of ClaveLL in low concentration on bacterial strains revealed low effect on growth of Gram-positive *M. luteus* (10.2 %) and *S. aureus* (10.1 %) or of Gram-negative *Serratia* sp. (6.8 %), *E. coli* (4.8 %) and *P. aeruginosa* (3.3 %) bacteria (Table 3). ClaveLL did not promote antibacterial activity on *B. subtilis* (0.8 %).

ClaveLL showed inhibitory effect on Gram-positive and Gram-negative bacteria. The lectin showed different results to *S. aureus* and *B. subtilis* according to used assays; it promoted *S. aureus* cell agglutination and growth inhibition on microdilution assay, but did not inhibit zone of growth on plates. Also, ClaveLL promoted *B. subtilis* cell agglutination and growth inhibition on plates but not on microdilution assay (using other strain, UFPEDA 16). The results indicate that distinct assays are necessary for a better understanding of interaction and inhibitory effect mechanisms of lectins with microorganisms; ClaveLL differentiated strains from identical species. Crustin *Pm1*, an isoform of crustin (from the shrimp *Penaeus monodon* that was overexpressed in *E. coli*) exhibited antimicrobial effect against Gram-positive bacteria showing strong inhibition on *S. aureus* and *Streptococcus iniae* (Supungul *et al.*, 2008). Two antifungal peptides from *Vigna sesquipedalis* cv. and *Phaseolus lunatus* showed antibacterial activity on *E. coli*, *Bacillus megaterium* (Wong and Ng, 2005a), *B. megaterium*, *B. subtilis* (Wong and Ng, 2005b) and other bacteria strains. Kacprzyk *et al.* (2007) studied histidine-rich synthetic peptide action on Gram-negative and Gram-positive bacteria and concluded that such peptides had antimicrobial activity on *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* and *S. aureus* related with acidity condition. The effect of human β -defensins, cathelicidin LL-37 and skin lysozyme on *S. aureus* and *E. coli* in different pH conditions revealed a synergistic antibacterial effect against both bacteria in acidic conditions (Chen *et al.*, 2005).

Highly purified glycosylated ClaveLL was stable to pH changes and mainly inhibited by glycoproteins. The lectin, a fungal growth inhibitor to different *Fusarium* species, with inhibitory effect to Gram-positive and Gram-negative growth bacteria is an useful tool in microbiology applications. ClaveLL is the first purified lectin from lichen species that demonstrated growth inhibition property on phytopathogenic fungi and bacteria species.

ClaveLL is under evaluation in our laboratory to its potential as a natural antimicrobial on pathogenic fungi and bacteria of economic interest for agriculture and human health.

References

- Ambrosio, A. L., Sanz, L., Sánchez, E. I., Wolfenstein-Todel, C., Calvete, J. J. Isolation of two novel mannan- and L-fucose-binding lectins from the alga *Enteromorpha prolifera*: biochemical characterization of EPL-2. Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 415, p. 245-250, 2003.
- Bauer, A. W., Kirby, W. M. M., Sherrie, J. C., Turck, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. American Journal of Clinical Pathology, v. 45, p. 493-496, 1996.
- Bayir, Y., Odabasoglu, F., Cakir, A., Aslan, A., Suleyman, H., Halici, M., Kazaz, C. The inhibition of gastric mucosal lesion, oxidative stress and neutrophil-infiltration in rats by the lichen constituent diffractaic acid. Phytomedicine, v. 13, i. 8, p. 584-590, 2006.
- Behera, B. C., Verma, N., Sonone, A., Makhija, U. Determination of antioxidative potential of lichen *Usnea ghattensis* in vitro. LWT - Food Science and Technology, v. 39, i. 1, p. 80-85, 2006.
- Behera, B. C, Verma, N., Sonone, A., Makhija, U. Antioxidant and antibacterial properties of some cultured lichens Bioresource Technology, v. 99, i. 4, p. 776-784, 2008.
- Bézivin, C., Tomasi, S., Dévéhat, F. L-L., Boustie, J. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. Phytomedicine, v. 10, i. 6-7, p. 499-503, 2003.

- Bucar, F., Schneider, I., Ögmundsdóttir, H., Ingólfssdóttir, K. Anti-proliferative lichen compounds with inhibitory activity on 12(S)-HETE production in human platelets. *Phytomedicine*, v. 11, i. 7-8, p. 602-606, 2004.
- Campanella, L., Delfini, M., Ercole, P., Iacoangeli, A., Risuleo, G. Molecular characterization and action of usnic acid: a drug that inhibits proliferation of mouse polyomavirus in vitro and whose main target is RNA transcription. *Biochimie*, v. 84, i. 4, p. 329-334, 2002.
- Chen, X., Niyonsaba, F., Ushio, H., Okuda, D., Nagaoka, I., Ikeda, S., Okumura, K., Ogawa, H. Synergistic effect of antibacterial agents human β -defensins, cathelicidin LL-37 and lysozyme against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Journal of Dermatological Science*, v. 40, i. 2, p. 123-132, 2005.
- Ciopraga, J., Gozia, O., Tudor, R., Brezuica, L., Doyle, R. J. *Fusarium sp.* growth inhibition by wheat germ agglutinin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v. 1428, i. 2-3, p. 424-432, 1999.
- Correia, M. T. S., Coelho, L. C. B. B. Purification of a glucose/mannose specific lectin, Isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart (camaratu bean). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 55, p. 261-273, 1995.
- Daly, K. A., Digby, M. R., Lefèvre, C., Nicholas, K. R., Deane, E. M., Williamson, P. Identification, characterization and expression of cathelicidin in the pouch young of tammar wallaby (*Macropus eugenii*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, v. 149, p. 524-533, 2008.
- Dunphy, J. L., Barcham, 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. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 17, p. 14916-14924, 2002.

- Duvick, J. P., Rood, T., Rao, A. G, Marshak, D. R. Purification and characterization of a novel antimicrobial peptide from maize (*Zea mays* L.) kernels. The Journal of Biological Chemistry, v. 267, p. 18814–18820, 1992.
- Elifio, S. L., Da Silva, M. D. C. C., Iacomini, M., *et al.* A Lectin from the lichenized basidiomycete *Dictyonema glabratum*. New Phytology, v. 148, n. 2, p. 327-334, 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, v. 40, p. 61-68, 2002.
- Gaidamashvili, M., van Staden, J. Interaction of lectin-like proteins of South African medicinal plants with *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*. Journal of Ethnopharmacology, v. 80, i. 2-3, p. 131-135, 2002.
- Gulluce, M., Aslan, A., Sokmen, M., Sahin, F., Adiguzel, A., Agar, G., Sokmen, A. Screening the antioxidant and antimicrobial properties of the lichens *Parmelia saxatilis*, *Platismatia glauca*, *Ramalina pollinaria*, *Ramalina polymorpha* and *Umbilicaria nylanderiana*. Phytomedicine, v. 13, i. 7, p. 515-521, 2006.
- Halici, M., Odabasoglu, F., Suleyman, H., Cakir, A., Aslan, A., Bayir, Y. Effects of water extract of *Usnea longissima* on antioxidant enzyme activity and mucosal damage caused by indomethacin in rats. Phytomedicine, v. 12, i. 9, p. 656-662, 2005.
- Howe, M. L., Barrett, J. T. Studies on a hemagglutinin from the lichen *Parmelia michauxiana*. Biochimica et Biophysica Acta, v. 215, p. 97-104, 1970.
- Huang, X., Xie, W-j., Gong Z-z. Characteristics and antifungal activity of a chitin binding protein from *Ginkgo biloba*. FEBS Letters, v. 478, i. 1-2, p.123-126, 2000.
- Ingram, G. A. Haemagglutinins and haemolysins in selected lichen species. The Bryologist, v. 85, n. 4, p. 389-393, 1982.

- Joshi, B. N., Sainani, M. N., Bastawade, K. B., Gupta, V. S., Ranjekar, P. K. Cysteine protease inhibitor from pearl millet: a new class of antifungal protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 246, p. 382–387, 1998.
- Jung, E. C., Kim, K. D., Bae, C. H., Kim, J. C., Kim, D. K., Kim, H. H. A mushroom lectin from ascomycete *Cordyceps militaris*. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1770, p. 833–838, 2007.
- Kacprzyk, L., Rydengård, V., Mörgelin, M., Davoudi, M., Pasupuleti, M., Malmsten, M., Schmidtchen, A. Antimicrobial activity of histidine-rich peptides is dependent on acidic conditions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, v. 1768, i. 11, p. 2667–2680, 2007.
- Kardish, N., Silberstein, L., Fleminger, G., Galun, M. Lectin from the lichen *Nephroma laevigatum* Ach. Localization and function. *Symbiosis*, v. 11, p. 47–62, 1991.
- Kawagishi, H., Takagi, J., Taira, T., Murata, T., Usui, T. Purification and characterization of a lectin from the mushroom *Mycoleptodonoides aitchisonii*. *Phytochemistry*, v. 56, p. 53–58, 2001.
- 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*, v. 26, p. 219–30, 1995.
- Kim, M-S., Lee, K-A. Antithrombotic activity of methanolic extract of *Umbilicaria esculenta*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 105, i. 3, p. 342–345, 2006.
- Kitani, Y., Kikuchi, N., Zhang, GH., Ishizaki, S., Shimakura, K., Shiomi, K., Nagashima, Y. Antibacterial action of L-amino acid oxidase from the skin mucus of rockfish *Sebastes schlegelii*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, v. 149, i. 2, p. 394–400, 2008.

- Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.
- Lockhart, C. M., Rowell, P., Stewart, W. D. P. Phytohaemagglutinins from the nitrogen-fixing lichens *Peltigera canina* and *P. polydactyla*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 3, p. 127-130, 1978.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.
- Lundy, F. T., Nelson, J., Lockhart, D., Greer, B., Harriott, P., Marley, J. J. Antimicrobial activity of truncated α -defensin (human neutrophil peptide (HNP)-1) analogues without disulphide bridges. *Molecular Immunology*, v. 45, i. 1, p. 190-193, 2008.
- Manojlovic, N. T., Solujic, S., Sukdolak, S., Milosev, M. Antifungal activity of *Rubia tinctorum*, *Rhamnus frangula* and *Caloplaca cerina*. *Fitoterapia*, v. 76, i. 2, p. 244-246, 2005.
- Martinichen-Herrero, J. C., Carbonero, E. R., Gorin, P. A. J., Iacomini, M. Anticoagulant and antithrombotic activity of a sulfate obtained from a glucan component of the lichen *Parmotrema mantiqueirens* Hale. *Carbohydrate Polymers*, v. 60, i. 1, p. 7-13, 2005a.
- Martinichen-Herrero, J. C., Carbonero, E. R., Sasaki, G. L., Gorin, P. A. J., Iacomini, M. Anticoagulant and antithrombotic activities of a chemically sulfated galactoglucomannan obtained from the lichen *Cladonia ibitipocae*. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 35, i. 1-2, p. 97-102, 2005b.
- Mo, H., Winter, H. C., Goldstein, I. J., Purification and characterization of a Neu5Acalpha2-6Galbeta1-4Glc/GlcNAc-specific lectin from the fruiting body of the polypore mushroom *Polyporus squamosus*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 275, p. 10623-10629, 2000.
- Molina, M. C., Vicente, C. Purification and characterization of two isolectins with arginase activity from the lichen *Xanthoria parietina*. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, v. 33, n. 4, p. 300-307, 2000.

- Mota Filho, F. O., Pereira, E. C., Lima, E. S., Silva, N. H., Figueiredo, R. C. B. Influência de Poluentes atmosféricos em Belo Jardim (PE) utilizando *Cladonia verticillaris* (líquen) como biomonitor. *Química Nova*, v. 30, n. 5, p. 1072-1076, 2007.
- Nagashima, Y., Kikuchi, N., Shimakura, K., Shiomi, K. Purification and characterization of an antibacterial protein in the skin secretion of rockfish *Sebastes schlegeli*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 136, i. 1, p. 63-71, 2003.
- Nascimento, S. C., Pereira, E. C., Oliveira, A. F. M., Silva, N. H., Boitard, M., Beriel, H. Screening de atividade citotóxica de extratos liquênicos: *Cladoniaceae*. *Acta Botânica Brasílica*, v. 8, n. 1, p. 97-108, 1994.
- Nash, T. H. *Lichen Biology*. Cambridge University Press, 1996. 303 p.
- Nevalainen, T. J., Graham, G. G., Scott, K. F. Antibacterial actions of secreted phospholipases A₂. Review. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, *in press*, 2008.
- Ng, T. B. Antifungal proteins and peptides of leguminous and non-leguminous origins. *Peptides*, v. 25, p. 1215–1222, 2004.
- Ngai, P. H. K., Ng, T. B. A mushroom (*Ganoderma capense*) lectin with spectacular thermostability, potent mitogenic activity on splenocytes, and antiproliferative activity toward tumor cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 314, p. 988-993, 2004.
- Odabasoglu, F., Aslan, A., Cakir, A., Suleyman, H., Karagoz, Y., Bayir, Y., Halici, M. Antioxidant activity, reducing power and total phenolic content of some lichen species. *Fitoterapia*, v. 76, i. 2, p. 216-219, 2005.

- Odabasoglu, F., Cakir, A., Suleyman, H., Aslan, A., Bayir, Y., Halici, M., Kazaz, C. Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 103, i. 1, 3, p. 59-65, 2006.
- Olafsdottir, E. S., Omarsdotti, S., Paulsen, B. S., Wagner, H. Immunologically active O6-branched (1 $\rightarrow$ 3)- β -glucan from the lichen *Thamnolia vermicularis* var. *subuliformis*. *Phytomedicine*, v. 10, i. 4, p. 318-324, 2003.
- Omarsdottir, S., Freysdottir, J., Barsett, H., Paulsen, B. S., Olafsdottir, E. S. Effects of lichen heteroglycans on proliferation and IL-10 secretion by rat spleen cells and IL-10 and TNF- α secretion by rat peritoneal macrophages *in vitro*. *Phytomedicine*, v. 12, i. 6-7, p. 461-467, 2005.
- Omarsdottir, J., Olafsdottir, E. S. S., Freysdottir. Immunomodulating effects of lichen-derived polysaccharides on monocyte-derived dendritic cells. *International Immunopharmacology*, v. 6, i. 11, p. 1642-1650, 2006.
- Omarsdottir, S., Freysdottir, J., Olafsdottir, E. S. Immunomodulating polysaccharides from the lichen *Thamnolia vermicularis* var. *subuliformis*. *Phytomedicine*, v. 14, i. 2-3, p.179-184, 2007.
- Pace, K. E., Lebestky, T., Hummel, T., Arnoux, P., Kwan, K., Baum, L. G. Characterization of a novel *Drosophila melanogaster* galectin. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 15, p. 13091-13098, 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*, v. 64, p. 173-186, 1991.
- Petit, P. Phytolectins from the nitrogen-fixing lichen *Peltigera horizontalis*: the binding pattern of primary protein extract. *New Phytology*, v. 91, p. 705-710, 1982.

- Petit, P., Lallemand, R., Savoye, D. Purified phytolectin from the lichen *Peltigera canina* var *canina* which binds to the phycobiont cell walls and its use as cytochemical marker *in situ*. *New Phytology*, v. 94, p. 103-110, 1983.
- Rai, A. N., Bergman, B. Cyanolichens. *Biology and Environment: Proceedings of the Royal Irish Academy*, vol. 102B, n. 1, p. 19-22, 2002.
- Rego, E. J. L., Carvalho, D. D., Marangoni, S., Oliveira, B., Novello, J. C. Lectins from seeds of *Crotalaria pallida* (smooth rattlebox). *Phytochemistry*, v. 60, p. 441-446, 2002.
- Saenz, M. T., Garcia, M. D., Rowe, J. G. Antimicrobial activity and phytochemical studies of some lichens from south of Spain. *Fitoterapia*, v. 77, i. 3, p. 156-159, 2006.
- Santi-Gadelha, T., Gadelha, C. A. A., Aragão, K. S., de Oliveira, C. C., Mota, M. R. L., Gomes, R. C., Pires, A. F., Toyama, M. H., Toyama, D. O., de Alencar, N. M. N., Criddle, D. N., Assreuy, A. M. S., Cavada, B. S. Purification and biological effects of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) seed lectin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 350, i. 4, p. 1050-1055, 2006.
- Sharon, N. Lectin-carbohydrate complexes of plants and animals: an atomic view. *Trends in Biochemical Science*, v. 18, p. 221-226, 1993.
- Sharon, N., Lis, H. How proteins bind carbohydrates: lessons from legume lectins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, p. 6586-6591, 2002.
- Silva, J. M., Cunha, M. H. A., Pereira, E. C. G., Mota Filho, F. O. *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr., para diagnostico da salubridade do ar decorrente da extração e beneficiamento de calcário em Vertente do Lério, Pernambuco (Brasil). *Caminhos de Geografia*, v. 8, n. 22, p. 49-65, 2007.
- Singha, B., Adhya, M., Chatterjee, B. P. Multivalent II [β -d-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)- β -d-GlcpNAc] and Ta [β -d-Galp-(1 $\rightarrow$ 3)- α -d-GalpNAc] specific Moraceae family plant lectin from the seeds of *Ficus bengalensis* fruits. *Carbohydrate Research*, v. 342, i. 8, p. 1034-43, 2007.

- Sitohy, M., Doheim, M., Badr, H. Isolation and characterization of a lectin with antifungal activity from Egyptian *Pisum sativum* seeds. Food Chemistry, v. 104, i. 3, p. 971-9, 2007.
- Smith, V. J., Fernandes, J. M. O., Kemp, G. D., Hauton, C. Crustins: Enigmatic WAP domain-containing antibacterial proteins from crustaceans. Developmental & Comparative Immunology, v. 32, p. 758-72, 2008.
- Sun, W-D., Fu, L-D., Jia, Y-P., Du, X. J., Wang, Q., Wang, Y-H., Zhao, X-F., Yu, X-Q., Wang, J-X. A hepatopancreas-specific C-type lectin from the Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* exhibits antimicrobial activity. Molecular Immunology, v. 45, i. 2, p. 348-361, 2008.
- Supungul, P., Tang, S., Maneeruttanarungroj, C., Rimphanitchayakit, V., Hirono, I., Aoki, T., Tassanakajon, A. Cloning, expression and antimicrobial activity of crustin $Pm1$, a major isoform of crustin, from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Developmental & Comparative Immunology, v. 32, i. 1, p. 61-70, 2008.
- Suseelan, K. N., Bhagwath, A., Pandey, R., Gopalakrishna, T. Characterization of Con C, a lectin from *Canavalia cathartica* Thouars seeds. Food Chemistry, v. 104, i. 2, p. 528-35, 2007.
- Syed, F. B. F., Joshi, B. N., Sivaraman, H., Khire, J. M., Khan, M. I. Purification and characterization of a cell-surface lectin (lectin II) from *Agrobacterium radiobacter* NCIM 2443. Biochemistry and Molecular Biology International, v. 47, n. 3, p. 361-367, 1999.
- Trigueros, V., Lougarre, A., Ali-Ahmed, D., Rahbé, Y., Guillot, J., Chavant, L., Fournier, D., Paquereau, L. *Xerocomus chrysenteron* lectin: identification of a new pesticidal protein. Biochimica et Biophysica Acta, v. 1621, p. 292-298, 2003.
- 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 (BBA) - Proteins & Proteomics*, v. 1764, i. 1, p. 146-152, 2006.
- Villarouco, F. M. O., Freire, E. V. C., Pereira, E. C. G., Pérez, R. E. U. Análise do líquen *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr., em condições de laboratório sob efeito do estireno e ciclohexano. *Interciencia*, v. 32, n. 4, p. 242-246, 2007.
- Wang, H., Song, L., Li, C., Zhao, J., Zhang, H., Ni, D., Xu, W. Cloning and characterization of a novel C-type lectin from Zhikong scallop *Chlamys farreri*. *Molecular Immunology*, v. 44, i. 5, p. 722-731, 2007.
- Wang, H., Ng, T. B., Liu, Q. A novel lectin from the wild mushroom *Polyporus adusta*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 307, p. 535-539, 2003.
- Wang, H. X., Ng, T. B. Purification of castamollin, a novel antifungal protein from Chinese chestnuts. *Protein Expression and Purification*, v. 32, i. 1, p. 44-51, 2003.
- Wong, J. H., Ng, T. B. Sesquin, a potent defensin-like antimicrobial peptide from ground beans with inhibitory activities toward tumor cells and HIV-1 reverse transcriptase. *Peptides*, v. 26, p. 1120-1126, 2005a.
- Wong, J. H., Ng, T. B. Lunatusin, a trypsin-stable antimicrobial peptide from lima beans (*Phaseolus lunatus* L.). *Peptides*, v. 26, i. 11, p. 2086-2092, 2005b.
- Yang, H., Luo, T., Li, F., Li, S., Xu, X. Purification and characterisation of a calcium-independent lectin (PjLec) from the haemolymph of the shrimp *Penaeus japonicus*. *Fish & Shellfish Immunology*, v. 22, i. 1-2, p. 88-97, 2007.
- Ye, X. Y., Ng, T. B., Tsang, P. W. K., Wang, J. Isolation of a homodimeric lectin with antifungal and antiviral activities from red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. *Journal of Protein Chemistry*, v. 20, p. 367-375, 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, v. 290, p. 813–819, 2002a.
- Ye, X. Y., Ng, T. B. Delandin, a Chitinase-like Protein with antifungal, HIV-1 reverse transcriptase inhibitory and mitogenic activities from the rice bean *Delandia umbellata*. Protein Expression and Purification, v. 24, i. 3, p. 524-529, 2002b.
- Ye X. Y., Ng, T. B. A chitinase with antifungal activity from the mung bean. Protein Expression and Purification, v. 40, p.230-236, 2005.
- Young, J. K., Byung, K. H. Purification, N-terminal amino acid sequencing and antifungal activity of chitinases from pepper stems treated with mercuric chloride. Physiological and Molecular Plant Pathology, v. 48, i. 6, p. 417-432, 1996.
- Zhu, S. Discovery of six families of fungal defensin-like peptides provides insights into origin and evolution of the CS $\alpha\beta$ defensins. Molecular Immunology, v. 45, i. 3, p. 828-838, 2008.

