

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM BIOQUÍMICA E FISILOGIA**

**LECTINAS DE CERNE E ENTRECASCA DE *Myracrodruon
urundeuva*: ATIVIDADES ANTIMICROBIANA E LARVICIDA
SOBRE *Aedes aegypti***

FRANCIS SOARES GOMES

**ORIENTADORA: Prof^ª. Dra. PATRÍCIA MARIA GUEDES PAIVA
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. ROBERTO ARAÚJO SÁ**

**RECIFE
2009**

FRANCIS SOARES GOMES

LECTINAS DE CERNE E ENTRECASCA DE *Myracrodruon urundeuva*:
ATIVIDADES ANTIMICROBIANA E LARVICIDA SOBRE *Aedes*
aegypti

ORIENTADORA: Prof^a Dra. PATRÍCIA MARIA GUEDES PAIVA

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. ROBERTO ARAÚJO SÁ

RECIFE
2009

Gomes, Francis Soares

Lectinas de cerne e entrecasca de *Myracrodruon urundeuva*: atividade antimicrobiana e larvicida sobre *Aedes aegypti* / Francis Soares Gomes. – Recife: O Autor, 2009.

69 folhas: il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Bioquímica e Fisiologia, 2009.

Inclui bibliografia e anexos

1. Proteínas 2. Lectinas 3. *Arueira-do-Sertão* 4. Atividade antimicrobiana 5. *Aedes aegypti* | Título

572.6

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB – 2009 – 165

FRANCIS SOARES GOMES

**"Lectinas de cerne e entrecasca de *Myracrodruon urundeuva*:
atividades antimicrobiana e larvicida sobre *Aedes aegypti*"**

Dissertação apresentada para o
cumprimento parcial das exigências
para obtenção do título de Mestre em
Bioquímica e Fisiologia pela
Universidade Federal de Pernambuco

Aprovado por:



Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva - Presidente



Profa. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho



Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia



Profa. Dra. Adriana Carla Cavalcante Argôlo

Data: 25 / 08 / 2009

“Ninguém pode construir em teu lugar
as pontes que precisarás passar,
para atravessar o rio da vida.”

Friedrich Nietzsche

Dedico

Aos meus pais, Francisco Gomes e
Ileana Martins, pelo eterno amor,
dedicação, carinho e apoio a
mim dispensados.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as graças concebidas;

À professora Dra. Patrícia Paiva, que me passou os seus ensinamentos desde o curso de graduação, além de me orientar com extrema dedicação na realização deste trabalho;

Ao meu co-orientador, Roberto Araújo Sá, por todo o apoio, amizade e dedicação em passar os conhecimentos iniciais dos procedimentos laboratoriais;

Ao CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão de suporte financeiro;

A Maria Barbosa Reis da Silva, pela amizade e assistência técnica no Laboratório de Glicoproteína da Universidade Federal de Pernambuco;

Aos professores do curso de mestrado, realizado no Departamento de Bioquímica da UFPE, que contribuíram na minha formação profissional;

À minha mãe, Ileana Martins Soares, e ao meu pai, Francisco Gomes da Silva Filho, por todo o empenho na minha educação;

Aos demais familiares que sempre me apoiaram em minha caminhada;

Aos amigos Nataly e Thiago, pelo apoio indispensável durante todo o tempo convívio.

A Lucélia pelos poucos mas maravilhosos momentos de companhia.

A todos que fazem ou fizeram parte do Laboratório de Glicoproteínas pela convivência harmoniosa: Adriana, Aleide, Amanda e Amanda Alves, Ana Luiza, Andréa Sales, Andréa Santos, Bernardo, Carina, Carlos, Cris, Cynarha, Cynthia, Dalila, Emmanuel, Felipe, Fernando, Flávia, Giselly, Jayra, José Roberto, Kézia, Larissa, Lidiane, Luciana, Maiara, Mariana, Marília, Mauricélia, Mercia, Michele, Mychely, Neila, Raiana, Regina, Rodrigo, Romero, Rosiely, Tatiana, Thâmarah, Thamara, Vanessa e Sandro.

A Onilda e Magnólia, diretoras do Colégio Conhecer, onde obtive os primeiros ensinamentos escolares;

A Armando Reis Vasconcelos, diretor do Colégio Equipe, pelo profissionalismo e inteira dedicação à minha formação como indivíduo e ser social;

E finalmente a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, participaram desta minha caminhada.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Anatomia da Madeira	16
2	<i>Myracrodruon urundeuva</i> : Parte aérea (A), inflorescência (B), folhas (C), frutos (D) e madeira (E).	19
3	Representação esquemática da ligação da lectina a um carboidrato (A), de acordo com Kennedy et al. (1995). As linhas pontilhadas representam pontes de hidrogênio.	22
4	Representação esquemática de aglutinação por lectinas, baseada em Kennedy <i>et al.</i> (1995). Lectina, e seus ligantes de superfície da célula, carboidratos ou não-carboidratos, ligantes ou não.	22
ARTIGO 1		
1	Growth halos of the fungi <i>F. solani</i> , <i>F. decemcellulare</i> , <i>F. oxysporum</i> and <i>F. lateritium</i> in YNB medium. The conditions of the assays were: only the mycelial disk (A) and in presence of 0.15 M NaCl (B), 10 ppm Cercobin (C) or purified lectin (50 µg) in 0.15 M NaCl (D). Each point represents the mean ± s.d. of three experiments.	54
2	Growth halos of the fungi <i>F. verticiloides</i> , <i>F. fusarioides</i> and <i>F. moniliforme</i> in YNB medium. The conditions of the assays were: only the mycelial disk (A) and in presence of 0.15 M NaCl (B), 10 ppm Cercobin (C) or purified lectin (50 µg) in 0.15M NaCl (D). Each point represents the mean ±S.D. of three experiments.	55
ARTIGO 2		
1	Chromatography of (A) BF — 20–40% supernatant from bark extract and (B) HF — 40–60% precipitate from heartwood extract on columns of N-acetyl-D-glucosamine immobilized in agarose gel. Washing step used 0.15 M NaCl. Arrows demonstrate eluents added. Fractions of 2.0 mL were collected and evaluated for hemagglutinating activity (HA). ABS 280 nm (♦), log HA (◇).	63
2	Chromatography of BF, 20–40% supernatant from bark extract (A), and HF, 40–60% precipitate from heartwood extract (B), on chitin columns. Washing step used 0.15 M NaCl. Arrows demonstrate eluents added. Fractions of 2.0 mL were collected and evaluated for hemagglutinating activity (HA). ABS 280 nm (♦), log HA (◇). PAGE for native basic proteins of MuBL (inset a1) and MuHL (inset b1). SDS-PAGE under reducing conditions for MuBL (inset a2) and MuHL (inset b2). Cytochrome c (insets a1 and b1) and molecular weight markers (insets a2 and b2) were used as standards in electrophoresis.	63