Table 1. Purification of ClaveLL

Sample	Volume (ml)	Protein (mg/ml)	Total protein (mg)	HA	SHA	THA	Yield %	Purification fold
E	150.0	7.75	1162.5	256	33.0	38,400	100.0	-
F ₁	25.7	19.85	510.1	8,192	412.7	210,534	548.3	12.5
ClaveLL	226.7	0.08	18.6	64	780.5	14,508	37.8	23.6

HA: hemagglutinating activity; SHA: specific HA; THA: total HA

Table 2. Proteins or peptides with antifungal activity against *Fusarium* species

Protein classes	Source	Antifungal activity against <i>Fusarium</i> sp.	Reference
Chitinases	<i>Capsicum annuum</i> L. cv.	<i>F. oxysporum</i>	Young and Byung, 1996
	<i>Delandia umbellata</i>	<i>F. oxysporum</i>	Ye and Ng, 2002b
	<i>Phaseolus mungo</i>	<i>F. solani</i> <i>F. oxysporum</i>	Ye and Ng, 2005
Not determined	pinto bean (<i>P. vulgaris</i>)	<i>F. oxysporum</i>	Ye and Ng, 2002a
Chitinase-like	pinto bean (<i>P. vulgaris</i>)	<i>F. oxysporum</i>	Ye and Ng, 2002a
Lectins	<i>Talisia esculenta</i> seeds	<i>F. oxysporum</i>	Freire <i>et al.</i> , 2002
	<i>Pisum sativum</i>	<i>F. oxysporum</i>	Sitohy <i>et al.</i> , 2007
	red kidney bean (<i>P. vulgaris</i>)	<i>F. oxysporum</i>	Ye <i>et al.</i> , 2001
	Romanian dihaploid variety	<i>F. graminearum</i> <i>F. oxysporum</i>	Ciopraga <i>et al.</i> , 1999
	jackfruit seeds	<i>F. moniliforme</i>	Trindade <i>et al.</i> , 2006
	breadfruit seeds	<i>F. moniliforme</i>	Trindade <i>et al.</i> , 2006
Chitin-binding Peptide	leaves of <i>Ginkgo biloba</i>	<i>F. graminearum</i> <i>F. moniliforme</i>	Huang <i>et al.</i> , 2000
Peptides	maize kernels	<i>F. moniliforme</i> <i>F. graminearum</i>	Duvick <i>et al.</i> , 1992
	<i>Vigna sesquipedalis</i> cv.	<i>F. oxysporum</i>	Wong and Ng, 2005a
	<i>Phaseolus lunatus</i> L.	<i>F. oxysporum</i>	Wong and Ng, 2005b
Protease inhibitor	pearl millet	<i>Fusarium</i> sp.	Joshi <i>et al.</i> , 1998

Table 3. Antibacterial activity on disk diffusion method^a, on quantitative microdilution assay^b and MAC values on bacterial agglutination assay of ClaveLL

	Bactéria	Zone of growth inhibition (mm) ^{a*}	MAC (µg/ml)
Gram-positive	<i>Corynebacterium callunae</i>	12.50 (± 0.36)	2.81
	<i>Streptococcus faecalis</i>	12.45 (± 0.42)	5.62
	<i>Bacillus subtilis</i>	11.20 (± 0.34)	5.62
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0	5.62
Gram-negative	<i>Escherichia coli</i>	10.35 (± 0.32)	5.62
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10.20 (± 0.34)	11.25
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10.10 (± 0.17)	11.25
	Bactéria	Growth inhibition (%) ^b	
Gram-positive	<i>Micrococcus luteus</i>	10.20 (± 0.35)	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	10.10 (± 2.49)	
	<i>Bacillus subtilis</i>	0.85 (± 1.47)	
Gram-negative	<i>Serratia sp.</i>	6.80 (± 1.20)	
	<i>Escherichia coli</i>	4.83 (± 0.32)	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3.30 (± 0.75)	

(*) It includes the diameter of disk paper. Used bacterial strains for (a) and MAC were: *C. callunae*, ATCC-5991; *S. faecalis*, ATCC-6057; *B. subtilis*, ATCC-6633; *S. aureus*, ATCC-6538; *E. coli*, ATCC-25922; *P. aeruginosa*, ATCC-27853; *K. pneumoniae*, ATCC-29665. Used bacterial strains for (b) were: *M. luteus*, UFPEDA 06; *S. aureus*, UFPEDA 01; *B. subtilis*, UFPEDA 16; *Serratia sp.*, UFPEDA 398; *E. coli*, UFPEDA 224; *P. aeruginosa*, UFPEDA 39.

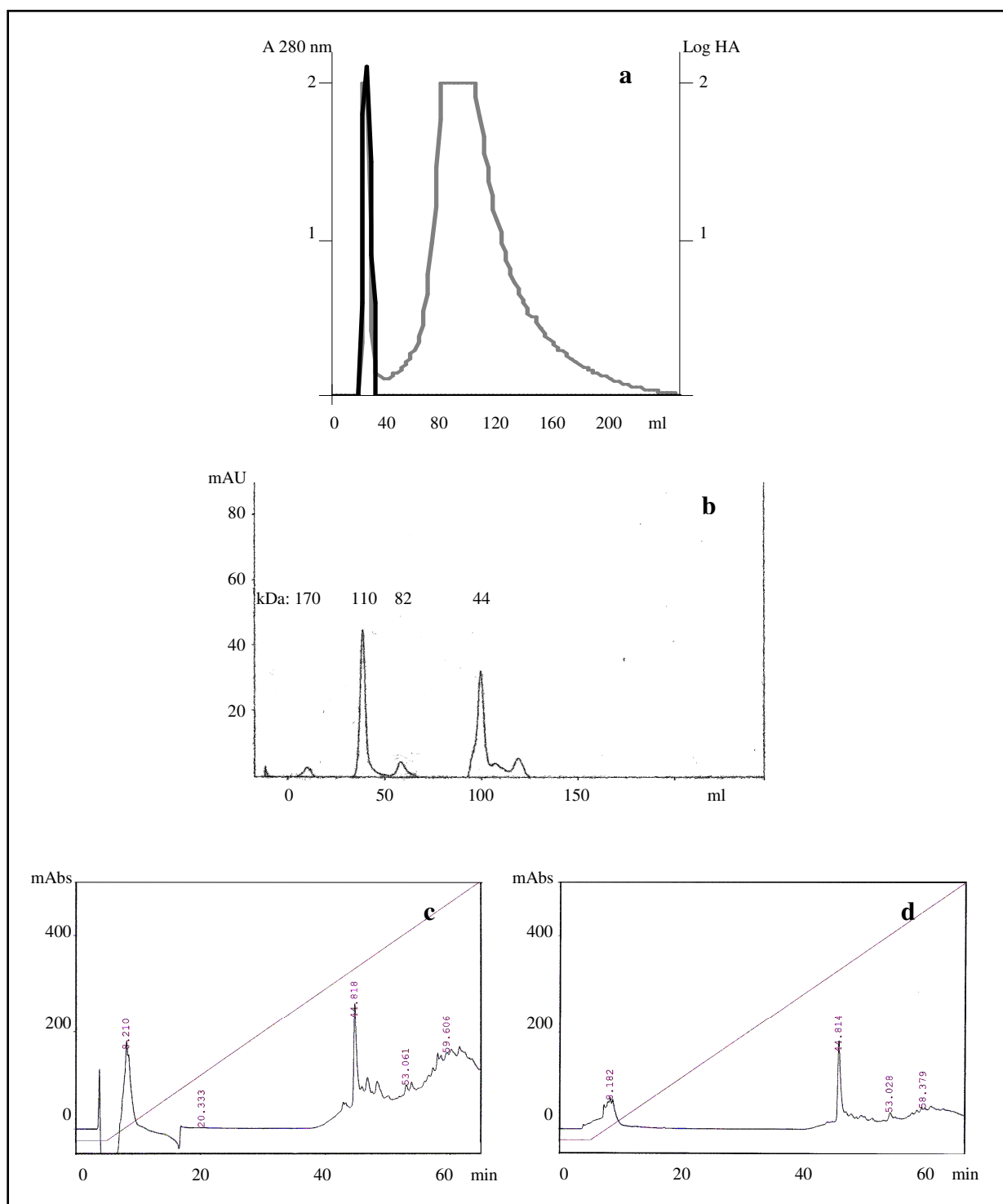


Figure 1. ClaveLL isolated from F₁ through gel filtration chromatography using Sephadex G-100 column (HA in log scale) (a); ClaveLL resolved in two main peaks through gel filtration chromatography using Sephacryl S-300 column connected to ÄKTA-FPLC system (b); ClaveLL resolved in one peak through chromatography using C4 column connected to RP-HPLC system, mAbs 215 nm (c) and 280 nm (d).

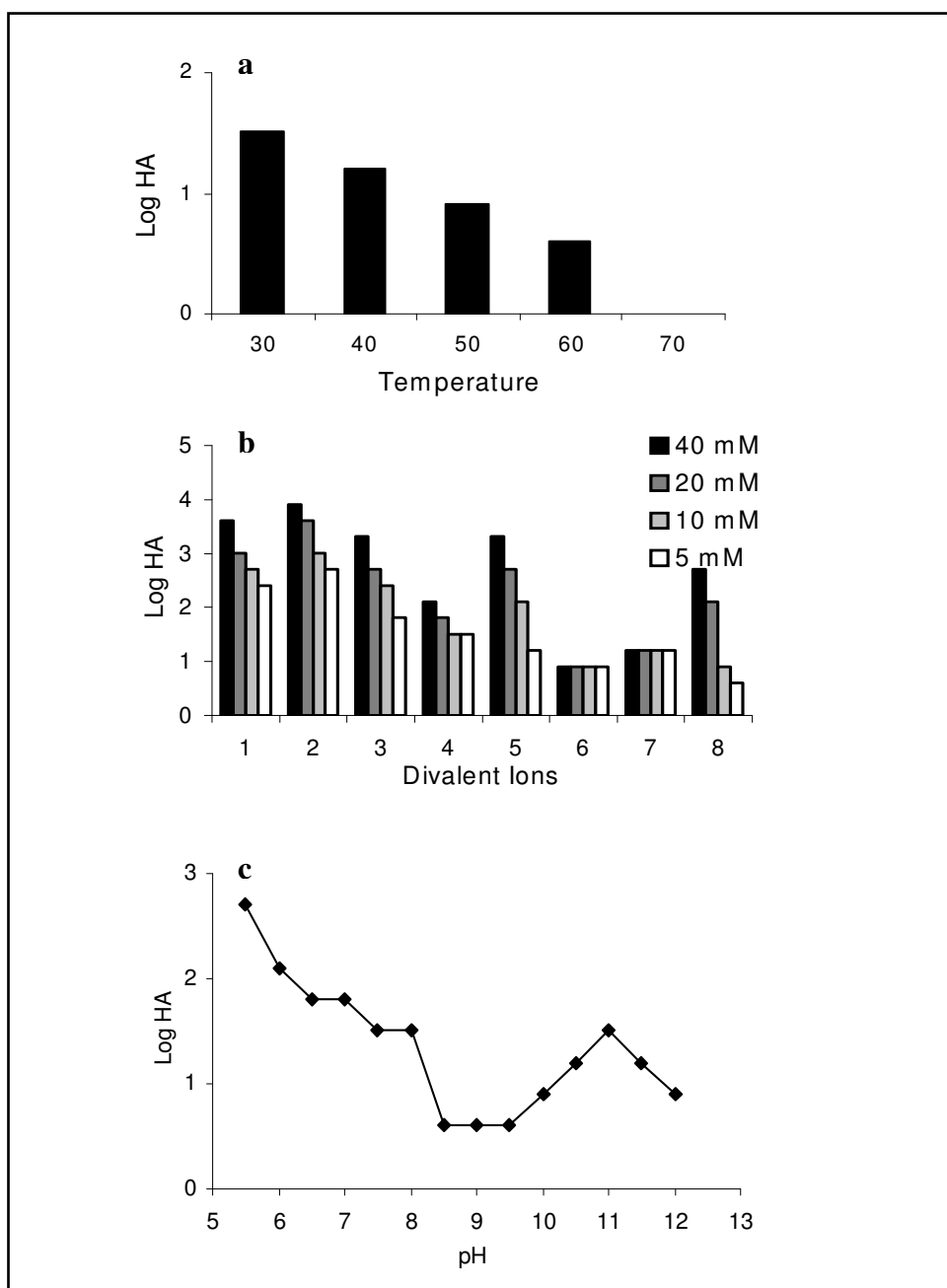


Figure 2. (a) Effect of temperature on ClaveLL HA. At room temperature, HA corresponds to observed in 30 °C. (b) Effect of ions on ClaveLL HA before dialysis (1, MnCl_2 ; 2, BaCl_2 ; 3, CaCl_2 ; 4, MgCl_2 ; in ions absence HA corresponds to observed with 5 and 10 mM MgCl_2) and after dialysis in EDTA solution (5, MnCl_2 ; 6, CaCl_2 ; 7, MgCl_2 ; 8, $\text{MnCl}_2\text{-CaCl}_2$; in ions absence HA was smaller than observed with 5 mM $\text{MnCl}_2\text{-CaCl}_2$). (c) Effect of pH on ClaveLL HA.

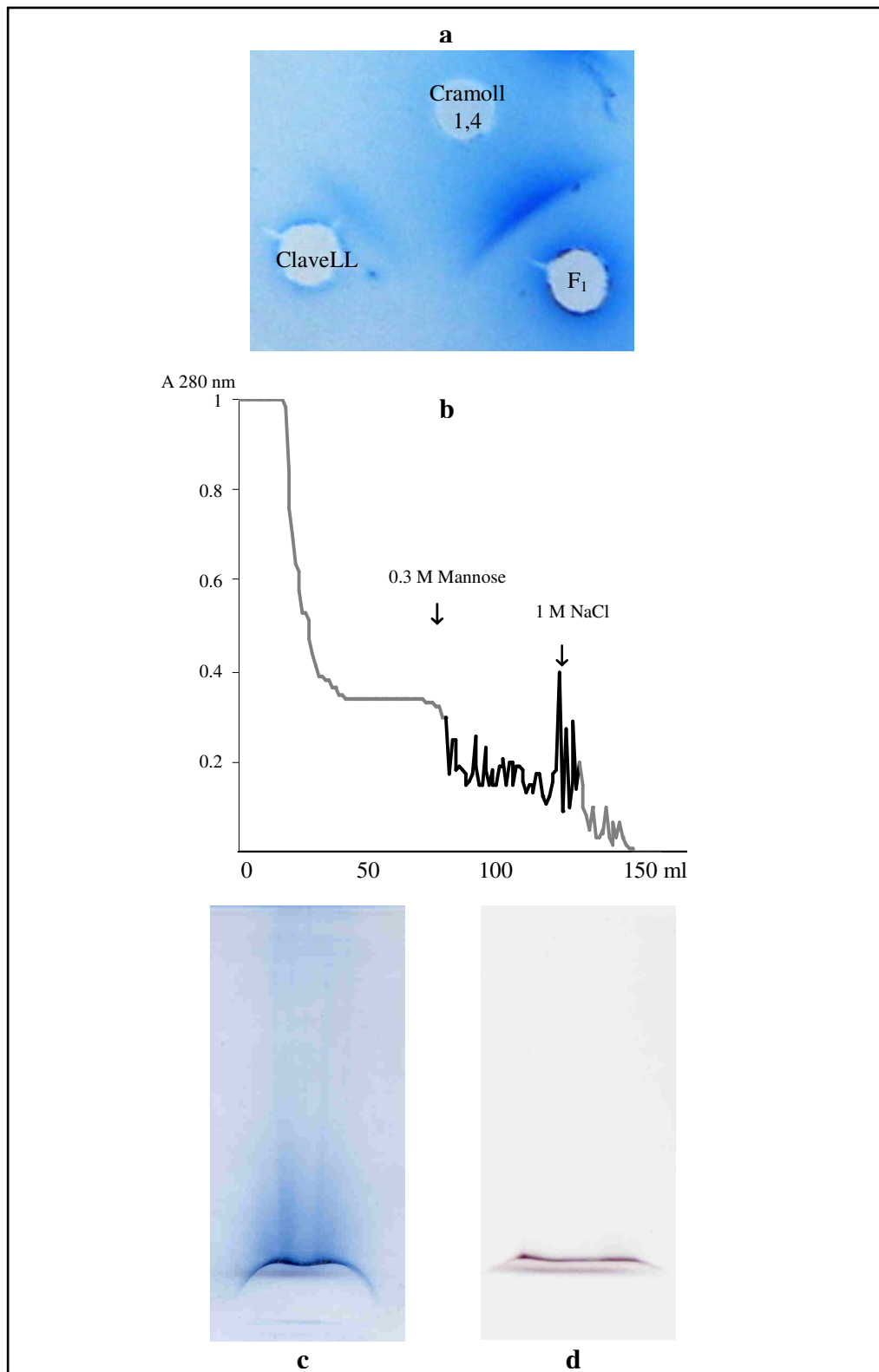


Figure 3. (a) Radial diffusion assay with F₁ and ClaveLL using Cramoll 1,4. (b) F₁ chromatography on Cramoll 1,4-Sepharose CL-4B. (c) SDS-PAGE of ClaveLL (obtained from Sephadex G-100 chromatography) stained with Coomassie Blue or (d) Schiff's reagent.

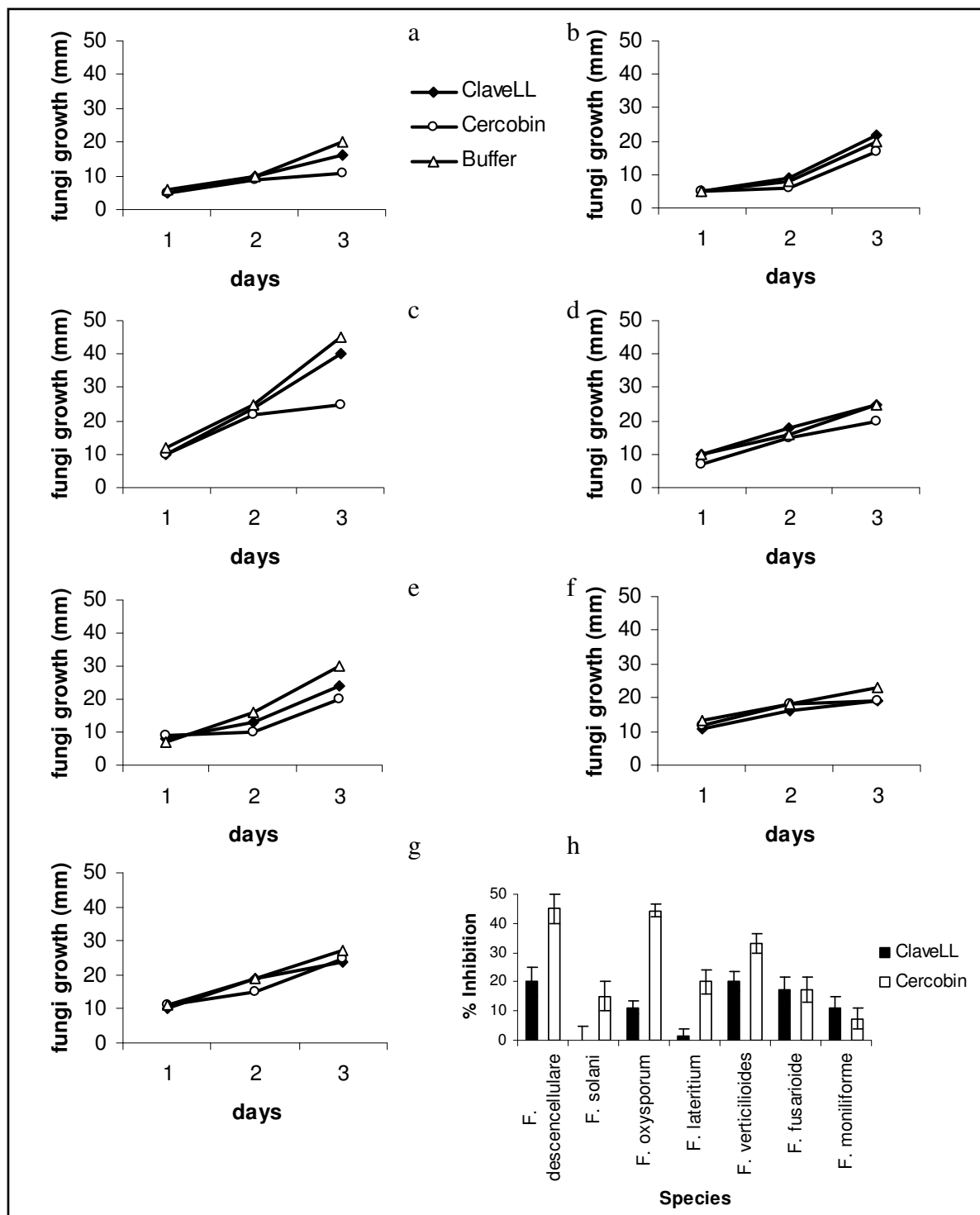


Figure 4. *Fusarium* growth curve of *F. decemcellulare* (a), *F. solani* (b), *F. oxysporum* (c), *F. lateritium* (d), *F. verticiloides* (e), *F. fusarioides* (f) and *F. moniliforme* (g) in YNB agar medium containing lectin buffer, ClaveLL or cercobin on surface, and inhibition (%) of fungi growth (h). Lectin buffer and cercobin constituted negative and positive controls, respectively.