LISTA DE TABELAS

TABELA		PÁGINA
1	Famílias de Lectinas de plantas: ocorrência e especificidade	23
ARTIGO 1		
1	Antibacterial activity from <i>M. urundeuva</i> heartwood preparations	53
2	MIC and MAC values of purified lectin.	53
ARTIGO 2		
1	Larvicidal activity on <i>A. aegypti</i> larvae from <i>M. urundeuva</i> bark and heartwood	64

LISTA DE ABREVIATURAS

AH: atividade hemaglutinante;

CMI: concentração mínima inibitória;

CMB: concentração mínima bactericida;

CMA : concentração mínima aglutinante;

IBAMA: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis;

IPT : Instituto de Pesquisa Tecnológica;

ARTIGO 1

CFU: unidade formadora de colônia, do ingles “colony forming units”;

F₁: fração 40-60%;

HA: atividade hemaglutinante, do ingles “hemagglutinating activity”;

MAC: concentração mínima aglutinante, do inglês “minimal agglutinating concentration”;

MBC: concentração mínima bactericida, do inglês “minimal bactericide concentration”;

MIC: concentração mínima inibitória, do inglês “minimal inhibitory concentration”;

NA: meio Ágar Nutritivo, do ingles “Nutrient Agar medium”;

NB: Caldo nutritivo, do ingles “Nutrient Broth medium”;

SHA: atividade hemaglutinante específica, do inglês “specific hemagglutinating activity”;

YNB: Yeast Nitrogen Base medium.

ARTIGO 2

BE: extrato de entrecasca, do inglês “bark extract”;

BF: fração de entrecasca, do inglês “bark fraction”;

HA: atividade hemaglutinante, do ingles “hemagglutinating activity”;

LC: Concentração necessária para matar da população, do inglês “lethal concentration”;

MuBL: lectina de entrecasca de *Myracrodruon urundeuva*, do inglês “*Myracrodruon urundeuva* bark lectin”;

MuHL: lectina do cerne de *Myracrodruon urundeuva*, do inglês “*Myracrodruon urundeuva* heartwood lectin”;

PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida, do inglês “polyacrilamide gel electrophorese

RESUMO

Sementes de plantas são fontes de lectinas, proteínas que interagem com carboidratos e promovem aglutinação de eritrócitos. A interação de lectinas com carboidratos resulta em atividades antimicrobiana e inseticida encontradas nessas proteínas. Cerne de *Myracrodruon urundeuva* é resistente a fitopatógenos. *Aedes aegypti* transmite os agentes etiológicos da febre amarela e da dengue. Vacina para o vírus da dengue não é disponível e o controle do vetor é essencial para minimizar a incidência da dengue. Este trabalho relata o isolamento das lectinas de entrecasca (MuBL) e cerne (MuHL) de *M. urundeuva*. Avaliação da atividade antimicrobiana de MuHL contra bactérias e fungos que atacam plantas, incluindo madeira, e os efeitos de MuHL e MuBL sobre larvas de *A. aegypti* foram também descritos. Atividade larvicida foi investigada com extratos, frações salinas e lectinas isoladas. As lectinas foram isoladas por tratamento do extrato bruto com sulfato de amônio seguido por cromatografia em coluna de quitina. MuBL e MuHL foram avaliadas por eletroforese em condições nativas (PAGE) e desnaturantes (sulfato sódico de dodecila, SDS-PAGE). A especificidade a carboidratos das lectinas foi avaliada pelo ensaio de inibição da atividade hemaglutinante (AH) usando N-acetil-Dglicosamina e por cromatografia de afinidade sobre N-acetil-D-glicosamina imobilizada em gel de agarose. PAGE caracterizou MuBL e MuHL como proteínas básicas de massas moleculares 14,0 e 14,4 kDa, respectivamente. A interação das lectinas com N-acetil-Dglicosamina foi detectada pela inibição da AH pelo monossacarídeo e adsorção das lectinas na matriz de N-acetil-D-glicosamina. MuHL inibiu bactérias Gram-negativa e Gram-positiva e foi mais efetiva que o antifúngico Cercobin na inibição do crescimento de fungos fitopatogênicos. Todas preparações de *M. urundeuva* promoveram mortalidade larval. Foram obtidos valores de CL_{16} , CL_{50} e CL_{84} de 0,077, 0,125, 0,173 para MuBL e 0,03, 0,04 e 0,05 mg/mL para MuHL. A atividade antimicrobiana detectada revela o possível papel de MuHL na resistência do cerne de *M. urundeuva* contra agentes biológicos deteriorantes. A lectina de *M. urundeuva* é o primeiro peptídeo bioativo encontrado em cerne, provavelmente estocado como uma proteção química contra biodegradação. Para nosso conhecimento este é o primeiro relato de atividade larvicida de lectinas contra *A. aegypti*.

Palavra-chaves: *Aedes aegypti*; Atividade antimicrobiana; Atividade larvicida; Cerne; Entrecasca; Lectina; *Myracrodruon urundeuva*.

ABSTRACT

Plant seeds are a source of lectins, proteins that interact with carbohydrates and promote erythrocyte agglutination. The interaction of lectins with carbohydrates results in antimicrobial and insecticide activities found in these proteins. *Myracrodruon urundeuva* heartwood is resistant to phytopatogens. *Aedes aegypti* transmits etiologic agents of yellow fever and dengue. Vaccine for dengue virus is not available and vector control is essential to minimize dengue incidence. This work reports the isolation of lectins from *Myracrodruon urundeuva* bark (MuBL) and heartwood (MuHL). Evaluation of MuHL antimicrobial activity against bacteria and fungi that attack plants, including woods and effects of MuHL and MuBL on *A. aegypti* larvae were also described. Larvicidal activity against *A. aegypti* was investigated with the extracts, salt fractions and isolated lectins. The lectins were isolated by ammonium sulphate treatment of crude extracts followed by chromatography on chitin column. MuBL and MuHL were evaluated by electrophoresis under native (PAGE) and denaturing conditions (sodium dodecyl sulphate, SDS-PAGE). Carbohydrate specificity of lectins was evaluated by hemagglutinating activity (HA) inhibition assay using N-acetyl-D-glucosamine and by affinity chromatography on N-acetyl-D-glucosamine immobilized in agarose gel. PAGE characterized MuBL and MuHL as basic proteins of molecular masses of 14.0 and 14.4 kDa, respectively. The interaction of lectins with N-acetylglucosamine was detected by inhibition of HA by monosaccharide and lectin adsorptions on N-acetyl-D-glucosamine matrix. MuHL inhibited Gram-negative and Gram-positive bacteria and was more effective than antifungal Cercobin in growth inhibition of phytopathogenic fungi. All *M. urundeuva* preparations promoted larvae mortality. LC₁₆, LC₅₀ and LC₈₄ values of 0.077, 0.125, 0.173 for MuBL and 0.03, 0.04 and 0.05 mg/mL for MuHL were obtained. The detected antimicrobial activity reveals the possible role of the MuHL in the resistance of *M. urundeuva* heartwood against deteriorative biological agents. The *M. urundeuva* lectin is the first bioactive peptide found in heartwood, probably stored as a chemical protection against biodegradation. To our knowledge this is the first report of larvicidal activity of lectins against *A. aegypti*.

Keywords: *Aedes aegypti*; antimicrobial activity; larvicidal activity; heartwood; bark; lectin; *Myracrodruon urundeuva*.

SUMÁRIO

	PÁGINA
1. INTRODUÇÃO	12
1.1 ANATOMIA E RESISTÊNCIA DE MADEIRAS	15
1.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE A FAMÍLIA ANACARDIACEAE E A ESPÉCIE <i>Myracrodruon urundeuva</i> Fr. All. (AROEIRA-DO-SERTÃO)	16
1.2.1 A Família Anacardiaceae	16
1.2.2 A espécie <i>Myracrodruon urundeuva</i> Fr. All.	17
1.3 LECTINAS	20
1.3.1 Fontes de lectinas	20
1.3.2 Detecção e Especificidade	21
1.3.3 Purificação de Lectinas	24
1.3.4 Características estruturais das lectinas	25
1.3.5 Lectinas ligadoras de quitina	25
1.3.6 Propriedades biológicas e potencial biotecnológico de lectinas	26
1.3.6.1 Atividade antimicrobiana	27
1.3.6.1.1 Bactérias	28
1.3.6.1.2 Fungos	29
1.3.6.2. Atividade inseticida	30
1.4 <i>Aedes aegypti</i> E A DENGUE	31
2. OBJETIVOS	34
2.1 Objetivo geral	34
2.2 Objetivos específicos	34
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
4. CAPÍTULO 1: ARTIGO PUBLICADO NO PERIÓDICO: “WOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY” (FATOR DE IMPACTO: 1,490)	47
5. CAPÍTULO 2: ARTIGO PUBLICADO NO PERIÓDICO: “COMPARATIVE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY, PART C” (FATOR DE IMPACTO: 2.530)	59
6. CONCLUSÃO	67
7. ANEXOS	68

1. INTRODUÇÃO

A indiscutível riqueza da flora brasileira, que desde muitos séculos tem despertado o interesse de pesquisadores em todo o mundo, é ressaltada principalmente pelos estudos etnofarmacológicos, abrangendo conhecimentos de origem ameríndia, enriquecidos historicamente pelas presenças africanas e européias a partir do século XVI (SANDES & DI BLASI, 2000).

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

A indústria farmacêutica mundial vem crescendo de forma sustentada alcançando um faturamento anual de 602 bilhões de dólares em 2005, e o Brasil se situa entre os dez maiores consumidores de medicamentos do mundo com aproximadamente US\$ 9 bilhões (IMS HEALTH, 2006). No entanto, cerca de um terço da população mundial não tem acesso regular aos medicamentos devido à falta de recursos para comprar remédios (VELÁZQUEZ, 2000).