Artigo 2: a ser submetido ao periódico *International Biodeterioration & Biodegradation*

**PURIFIED *Cladonia verticillaris* LICHEN LECTIN: INSECTICIDAL ACTIVITY ON
Nasutitermes corniger (Isoptera: Termitidae)**

**PURIFIED *Cladonia verticillaris* LICHEN LECTIN: INSECTICIDAL ACTIVITY ON
Nasutitermes corniger (Isoptera: Termitidae)**

**Michele D. C. da Silva^a; Roberto A. Sá ^a; Thiago H. Napoleão ^a; Francis S. Gomes ^a;
Nataly D. L. Santos^a; Auristela C. Albuquerque^b; Haroudo S. Xavier^c; Patrícia M. G.
Paiva^a; Maria T. S. Correia ^a; Luana C. B. B. Coelho ^{a*}.**

^aLaboratório de Glicoproteínas, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco; ^bDepartamento de Biologia, Área Zoologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco; ^cLaboratório de Farmacognosia, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco.

***Corresponding author: Luana C. B. B. Coelho**

e-mail address: micheledalvina@ig.com.br

Abstract

Cladonia verticillaris lichen lectin (ClaveLL) was isolated through Sephadex G-100 gel filtration chromatography and characterized as a pure lectin through AKTA-FPLC and HPLC systems. The lichen extract (E), protein fraction (F₁) and ClaveLL were assayed to evaluate their potential insecticidal and/or repellence activities on termite *Nasutitermes corniger*. E, F₁ and ClaveLL were evaluated for hemagglutinating activity (HA), protein estimation and presence of secondary metabolites. E and F₁ samples and active ClaveLL, free of secondary metabolites that can promote insect mortality, were able to induce mortality of termites with LC₅₀ values for workers and soldiers of 47.42 and 103.59 µg protein/cm² for E, 51.97 and 121.46 µg protein/cm² for F₁, and 3.13 and 8.01 µg protein/cm² for lectin, respectively, after 29 % of the experimental time. *C. verticillaris* preparations are potential tools for researches involving termites (or other insects) of economic interest to wooden industry or agriculture as well as preservation of plant species in extinction that are targets of termites or other plagues.

Key words: lectin, lichen, *Cladonia verticillaris*, insecticidal activity, termite, *Nasutitermes corniger*.

Introduction

Termites constitute a great group of social insects and they are responsible for prejudice and damage caused in trees or wood products; these insects however, are also ecologically beneficial since they are the great responsible for decomposition of cellulose, the most present carbohydrate polymer in the world, acting in biorecycling. The genus *Nasutitermes* belongs to the most species-rich Termitidae family that contains around 70-75 % of all termite cataloged species, wood, grass or soil feeders (Inward *et al.*, 2007; Tokuda *et al.*, 1999), Nasutitermitinae subfamily, which have 93 genera and is represented by more than 240 species, forming the largest genus of wood-feeding Isoptera (Bergamaschi *et al.*, 2007). Representatives of these insects can be found mainly distributed over tropical regions.

Termites have ability to digest cellulose through three types of cellulases, with endogenous and symbiotic origins, endoglucanases, exoglucanases and β -glucosidases (Breznak and Brune, 1994); enzymes of endogenous origin are those encoded by genes in the termite genome and enzymes of symbiotic origin are those produced by hindgut symbionts (Zhou *et al.*, 2008). All order Isoptera is constituted of seven families that have (except Termitidae) cellulolytic protozoa in the hindguts of termites (Tokuda *et al.*, 1999), being according to morphological and molecular characters, the Termitidae family accepted as the most recently evolved and derived Isopteran family (Miura *et al.*, 1998).

Plants use either secondary metabolites or macromolecules resultant of the primary metabolism against microorganisms, insects, herbivorous or in response to abiotic stress. The main roles of plant secondary metabolites are believed to protect vegetables from attack by pathogens or predators and also to survive to other biotic and abiotic stresses (Zhao *et al.*, 2005). In plants, as well reviewed by Carlini and Grossi-de-Sá (2002), among the many proteins involved in defense's mechanisms are lectins, ribosome-inactivating proteins (types 1 and 2) (He and Liu, 2003), inhibitors of proteolytic enzymes (protease inhibitors) (Lalitha *et*

al., 2005) and glycohydrolases (α -amylase inhibitors) (Kluh *et al.*, 2005), arcelins (found only in wild accessions of the common bean *Phaseolus vulgaris*) (Rougé *et al.*, 1993), chitinases (Fitches *et al.*, 2004), hemilectins also denominated chimerolectins (protein like monovalent lectins), canatoxin-like protein (protein like hemilectins) (Stanisçuaski *et al.*, 2005) as well as modified forms of storage proteins and ureases (Follmer, 2008).

Lectins, proteins of wide distribution and not immune origin that present the ability to recognize a variety of carbohydrates or other glycosilated molecules free or present on cell surface through its reversible bind sites (Kennedy *et al.*, 1995) stand out in biotechnology due to many applications and other potential utilities that are daily evaluated and studied by researchers in lectinology. Several lectins have revealed effects in different life stages of insects that indicate insecticide activity against Coleoptera (Sadeghi *et al.*, 2006; Leite *et al.*, 2005; Macedo *et al.*, 2002; Machuka *et al.*, 2000), Homoptera (Dutta *et al.*, 2005; Bandyopadhyay *et al.*, 2001), Hemiptera (Sauvion *et al.*, 2004), Diptera (Kaur *et al.*, 2006), Diptera and Hemiptera (Trigueros *et al.*, 2003), Lepidoptera (Coelho *et al.*, 2007; Fitches *et al.*, 2001;), Coleoptera and Lepidoptera (Macedo *et al.*, 2007), Hymenoptera (Couty *et al.*, 2001) and other order insect representatives. The unique report of lectin toxicity on an insect of Isoptera order is the lethal effect of a lectin from the heartwood of a timber tree (*Myracrodruon urundeuva*) on *Nasutitermes corniger* (Sá *et al.*, 2008). This lectin induced mortality of workers and soldiers with values of LC50 of 0.248 mg/ml and 0.199 mg/ml, respectively. The authors pointed out the possibility of participation of this lectin in the natural resistance of *M. urundeuva*.

Around its wide distribution, lectins can be found and isolated from lichens (Elifio *et al.*, 2000; Molina and Vicente, 2000; Ingram, 1982; Lockhart *et al.*, 1978; Howe and Barrett, 1970); the involvement of these molecules in the symbiosis establishment have been studied and its possible physiological role suggested (Elifio *et al.*, 2000; Molina and Vicente, 2000;

Kardish *et al.*, 1991; Petit *et al.*, 1983; Petit, 1982; Lockhart *et al.*, 1978). ClaveLL is a new lichen lectin that has been purified in your laboratory; its potential antimicrobial activities and its use as histochemical marker are being evaluated.

In this work, we propose ClaveLL as a pure lectin sample (free of secondary metabolites that can interfere in insecticidal assay) with insecticide activity against *Nasutitermes corniger*, a termite species wood parasite and, because of this, of larger interest for wooden industry and for preservation of areas with tree species in extinction. Additionally, a lichen protein fraction and extract of *C. verticillaris* samples used in purification protocol of ClaveLL also were active against termites.

Material and Methods

Lectin Purification

C. verticillaris lichen lectin was obtained through a sequential purification protocol; lichen was dried at room temperature and an overnight extraction was performed in 0.15 M sodium phosphate buffer, pH 7, containing 0.15 M NaCl (PBS), for 16 h at room temperature, followed by filtration, centrifugation and protein precipitation with 30 % (w/v) ammonium sulphate for 4 h at room temperature. Fraction precipitate, F₁ (0-30 %), was obtained by centrifugation, submitted to protein quantification (Lowry *et al.*, 1951) and chromatography (18 mg) on gel filtration Sephadex G-100 (1.4 x 63 cm) column to obtain pure and active lectin, denominated ClaveLL. Extract (E), protein fraction (F₁) and ClaveLL samples obtained in the purification process had its haemagglutinating activity evaluated with glutaraldehyde-treated erythrocyte suspension, 2.5 % (v/v) in 0.15 M NaCl (Bing *et al.*, 1967) according to Correia and Coelho (1995). Activity inhibition assays were performed with N-acetylglucosamine and animal glycoprotein solutions.

Phytochemical Analysis

Phytochemical evaluation used E, F₁ and ClaveLL samples in PBS and metanolic extract that was prepared through a metanolic infusion (3 g of triturated lichen) under constant agitation for 30 min. Samples were analyzed by thin layer chromatography on silica sheet (Merck, Germany). The analyses used to mobile phase several systems of development, reagents for adequate revelation and chromatographic standards, to investigate the presence of alkaloids (EtOAc- HCOOH- AcOH- H₂O (100:11:11:26 v/v) and Dragendorff's reagent) (Wagner and Bladt, 1996), terpenoids as triterpenoids and steroids (EtOAc- HCOOH- AcOH- H₂O (100:0.5:0.5:0.5 v/v) and Liebermann-Burchard reagent) (Harbone, 1998), saponins (EtOAc- HCOOH- AcOH- H₂O (100:11:11:26 v/v) and anisaldehyde to reveal) (Wagner and Bladt, 1996), iridoids (EtOAc- HCOOH- AcOH- H₂O (100:11:11:26 v/v) and vanillin sulphuric acid to reveal) (Wagner and Bladt, 1996), sugars (n-BuOH- Me₂CO- phosphate buffer, pH 5.0 (40:50:10 v/v) and 2,3,5 triphenyltetrazolium chloride to reveal) (Wallenfels, 1950) and polifenols as coumarins (Et₂O- toluene- AcOH 10% (50:50:50 v/v) and UV 365 nm to detect) (Wagner and Bladt, 1996), cinnamic deriveds, phenylpropanoglucosides, flavonoids and fenolic acids (EtOAc- HCOOH- AcOH- H₂O (100:11:11:26 v/v) and Neu's reagent) (Wagner and Bladt, 1996; Markhan, 1982; Neu, 1956), condensed proanthocyanidins and leucoanthocyanidins (EtOAc- HCOOH- AcOH- H₂O (100:11:11:26 v/v) and vanillin chloridric to reveal) (Roberts *et al.*, 1956) and hydrolysable tannins (n-BuOH- Me₂CO- phosphate buffer pH 5.0 (40:50:10 v/v) and iron alumen to reveal) (Stiasny, 1912).

Insecticidal Assays

Termite species *N. corniger* collected in the area of the Universidade Federal Rural de Pernambuco was identified by Dr. Luiz Roberto Fontes (from Superintendência de Controle de Endemias, SUCEN, Brasil). Termite colonies were kept at vegetation house from the Departamento de Agronomia from Universidade Federal Rural de Pernambuco. Termiticidal

activity was evaluated by a bioassay based on the method described by Kang *et al.* (1990); assays were carried out on Petri plates (90 x 15 mm) covered by filter paper. Disks of filter paper (4 cm diameter) were soaked with E or F₁ samples for 4, 0.4 or 0.2 mg of total protein (corresponding to 320, 32 or 16 µg/cm² offered on filter paper for the feeding of the insects, respectively), lectin sample for 120, 80, 40 or 10 µg of total protein (corresponding to 9.6, 6.4, 3.2 or 0.8 µg protein/cm², respectively), or with PBS (negative control), were dried at room temperature and then placed in the plates. Twenty insects (16 workers and 4 soldiers) from termite colonies of the vegetation house properly adapted to the environment were carefully transferred to plates. All plates were kept protected of the light, at 28 °C; monitoring of assays was performed daily to detect death of insects and to guarantee the humidity of the plates adding a water drop to paper covering plates until death of all insects. Assays were made in quintuplicate. Survival rates were obtained for each treatment and expressed as mean. Statistical analyses were determined through Statplus (2006). Significant differences between groups were established using Student's t-test ($p < 0.05$) assuming equal variances (homoscedastic) and considering the accumulative mortality during all assay; the concentration required to kill 50% of insects in each treatment (LC₅₀) was determined for E, F₁ and lectin after 29 % of the experimental time and defined from the data obtained with different protein concentration of samples using Probit Analysis with a reliability interval of 95%.

Repellence Assays

The potential repellent property from E, F₁ and ClaveLL samples was evaluated through assay based on Su *et al.* (1982). A 2% agar solution was added to Petri plates until the border of plates; after solidification and temperature reduction of gel for room temperature holes were made in agar by the removal of 1 central cylinder (25 mm diameter) and 8 peripheral cylinders (6 mm diameter). Disks of filter paper (6 mm diameter) were soaked with E or F₁

samples for 300, 150, 30 or 15 μg of total protein (corresponding to concentrations of 1060, 530, 106 or 53 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectively), lectin sample for 11.5, 5.75, 2.25, 1.5 or 0.75 μg of total lectin (corresponding to 40.6, 20.3, 7.95, 5.3 or 2.65 μg lectin/ cm^2 , respectively), or with PBS (negative control), were put to dry at room temperature and placed in the peripheral cylinders of plates. Each protein concentration was present in double in plates and each plate was carried in triplicate performing a total of 6 repetitions for each protein concentration assayed. Twenty insects (16 workers and 4 soldiers) were carefully transferred to central holes in the plates that were maintained protected of the light, at 28 °C; plates were daily observed to evaluate absence or presence of termites in the disks with E, F₁, lectin or PBS treated, construction standards of tunnels in agar and closing by insects of constructed galleries and to detect death of insects.

Results

A quantity of 20 g from *C. verticillaris* flour allowed to obtain 1162.50 mg (total protein) in E, 510.14 mg in F₁ and 18.58 mg of ClaveLL through a simple established protocol; ClaveLL represents 0.093 percent of the dry brute flour, 1.59 percent and 3.64 percent of the total protein present in E and F₁, respectively. These samples agglutinated glutaraldehyde-treated human erythrocytes from all ABO system, rat, chicken, quail and (mostly) rabbit. E and F₁ showed elevated protein concentration, HA and specific HA; moreover, they (including purified active ClaveLL through molecular exclusion chromatography) were free of secondary metabolites constituting samples chosen to evaluate its potential insecticidal properties via protein.

Phytochemical analysis of E, F₁ and ClaveLL samples in PBS showed none constituting secondary metabolites (alkaloids, terpenoids as triterpenoids and steroids, saponins, iridoids and polyfenols as coumarins, cinnamic deriveds, phenylpropanoglucosides,

flavonoids and fenolic acids, condensed proanthocyanidins and leucoanthocyanidins and hydrolysable tannins); the chromatograms revealed total absence of secondary metabolites. The metanolic extract analyzed to potential presence of terpenoids, revealed bands corresponding to β -amirin and β -sitosterol standards and additional bands of smaller polarity that characterize triterpenes and steroids, which reacted with Liebermann-Burchard reagent. No other secondary metabolite was detected in the metanolic extract, through the preparative analysis by thin layer chromatography on silica sheet. Presence of terpenes in the metanolic extract proved the existence of secondary metabolites in the lichen constitution, which were not extracted with PBS as the first step to obtain the lectin.

E, F₁ and ClaveLL free of secondary metabolites samples in PBS were submitted to insecticidal assays against *N. corniger* to evaluate termiticidal activity; E, F₁ and ClaveLL samples in all tested concentrations promoted 100% of workers and soldiers mortality below time obtained for control; all assays also showed survival rate of 50 % in a smaller time than that obtained for the control. ClaveLL was able to promote premature death of insects (comparing with the negative control) in all tested concentrations; the insects reacted in different way front to used concentrations, presenting periods for the total mortality in each rehearsal where the minor and larger time to the total mortality did correspond to the largest and smaller offered concentrations, respectively.

Effect analyzes of E and F₁ samples of 4, 0.4 or 0.2 mg of total protein (corresponding to 320, 32 or 16 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectively) on workers showed that there was death induction of 100% of workers after 65, 76 and 82 % of the experimental time (E) and 41, 59 and 71 % of days (F₁), in respective concentrations; survival rate of 50 % for E treatment was observed around 12 % of days (4 mg) and between 24-30 and 30-35 % of days (with 0.4 and 0.2 mg of total protein, respectively) and for F₁ treatment was around 12 % of days (4 mg), between 24-30 and 29 % of days (with 0.4 and 0.2 mg of total protein, respectively). Mortality induction

with E and F₁ was related to protein concentration on workers (Figure 1a and 1b). LC₅₀ value for workers was 47.42 (Standard error, SE, 15.59) for E and 51.97 µg protein/cm² (SE 25.41) for F₁ (corresponding to 3.0 and 3.26 mg/ml, respectively) after 29 % of the experimental time. In negative control of E and F₁ assays 100% of mortality was observed after 100 % of days and survival rate of insects was lower than 50% around 41 % of days. On soldiers E and F₁ samples for 320, 32 and 16 µg protein/cm² also induced death of 100% of insects after 41, 71 and 82 % of the experimental time (E) and 41, 53 and 76 % of days (F₁) in these concentrations, respectively; survival rate of 50 % for treatments was observed around 12, 35 and 41 % of days for E and around 12, 29 and 35 % of days for F₁ (concentrations above cited, respectively). E and F₁ mortality induction was also related to protein concentration on soldiers (Figure 1c and 1d). LC₅₀ value for soldiers was 103.59 (SE 18.17) for E and 121.46 µg protein/cm² (SE 34.87) for F₁ (corresponding to 6.5 and 7.7 mg/ml, respectively) after 29 % of the experimental time. Negative control on E and F₁ assays showed 100% of mortality after 94 % of days and survival rate of 50% around 41 % of days.

E and F₁ showed statistically significant difference only with 4 mg of total protein (320 µg/cm²) treatment in relation to workers and soldiers death of negative control. There was significant difference among E 4 mg and 200 µg of total protein treatments to induce workers death. Effects of other treatments with E and F₁ on workers or soldiers were not significantly different; result of E and F₁, 4 mg of total protein treatment on death of insects was not statistically different.

The analyzes of workers revealed that treatment with 120 µg of total lectin offered (9.6 µg lectin/cm²) induced death of all insects after 37 % of the experimental time (average in percentile); 100% of mortality after 46, 56 and 63 % of days were promoted for treatments with 80 (6.4 µg lectin/cm²), 40 (3.2 µg lectin/cm²) and 10 (0.8 µg lectin/cm²) of total lectin, respectively. Survival rate of 50 % for these treatments was observed around 22 and 24 % of

days for treatment with 120 and 80 μg of total lectin, and around 29 and 34 % of days for treatments with 40 and 10 μg of total lectin, respectively. Mortality induction with the lectin was also proportional to protein concentration on *N. corniger* workers (Figure 2a). LC_{50} value for workers was 3.13 μg lectin/ cm^2 (SE 0.34) (corresponding to 0.196 mg/ml) after 29 % of the experimental time. In negative control of lectin assays 100% of mortality was observed only after 100 % of days and survival rate lower than 50% around 63 % of days. Soldier analyzes showed that 9.6 μg lectin/ cm^2 treatment induced death of all insects after 39 % of the experimental time (average in percentile), 100% of mortality after 46, 59 and 68 % of days were promoted for treatments with 6.4, 3.2 and 0.8 μg lectin/ cm^2 , respectively. Survival rate of 50 % for these treatments was observed around 27, 41, 49 and 56 % of days for treatments of insects with 9.6, 6.4, 3.2 and 0.8 μg lectin/ cm^2 , respectively. Lectin mortality induction is also proportional to protein concentration on *N. corniger* soldiers (Figure 2b). LC_{50} value obtained for soldiers caste was 8.01 μg lectin/ cm^2 (SE 0.24) (corresponding to 0.5 mg/ml) after 29 % of the experimental time. Negative control on lectin assays showed 100% of mortality after 98 % of time and survival rate of 50% around 83 % of days.