Graças à valorização do saber popular e à tentativa de suprir a falta de recursos financeiros para os setores de saúde, o uso de fitoterápicos tem crescido substancialmente. No mundo, produtos naturais e seus derivados representam mais que 50% de todas as drogas de uso clínico (BALANDRIN, 1993) e no Brasil, estima-se que o mercado de fitoterápicos tenha alcançado em 2001 a casa dos US\$ 550 milhões. A revitalização da fitoterapia, acompanhada pelo abandono de seu empirismo inicial, deu lugar a um crescente número de pesquisas e estudos que analisam constituintes químicos ativos e novas tecnologias (ARAÚJO, 2002).

Plantas com valor medicinal, segundo a Organização Mundial de Saúde, são aquelas que possuem, em um ou em vários de seus órgãos, substâncias usadas com finalidade terapêutica ou substâncias que sejam ponto de partida para a síntese de produtos químicos e farmacêuticos. A essas substâncias é dado o nome de princípios ativos. As funções fisiológicas de muitos desses princípios ativos ainda não estão completamente esclarecidas, mas associa-se a sua produção à defesa da própria planta contra agentes externos, como doenças, pragas e radiação solar, entre outros. Assim, essas substâncias possuem funções ecológicas importantes para a sobrevivência da espécie (INGKANINAN et al., 1999) e podem

ser utilizadas, com a devida responsabilidade, em benefício do ser humano em doenças de impacto mundial, como a febre de dengue.

O dengue, arbovirose (virose transmitida por artrópodes) de maior incidência no mundo, tem como vetor o *Aedes aegypti* e vem preocupando as autoridades sanitárias de todo o mundo, em virtude de sua ampla circulação em regiões tropicais e subtropicais (MICIELI & CAMPOS, 2003). No Brasil, já foram registrados nas primeiras 15 semanas de 2009, 226.513 casos de dengue (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2009). Como não há vacinas nem agentes terapêuticos efetivos para prevenir a infecção da dengue ou combater essa doença em pessoas infectadas, o controle do vetor é a única solução disponível e mais comumente escolhida para redução da transmissão desse vírus (CHAPAGAIN et al., 2008), sendo preferível o controle feito por substâncias naturais isentas de toxicidade para o meio ambiente.

A co-evolução existente entre plantas, insetos e outros microorganismos tem sido explorada, então, na busca por fontes naturais de substâncias inseticidas, já que as mesmas são produzidas pelo vegetal em resposta a um ataque. Usualmente os compostos naturais são separados em compostos do metabolismo primário e do metabolismo secundário (MATOS et al., 1995). Os metabólitos primários são amplamente distribuídos nos seres vivos, enquanto os metabólitos secundários são de ocorrência restrita e utilidade não-evidente, embora essenciais para os organismos que os produzem (MANN et al., 1994).

O metabolismo primário leva à produção de substâncias simples, fabricadas pelas plantas com a introdução de nutrientes tirados do solo (nitrogênio, fósforo e sais minerais). Essas substâncias têm a função de promover os processos básicos da planta, como os ácidos carboxílicos do ciclo do ácido cítrico (ciclo de Krebs), os cerca de vinte aminoácidos que constituem a maioria das proteínas, os ácidos graxos e os açúcares comuns e seus derivados. São substâncias que existem em todas as plantas e constituem a matéria-prima de reações posteriores, catalisadas por enzimas e controladas geneticamente. São essas reações que levam à produção dos compostos do metabolismo secundário das plantas (flavonóides, alcalóides, terpenos, entre outros) (LEONICER & MITSCHLER, 1977).

Os metabólitos secundários são conhecidos por suas ações repelentes ou atraentes nas interações intra-espécies e interespecies, na proteção contra estresse biótico e abiótico e na manutenção da integridade estrutural. Essa vasta gama de compostos orgânicos naturais biologicamente ativos pode apresentar também ação farmacológica, agindo como tranqüilizante, analgésico, antiviral, fungicida e inseticida, cujas diversas aplicações

estendem-se tanto à terapêutica médica quanto à indústria de cosméticos e de alimentos (PLETSCH, 1997).

Entre os diversos exemplos de substâncias de uso terapêutico, oriundas do metabolismo secundário de plantas, podemos citar a artemisina (DHINGRA et al., 1999), presente em artemísia, *Artemisia annua*, que possui atividade antimalárica; a morfina (KALSO, 2007), obtida do látex da papoula, *Papaver somniferum*, que ainda é o analgésico mais potente para uso clínico, e o diterpeno taxol (CHENG et al., 2008), isolado de *Taxus brevifolia*, teixo-do-pacífico, usado para o tratamento de câncer dos ovários e pulmões.

Além dos metabólitos secundários, alguns componentes do metabolismo primário das plantas têm sido relacionados a mecanismos de defesa. As lectinas de plantas, por exemplo, são proteínas que podem assumir diferentes papéis biológicos. Todavia, não existe uma função universal para todas elas. De maneira abrangente, as lectinas podem assumir papéis exógenos como, por exemplo, atividade antifúngica contra fitopatógenos (XU et al., 1998) ou inseticida (Sá et al., 2008; Silva et al., 2009) ou podem assumir papéis endógenos se interagirem com ligantes do próprio organismo para, por exemplo, auxiliar a deposição de proteínas de reservas nos corpos protéicos (LIMPENS & BISSELING, 2003). Felizmente, as questões concernentes às funções biológicas que as lectinas desempenham nos organismos em que são produzidas têm ganhado atenção crescente, diminuindo o contraste que predominava no passado entre função e aplicação de lectinas (PEUMANS & VAN DAMME, 1995).

O Laboratório de Glicoproteínas do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco tem como propósitos, desde 1983, a obtenção de um painel de lectinas puras e a investigação do potencial biotecnológico das proteínas obtidas. De acordo com alguns estudos, o cerne, tecido central do tronco de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All (aroeira-do-sertão), apresenta alta resistência a fitopatógenos (MORAIS et al., 1999; MAINIERI & CHIMELO, 1989) e a entrecasca apresenta diversas aplicações na medicina popular envolvendo, principalmente, atividade antiinflamatória e cicatrizante. As propriedades do cerne e da entrecasca de *M. urundeuva* estimula a investigação das atividades biológicas das lectinas destes dois tecidos sobre microorganismos e insetos.

O estudo das atividades antimicrobiana e larvicida contra *Aedes aegypti*, visa determinar o potencial das lectinas como agentes antimicrobiano e inseticida para controle de pragas.

1.1. ANATOMIA E RESISTÊNCIA DE MADEIRAS

A madeira é um material que possui propriedades energéticas, medicinais, químicas e alimentícias (LEPAGE et al., 1986), apresentando uma vasta gama de utilização nos meios rural e urbano. Entretanto, em virtude da sua estrutura e constituição química, boa parte das madeiras é passível de sofrer ataque de vários microorganismos que utilizam os polímeros naturais da parede celular como fonte de nutrição, entre os quais os fungos são responsáveis pelos maiores danos (CAVALCANTE, 1982).

A durabilidade natural da madeira é interpretada pela capacidade que a mesma possui de resistir à ação dos agentes deteriorantes, tanto biológicos quanto físico-químicos. A madeira, portanto, pode apresentar alta, média ou baixa resistência à ação desses agentes (CARBALLEIRA LOPES & MILANO, 1986).

O conhecimento da resistência natural da madeira é de suma importância na recomendação de sua utilização, para que sejam evitados gastos desnecessários com a reposição de peças deterioradas e seja reduzido o impacto sobre as florestas remanescentes (PAES et al., 2007).

Observando-se um corte transversal de um tronco, podem-se notar, na maioria das madeiras, dois tecidos bem distintos em termos de cor (Figura 1): a parte central, mais escura, é denominada cerne, enquanto a parte mais clara é denominada alborno e envolvendo-os, temos a casca interna (entrecasca) e externa.

O cerne é considerado um tecido morto, sem atividade vegetativa. A transformação do alborno em cerne é iniciada internamente, e não por condições externas. A morte da maioria das células após o espessamento celular é marcada pelo desaparecimento do núcleo e do protoplasma, pela mudança química do citoplasma, redução em amido, açúcares e materiais nitrogenados. Entretanto, algumas células retêm seu protoplasto, como as células do parênquima, que ocorrem como células longitudinais e radiais (RAVEN et al., 2004).

Em uma árvore, o alborno é responsável por processos metabólicos como a respiração e digestão (SILVA, 2002), além de fornecer suporte ao tronco, conduzir a seiva bruta até as folhas e armazenar alimentos. O cerne, por outro lado, não armazena alimento nem faz condução de seiva, funcionando, segundo Hunt & Garratt (1967), somente como suporte. Já a casca funciona como primeiro impedimento à entrada de agentes deteriorantes.

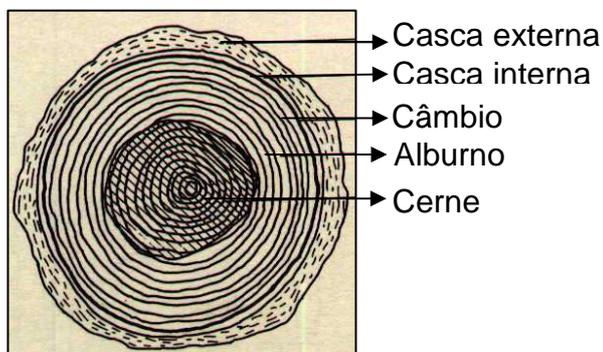


Figura 1. Anatomia da Madeira. Fonte: Silva, 2002

Apesar de não ser formado por tecido vivo, o cerne de algumas árvores apresenta elevada resistência a agentes biodegradantes. A resistência à deterioração de algumas madeiras tem sido atribuída a substâncias presentes no lenho (tecido por onde circula água e sais minerais dissolvidos), denominadas extrativos (CHANG et al., 1999).

De modo geral, há grande diferença na resistência natural entre as madeiras do cerne interno e externo, como observado por Paes & Vital (2000) para as madeiras de *Eucalyptus saligna* e *E. urophylla*. Em quase todas as espécies em que tais diferenças ocorrem, a porção interna do cerne, formada pela planta jovem, é menos resistente à decomposição que a externa. Todavia, nem todas as espécies apresentam esse padrão; entre as mais duráveis, a madeira próxima à medula é tão resistente quanto àquela da região externa do cerne. Por outro lado, a madeira de albarno é reconhecidamente susceptível à deterioração biológica (FINDLAY, 1985).

1.2. CONSIDERAÇÕES SOBRE A FAMÍLIA ANACARDIACEAE E A ESPÉCIE *Myracrodruon urundeuva* Fr. Ail. (AROEIRA-DO-SERTÃO)

1.2.1. A Família Anacardiaceae

Anacardiaceae é uma família botânica representada por 70 gêneros e cerca de 600 espécies, conhecidas por suas espécies frutíferas, entre elas a mangueira (*Mangifera indica*), originária da Ásia, e o cajueiro (*Anacardium occidentale*), nativo do Brasil. A família

distingue-se de outras pela combinação de um disco intra-estaminal, com a presença de fruto drupáceo e vasos resiníferos que, quando expostos por injúrias, têm um cheiro característico (RAVEN et al., 2004).