Results with all lectin treatments showed statistically significant difference for workers, soldiers and for all insect death induction in relation to control. There was none significant differences among lectin concentrations to induce workers death; however, concentration of 9.6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ showed statistical difference in relation to 3.2 and 0.8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ to promote death of soldiers, as well as 6.4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ in relation to 0.8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. The statistical analyses on all insects showed ClaveLL effect on termite death proportional to protein concentration (Figure 2c); 9.6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ was significantly different in relation to 0.8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ to promote death of all termites.

E, F₁ and ClaveLL samples showed no repellent property against workers or soldiers since these insects continuously and randomly visited peripheral cylinders containing disks of

filter paper with E, F₁ and lectin samples in all used concentrations as well as with PBS. Insects built galleries randomly, where was observed no standards related with samples or negative control presence and tunnel construction. Termites maintained galleries open and active throughout the experiment duration.

According to LC₅₀ determination, in relation to toxic activity on insect castes, effect of E, F₁ and ClaveLL was higher on workers than soldiers.

Discussion

ClaveLL was simple and efficiently purified and yielded milligram quantities (18 mg from 20 g of flour); *C. verticillaris* is a lichen of wide distribution on the world and represents a rich lectin source. ClaveLL with high affinity to N-acetyl-D-glucosamine and several glycoproteins which summed to the elevated protein concentration available awoke the interest in investigation of its potential applicability as an insecticide molecule.

It is known that chemical plant defence against microorganisms, insects or herbivore predators can be due to secondary metabolites of low molecular weight and to lectins or many other protein types. Evaluated samples showed to be free of alkaloids, terpenoids, saponins, iridoids, polifenols, condensed anthocyanidins and hydrolysable tannin compounds that can be responsible for insecticidal action in plants suggesting that action of samples against termites evaluated in this work occur via lectin.

All concentrations of tested lectin induced mortality of termites. Effect of different lectin concentrations on termites seems to be more effective on soldiers since there was statistical difference for this caste when lectin concentration varied. However effect of lectin seems to be increased along time on workers once that LC₅₀ value for workers it was lower in relation to LC₅₀ value for soldiers, after 29 % of the experimental time. Lectins also showed effects in different life stages of larva insect (Coelho *et al.*, 2007; Macedo *et al.*, 2007; Leite

et al., 2005; Macedo *et al.*, 2002; Fitches *et al.*, 2001), nymph (Bandyopadhyay *et al.*, 2001) and adult stage (Sauvion *et al.*, 2004) and on oviposition (Sadeghi *et al.*, 2006); Similarly to lectin from the *M. urundeuva* heartwood (MuHL), termiticidal effect of ClaveLL yielded different LC₅₀ values for soldier and worker castes but, on the other hand, ClaveLL was more effective on workers while MuHL was more toxic for soldiers (Sá *et al.*, 2008).

Treatment with 9.6 µg lectin/cm² was the main concentration with toxic effect on termites, inducing to death all workers and soldiers at 37 and 39 % of the experimental time respectively. Lectin effects on the insects are expressed using different parameters to protein values according to used experimental methods that generally are based on bioassays with lectin incorporation into artificial diets offered to target insects. Lectin toxicity seems to depend upon both the necessary resistance of the molecule against assimilatory proteins and proteolytic degradation by the insect digestive enzymes and on the binding to insect gut structures, in the peritrophic membrane and/or chitinous structures in the midgut region (Coelho *et al.*, 2007; Macedo *et al.*, 2007). Insecticidal action of lectins still is unknown, but it is probable that involves its binding to glycoproteins of midgut epithelial cells; it is suggested that various modes of action exist to different lectins at the cellular levels (Sauvion *et al.*, 2004), not necessarily implying in the disruption of cellular function and lysis. Action mechanism of lectins as toxic molecules can also be related to digestive enzymes and assimilatory proteins in which lectins can interfere with its functions and inhibiting digestion and absorption causing nutritional deprivation (Coelho *et al.*, 2007; Leite *et al.*, 2005; Eisemann *et al.*, 1994).

In general, N-acetyl-D-glucosamine specific lectins with ability to bind to chitin appear to own insecticidal property; however, plant lectins with different specificities to sugars also showed ability as insecticidal molecules suggesting that this property is not exclusive to N-acetyl-D-glucosamine specific lectins. For example, XCL, a *Xerocomus*

chrysesteron (mushroom) lectin with affinity for D-galactose and lactose and to a lesser extent, N-acetyl-D-galactosamine, had effect on *Drosophila melanogaster* and pea aphid *Acyrtosiphon pisum* showing LC₅₀ values of 0.4 mg/ml and 0.023 mg/ml respectively (Trigueros *et al.*, 2003). Other *Gracilaria ornata* lectin (a red alga) named GOL only inhibited by some glycoproteins showed that 1% (w/w) caused a significant 65.1% reduction in larval survival in relation to control artificial seeds. Also, GOL significantly affected the percentage of adult emergence in relation to control (Leite *et al.*, 2005). In other work, Sadeghi *et al.* (2006) used 14 plant lectins (of four lectin families) with several specificities at a concentration of 0.05% (w/v) solution; they showed that all lectins had deterrent effect against oviposition of *C. maculatus* adults varying of 36 to 78 %. *Talisia esculenta* lectin (TEL) isolated from seeds with chitin-binding properties and inhibited by mannose and glucose produced ca. 90% mortality to *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* larvae with LD₅₀ and ED₅₀ (decrease of 50% weight) of ca. 1% (w/w) for both insects (Macedo *et al.*, 2002).

N. corniger are insects that have ability to build tunnels and galleries and on stress condition at presence of possible toxic substances they can react closing these spaces to avoid physical contact (Su *et al.*, 1982). The investigation of repellent activity revealed that ClaveLL and other samples (E and F₁) did not have repellent property on termites; the results suggested that the insects have eaten the paper disk containing lectin and that the insecticidal effect was due to action of lectin. Similarly to ClaveLL, MuHL did not show repellent property (Sá *et al.*, 2008).

ClaveLL may promote termite mortality as already proposed by the literature to other lectins; according to subcellular targets of lectin, it may decrease food intake through its binding to the midgut epithelium or to the peritrophic matrix (Fitches *et al.*, 1997; Eisemann *et al.*, 1994); it could cross midgut epithelial barrier and pass into insect circulatory system

resulting in a toxic action interfering with endogenous lectins involved in self-defense present in the haemolymph (Fitches *et al.*, 2001); it may be internalized by endocytotic vesicles into the epithelial cells and blocks nuclear localization sequence-dependent nuclear protein import inhibiting cell proliferation (Yu *et al.*, 1999).

There is an increasing biotechnological and industrial interest in the discovery of new natural pesticides to promote a biological control avoiding the environmental impact. In this conception, genes coding for inhibitors of digestive enzymes, amylase inhibitors, peptides, lectins and other molecules have been used in production of transgenic plants with resistance to microorganisms (Prasad *et al.*, 2008) and insects (Hilder and Boulter, 1999; Schuler *et al.*, 1998). Inside our interest, genes of lectins are being widely introduced into transgenic plant production of economic interest (McCafferty *et al.*, 2008; Ramesh *et al.*, 2004).

ClaveLL is a lectin easily purified in milligram quantities that can be considered as a possible biotechnological tool in plague management strategies (as termite species, wooden parasites) for the plant species preservation and to decrease the prejudices of the wooden industry or agriculture. Therefore, ClaveLL could be of biotechnological interest to make trees of industrial or commercial importance more resistant to termite action.

References

- Bandyopadhyay, S., Roy, A., Das, S. Binding of garlic (*Allium sativum*) leaf lectin to the gut receptors of homopteran pests is correlated to its insecticidal activity. *Plant Science*, v. 161, p. 1025–1033, 2001.
- Bergamaschi, S., Dawes-Gromadzki, T. Z., Luchetti, A., Marini, M., Mantovani, B. Molecular taxonomy and phylogenetic relationships among Australian *Nasutitermes* and *Tumulitermes* genera (Isoptera, Nasutitermitinae) inferred from mitochondrial COII and 16S sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 45, p. 813–821, 2007.

- Bing, D. H., Weyand, J. G., Stavinsky, A. B. Hemagglutination with aldehyde-fixed erythrocytes for assay of antigens and antibodies. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, v. 124, p. 1166-1170, 1967.
- Breznak, J. A., Brune, A. Role of microorganisms in the digestion of lignocellulose by termites. *Annual Review of Entomology*. v. 39, p. 453-487, 1994.
- Carlini, C. R., Grossi-de-Sá, M. F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon*, v. 40, p. 1515-1539, 2002.
- Coelho, M. B., Marangoni, S., Macedo, M. L. R. Insecticidal action of *Annona coriacea* lectin against the flour moth *Anagasta kuehniella* and the rice moth *Corcyra cephalonica* (Lepidoptera: Pyralidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 146, p. 406-414, 2007.
- Correia, M. T. S., Coelho, L. C. B. B. Purification of a glucose/mannose specific lectin, Isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart (camaratu bean). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 55, p. 261-273, 1995.
- Couty, A., de la Vinã, G., Clark, S. J., Kaiser, L., Pham-Delègue, M.-H., Poppy, G. M. Direct and indirect sublethal effects of *Galanthus nivalis* agglutinin (GNA) on the development of a potato-aphid parasitoid, *Aphelinus abdominalis* (Hymenoptera: Aphelinidae). *Journal of Insect Physiology*, v. 47, p. 553–561, 2001.
- Dutta, I., Majumder, P., Saha, P., Ray, K., Das, S. Constitutive and phloem specific expression of *Allium sativum* leaf agglutinin (ASAL) to engineer aphid (*Lipaphis erysimi*) resistance in transgenic Indian mustard (*Brassica juncea*). *Plant Science*, v. 169, p. 996–1007, 2005.
- Eisemann, C.H., Donaldson, R.D., Pearson, R.D., Cadogan, L.C., Vuocolo, T., Tellam, R.L. Larvicidal activity of lectins on *Lucilia cuprina*: mechanism of action. *Entomologia Experimentales et Applicata*, v. 72, p. 1-10, 1994.

- Elifio, S. L., Da Silva, M. D. C. C., Iacomini, M., et al. A Lectin from the lichenized basidiomycete *Dictyonema glabratum*. *New Phytology*, v. 148, p. 327-334, 2000.
- Fitches, E; Edwards, MG; Mee, C; Grishin, E; Gatehouse, AMR; Edwards, JP; Gatehouse, JA. Fusion proteins containing insect-specific toxins as pest control agents: snowdrop lectin delivers fused insecticidal spider venom toxin to insect haemolymph following oral ingestion. *Journal of Insect Physiology*, v. 50, p. 61-70, 2004.
- Fitches, E., Woodhouse, S.D., Edwards, J.P., Gatehouse, J.A. In vitro and in vivo binding of snowdrop (*Galanthus nivalis* agglutinin; GNA) and jackbean (*Canavalia ensiformis*; Con A) lectins within tomato moth (*Lacanobia oleracea*) larvae; mechanisms of insecticidal action. *Journal of Insect Physiology*, v. 47, p. 777-787, 2001.
- Fitches, E., Gatehouse, A.M.R., Gatehouse, J.A. Effects of snowdrop lectin (GNA) delivered via artificial diet and transgenic plants on the development of tomato moth (*Lacanobia oleracea*) larvae in laboratory and glasshouse trials. *Journal of Insect Physiology*, v. 14, p. 727– 739, 1997.
- Follmer, C. Insights into the role and structure of plant ureases. *Phytochemistry*, v. 69, p. 18-28, 2008.
- Harbone, J. B. 1998. *Phytochemical Methods*. Chapman & Hall 3.ed. London.
- He, W-J, Liu, W-Y. Cinnamomin: a multifunctional type II ribosome-inactivating protein. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 35, p. 1021-7, 2003.
- Hilder, V.A., Boulter, D. Genetic engineering of crop plants for insect resistance – a critical review. *Crop Protection*, v. 18, p. 177-191, 1999.
- Howe, M. L., Barrett, J. T. Studies on a hemagglutinin from the lichen *Parmelia michauxiana*. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 215, p. 97-104, 1970.
- Ingram, G. A. Haemagglutinins and haemolysins in selected lichen species. *The Bryologist*, v. 85, n. 4, p. 389-393, 1982.

- Inward, D. J. G., Vogler, A. P., Eggleton, P. A comprehensive phylogenetic analysis of termites (Isoptera) illuminates key aspects of their evolutionary biology. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 44, p. 953–967, 2007.
- Kang, H. Y., Matsushima, N., Sameshima, K., Takamura, N. Termite resistance tests of hardwoods of Kochi growth. The strong termiticidal activity of kagonoki (*Litsea coreana* L´eveill´e). *Mokuzai Gakkaishi*, v. 36, p. 78–84, 1990.
- Kardish, N., Silberstein, L., Fleminger, G., Galun, M. Lectin from the lichen *Nephroma laevigatum* Ach. Localization and function. *Symbiosis*, v. 11, p. 47-62, 1991.
- 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*, v. 445, p. 156-165, 2006.
- 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*, v. 26, p. 219-30, 1995.
- Lalitha, S; Shade, RE; Murdock, LL; Bressan, RA; Hasegawa, PM; Nielsen, SS. Effectiveness of recombinant soybean cysteine proteinase inhibitors against selected crop pests. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 140, p. 227-35, 2005.
- 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. 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*, v. 1724, p. 137-145, 2005.
- Lockhart, C. M., Rowell, P., Stewart, W. D. P. Phytohaemagglutinins from the nitrogen-

- fixing lichens *Peltigera canina* and *P. polydactyla*. FEMS Microbiology Letters, v. 3, p. 127-130, 1978.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, v. 193, p. 265–275, 1951.
- 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, v. 1571, p. 83–88, 2002.
- 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, p. 486-498, 2007.
- Machuka, J. S., Okeola, O. G., Chrispeels, M. J., Jackai, L. E. N. The African yam bean seed lectin affects the development of the cowpea weevil but does not affect the development of larvae of the legume pod borer. Phytochemistry, v. 53, p. 667-674, 2000.
- Markhan, K. R., 1982. Techniques of flavonoid identification. Academic Press, London.
- McCafferty, H. R. K., Moore, P. H., Zhu, Y. J. Papaya transformed with the *Galanthus nivalis* GNA gene produces a biologically active lectin with spider mite control activity. Plant Science, *in press*, 2008.
- Miura, T., Maekawa, K., Kitade, O., Abe, T., Matsumoto, T. Phylogenetic relationships among subfamilies in higher termites (Isoptera: Termitidae) based on Mitochondrial COII gene sequences, Annals of the Entomological Society of America, v. 91, p. 515-523, 1998.
- Molina, M. C., Vicente, C. Purification and characterization of two isolectins with arginase activity from the lichen *Xanthoria parietina*. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, v. 33, p. 300-307, 2000.
- Neu, R.A. A new reagent for differentiating and determining flavones on paper

chromatograms. *Naturwissenschaften*, v. 43, p. 82, 1956.

Petit, P. Phytolectins from the nitrogen-fixing lichen *Peltigera horizontalis*: the binding pattern of primary protein extract. *New Phytology*, v. 91, p. 705-710, 1982.

Petit, P., Lallemand, R., Savoye, D. Purified phytolectin from the lichen *Peltigera canina* var *canina* which binds to the phycobiont cell walls and its use as cytochemical marker in situ. *New Phytology*, v. 94, p. 103-110, 1983.

Prasad, B. D., Jha, S., Chattoo, B. B. Transgenic *indica* rice expressing *Mirabilis jalapa* antimicrobial (Mj-AMP2) protein shows enhanced resistance to the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Plant Science*, *in press*, 2008.

Ramesh, S., Nagadhara, D., Reddy, V. D., Rao, K. V. Production of transgenic indica rice resistant to yellow stem borer and sap-sucking insects, using super-binary vectors of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Science*, v. 166, p. 1077-1085, 2004.

Roberts, E. H., Cartwright, R. A., Wood, D. J. The flavones of tea. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 7, p. 637-646, 1956.

Sá, R. A., Napoleão, T. H., Santos, N. D. L., Gomes, F. S., Albuquerque, A. C., Coelho, L. C. B. B., Bieber, L. W., Paiva, P. M. G. Induction of mortality on *Nasutitermes corniger* by *Myracrodruon urundeuva* heartwood lectin. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *in press*, 2008.

Sadeghi, A., Van Damme, E. J. M., Peumans, W. J., Smagghe, G. Deterrent activity of plant lectins on cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (F.) oviposition. *Phytochemistry*, v. 67, p. 2078-2084, 2006.

Sauvion, N., Nardonb, G., Febvay, G., Gategouse, A. M. R., Rahbe', 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*, v. 50, p. 1137-1150, 2004.

- Schuler, T. H., Poppy, G. M., Kerry, B. R., Denholm, I. Insect-resistant transgenic plants. *Trends in Biotechnology*, v. 16, p. 168-175, 1998.
- Stanisçuaski, F., Silva, C. T. F., Mulinari, F., Alves, M. P., Carlini, C. R. Insecticidal effects of canatoxin on the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). *Toxicon*, v. 45, p. 753-60, 2005.
- Stiasny, E., 1912. The qualitative detection and differentiation of vegetable tannins. Collegium, Haltingen.
- 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*, v. 75, p. 188-193, 1982.
- Tokuda, G., Lo, N., Watanabe, H., Slaytor, M., Matsumoto, T., Noda, H. Metazoan cellulase genes from termites: intron/exon structures and sites of expression. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression*, v. 1447, p. 146-159, 1999.
- Trigueros, V., Lougarre, A., Ali-Ahmed, D., Rahbé, Y., Guillot, J., Chavant, L., Fournier, D., Paquereau, L. *Xerocomus chrysenteron* lectin: identification of a new pesticidal protein. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1621, p. 292-298, 2003.
- Wagner, H., Blatt, S., 1996. Plant drug analysis (2nd edn). Springer, New York.
- Wallenfels K. Detection of reducing sugars in paper chromatogram and quantitative evaluation. *Naturwissenschaften*, v. 37, p. 491-492, 1950.
- Yu, L. G., Fernig, D. G., White, M. R. H., Spiller, D. G., Appleton, P., Evans, R. C., Grierson, I., Smith, J. A., Davies, H., Gerasimenko, O. V., Petersen, O. H., Milton, J. D., Rhodes, J. M., Edible mushroom (*Agaricus bisporus*) lectin, which reversibly inhibits epithelial cell proliferation, blocks nuclear localization sequence-dependent nuclear protein import. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 274, p. 4890-4899, 1999.

Zhao, J., Davis, L. C., Verpoorte, R. Research review paper: Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, v. 23, p. 283-333, 2005.

Zhou, X., Wheeler, M. M., Oi, F. M., Scharf, M. E. Inhibition of termite cellulases by carbohydrate-based cellulase inhibitors: Evidence from *in vitro* biochemistry and *in vivo* feeding studies. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 90, p 31-41, 2008.

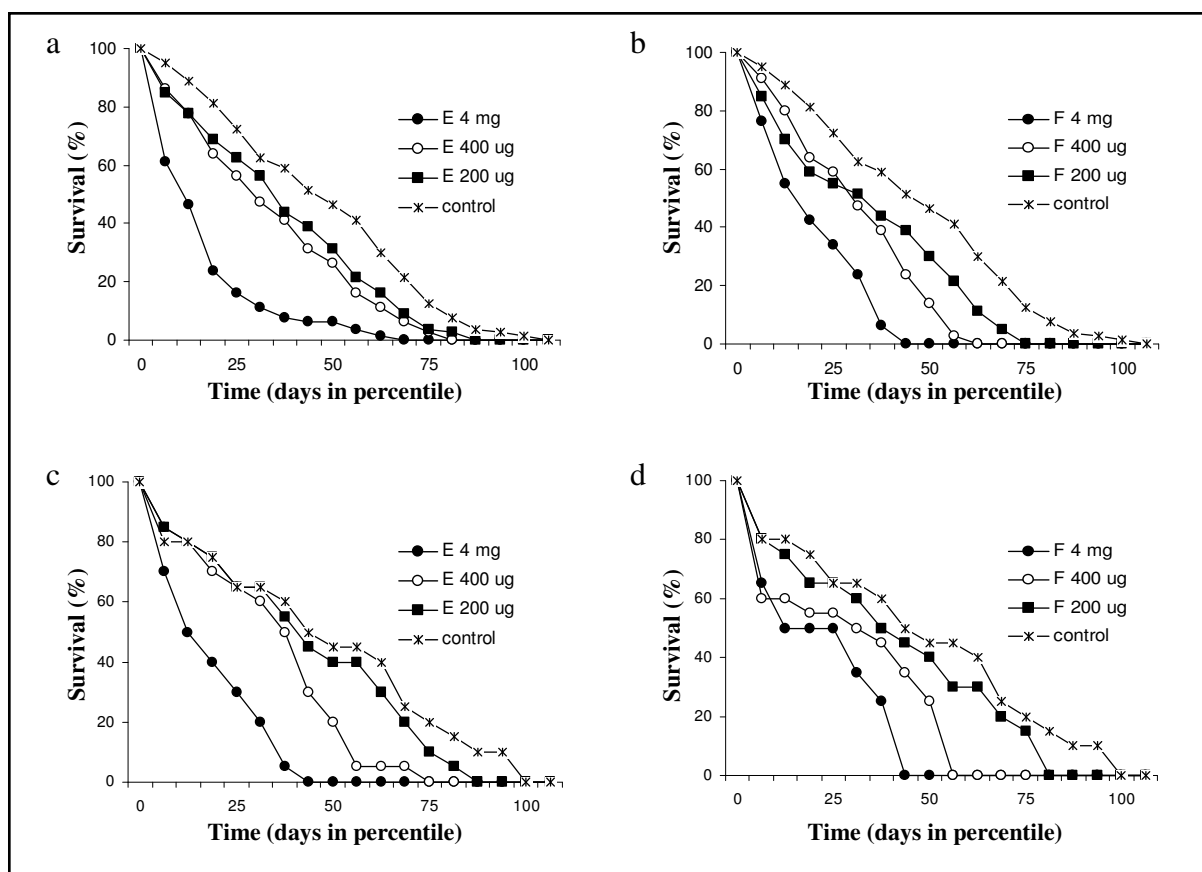


Figure 1. Survival percentile of *Nasutitermes corniger* worker (a and b) and soldier (c and d) castes in presence of PBS (control), extract (E) or fraction 0-30 % (F) (treatments at concentration of 0.2, 0.4 and 4 mg total protein). Each point represents the mean of five repetitions. Statistically significant difference was observed between 4 mg and control (in a, b, c and d), and between 4 mg and 200 μ g (in c).