Há dois centros vegetativos desta família: um na Malásia e outro na América Andina, estendendo-se da zona tropical até ambas as zonas temperadas. No Brasil conhecem-se aproximadamente 40 espécies. A família possui componentes de hábito arbóreo ou arbustivo, e menos freqüentemente há rasteiras, pequenos arbustos e lianas. (SMITH et al., 2004). As folhas desta família são alternantes, em sua maioria, simples ou imparipenadas, às vezes ternadas, sempre sem estípulas. Suas flores são diclamídeas e podem ser terminais ou axilares, com inflorescência racemosa, em sua maioria. Sua madeira é de boa qualidade e muitas substâncias são extraídas para uso na indústria e na medicina. Os canais resiníferos são ricos em taninos (CRONQUIST, 1981).

Nos cerrados, a família Anacardiaceae está representada principalmente pelos gêneros *Anacardium*, *Lithraea*, *Schinus* e *Tapirira*. Na América Tropical, o gênero *Tapirira* é representado por *Tapirira guianensis*, que produz um óleo aromático. Uma característica peculiar da família Anacardiaceae é a presença de canais secretores nos órgãos vegetativos e reprodutivos. O material secretado tem reconhecido valor biológico, econômico e medicinal, justificando a proposta de investigações que caracterizem a morfologia das estruturas secretoras e a composição química do exsudato (BARROSO, 1991).

O gênero *Anacardium* apresenta um pequeno número de espécies, todas originárias da América Central e do Sul à exceção de *Anacardium endocardium*, provavelmente procedente da Malásia. A espécie mais importante é a *Anacardium occidentale*, o cajueiro comum, por ser a única cultivada em escala comercial e que apresenta o maior grau de dispersão em todo o mundo (CRONQUIST, 1981).

1.2.2. A espécie *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. (aroeira-do-sertão)

Em meio ao crescente número de trabalhos envolvendo as plantas medicinais, a aroeira se destaca pelo uso popular, que no Brasil remonta ao período colonial, tendo sido citada por Guilherme Piso no século XVII que, em sua vinda ao Recife, a convite do Príncipe Maurício de Nassau, a comparou ao lentisco (*Pistacia lentiscus*), observando seu uso na conservação de carnes frescas, provavelmente devido a uma atividade antimicrobiana (PISO, 1957).

No Brasil, essa planta é conhecida como *aroeira*, *aroeira-do-sertão*, *aroeira-preta*, *aroeira-do-campo*, *aroeira-verdadeira* ou *urundeúva*, entre outras denominações. O nome *aroeira* é uma corruptela do nome “arara” e da terminação “eira”, significando “árvore da arara”, por ser uma árvore onde essa ave normalmente habita. O nome *urundeuva* vem de um conceito guarani para “incorrupível na água”, uma referência à grande resistência que a madeira dessa planta possui (LORENZI, 2000).

O termo *aroeira* tem sido usado para designar plantas classificadas em três gêneros da família Anacardiaceae: *Lithraea*, *Schinus* e *Myracrodruon*. A *aroeira-do-sertão*, ou *aroeira-preta*, é a *Myracrodruon urundeuva* Fr. All., nome dado por Francisco Allemão e Cysneiros em 1862. Alguns sinônimos também podem ser encontrados, tais como *Astronium juglandifolium* Griseb. e *Astronium urundeuva* Engl (GARRIDO & POGGIANI, 1979).

Considerada madeira de lei, a *aroeira* é muito densa (densidade = 1,00 a 1,21 g/cm³), dura, elástica e resistente a fungos fitopatógenos. Recebe excelente polimento e, quando seca, é de difícil trabalhabilidade. A madeira é muito pesada, tem textura média e uniforme, grã irregular, possuindo o alburno bem diferenciado do cerne e facilmente decomposto (MORAIS et al., 1999). Estudos realizados pelo Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT) indicam que um pedaço de *aroeira-preta* do tamanho de uma caixa de fósforos suporta 6 toneladas de carga, sem se deformar. A madeira da *aroeira* suporta cerca de três vezes mais peso do que o concreto, sendo excelente para obras externas (postes, moirões, esteios, estacas, vigas, armações de pontes e moendas de engenho) e para a construção civil (caibros, vigas, tacos, assoalhos, ripas e peças torneadas) (MAINIERI & CHIMELO, 1989).

A característica de durabilidade é encontrada em apenas 1 a 5 % das madeiras e apenas menos de 1 % delas são muito duráveis. De acordo com testes realizados pelo IPT, a *aroeira-preta* foi classificada como muito durável e está incluída no grupo das madeiras chamadas imputrescíveis. Além das propriedades mecânicas dessas madeiras, que formam uma barreira física de proteção, existe também uma barreira química formada pelos extrativos e outras substâncias, que possuem efeito fungicida. Essas substâncias se formam principalmente no processo de transformação do alburno em cerne (*ibid.*).

A *aroeira* tem tronco de 50 a 80 cm de diâmetro, cerca de 6 a 14 m de altura no Cerrado e na Caatinga, e até 20 a 25 m em solos mais férteis da floresta latifoliada semidecídua. Apesar de ser considerada típica de regiões da Caatinga e do Cerrado, formando agrupamentos densos, é também encontrada em formações muito úmidas e fechadas, incluindo florestas pluviais. Ocorre desde o México a Argentina (BARKLAY, 1968; GARRIDO & POGGIANI, 1979); no Brasil, essa espécie possui ampla distribuição do

Maranhão até o Paraná e Mato Grosso do Sul, sendo mais freqüente nos estados da Bahia, Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso e Goiás. É uma planta característica de terrenos secos e rochosos, ocorrendo em grupamentos densos (LORENZI, 2000).

A flor de *M. urundeuva* é do tipo inflorescência em racemo e de cor vermelha. As folhas são compostas, imparipinadas, ovaladas com 10 a 30 cm de comprimento (Figura 2). O fruto é do tipo drupa e de estrutura carnosa e as sementes são pequenas medindo cerca de 0,2cm (FAO, 1986; LEITE, 2002).