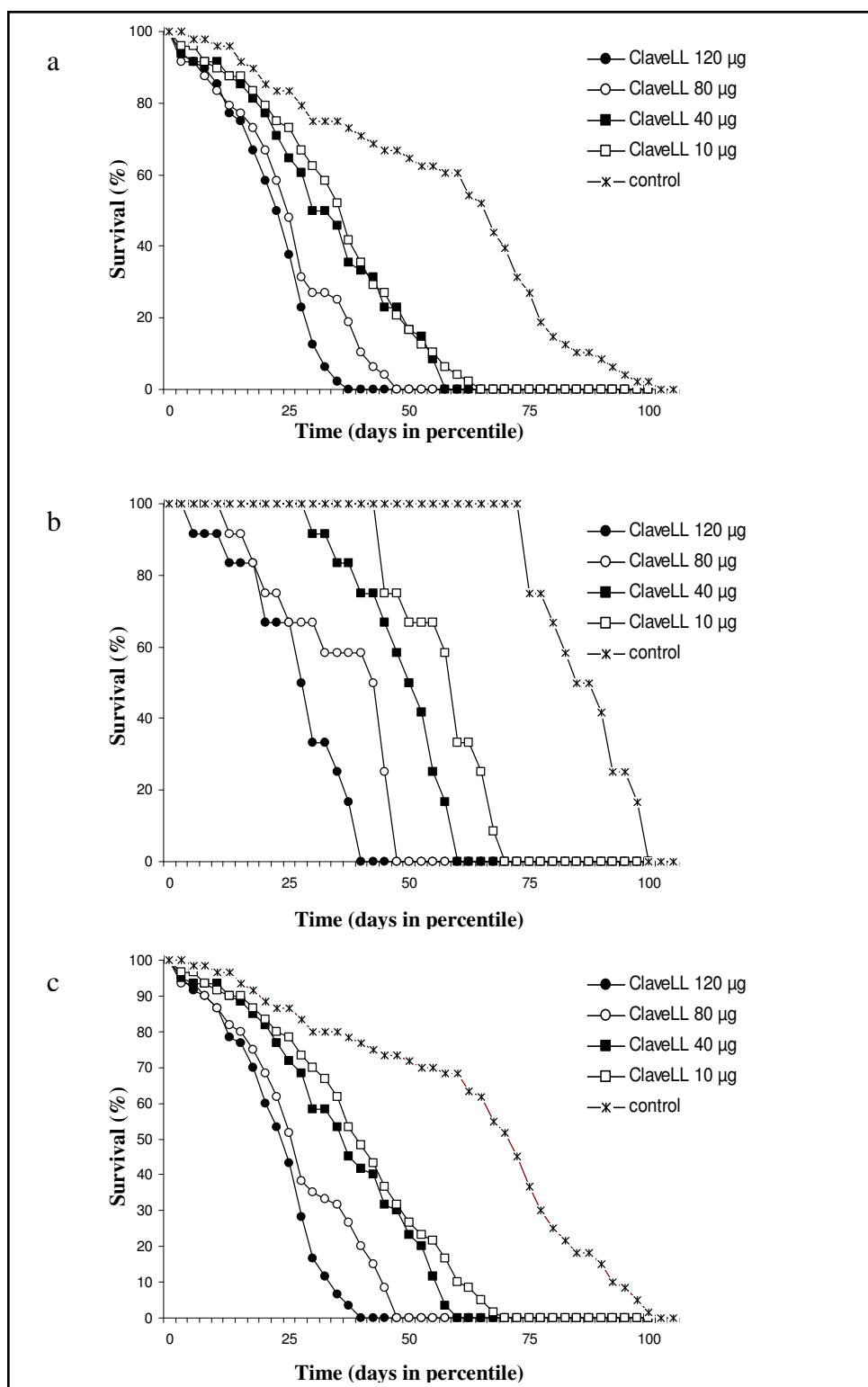


Figure 2. Survival percentile of *Nasutitermes corniger* worker (a), soldier (b) castes or all insects (c) in presence of PBS (control) or lectin (treatments at concentration of 10, 40, 80 and 120 µg total lectin). Each point represents the mean of five repetitions. Statistically significant difference was observed between all treatments and control, between 120 µg and 40 µg (in b), between 120 µg and 10 µg (in b and c), and between 80 µg and 10 µg (in b).

Artigo 3: a ser submetido ao periódico *Biodegradation*

**ANTIMICROBIAL AND INSECTICIDAL ACTIVITIES ON *Nasutitermes corniger*
(Isoptera: Termitidae) OF *Bauhinia monandra* LEAF LECTIN**

**ANTIMICROBIAL AND INSECTICIDAL ACTIVITIES ON *Nasutitermes corniger*
(Isoptera: Termitidae) OF *Bauhinia monandra* LEAF LECTIN (BmoLL)**

**Silva, M. D. C.¹; Silva, M. B. R.¹; Paiva, P. M. G.¹; Sá, R. A.¹; Melo, C. M.²; Gusmão,
N. B.²; Albuquerque, A. C.³; Correia, M. T. S.¹; Coelho, L. C. B. B.^{1*}**

¹Laboratório de Glicoproteínas, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco. ²Laboratório de Ensaios Biotecnológicos, Departamento de Antibióticos, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco. ³Departamento de Biologia, Área Zoologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco;

***Corresponding author: Luana C. B. B. Coelho**

e-mail address: micheledalvina@ig.com.br

Abstract

Bauhinia monandra leaf lectin (BmoLL) was purified according to a pre-established protocol where leaves flour extract was submitted to ammonium sulphate fractionation followed by chromatography on guar gel affinity and elution of adsorbed lectin with galactose; BmoLL was evaluated for haemagglutinating activity and protein quantification, and was submitted to assays against *Fusarium sp.*, Gram-positive and Gram-negative bacteria and termites *Nasutitermes corniger* to verify its potential antimicrobial, insecticidal and repellent actions, respectively. BmoLL showed strong antifungal effect to *F. solani* and *F. lateritium*; was also an inhibitor to *F. fusarioides*, *F. moniliforme* and *F. verticiloides*. BmoLL promoted agglutination as well as inhibited the growth of pathogen bacteria. BmoLL was able to induce the mortality of the evaluated termites with all treatments comprehended from 32 to 2 µg lectin/cm² used; LC₅₀ values for workers and soldiers were 8.83 and 47.12 µg lectin/cm² in filter paper after 9 days, respectively. BmoLL is a potential tool for researches involving pathogenic *Fusarium* species, bacteria or termites (as well as other plagues) of interest for agriculture, health and for the wooden industry.

Key words: lectin, *Bauhinia monandra*, antimicrobial activity, *Fusarium*, insecticidal activity, termite, *Nasutitermes corniger*.

Introduction

Species of *Bauhinia* genera represents a group of vegetables that have been evaluated in relation to antitumor (Raj Kapoor *et al.*, 2003), hypoglycemic (Silva *et al.*, 2002) and antidiabetic (Pepato *et al.*, 2002) effects, as well as in the reduction of the intestinal glucose absorption (Mujica *et al.*, 2003). Current popular use of *Bauhinia monandra* is for many implications involving the health; is mainly used for its hypoglycemic activity. *B. monandra* leaf lectin was purified in milligram amounts (Coelho and Silva, 2000) and this galactose-specific lectin has been studied in relation to hypoglycemic action being of big importance a larger knowledge about its potential to bind to different cell surfaces.

Plant lectins have been isolated mainly from seeds (Singha *et al.*, 2007; Sitohy *et al.*, 2007; Susseelan *et al.*, 2007; Freire *et al.*, 2002), but also isolated from roots (Naeen *et al.*, 2001), leaves (Coelho and Silva, 2000) or algae (Ambrosio *et al.*, 2003) and lichens (Elifio *et al.*, 2000; Molina and Vicente, 2000). Some of these molecules have been demonstrating action antimicrobial (Sitohy *et al.*, 2007; Santi-Gadelha *et al.*, 2006; Trindade *et al.*, 2006; Freire *et al.*, 2002; Gaidamashvili and van Staden, 2002; Ye *et al.*, 2001; Ciopraga *et al.*, 1999) or insecticidal; their genes are being incorporated in transgenics as an alternative to check resistance for vegetables of economic interest, and come producing plants less susceptible to microorganisms attack (Prasad *et al.*, 2008) and insects (McCafferty *et al.*, 2008; Dutta *et al.*, 2005; Ramesh *et al.*, 2004; Hilder and Boulter, 1999; Schuler *et al.*, 1998).

BmoLL already revealed anti-insect activity against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) (Macedo *et al.*, 2007). In this work, BmoLL was isolated on guar gel affinity chromatography and was evaluated as a potential molecule with antifungal action against *Fusarium* species phytopathogen and pathogen human, antibacterial action against different bacteria and insecticide effect on *Nasutitermes corniger*, termites that cause financial

prejudices to the wooden industry, degrade trees and are distributed by the whole world, specially over tropical regions.

Material and Methods

BmoLL Purification: BmoLL was purified according to a pre-established protocol (Coelho and Silva, 2000); *B. monandra* fresh leaves (after removal of the petioles and wash) were dried at room temperature and an extraction overnight was performed in 10 mM citrate phosphate buffer pH 6.5 containing 0.15 M NaCl, for 16 h at 4 °C followed by filtration, centrifugation and protein precipitation with 60 % (w/v) ammonium sulphate for 4 h at room temperature. Precipitate after centrifugation and dialysis was submitted to protein quantification (Lowry *et al.*, 1951) and chromatography on guar gel affinity column of which adsorbed lectin was eluted with citrate phosphate buffer containing 50 mM galactose. BmoLL dialysed had its hemagglutination activity (HA) evaluated with 2.5 % suspension in 0.15 M NaCl (v/v) of rabbit erythrocytes treated with glutaraldehyde; the HA title was determined as the inverse of the largest dilution with total agglutination, after 45 min of rest.

Antifungal Activity: BmoLL was evaluated with *Fusarium* species according a modified assay based on Wong and Ng (2005). BmoLL was filtered to sterilization and applied (50 µl with 29.75 µg of protein) on sterile Petri plate (90 x 15 mm) surfaces containing 10 ml of Yeast Nitrogen Base (YNB) agar medium; a fungal mycelium disk (6 mm in diameter) containing different *Fusarium* species (*F. solani*, URM-2480; *F. oxysporum*, URM-2489; *F. moniliforme*, URM-3226; *F. lateritium*, URM-2491) obtained from the Culture Collections from the Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil and (*F. fusarioides* and *F. verticiloides*) from the Laboratório de Fungos do Solo, Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil were placed in the middle of plates. Lectin buffer and commercial antifungal Cercobin (10 ppm) constituted negative and

positive controls, respectively. Plates were incubated at 28 °C for 72 h and fungi growth halos were measured in millimeters. Lectin effect on *Fusarium sp.* was defined by comparison with fungal growth in the negative and positive control and was evaluated by growth halos reduction. All assays were carried out in triplicate and the inhibition percentage data were expressed as a mean $\pm$ standard deviation (S.D.).

Antibacterial Activity:

Disk Diffusion Method - Inoculum preparations were made according to Bauer *et al.* (1966). Stationary cultures from different Gram-positive (*Corynebacterium callunae*, ATCC-5991; *Streptococcus faecalis*, ATCC-6057; *Bacillus subtilis*, ATCC-6633; *Staphylococcus aureus*, ATCC-6538) or Gram-negative (*Escherichia coli*, ATCC-25922; *Pseudomonas aeruginosa*, ATCC-27853; *Klebsiella pneumoniae*, ATCC-29665) bacterial strains obtained from the Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil, were maintained into Nutrient agar medium and stored at 4 °C. Bacteria were cultured in Nutrient broth medium and incubated under permanent shaking overnight at 37 °C. Bacterial culture concentrations were adjusted turbidimetrically at a wavelength of 600 nm to 10^6 colony forming units (CFU).ml⁻¹ constituting the inoculum working concentration. Each inoculum (0.5 ml) was added to warm Nutrient agar medium (100 ml) at 43 °C and solutions (10 ml) were distributed in sterile Petri plates (90 x 15 mm). After medium solidification, sterile paper disks (6 mm in diameter) impregnated with BmoLL filtered to sterilization (15 μ l equivalent to 8.925 μ g) were placed on Petri plate surfaces containing bacteria in solidified agar medium. Lectin buffer and commercial antibacterial amoxicilin (1 mg/ml) constituted negative and positive controls, respectively. Plates were incubated at 37 °C for 24 h and transparent rings around each paper disk that revealed antimicrobial activity (zones of growth inhibition) were measured in millimeters. BmoLL effect on bacterial strains was defined by comparison with

the negative control that should not have any effect on growth bacteria. All assays were carried out in triplicate. Zone of growth inhibition data were expressed as a mean $\pm$ S.D.

Quantitative Antibacterial Microdilution Assay - Other bacterial strains (Gram-positive *B. subtilis*, UFPEDA 16; *Micrococcus luteus*, UFPEDA 06; *S. aureus*, UFPEDA 01; or Gram-negative *E. coli*, UFPEDA 224; *P. aeruginosa*, UFPEDA 39; *Serratia sp.*, UFPEDA 398) were obtained from Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil. Pre-inoculum of bacteria were used for inoculum preparation (10^6 colony forming units (CFU).ml⁻¹) through strong agitation in sterile water containing glass pearls. Nutrient broth medium (180 μ l) was added to sterile microplates for culture cell followed by filtered BmoLL (20 μ l with 11.9 μ g of protein), which was thus ten times diluted (final 5.95 μ g/ml). To each well inoculum was added using a platinum handle (10 μ l). The wells first sequence of plates was free of bacteria for control of medium sterility. Wells were monitored by absorbance (visible light 600 nm) in time 0; plates were sealed and submitted to incubation for 18 h at 35 °C followed by a new absorbance. Last absorbances were subtracted from the first absorbances and resultant absorbances in presence of BmoLL were compared to resultant absorbances in presence of lectin buffer (control). All assays were carried out in triplicate. Growth inhibition percentage data were expressed as a mean $\pm$ S.D.

Bacterial Agglutination Assay: Minimum agglutinating lectin concentration (MAC) able to promote bacterial agglutination was quantitatively determined through assays in microtiter plates with two-fold serial dilutions of BmoLL (1.9 mg/ml) in 0.15 M NaCl. Overnight bacterial cultures were diluted with Nutrient broth medium (at a ratio of 1:100) and an aliquot (100 μ l) was added to each well for a final volume of 200 μ l; after overnight incubation of plates at 37 °C, MAC was determined through visual observation of agglutination. All assays were carried out in triplicate.

Insecticidal Assays: Termite species *N. corniger* collected in the area of the Universidade Federal Rural de Pernambuco was identified by Dr. Luiz Roberto Fontes (from Superintendência de Controle de Endemias, SUCEN, Brasil). Termite colonies were kept at vegetation house from the Departamento de Agronomia from Universidade Federal Rural de Pernambuco. Termiticidal activity was evaluated by a bioassay based on the method described by Kang *et al.* (1990); assays were carried out on Petri plates (90 x 15 mm) covered by filter paper. Disks of filter paper (containing 4 cm diameter) were soaked with BmoLL for 400, 100, 50 or 25 µg of total protein (corresponding to 32, 8, 4 or 2 µg lectin/cm² offered on filter paper for the feeding of the insects, respectively), or with Extraction buffer (negative control), were dried at room temperature and then placed in the plates. Twenty insects (16 workers and 4 soldiers) from termite colonies of the vegetation house properly adapted to the environment were carefully transferred to plates. All plates were kept protected of the light, at 28 °C; monitoring of assays was performed daily to detect death of insects and to guarantee the humidity of the plates adding a water drop to paper covering plates until death of all insects. Assays were made in triplicate. Survival rates were obtained for each treatment and expressed as mean. Statistical analyses were determined through Statplus (2006). Significant differences between groups were established using Student's t-test ($p < 0.05$) assuming equal variances (homoscedastic) and considering the accumulative mortality during all assay; the concentration required to kill 50% of insects in each treatment (LC₅₀) was determined after 9 days and defined from the data obtained with different protein concentration of samples using Probit Analysis with a reliability interval of 95%.

Repellence Assays: The potential repellent property from BmoLL was evaluated through assay based on Su *et al.* (1982). A 2% agar solution was added to Petri plates until the border of plates; after solidification and temperature reduction of gel for room temperature holes were made in agar by the removal of 1 central cylinder (25 mm diameter) and 8 peripheral

cylinders (6 mm diameter). Disks of filter paper (6 mm diameter) were soaked with BmoLL or Extraction buffer (negative control), were put to dry at room temperature and placed in the peripheral cylinders of plates. Each protein concentration was present in double in plates and each plate was carried in triplicate performing a total of 6 repetitions for each protein concentration assayed. Twenty insects (16 workers and 4 soldiers) were carefully transferred to central holes in the plates that were maintained protected of the light, at 28 °C; plates were daily observed to evaluate absence or presence of termites in the disks with BmoLL or Extraction buffer treated, construction standards of tunnels in agar and closing by insects of constructed galleries and to detect death of insects.

Results and Discussion

Alcoholic preparations of *Bauhinia variegata* stem (Raj Kapoor *et al.*, 2003), *B. forficata* leaves (Silva *et al.*, 2002), and aqueous preparations of *B. forficata* (Pepato *et al.*, 2002) and *B. megalandra* leaves (Mujica *et al.*, 2003) have produced antitumor, hypoglycemic, antidiabetic effects and reduction of the intestinal absorption of glucose, respectively. These biological activities have been putting *Bauhinias* in highlight and prove the presence of active principles in your components, able of promote interactions in cell surfaces.

Bauhinia monandra is today widely used by the popular medicine because your leaves are well-known popularly by own antioxidant (Argolo *et al.*, 2004), hypoglycemic, diuretic and slimming effect. Active BmoLL, a galactose-specific lectin present in your leaves showed here active as antifungal molecule (Figure 1), strongly inhibiting the growth of *Fusarium solani* (72.5 %) and *F. lateritium* (57.15 %); was also an inhibitor to *F. fusarioides* (27.8 %), *F. moniliforme* (24 %) and *F. verticiloides* (14.3 %); *F. oxysporum* was not inhibited by BmoLL (Figure 1b); inhibitory effect promoted by BmoLL was more efficient after 72 h. The lectin was equally efficient to commercial antifungal Cercobin against *F. solani*; against other

Fusarium species evaluated BmoLL was better than Cercobin. Other lectins have demonstrated antifungal activity against *Fusarium* species; four lectins isolated from *Talisia esculenta* seeds (Freire *et al.*, 2002), *Pisum sativum* (Sitohy *et al.*, 2007), *Astragalus mongholicus* (Yan *et al.*, 2005) and *Phaseolus vulgaris* (Ye *et al.*, 2001) were inhibitors to *F. oxysporum*; WGA (isolated from *Romanian dihaploid*) was able to inhibit two other pathogenic *F. graminearum* and *F. oxysporum* species (Ciopraga *et al.*, 1999). *F. moniliforme* was inhibited by lectins, two chitin-binding molecules purified from *Artocarpus heterophyllus* and *Artocarpus altilis* (Trindade *et al.*, 2006).

Since cell surface, especially bacteria can be differentiated in relation to your glycosylated components, there is the interest discovering new lectins able of recognize, interact or even inhibit the development of microbial cells once lectins recognize carbohydrates or glycoconjugates present in cell surfaces, according its specificity. In antibacterial assays, BmoLL showed inhibition halos (zones of growth inhibition) in plates with Gram-positive *C. callunae*, *S. faecalis* and *B. subtilis* and Gram-negative *E. coli*, *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae* bacteria. BmoLL not affected the *S. aureus* growth. In quantitative microassay BmoLL was only active against Gram-positive *Micrococcus luteus* (22.59 %) and Gram-negative *Serratia sp.* (8.02 %). BmoLL also promoted cellular agglutination with all tested bacteria; *B. subtilis* showed a better MAC (Table 1). Lectins from different sources can be antibacterial against Gram-positive and Gram-negative bacteria, as a lectin from marine species *Holothuria scabra* (Gowda *et al.*, 2008), the lectin from *Araucaria angustifolia* seeds (Santi-Gadelha *et al.*, 2006) and C-type lectins from chicken and goose eggs (both actives against *B. subtilis*, *S. aureus* and *P. aeruginosa* (Wellman-Labadie *et al.*, 2008). Gaidamashvili and van Staden (2002) using very plant lectins, obtained aggregation of *S. aureus* with very low lectins concentration (4 and 5 µg/ml) or of *B. subtilis* with very high concentrations, depending of lectin or bacteria.