Figura 2. *Myracrodruon urundeuva*: Parte aérea (A), inflorescência (B), folhas (C), frutos (D) e madeira (E). Fonte: VIANA, 1995.

Além de ser explorada como madeira, a casca da aroeira também é empregada na farmacologia popular, como planta medicinal, sendo recomendada para o tratamento de inflamação de garganta, gastrite e prisão de ventre. Sua resina amarelo-clara, proveniente das

lesões da casca, possui aplicação em larga escala como tônico entre os sertanejos (BRAGA, 1976).

Por causa de suas qualidades, a aroeira sofreu superexploração, tornando-se escassa em todas as áreas de ocorrência, fato que a colocou na categoria “vulnerável”, ou seja, em perigo de extinção, conforme a Lista Oficial de Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção (IBAMA, 1992).

1.3. LECTINAS

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

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

A rota biossintética de muitas lectinas de plantas segue a seguinte via secretora: as lectinas são sintetizadas pelos ribossomos, entram no retículo endoplasmático, são transportadas para o complexo de Golgi, de onde vão para os vacúolos, ficando aí armazenadas (*ibid.*).

1.3.1. Fontes de lectinas

Lectinas estão largamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em seres unicelulares (IMBERT et al., 2004), animais (MOURA et al., 2006) e vegetais (LEITE et al., 2005). Em vegetais, as lectinas são frequentemente isoladas de sementes (LATHA et al.,

2006) e, em menores proporções, de outros tecidos vegetais, tais como folhas (COELHO & SILVA, 2000), cascas (INA et al., 2005), raízes (WANG & NG, 2006) e flores (SUSEELAN et al., 2002). As lectinas de plantas que são produzidas em órgãos de estocagem (sementes, na maioria, mas também tubérculos, bulbos e raízes, dependendo da planta) dominam o cenário da lectinologia por serem encontradas em quantidades preparativas.

As lectinas mais estudadas são da família Leguminosae. Entretanto, muitas lectinas de outras famílias também têm sido frequentemente isoladas e caracterizadas como, por exemplo, lectinas de Solanaceae (PEUMANS et al., 2003), Cucurbitaceae (PLA et al., 2004), Amaranthaceae (PORRAS et al., 2005), Cactaceae (ZENTENO et al., 1995), Euphorbiaceae (WITTSUWANNAKUL et al., 1998), Labiateae (FERNÁNDEZ-ALONSO et al., 2003), Moraceae (MOREIRA et al., 1998) e Urticaceae (KAVALALI, 2003), entre diversas outras.

Dentro de Anacardiaceae, Viana (2002) isolou a lectina de entrecasca da aroeira-da-praia, *Schinus terebinthifolius*, que, dentre outras atividades biológicas, foi capaz de induzir a liberação de peróxido de hidrogênio por macrófagos. Maciel (2000) purificou a lectina da entrecasca do cajueiro-roxo, *Anacardium occidentale*, e Oliveira et al. (2000) detectaram a presença de lectinas em *Spondias tuberosa*, o umbuzeiro. Em *Mangífera indica* (mangueira) é encontrada uma aglutinina com atividades semelhantes a das lectinas, capaz de aglutinar células de bactérias (WAUTERS et al., 1995).

1.3.2. Detecção e Especificidade

As lectinas são, em sua maioria, di ou polivalentes e são capazes de formar pontes entre carboidratos ou glicoproteínas, que se apresentam em solução ou ligadas à membrana celular (CORREIA et al., 2008) (Figura 3).

A presença de lectinas em uma amostra pode ser facilmente detectada a partir de ensaios de aglutinação, nos quais elas interagem com carboidratos da superfície celular através de seus sítios, formando diversas ligações reversíveis entre células opostas (Figura 4). As lectinas podem aglutinar diversos tipos de células. O ensaio mais comumente utilizado é o de hemaglutinação, o qual é realizado através de uma diluição seriada da amostra contendo lectina e de posterior incubação com eritrócitos; a rede formada entre os eritrócitos constitui o fenômeno de hemaglutinação. O inverso da maior diluição em que se observa a hemaglutinação (título) corresponde à atividade hemaglutinante (AH) (SANTOS et al., 2005).

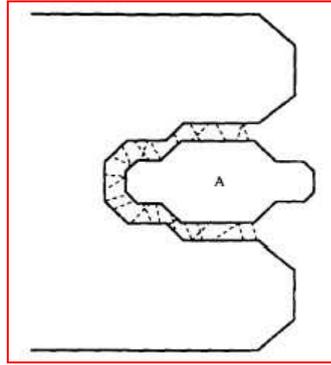


Figura 3. Representação esquemática da ligação da lectina a um carboidrato (A). As linhas pontilhadas representam pontes de hidrogênio. Fonte: Kennedy et al. (1995)

Para assegurar que o agente aglutinante é uma lectina, são necessários ensaios subsequentes de inibição da AH, utilizando-se uma solução do carboidrato ligante (WU, J. H. et al., 2006). Os eritrócitos utilizados podem ser de humanos ou de animais, os quais podem ser tratados enzimaticamente (com tripsina, papaína, entre outras) ou quimicamente (com glutaraldeído ou formaldeído), aumentando ou não a sensibilidade das células à lectina (SANTOS et al., 2005; COELHO & SILVA, 2000).