On *N. corniger*, BmoLL was able to promote termiticidal activity with all concentrations. 100% or 50 % of workers and soldiers mortality below time obtained for control was showed in BmoLL assays. BmoLL concentrations was able to promote premature death of insects where was observed that death was proportional to used concentrations, however, there was none significant statistical differences among BmoLL concentrations to induce workers or soldiers death. All lectin treatments showed statistical significance in relation to control.

Workers analysis revealed that treatment with 400, 100 or 50 and 25 µg of total BmoLL in filter paper (32, 8, 4 or 2 µg lectin/cm², respectively) induced death of all insects after 12, 14 and 20 days, respectively (average in percentile); Survival rate of 50 % for these treatments was observed, in order, around 5, 8, 9 and 10 days. In negative control of lectin assays 100% of mortality was observed only after 34 days and survival rate lower than 50% around 23 days (Figure 2a). LC₅₀ value for workers was 8.83 µg lectin/cm² (SE 1.31) after 9 days. Soldier analyzes showed that BmoLL promoted 100% of mortality after 14 (with 400 µg), 16 (with 100 or 50 µg) and 21 days (with 25 µg of total lectin). Survival rate of 50 % or more for these treatments was observed around 10, 13 and 14 days. Negative control showed 100% of mortality after 34 days and survival rate of 50% around 31 days (Figure 2b). Lectin mortality induction was proportional to protein concentration on workers and soldiers castes of *N. corniger* soldiers. LC₅₀ value for soldiers was 47.12 µg lectin/cm² (SE 2.36) after 9 days. LC₅₀ values revealed that worker caste was more sensitive to the toxic lectin effect.

In addition, BmoLL promoted no repellent action on *N. corniger*; insects visited peripheral cylinders with disks of filter paper with lectin as well as with Extract buffer. Insects built galleries and tunnels that were maintained open and were observed no standards related with lectin or negative control presence.

Bauhinia monandra is easily found ornamenting gardens and squares; generally in it is not observed none type of damage caused by phytopathogens, insects or other herbivores. It is an intriguing fact that stimulated to analyze the BmoLL lectin as potential pesticide. Chemical plant defence against plagues predators can be due to secondary metabolites or proteins as lectins.

Many lectins have demonstrated action against life development of insects (Coelho *et al.*, 2007; Macedo *et al.*, 2007; Leite *et al.*, 2005; Macedo *et al.*, 2002; Fitches *et al.*, 2001) nymph (Sadeghi *et al.*, 2006; Sauvion *et al.*, 2004; Bandyopadhyay *et al.*, 2001). According Macedo *et al.* (2007), BmoLL is able to bind to chitin as well as to midgut extracts and membrane proteins of *Callosobruchus maculatus* larvae and your insecticidal activity may involve binding to chitin components, interaction with glycoconjugates on epithelial cell surface, binding to glycosylated digestive enzymes and/or assimilatory proteins, resistance against enzymatic digestion and also decrease of the α -amylase activity in midgut of insects. Lectins with insecticidal action probably own different modes of action according its cell localization (Sauvion *et al.*, 2004).

Lectins able to bind N-acetyl-glucosamine with affinity to chitin own insecticidal property; however, plant lectins with different specificities to sugars also showed ability as insecticidal molecules suggesting that this property is not exclusive to specificity of lectins (Sadeghi *et al.*, 2006; Leite *et al.*, 2005; Trigueros *et al.*, 2003; Macedo *et al.*, 2002).

Lectins as well as peptides and other proteins have been introduced in transgenic plants for resistance to microorganisms and insects (McCafferty *et al.*, 2008; Prasad *et al.*, 2008; Ramesh *et al.*, 2004; Hilder and Boulter, 1999; Schuler *et al.*, 1998). BmoLL easily purified in milligram quantities with property antimicrobial, especially against *Fusarium sp.*, and insecticidal against *N. corniger* (specie of industrial and biotechnological interest) is a promising molecule for investigations regarding your utilization as a lectin able to check

resistance for vegetables acting as a natural pesticide as well as in researches involving pathogen human microorganisms.

References

- Ambrosio, AL; Sanz, L; Sánchez, EI; Wolfenstein-Todel, C; Calvete, JJ. Isolation of two novel mannan- and L-fucose-binding lectins from the alga *Enteromorpha prolifera*: biochemical characterization of EPL-2. Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 415, p. 245-50, 2003.
- Argolo, ACC; Sant'Ana, AEG; Pletsch, M; Coelho, LCBB. Antioxidant activity of leaf extracts from *Bauhinia monandra*. Bioresource Technology, v. 95, p. 229-33, 2004.
- Bandyopadhyay, S; Roy, A; Das, S. Binding of garlic (*Allium sativum*) leaf lectin to the gut receptors of homopteran pests is correlated to its insecticidal activity. Plant Science, v. 161, p. 1025–33, 2001.
- Bauer, A. W., Kirby, W. M. M., Sherrie, J. C., Turck, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. American Journal of Clinical Pathology, v. 45, p. 493-6, 1996.
- Ciopraga, J; Gozia, O; Tudor, R; Brezuica, L; Doyle, RJ. *Fusarium sp.* growth inhibition by wheat germ agglutinin. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, v. 1428, p. 424-32, 1999.
- Coelho, MB; Marangoni, S; Macedo, MLR. Insecticidal action of *Annona coriacea* lectin against the flour moth *Anagasta kuehniella* and the rice moth *Corcyra cephalonica* (Lepidoptera: Pyralidae). Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, v. 146, p. 406-14, 2007.

Coelho, LCBB; Silva, MBR. Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. *Phytochemical Analysis*, v. 11, p. 295-300, 2000.

Dutta, I; Majumder, P; Saha, P; Ray, K; Das, S. Constitutive and phloem specific expression of *Allium sativum* leaf agglutinin (ASAL) to engineer aphid (*Lipaphis erysimi*) resistance in transgenic Indian mustard (*Brassica juncea*). *Plant Science*, v. 169, p. 996–1007, 2005.

Elifio, SL; Silva, MLCC; Iacomini, M; Gorin, PAJ. A Lectin from the lichenized Basidiomycete *Dictyonema glabratum*. *New Phytologist*, v. 148, p. 327-34, 2000.

Fitches, E; Woodhouse, SD; Edwards, JP; Gatehouse, JA. In vitro and in vivo binding of snowdrop (*Galanthus nivalis* agglutinin; GNA) and jackbean (*Canavalia ensiformis*; Con A) lectins within tomato moth (*Lacanobia oleracea*) larvae; mechanisms of insecticidal action. *Journal of Insect Physiology*, v. 47, p. 777-87, 2001.

Freire, MGM; Gomes, VM; Corsini, RE; Machado, OLT; De Simone, SG; Novello, JC; Marangoni, S; Macedo, MLR. Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 40, p. 61-8, 2002.

Gaidamashvili, M; van Staden, J. Interaction of lectin-like proteins of South African medicinal plants with *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 80, p. 131-5, 2002.

Gowda, NM; Goswami, U; Khan, MI. T-antigen binding lectin with antibacterial activity from marine invertebrate, sea cucumber (*Holothuria scabra*): Possible involvement in differential recognition of bacteria. *Journal of Invertebrate Pathology*, *in press*, 2008.

Hilder, VA; Boulter, D. Genetic engineering of crop plants for insect resistance – a critical review. *Crop Protection*, v. 18, p. 177-91, 1999.

Kang, H. Y., Matsushima, N., Sameshima, K., Takamura, N. Termite resistance tests of

hardwoods of Kochi growth. The strong termiticidal activity of kagonoki (*Litsea coreana* L'èveill'e). Mokuzai Gakkaishi, v. 36, p. 78–84, 1990.

Leite, YFMM; Silva, LMCM; Amorim, RCN; Freire, EA; Jorge, DMM; Grangeiro, T.B; Benevides, NMB. 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, v. 1724, p. 137-45, 2005.

Macedo, MLR; Freire, MGM; Silva, MBR; Coelho, LCB. Insecticidal action of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology, v. 146, p. 486–98, 2007.

Macedo, MLR; Freire, MGM; Novello, JC; Marangoni, S. *Talisia esculenta* lectin and larval development of *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera:Bruchidae). Biochimica et Biophysica Acta, v. 1571, p. 83–8, 2002.

McCafferty, HRK; Moore, PH; Zhu, YJ. Papaya transformed with the *Galanthus nivalis* GNA gene produces a biologically active lectin with spider mite control activity. Plant Science, *in press*, 2008.

Molina, MC; Vicente, C. Purification and characterization of two isolectins with arginase activity from the lichen *Xanthoria parietina*. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, v. 33, p. 300-7, 2000.

Mujica, FG; Motta, N; Márquez, AH; Zulueta, JC. Effects of *Bauhinia megalandra* aqueous leaf extract on intestinal glucose absorption and uptake by enterocyte brush border membrane vesicles. Fitoterapia, v. 74, p. 84-90, 2003.

- Naeem, A; Khan, RH; 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, v. 396, p. 99-105, 2001.
- Pepato, MT; Keller, EH; Baviera, AM; Kettelhut, IC; Vendramini, RC; Brunetti, IL. Anti-diabetic activity of *Bauhinia forficata* decoction in streptozotocin-diabetic rats. Journal of Ethnopharmacology, v. 81, p. 191-7, 2002.
- Prasad, BD; Jha, S; Chattoo, BB. Transgenic *indica rice* expressing *Mirabilis jalapa* antimicrobial (Mj-AMP2) protein shows enhanced resistance to the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. Plant Science, *in press*, 2008.
- Raj Kapoor, B; Jayakar, B; Muruges, N. Antitumour activity of *Bauhinia variegata* on Dalton's ascitic lymphoma. Journal of Ethnopharmacology, v. 89, p. 107-9, 2003.
- Ramesh, S; Nagadhara, D; Reddy, VD; Rao, KV. Production of transgenic indica rice resistant to yellow stem borer and sap-sucking insects, using super-binary vectors of *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Science, v. 166, p. 1077-85, 2004.
- Sadeghi, A., Van Damme, E. J. M., Peumans, W. J., Smagghe, G. Deterrent activity of plant lectins on cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (F.) oviposition. Phytochemistry, v. 67, p. 2078-2084, 2006.
- Santi-Gadelha, T; Gadelha, CAA; Aragão, KS; Oliveira, CC; Mota, MRL; Gomes, RC; Pires, AF; Toyama, MH; Toyama, DO; Alencar, NMN; Criddle, DN; Assreuy, AMS; Cavada, BS. Purification and biological effects of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) seed lectin. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 350, p. 1050-5, 2006.
- Sauvion, N; Nardon, C; Febvay, G; Gategouse, AMR; 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, v. 50, p. 1137-50, 2004.

- Schuler, TH; Poppy, GM; Kerry, BR; Denholm, I. Insect-resistant transgenic plants. Trends in Biotechnology, v. 16, p. 168-75, 1998.
- Silva, FRMB; Szpoganicz, B; Pizzolatti, MG; Willrich, MAV; Sousa, E. Acute effect of *Bauhinia forficata* on serum glucose levels in normal and alloxan-induced diabetic rats. Journal of Ethnopharmacology, v. 83, p. 33-7, 2002.
- Singha, B; Adhya, M; Chatterjee, BP. Multivalent II [β -d-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)- β -d-GlcpNAc] and T α [β -d-Galp-(1 $\rightarrow$ 3)- α -d-GalpNAc] specific Moraceae family plant lectin from the seeds of *Ficus bengalensis* fruits. Carbohydrate Research, v. 342, p. 1034-43, 2007.
- Sitohy, M; Doheim, M; Badr, H. Isolation and characterization of a lectin with antifungal activity from Egyptian *Pisum sativum* seeds. Food Chemistry, v. 104, p. 971-9, 2007.
- 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, v. 75, p. 188-93, 1982.
- Suseelan, KN; Bhagwath, A; Pandey, R; Gopalakrishna, T. Characterization of Con C, a lectin from *Canavalia cathartica* Thouars seeds. Food Chemistry, v. 104, p. 528-35, 2007.
- Trigueros, V; Lougarre, A; Ali-Ahmed, D; Rahbé, Y; Guillot, J; Chavant, L; Fournier, D; Paquereau, L. *Xerocomus chrysenteron* lectin: identification of a new pesticidal protein. Biochimica et Biophysica Acta, v. 1621, p. 292-8, 2003.
- Trindade, MB; Lopes, JLS; Soares-Costa, A; Monteiro-Moreira, AC; Moreira, RA; Oliva, MLV; Beltramini, LM. Structural characterization of novel chitin-binding lectins from the genus *Artocarpus* and their antifungal activity. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics, v. 1764, p. 146-52, 2006.
- Wellman-Labadie, O; Lakshminarayanan, R; Hincke, MT. Antimicrobial properties of avian eggshell-specific C-type lectin-like proteins. FEBS Letters, v. 582, p. 699-704, 2008.

Wong, JH; Ng, TB. Sesquin, a potent defensin-like antimicrobial peptide from ground beans with inhibitory activities toward tumor cells and HIV-1 reverse transcriptase. *Peptides*, v. 26, p. 1120-6, 2005.

Yan, Q; Jiang, Z; Yang, S; Deng, W; Han, L. A novel homodimeric lectin from *Astragalus mongholicus* with antifungal activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 442, p. 72-81, 2005.

Ye, XY; Ng, TB; Tsang, PWK; Wang, J. Isolation of a homodimeric lectin with antifungal and antiviral activities from red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. *Journal of Protein Chemistry*, v. 20, p. 367–75, 2001.

Table 1. Antibacterial activity on disk diffusion method^a, on quantitative microdilution assay^b and MAC values on bacterial agglutination assay of BmoLL

	Bacteria	Zone of growth inhibition (mm) ^{a*}	MAC (µg/ml)
Gram-positive	<i>Corynebacterium callunae</i>	6.40 (± 0.32)	118.75
	<i>Streptococcus faecalis</i>	6.50 (± 0.05)	118.75
	<i>Bacillus subtilis</i>	8.30 (± 0.10)	59.37
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0	118.75
Gram-negative	<i>Escherichia coli</i>	6.45 (± 0.13)	118.75
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6.53 (± 0.30)	118.75
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6.61 (± 0.27)	118.75
	Bacteria	Growth inhibition (%) ^b	
Gram-positive	<i>Micrococcus luteus</i>	22.59 (± 1.20)	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0	
	<i>Bacillus subtilis</i>	0	
Gram-negative	<i>Serratia sp.</i>	8.02 (± 3.14)	
	<i>Escherichia coli</i>	0	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	

(*) It includes the diameter of disk paper. Used bacterial strains for (a) and MAC were: *C. callunae*, ATCC-5991; *S. faecalis*, ATCC-6057; *B. subtilis*, ATCC-6633; *S. aureus*, ATCC-6538; *E. coli*, ATCC-25922; *P. aeruginosa*, ATCC-27853; *K. pneumoniae*, ATCC-29665. Used bacterial strains for (b) were: *M. luteus*, UFPEDA 06; *S. aureus*, UFPEDA 01; *B. subtilis*, UFPEDA 16; *Serratia sp.*, UFPEDA 398; *E. coli*, UFPEDA 224; *P. aeruginosa*, UFPEDA 39.

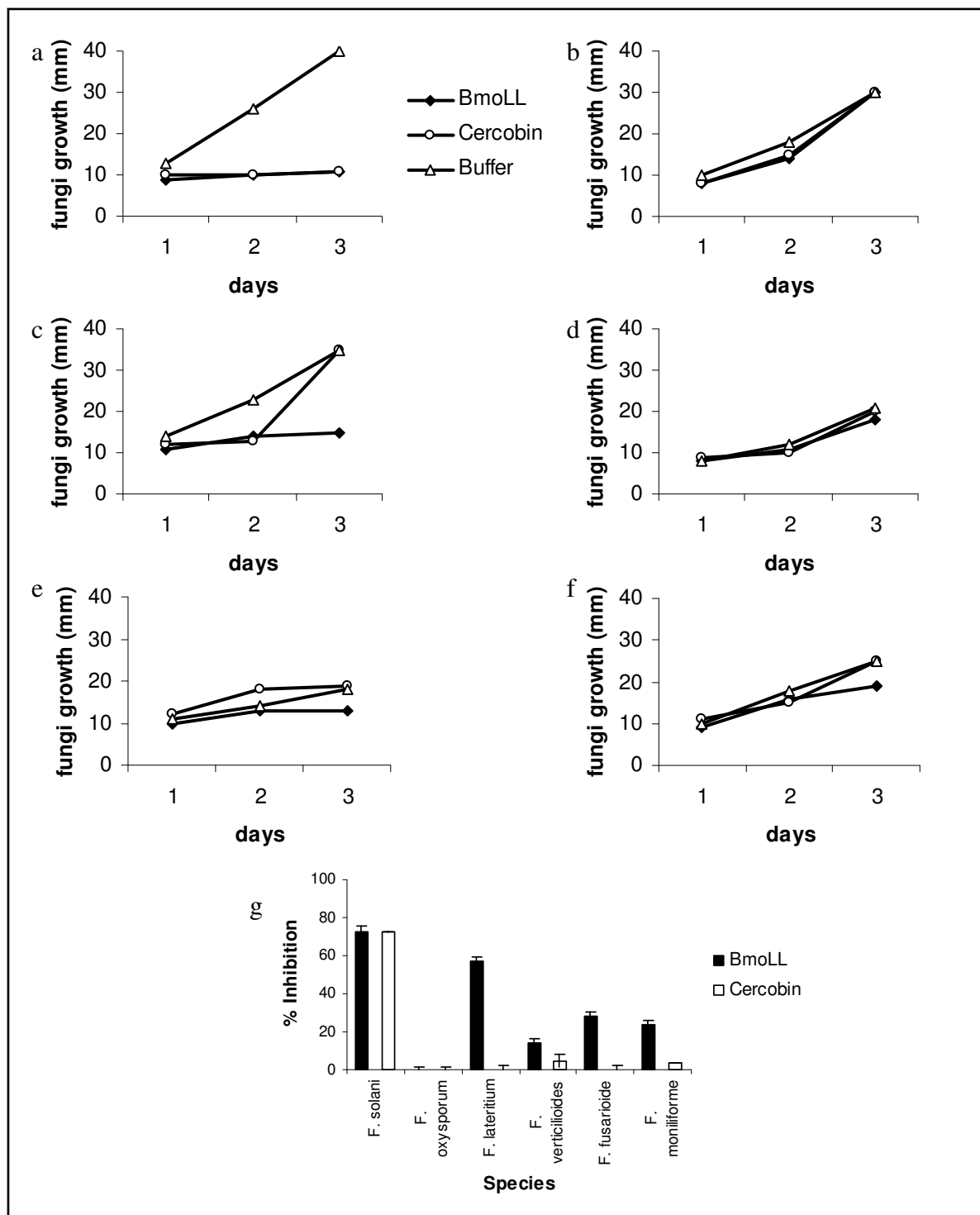


Figure 1. *Fusarium* growth curve of *F. solani* (a), *F. oxysporum* (b), *F. lateritium* (c), *F. verticilloides* (d), *F. fusarioides* (e) and *F. moniliforme* (f) in YNB agar medium containing lectin buffer, BmoLL or cercobin on surface, and inhibition (%) of fungi growth (g). Lectin buffer and cercobin constituted negative and positive controls, respectively.

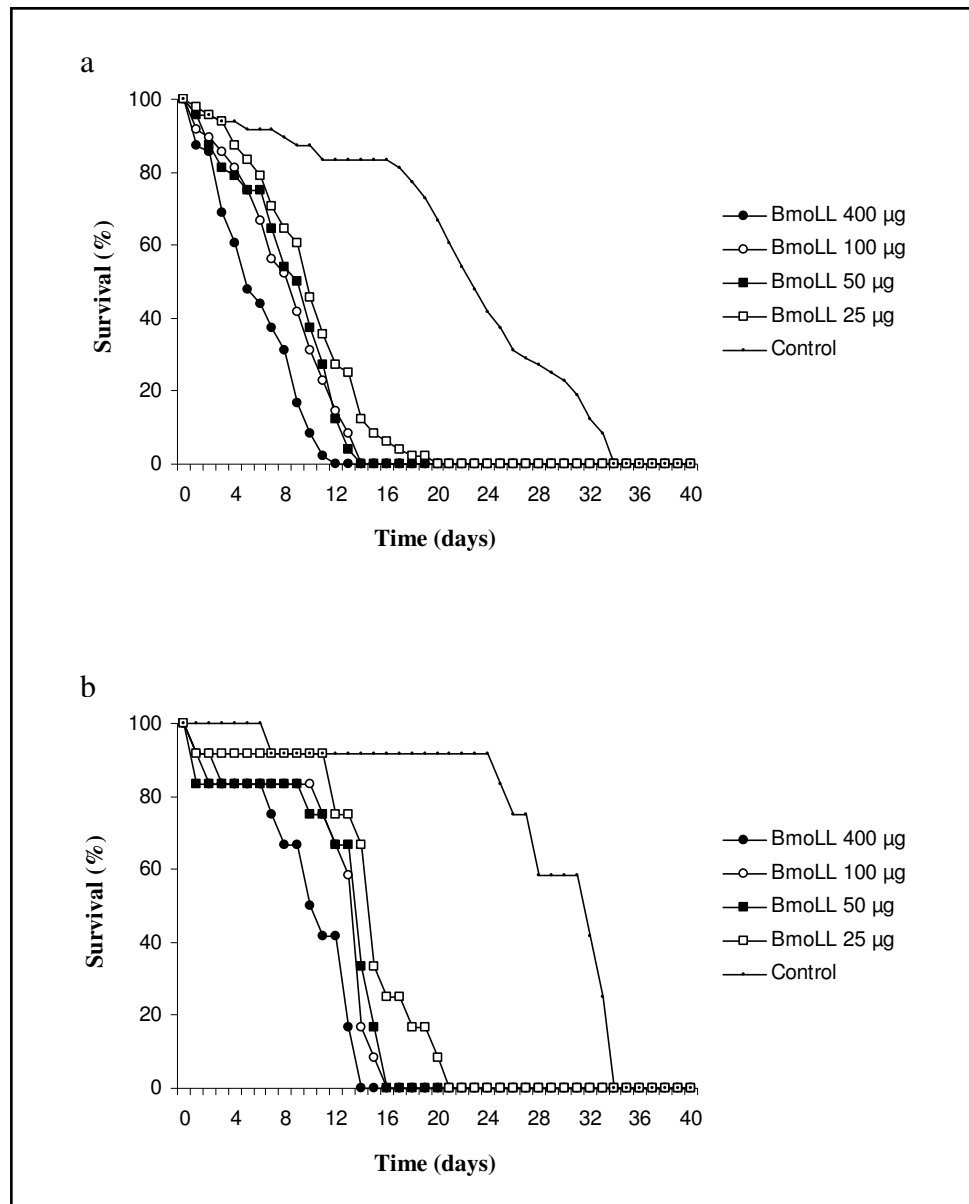


Figure 2. Survival percentile of *Nasutitermes corniger* worker (a), soldier (b) castes in presence of CPB (control) or BmoLL (treatments at concentration of 25, 50, 100 and 400 µg total lectin. Each point represents the mean of three repetitions.

Artigo 4: a ser submetido ao periódico *Histology and Histopathology*

**HISTOCHEMISTRY OF HIPPOCAMPUS FROM ALZHEIMER'S DISEASE
PATIENTS WITH *Cladonia verticillaris* LICHEN LECTIN AND *Bauhinia monandra*
LEAF LECTIN**

**HISTOCHEMISTRY OF HIPPOCAMPUS FROM ALZHEIMER'S DISEASE
PATIENTS WITH *Cladonia verticillaris* LICHEN LECTIN AND *Bauhinia monandra*
LEAF LECTIN**

**Silva, M. D. C.¹; Lima, A. L. R.^{1,2}; Silva, M. B. R.¹; Beltrão, E. I. C.^{1,2}; Mello, R. J. V.³;
Correia, M. T. S.¹; Coelho, L. C. B. B.^{1*}**

**¹Laboratório de Glicoproteínas, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências
Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco. ²Setor de Patologia, Laboratório de
Imunopatologia Keiso-Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Recife,
Brasil. ³Departamento de Patologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal
de Pernambuco.**

***Corresponding author: Luana C. B. B. Coelho**

e-mail address: micheledalvina@ig.com.br

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative brain pathology related to memory loss and cognitive dysfunction in elderly individuals, mainly characterized for presence of intracellular neurofibrillary tangles, extracellular deposition of senile plaques, amyloid deposits of vascular type (blood vessels dependent) or vessel independent, spherical deposits and corpora amylacea. *Cladonia verticillaris* lichen lectin (ClaveLL) and *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) were conjugated to horseradish peroxidase (HRP) to evaluate glycosylated residues of glycoconjugates from histological surface of patient hippocampus with AD. ClaveLL and BmoLL recognize carbohydrate binding sites containing N-acetylglucosamine (and other carbohydrates or glycoproteins) and galactose, respectively. Neurons with intracellular neurofibrillary tangles or granulo-vacuolar degeneration in the hippocampal formation were recognized by lectin staining using ClaveLL-HRP conjugate; corpora amylacea and blood vessels were strongly stained with ClaveLL- and BmoLL-conjugates. Lectins were able to recognize cytoplasm of neurons. These lectin staining are handy histochemical tools to investigate carbohydrate composition in the brain tissues for AD diagnosis.

Key words: lichen, *Cladonia verticillaris*, *Bauhinia monandra*, lectin histochemistry, hippocampus, brain, Alzheimer's disease.

Introduction

Alzheimer's disease (AD) is among several neurodegenerative diseases and it is characterized for causing slowly progressive dementia on the adult age of onset. Main AD symptoms are progressive memory loss and involvement of other higher brain functions such as cognitive dysfunction, language and motor functioning. The neuropathological features are neuronal loss, and microscopic lesions such as extracellular deposition of amyloid plaques (senile plaques) and presence of intracellular neurofibrillary tangles, NFT (Bonifati and Kishore, 2007; Wang et al., 2007) that can be associated to dementia in AD. Dystrophic neurites, degenerating neurons, and activated astrocytes and microglia especially around the senile plaques also characterize AD brains.

NFT are intraneuronal accumulations of paired helical filaments composed of abnormally hyperphosphorylated tau protein. The senile plaques are characterized for extracellular deposition of aggregated β -amyloid peptide, A β 1–40 or A β 1–42 (the last is more neurotoxic, aggregated and more involved with AD), 39–42 amino acid residues resultant from the intracellular proteolytic cleavage of neuronal larger β -amyloid precursor protein (APP), a glycosylated trans-membrane protein; NFT and senile plaques constitute histological hallmarks of AD pathology (Ng'walali et al., 2002; Bonifati and Kishore, 2007; Findeis, 2007; Yoon et al., 2007). However, neither plaques nor NFT are unequivocal evidence to account for the AD pathology since the same distribution pattern in individuals with AD is observed as those in individuals with Down's syndrome (DS) and in smaller numbers in non-demented elderly persons; the neuropathological role from both lesions is related to cognitive dysfunctions of individuals with dementia (Ng'walali et al., 2002; Nishi et al., 2003). Li et al. (2007) emphasize the significance of intracellular A β as a complementary explanation for defective neuronal physiology and neuronal cell loss in AD. Several evidences support the role of intraneuronal A β accumulation as an early event in AD-associated neuronal

dysfunction (Arbel and Solomon, 2007). Mitochondria constitute an intracellular aggregation site for A β ; both monomers and oligomers of A β are present within mitochondria; mitochondrial A β levels in AD brain may play a pathological role by inducing mitochondrial dysfunction through numerous factors and interactions among various signaling pathways (Wang et al., 2007).

Forensic pathology involves, among several tasks, the investigation of individual predispositions to fatal conditions in consequence of traumas and diseases. So, evaluation of brain degenerative changes is significant, since many neurodegenerative diseases are intimately related to brain dysfunctions, as deficit cognitive and memory loss. Thus, histological and immunohistochemical assays constitute important tools to investigate or diagnose cerebral abnormalities and diseases in *postmortem* circumstance of humans (Cummings et al., 1992; Nishimura et al., 2000; Ng'walali et al., 2002; Minnasch et al., 2003; Nishi et al., 2003; Ulfing et al., 2004; Ishikawa et al., 2006; Uryu et al., 2007) and animals (Medina-Flores et al., 2004; Arendash et al., 2007), some of these using lectin as histochemical markers. Clinical diagnosis is still limited today to “probable” or “possible” AD; therefore, unequivocal diagnosis of definite AD continues to require *postmortem* histological analysis of the brain to investigate the presence of the characteristic senile plaques, NFT and other lesions that define the disease, at least in later disease stage (Findeis, 2007).

Lectins are molecules capable to detect and characterize different glycoconjugate composition of cell and tissue surfaces, detecting distinct expression of these constituent molecules related to many physiological and pathological stages through (immuno)histochemical assays or others (Barou et al., 2002; Beltrão et al., 2003; Babál et al., 2006; Fiedler et al., 2007; Hemmoranta et al., 2007; Szöke et al., 2007; Thöm et al., 2007).

Lectin histochemistry application in forensic neuropathology is an economical method

to detect carbohydrate-related degenerative changes in different regions of the brain involved with different pathologies, such as carbohydrate deposits (senile plaques and NFT) predominant pathological markers of AD and DS (corpora amylacea which is relevant to repeated brain hypoxia and mitochondrial damage, amyloid deposits and other lesions) and present in these and other neurodegenerative conditions. Thus, in the present paper lectin staining is a handy tool that contributed with information on carbohydrate composition in the brain tissues for AD diagnosis.

Materials and Methods

Lectin Purification

C. verticillaris lichen lectin was obtained through a sequential purification protocol; lichen was dried at room temperature and an extraction overnight was performed in 0.15 M sodium phosphate buffer pH 7 containing 0.15 M NaCl, for 16 h at room temperature followed by filtration, centrifugation and protein precipitation with 30 % (w/v) ammonium sulphate for 4 h at room temperature. Precipitate obtained by centrifugation was submitted to protein quantification (Lowry et al., 1951) and chromatography (18 mg) on gel filtration Sephadex G-100 (1.4 x 63 cm) column to obtain pure and active lectin. BmoLL was purified according to a pre-established protocol (Coelho and Silva, 2000); *B. monandra* fresh leaves (after removal of the petioles and wash) were dried at room temperature and an extraction overnight was performed in 10 mM citrate phosphate buffer pH 6.5 containing 0.15 M NaCl, for 16 h at 4 °C followed by filtration, centrifugation and protein precipitation with 60 % (w/v) ammonium sulphate for 4 h at room temperature. Precipitate after centrifugation and dialysis was submitted to protein quantification (Lowry et al., 1951) and chromatography (144 mg) on guar gel (10 ml) affinity column; adsorbed lectin was eluted with citrate phosphate buffer

containing 50 mM galactose. ClaveLL and BmoLL (dialysed) had its activity evaluated with rabbit erythrocytes treated with glutaraldehyde (Bing et al., 1967).

Conjugation

Lectin conjugation to horseradish peroxidase (HRP) was performed according to Beltrão et al. (1998). Lectins were dialyzed against 0.1 M sodium phosphate buffer (PBS) pH 6.8 for 16 h at 4 °C. HRP was added to dialyzed lectins (a proportion of 3 mg for 1 mg of lectin); the solutions were softly shaken and 50 µl of 1% (v/v) glutaraldehyde aqueous solution was added. After incubation under rest for 2 h at 25 °C, solutions were dialyzed against 0.01 M PBS pH 6.8 containing 0.15 M NaCl, for 16 h at 4 °C. ClaveLL-HRP and BmoLL-HRP activities were evaluated by hemagglutinating assays (Correia and Coelho, 1995) using glutaraldehyde-treated rabbit erythrocytes, 2.5 % (v/v) suspension in 0.15 M NaCl.

Lectin Histochemistry of Hippocampus

Tissue sections in paraffin blocks were obtained from Death Verification Service from the State of Pernambuco. Sections were cut (4 µm) and adhered to albuminized slides. Histological slices were deparaffined with xylene, hydrated through graded alcohol 70-100% and treated with 0.1% (w/v) trypsin solution for 2 min at 37 °C. Slices were submitted to treatment with 0.3 % (v/v) methanolic hydrogen peroxide solution for 15 min at 25 °C. For lectin histochemistry, histological slices were incubated with ClaveLL-HRP or BmoLL-HRP conjugates (60 µg/ml of lectin) for 2 h at 4 °C; negative control slices were incubated with ClaveLL-HRP containing 0.3 M N-acetyl-glucosamine (specific inhibitory sugar for carbohydrate recognition sites of ClaveLL) or BmoLL-HRP containing 0.3 M D-galactose (specific inhibitory sugar for carbohydrate recognition sites of BmoLL). Histological slices were washed (twice for 5 min) with 0.01 M PBS pH 7.2, containing 0.15 M NaCl, after each step. Horseradish peroxidase was visualized by incubation in 0.01 M PBS containing

diaminobenzidine (DAB) and hydrogen peroxide solution (Beltrão et al., 2003) for 5 to 8 min. Slices were counterstained with haematoxylin and evaluated through optic microscopy.

Results

We found that NFT present in the dentate gyrus and other regions of the hippocampus of patients with AD contained glycidic radicals able to be recognized by ClaveLL-HRP (Figure 1F-I); cells with granulo-vacuolar degeneration (other typical degeneration in AD) also were stained by ClaveLL-HRP (Figure 1J). BmoLL-HRP was not reactive with NFT. Both lectins evaluated were not able to detect senile plaques on hippocampus tissues tested (if tissues contained senile plaques). Strong recognition of blood vessels in the hippocampal formation was detected by lectin staining using ClaveLL-HRP (Figure 1A) and BmoLL-HRP (Figure 2A). Lectins were able to recognize cell cytoplasm of neurons (Figure 1A-C and E, with ClaveLL; Figure 2B, C, E and F, with BmoLL). Moreover, ClaveLL-HRP (Figure 1A, B and D) and BmoLL-HRP (Figure 2A and D) conjugates, GlcNac (or fetuin, asialofetuin, casein, asocasein and glycoproteins present in colostrum and in rabbit or bovine fetal serums) and galactose specific, respectively, showed strong reactivity with corpora amylacea present in the hippocampus of patients with AD. BmoLL-HRP not stained cell cytoplasm and blood vessels in hippocampus of patients without Alzheimer's disease.

Discussion

Lectins with different specificities to carbohydrates are powerful histochemical tools for a detailed characterization of physiological cell stages, metabolic diseases and general pathologies tracing changes in cells and tissues. However, use of lectins specifically in the histochemical study of AD is not significant in relation to the potential contributions that these molecules can provide for a better understanding of the pathology (Mann et al., 1988;

Kobayashi et al., 1989; Cummings et al., 1992; Mann et al., 1992; Nishimura *et al.*, 2000; Nishi et al., 2003), contributing with information on cells and tissue changes in respect to modified glycosylation processes.

AD is a neurodegenerative disease characterized by a slow progressive dementia on the adult age of onset that can be linked to neuronal loss (Kobayashi et al., 1989), extracellular deposition of senile plaques and presence of NFT (Bonifati and Kishore, 2007), which are the pathological hallmarks of AD (Ng'walali et al., 2002; Bonifati and Kishore, 2007; Findeis, 2007; Yoon et al., 2007).

Carbohydrates located at cell surface are found as glycolipids or glycoproteins at the outer layer of cell membrane, where they are involved in most of the major biological events and can serve as biological markers (Boullanger et al., 2008). Carbohydrate-chains are co-translational or posttranslational modifications of proteins and also can occur in lipid-linked forms constituting glycoconjugates. Such modifications are executed by sequential actions of cellular glycosyltransferases and other molecules. Many post-translational modifications, such as N- and O-glycosylation, phosphorylation, tyrosin O- sulfation and ϵ glycation have been described in trans-membrane APP (Schmitt, 2006). Glycan chains can significantly alter protein conformation and may consequently modulate the functional activity of a protein as well as protein/protein interactions (Geyer and Geyer, 2006). For instance, *O*-GlcNAc like modification is involved with many cell functions (Kneass et al., 2004; Zachara et al., 2004) and enzymes of addition (*O*-GlcNAc transferase, OGT) and removal (*O*-glycoprotein 2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosidase) of *O*-GlcNAc like modification show intense expression in brain tissues (Kreppel et al., 1997; Gao et al., 2001). Thus, it is clear that the modification act on important brain functions. *O*-GlcNAc and phosphorylation like modifications, when simultaneous, they seem to be involved with regulation of hyperphosphorylated tau protein participation on intracellular NFT formation (Liu et al.,

2004). Final glycosylation of cell molecules is one of the key processes by which the cell modifies proteins and lipids constituents, and it can change several physical and chemical properties, reactivity, and biological function of these molecules (Babál et al., 2006). Brain glycoconjugates are important recognition molecules in mediating cell–cell interactions during development of the central nervous system (Nishimura et al., 2000; Nishi et al., 2003), act as inductors in development and migration of neurons, neural cell adhesion and others. Thus, an imbalance in the glycidic metabolism can deliberate cerebral disorders resulting in abnormal protein modifications and may produce the accumulation or deposition of glycoconjugates intracellular and/or the intercellular matrix (Nishimura et al., 2000).

Although both ClaveLL-HRP and BmoLL-HRP lectins were not able to detect senile plaques on hippocampus, these lesions and NFT were recognized mainly in the cerebral cortex and hippocampus of some elderly people, patients with DS and/or ATD (Alzheimer-type dementia); lesions were clearly stained by Con A (*Canavalia ensiformes* agglutinin), PSA (*Pisum sativum* agglutinin) and GS-I (*Griffonia simplicifolia* I lectin) lectins (showed no reactivity with other lectins tested) and not detected in the younger control group (Nishimura et al., 2000). Nishi et al. (2003) reviewed that NFT in cerebral cortex with DS were detected by weak but clear lectin staining using WGA (Wheat Germ Agglutinin), GSI (*Griffonia simplicifolia* agglutinin), GSAI-B4 (*Griffonia simplicifolia* iso agglutinin B4), Con A, and PSA; senile plaques were diffusely stained by these lectins, reacting strongly with Con A and PSA, and moderately with WGA and GSA-IB4. Mann et al. (1988) studying the oligosaccharidic composition from structure of the senile plaque and NFT with lectin histochemistry, observed that different lectin groups stained the neurites of senile plaques and NFT; neuraminidase pretreatment abolished staining of NFT by some of these lectins that stained NFT (but did not affect staining of all). Authors concluded that oligosaccharides could contribute (but in different ways) to glycoprotein or glycolipid residues that form an integral

part of the structure of the senile plaque and the NFT. Tau proteins belong to the family of brain microtubule associated proteins involved in polymerisation and stability of neuronal microtubules and can be posttranslationally modified by phosphorylation, N- and O-linked glycosylation, ubiquitination, glycation, proteolysis and other events (Buée et al., 2000). Abnormal phosphorylation of tau proteins occurs during neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease and these abnormally phosphorylated tau proteins are the main components of filaments (named NFT) that accumulate in degenerating neurons. In addition, tau proteins from brains with AD are glycosylated with N- and O-linked saccharides. Lefebvre et al (2003) verified that WGA recognized the tau protein and this recognition was indeed specific for O-linked GlcNAc residues; use of other techniques confirmed that human tau proteins were glycosylated with O-GlcNAc residues only. However, *in vivo*, the hyperphosphorylated tau proteins that aggregate in NFT during neurodegenerative diseases are devoid of O-GlcNAc residues. Liu et al. (2002) through monosaccharide composition analyses and specific lectin blots suggested that tau in AD brain was glycosylated mainly through N-linkage and they suggested that tau glycosylation is an early abnormality of neurofibrillary degeneration in AD, and that glycosylation of tau might facilitate its abnormal hyperphosphorylation in AD brain.

In spite of strong recognition of ClaveLL-HRP by material surrounding blood vessels on hippocampal formation, previous investigations demonstrated that amyloid deposits of vascular type found mainly in the hippocampus of patients with ATD and nearby the dentate nucleus of the cerebellum of a patient with DS showed good reactivity with UEA-I (*Ulex europaeus* isolectin I), GS-I and DBA (*Dolichos biflorus* agglutinin), and no reactivity with Con A and PSA (Nishimura et al., 2000). Mann et al. (1992) used 14 lectins to investigate the expression of saccharides by cerebral microvessels (MBV) in ageing, AD and DS, and verified that in AD and in persons over 50 years of age with DS, binding of e-PHA

(erythroagglutinating phytohemagglutinin from *Phaseolus vulgaris*), l-PHA (*Phaseolus vulgaris* leucoagglutinating lectin) and PAA (*Pisum arvense* agglutinin) was increased beyond (in relation to age alone), as was binding of UEA-I and BSA-1B4 (*Bandeiraea simplicifolia* agglutinin) in AD, but not in DS. These specific increases in AD and DS may reflect selective disease-related changes in basement membrane (that occurs in DS after 50 years of age and that could stem from the loss of neurones from locus caeruleus, raphe and nucleus basalis, which are thought to innervate MBV and exert control over blood flow and permeability) and could indicate an impaired blood-brain barrier function or integrity.

Corpora amylacea were found with increasing frequency in different neurological diseases, for instance in the hippocampus of patients with DS or ATD; this lesion in this work was strongly stained with ClaveLL-HRP and BmoLL-HRP lectins, that are GlcNAc inhibited and galactose specific, respectively. It showed good reactivity with GS-I (specific to galactose and GalNAc) and was also stained by UEA-I (specific to fucose), DBA (specific to GalNAc), PNA (specific to Gal–GalNAc) and ECA (specific to Gal–GlcNAc) lectins, but was not stained by lectins specific to mannose (PSA and Con A) (Nishimura et al., 2000).

The new lectin ClaveLL obtained from the lichen *Cladonia verticillaris* is being analyzed in relation to its potential antifungal, antibacterial and insecticide activities. *Bauhinia monandra* leaves are broadly used as popular hypoglycemic medicine in Northeast of Brazil and a galactose-specific lectin (BmoLL) is present in leaves in milligram amounts (Coelho and Silva, 2000). The interfacial behavior of BmoLL and its interaction with lipid monolayers have been studied by surface tension measurements (Rosilio et al., 2004); dielectric properties of BmoLL monolayers (Andrade et al., 2005 part I) and mixed monolayers with phospholipids (Andrade et al., 2005 part II) have been evaluated. BmoLL also revealed anti-insect activity (Macedo et al., 2007).

Lichen lectins are not frequently purified; in general they are evaluated structurally, however few biological or biotechnological applications have been described to these molecules of exotic biological nature. Also, leaf lectins are purified less habitually in comparison to seeds and other vegetable structures. In this work, we show a new lectin (ClaveLL) of lichenic nature with glycoproteins or N-acetyl-glucosamine-binding property that is able to recognize neuron cells and some characteristic intra and extra cellular structures (lesions) of the hippocampus of patients with AD. In addition, we introduce that BmoLL, a galactose specific lectin purified from leaves, also was able to recognize corpora amylacea characteristic in brain tissues of patients with AD; BmoLL was also able to recognize cytoplasm of neuron cell and blood vessels present in the hippocampus with Alzheimer disease. These lectins with different specificities are useful as histochemistry markers to diagnosis or study AD through the hippocampus tissues.

References

- Andrade CAS, Baszkin A, Santos-Magalhães NS, Coelho LCBB, Melo CP. Dielectric properties of *Bauhinia monandra* and Concanavalin A lectin monolayers, part I. J Colloid Interf Sci 2005;289:371-8.
- Andrade CAS, Baszkin A, Santos-Magalhães NS, Coelho LCBB, Melo CP. Mixed monolayers of *Bauhinia monandra* and Concanavalin A lectins with phospholipids, part II. J Colloid Interf Sci 2005;289:379-85.
- Arbel M, Solomon, B. Immunotherapy for Alzheimer's disease: attacking amyloid- β from the inside. Trends Immunol 2007;28:511-3.
- Arendash GW, Jensen MT, Salem Jr. N, Hussein N, Cracchiolo J, Dickson A, et al. A diet high in omega-3 fatty acids does not improve or protect cognitive performance in Alzheimer's transgenic mice. Neuroscience 2007;149:286–302.

- Babál P, Janega P, Cerná A, Kholová I, Brabencová E. Neoplastic transformation of the thyroid gland is accompanied by changes in cellular sialylation. *Acta Histochem* 2006;108:133-40.
- Barou O, Mekraldi S, Vico L, Boivin G, Alexandre C, Lafage-Proust MH. Relationships between trabecular bone remodeling and bone vascularization: a quantitative study. *Bone* 2002;30:604-12.
- Beltrão EIC, Medeiros PL, Rodrigues OG, Figueredo-Silva J, Valença MM, Coelho LCBB, et al. *Parkia pendula* lectin as histochemistry marker for meningothelial tumor. *Eur J Histochem* 2003;47:139-42.
- Beltrão EIC, Correia MTS, Figueredo-Silva J, Coelho LCBB. Binding evaluation of isoform 1 from *Cratylia mollis* lectin to human mammary tissues. *Appl Biochem Biotech* 1998;74:125-34.
- Bing DH, Weyand JG, Stavitsky AB. Hemagglutination with aldehyde-fixed erythrocytes for assay of antigens and antibodies. *Proc Soc Exp Biol Med* 1967;124:1166-70.
- Bonifati DM, Kishore U. Role of complement in neurodegeneration and neuroinflammation. *Mol Immunol* 2007;44:999-1010.
- Boullanger P, Lafont D, Bouchu M-N, Jiang L, Liu T, Lu W, et al. The use of glycolipids inserted in color-changeable polydiacetylene vesicles, as targets for biological recognition. *C R Chimie* 2008;11:43-60.
- Buée L, Bussière T, Buée-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Rev* 2000;33:95-130.
- Coelho LCBB, Silva MBR. Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. *Phytochem Anal* 2000;11:295-300.
- Correia MTS, Coelho LCBB. Purification of a glucose/mannose specific lectin, Isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart (camaratu bean). *Appl Biochem Biotech* 1995;55:261-73.

- Cummings BJ, Su JH, Geddes JW, Van Nostrand WE, Wagner SL, Cunningham DD, et al. Aggregation of the amyloid precursor protein within degenerating neurons and dystrophic neurites in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 1992;48:763-77.
- Fiedler A, Reinert T, Morawski M, Brückner G, Arendt T, Butz T. Intracellular iron concentration of neurons with and without perineuronal nets. *Nucl Instr and Meth in Phys Res B* 2007;260:153-8.
- Findeis MA. The role of amyloid β peptide 42 in Alzheimer's disease. *Pharmacol Ther* 2007;116:266-86.
- Gao Y, Wells L, Comer FL, Parker GJ, Hart GW. Dynamic *O*-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Cloning and characterization of a neutral, cytosolic b-*N*-acetylglucosaminidase from human brain. *J Biol Chem* 2001;276:9838–45.
- Geyer H, Geyer R. Strategies for analysis of glycoprotein glycosylation. *Biochim Biophys Acta* 2006;1764:1853-69.
- Hemmoranta H, Satomaa T, Blomqvist M, Heiskanen A, Aitio O, Saarinen J, et al. N-glycan structures and associated gene expression reflect the characteristic N-glycosylation pattern of human hematopoietic stem and progenitor cells. *Exp Hematol* 2007;35:1279-92.
- Ishikawa T, Zhu B-L, Li D-R, Zhao D, Michiue T, Maeda H. Age-dependent increase of clusterin in the human pituitary gland. *Legal Med* 2006;8:28-33.
- Kneass ZT, Marchase RB. Neutrophils exhibit rapid agonist induced increases in protein-associated *O*-GlcNAc. *J Biol Chem* 2004;279:45759-65.
- Kobayashi K, Emson PC, Mountjoy CQ. *Vicia villosa* lectin-positive neurones in human cerebral cortex. Loss in Alzheimer-type dementia. *Brain Res* 1989;498:170-4.
- Kreppel LK, Blomberg MA, HART GW. Dynamic glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Cloning and characterization of a unique *O*-GlcNAc transferase with multiple tetratricopeptide repeats. *J Biol Chem* 1997;272:9308-15.

- Lefebvre T, Ferreira S, Dupont-Wallois L, Bussière T, Dupire M-J, Delacourte A, et al. Evidence of a balance between phosphorylation and O-GlcNAc glycosylation of Tau proteins - a role in nuclear localization. *Biochim Biophys Acta* 2003;1619:167-76.
- Li M, Chen L, Lee DHS, Yu L-C, Zhang Y. The role of intracellular amyloid b in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* 2007;83:131-9.
- Liu F, Zaidi T, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Merkle RK, Gong C-X. Role of glycosylation in hyperphosphorylation of tau in Alzheimer's disease. *FEBS Lett* 2002;512:101-6.
- Liu F, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Hart GW, Gong CX. O-GlcNAcylation regulates phosphorylation of Tau: a mechanism involved in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:10804-9.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75.
- Macedo MLR, Freire MGM, Silva MBR, Coelho LCBB. Insecticidal action of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Comp Biochem Physiol A* 2007;146:486-98.
- Mann DMA, Bonshek RE, Marcyniuk B, Stoddart RW, Torgerson E. Saccharides of senile plaques and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1988;85:277-82.
- Mann DMA, Purkiss MS, Bonshek RE, Jones D, Brown AMT, Stoddart RW. Lectin histochemistry of cerebral microvessels in ageing, Alzheimer's disease and Down's syndrome. *Neurobiol Aging* 1992;13:137-43.
- Medina-Flores R, Wang G, Bissel SJ, Murphey-Corb M, Wileya CA. Destruction of extracellular matrix proteoglycans is pervasive in simian retroviral neuroinfection. *Neurobiol Dis* 2004;16:604-16.

- Minnasch P, Yamamoto Y, Ohkubo I, Nishi K. Demonstration of puromycin-sensitive alanyl aminopeptidase in Alzheimer disease brain. *Legal Med* 2003;5:S285-7.
- Ng'walali PM, Yonemitsu K, Kibayashi K, Tsunenari S. Neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease in forensic autopsy of elderly persons with fatal accident. *Legal Med* 2002;4:223-31.
- Nishi K, Tanegashima A, Yamamoto Y, Ushiyama I, Ikemoto I, Yamasaki S, et al. Utilization of lectin-histochemistry in forensic neuropathology: lectin staining provides useful information for postmortem diagnosis in forensic neuropathology. *Legal Med* 2003;5:117-31.
- 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 Sci Int* 2000;113:265-9.
- Pedini V, Scooco P, Gargiulo AM, Ceccarelli P, Lorvik S. Glycoconjugate characterization in the intestine of *Umbrina cirrosa* by means of lectin histochemistry. *J Fish Biol* 2002;61:1363-72.
- Schmitt HP. ϵ -Glycation, APP and A β in ageing and Alzheimer disease: A hypothesis. *Medical Hypotheses* 2006;66:898-906.
- Rosilio V, Boissonnade M-M, Coelho LCBB, Santos-Magalhães NS, Andrade CAS, Baszkin A. Interaction of *Bauhinia monandra* lectin (BmoLL) with lipid monolayers. *Colloid Surface A* 2004;250:491-7.
- Szöke T, Kayser K, Trojan I, Kayser G, Furak J, Tiszlavicz L, et al. The role of microvascularization and growth/adhesion-regulatory lectins in the prognosis of non-small cell lung cancer in stage II. *Eur J Cardiothorac Surg* 2007;31:783-7.
- Thöm I, Schult-Kronefeld O, Burkholder I, Goern M, Andritzky B, Blonski K, et al. Lectin histochemistry of metastatic adenocarcinomas of the lung. *Lung Cancer* 2007;56:391-7.

- Ulfing N, Bohl J, Neudörfer F, Rezaie P. Brain macrophages and microglia in human fetal hydrocephalus. *Brain Dev* 2004;26:307-15.
- Uryu K, Chen X-H, Martinez D, Browne KD, Johnson VE, Graham DI, et al. Multiple proteins implicated in neurodegenerative diseases accumulate in axons after brain trauma in humans. *Exp Neurol* 2007;208:185-92.
- Wang X, Su B, Perry G, Smith MA, Zhu X. Insights into amyloid- β -induced mitochondrial dysfunction in Alzheimer disease. *Free Radical Bio Med* 2007;43:1569-73.
- Yoon SY, Choi HI, Choi JE, Sul CA, Choi JM, Kim DH. Methotrexate decreases PP2A methylation and increases tau phosphorylation in neuron. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;363:811-16.
- Zachara NE, O'Donnell N, Cheung WD, Mercer JJ, Marth JD, Hart GW. Dynamic *O*-GlcNAc Modification of nucleocytoplasmic proteins in response to stress. A Survival response of mammalian cells. *J Biol Chem* 2004;279:30133-42.

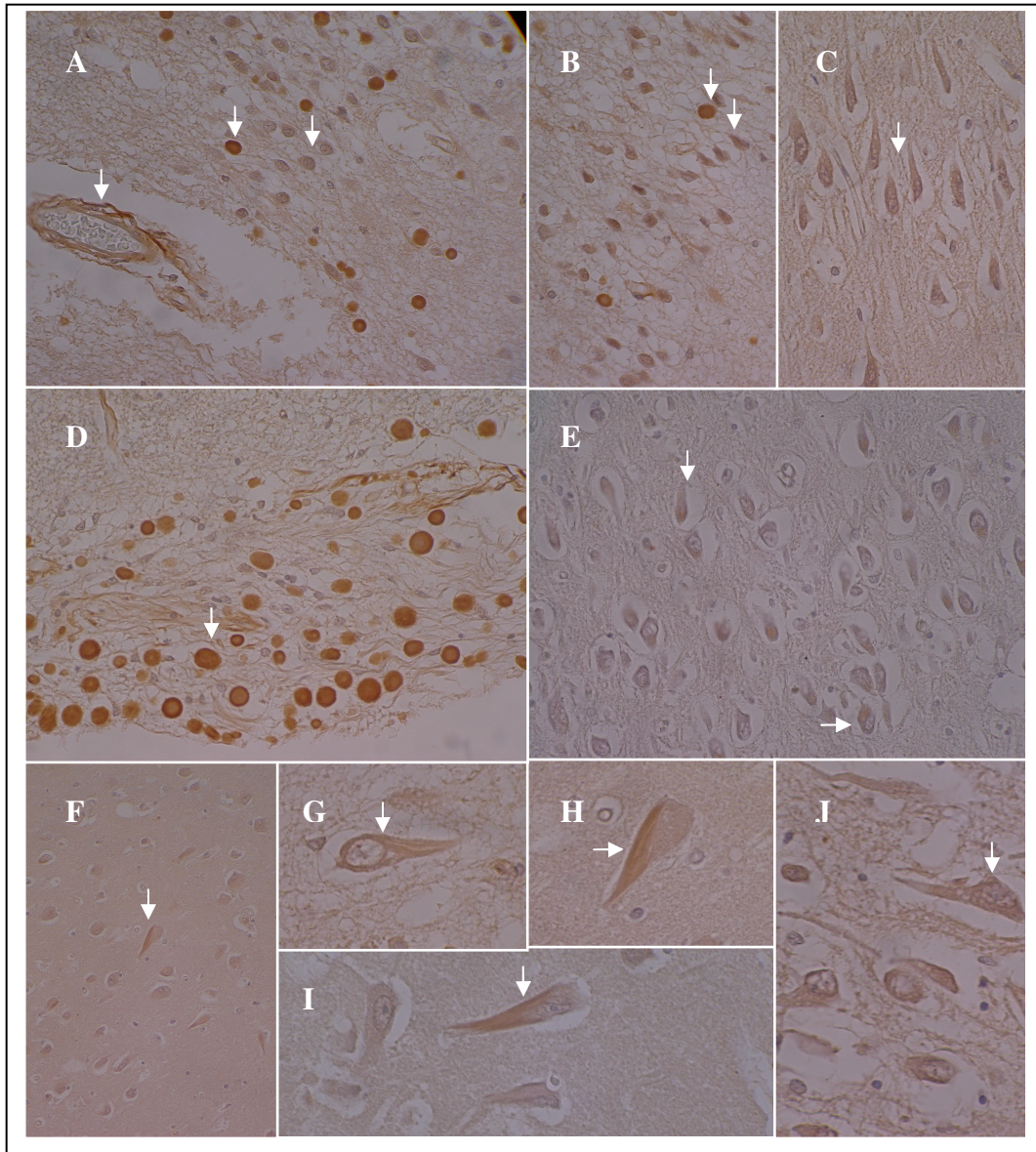


Figure 1. Lectin histochemistry in the hippocampal formation of patients with AD: cells with neurofibrillary tangles showed strong reactivity with ClaveLL-HRP (F, G, H, and I) that were not stained with BmoLL-HRP; blood vessels (A), cell cytoplasm (A, B, C and E) and cells with granulo-vacuolar degeneration (J) also showed clear reactivity with ClaveLL-HRP; corpora amylacea in the hippocampus were strongly stained by ClaveLL-HRP (A, B, and D). A, B, C, D and E (X 400x1.7), F (X 200x1.7) and G, H, I and J (X 400x3.0) with haematoxylin counterstain.

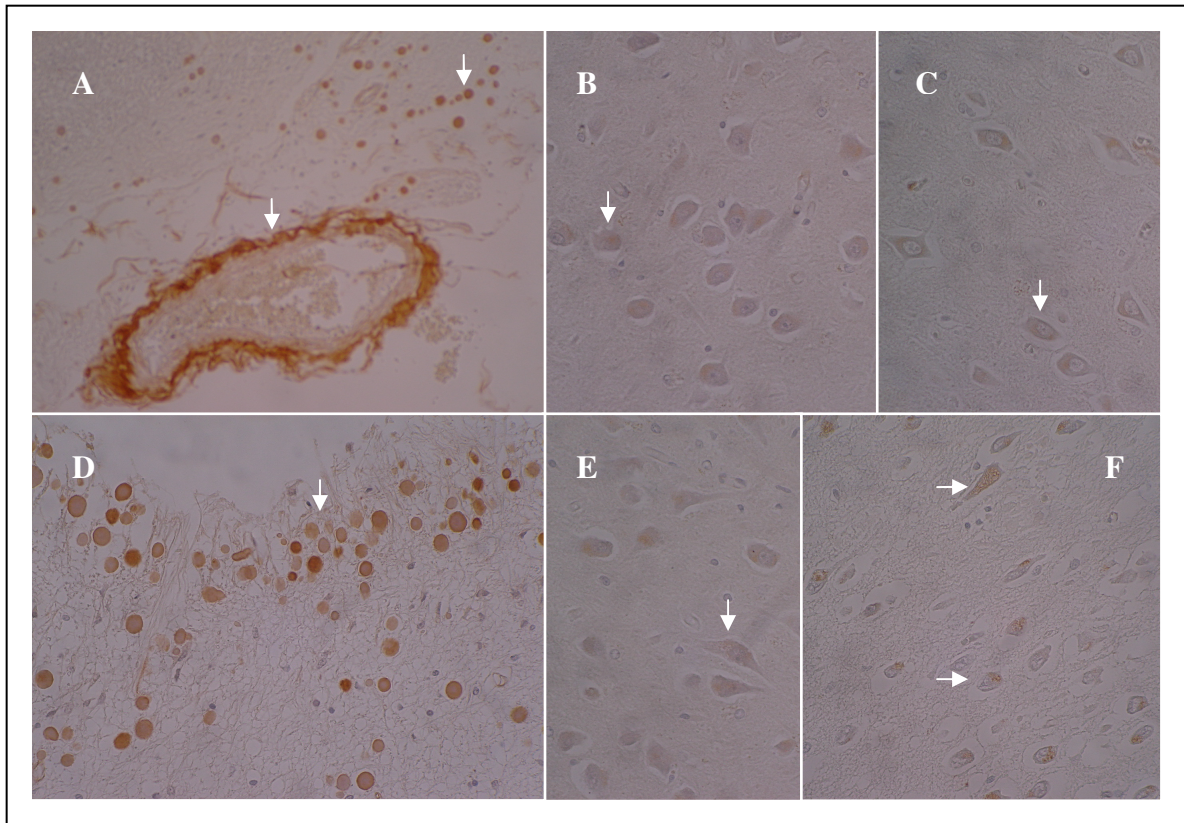


Figure 2. Lectin histochemistry in the hippocampal formation of patients with AD: cells cytoplasm showed clear reactivity with BmoLL-HRP (B, C, E and F); blood vessels (A) and corpora amylacea in the hippocampus (A and D) were strongly stained by BmoLL-HRP. A (X 200x1.7) and B, C, D, E and F (X 400x1.7) with haematoxylin counterstain.

6 CONCLUSÕES

- Num protocolo simples, cromatografias em Sephadex G-100 isolam mais que 18 mg de ClaveLL presente na fração protéica (F₁), obtida do extrato (E) de apenas 20 g do líquen *Cladonia verticillaris*;
- ClaveLL é termossensível, não dependente de íons, estável em pH ácido e básico, glicosilada e apresenta elevada afinidade por glicoconjugados;
- ClaveLL possui elevado peso molecular (110 kDa), forte caráter hidrofóbico, perfil homogêneo e parece ser constituída por agregados moleculares em condições para proteínas nativas;
- ClaveLL em baixas concentrações e BmoLL apresentam ação antifúngica atuando como inibidores do crescimento de espécies de *Fusarium*, podendo ser mais eficientes que o antifúngico comercial Cercobin. As lectinas também atuam inibindo o crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, bem como promovem aglutinação bacteriana;
- ClaveLL é uma amostra lectínica livre de metabólitos secundários, com elevada afinidade por N-acetil-D-glicosamina e, especialmente, glicoproteínas. BmoLL é uma lectina específica para galactose e tem afinidade por quitina. As duas lectinas apresentam ação inseticida contra *Nasutitermes corniger*, uma espécie que ataca madeiras;
- Adicionalmente, preparações protéicas do líquen (E e F₁), também livres de metabólitos secundários, são similarmente tóxicas para os cupins;
- ClaveLL e preparações do líquen (E e F₁) bem como BmoLL não possuem ação repelente sobre os insetos avaliados reforçando que a morte dos mesmos ocorre devido à ingestão de papel contendo as preparações;
- ClaveLL reconhece células neuronais e algumas lesões intra e extra-celulares (degenerações e corpos amiláceos) características da doença de Alzheimer;
- BmoLL marca o citoplasma neuronal e corpos amiláceos (abundantes em hipocampus de pacientes com a doença de Alzheimer);

- ClaveLL e BmoLL são lectinas úteis como marcadores histoquímicos para contribuir com o diagnóstico e estudo da doença de Alzheimer.