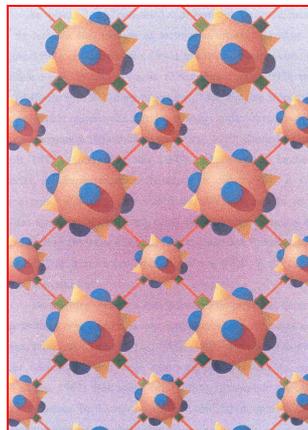


Figura 4. Representação esquemática de aglutinação por lectinas, baseada em Kennedy et al.(1995). Lectina , e seus ligantes de superfície da célula , carboidratos ou não-carboidratos, ligantes ou não.

A grande maioria de lectinas de plantas apresenta especificidade por carboidratos simples (monossacarídeos) ou complexos (oligossacarídeos e glicanas), os quais podem ser de

origem vegetal ou não, como N-acetilglicosamina e ácidos N-glucurônico, galacturônico, xilurônico, L-idurônico, siálico e N-acetilmurâmico (VAN DAMME et al., 1998).

De acordo com Sharon & Lis (1990), algumas lectinas apresentam interações mais fortes com oligossacarídeos em comparação com monossacarídeos, outras são quase exclusivas para oligossacarídeos. Dessa forma, as lectinas podem ser classificadas com especificidade para monossacarídeo ou para oligossacarídeo (Tabela 1) (PEUMANS & VAN DAMME, 1998).

As lectinas podem apresentar especificidade para eritrócitos, como a lectina de jujube, *Zizyphus mauritiana* (GUPTA & SRIVASTAVA, 1998), que só aglutina eritrócitos humanos, ou as lectinas do caranguejo *Charybdis japonica* (UMETSU et al., 1991) e do cogumelo *Marasmius oreades* (WINTER et al., 2002), específicas para eritrócitos do tipo B. Outras lectinas, no entanto, são caracterizadas como não específicas para grupos sanguíneos (SITOHY et al., 2007).

Tabela 1. Famílias de Lectinas de plantas: ocorrência e especificidade

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

Gal: galactose; GalNAc: N-acetilgalactosamina; GlcNAc: N-acetilglicosamina. Fonte: Peumans & Van Damme, 1998)

1.3.3. Purificação de Lectinas

Métodos comuns utilizados na purificação de proteínas são aplicados para purificar as lectinas. Extratos podem ser feitos a partir de uma solução salina, como no caso do isolamento da lectina das sementes de corticeira, *Erythrina speciosa*, (KONOZY et al., 2003) ou usando tampões, como na obtenção das lectinas de cotilédones de pau-serrote, *Luetzelburgia auriculata*, (OLIVEIRA et al., 2002), dos tubérculos de tupinambo, *Helianthus tuberosus*, (SUSEELAN et al., 2002), e da entrecasca da seringueira, *Hevea brasiliensis*, (WITITSUWANNAKUL et al., 1998), sabugueiro, *Sambucus racemosa*, (ROJO et al., 2003), e amoreira, *Morus nigra* (ROUGÉ et al., 2003).

Para a preparação do extrato, o material é submetido à extração sob período de tempo e condições de temperatura estabelecidas, sob agitação constante. A partir do extrato bruto, as proteínas podem ser isoladas por alguns métodos, tais como o fracionamento de proteínas com sais. O sulfato de amônio, altamente hidrofílico, remove a camada de solvatação das proteínas fazendo com que as mesmas se precipitem (DELATORRE et al., 2006).

As lectinas parcialmente purificadas pelo tratamento salino são geralmente submetidas ao processo de diálise em membranas semipermeáveis, método baseado na separação de moléculas por diferenças de peso molecular; as proteínas ficam retidas dentro da membrana enquanto moléculas menores (como carboidratos ou sais), presentes na amostra, passam para a solução solvente (THAKUR et al., 2007).

As lectinas podem ser purificadas à homogeneidade através de cromatografia de afinidade (SUN et al., 2007), cromatografia de troca iônica (SANTI-GADELHA et al., 2006) ou cromatografia de gel filtração (MOURA et al., 2006). O que varia, principalmente, são as matrizes que são utilizadas nessas cromatografias, cuja escolha depende da especificidade a carboidratos (cromatografia de afinidade), carga líquida (cromatografia de troca iônica) e tamanho molecular da proteína (cromatografia de gel filtração).

A cromatografia de afinidade, técnica mais amplamente utilizada, tem como princípio de separação a habilidade das lectinas se ligarem especificamente a suportes polissacarídicos, através de ligações não-covalentes. A proteína desejada é obtida com alto grau de pureza, alterando-se as condições de pH, força iônica ou pela eluição com uma solução contendo um competidor (PEUMANS & VAN DAMME, 1998).

O isolamento de lectinas é estimulado pela sua potencial utilização em diversas áreas da medicina clínica, bem como em pesquisa química e biológica (DURHAM & REGNIER, 2006; BIES et al., 2004).

1.3.4. Características estruturais das lectinas

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 et al, 1998). As lectinas exibem uma elevada homologia em seus resíduos de aminoácidos, incluindo aqueles envolvidos na ligação a carboidratos e a maioria dos que coordenam os íons metálicos, necessários à integridade das subunidades e ao correto posicionamento dos resíduos para a ligação (SPILATRO et al., 1996).

Com base na estrutura geral das proteínas, as lectinas de plantas têm sido subdivididas em merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas (PEUMANS & VAN DAMME et al., 1998). Merolectinas são aquelas que possuem apenas um domínio para ligação a carboidratos. São monovalentes e por isso não podem precipitar glicoconjugados ou aglutinar células. Hololectinas também possuem domínio específico para ligação a carboidratos, mas contêm, pelo menos, dois domínios idênticos ou mais domínios homólogos ligantes a açúcares; sendo di ou multivalentes, aglutinam células e/ou precipitam glicoconjugados. A maioria das lectinas de plantas pertence a esse grupo.

Quimerolectinas são proteínas com um ou mais domínios de ligação a carboidratos e um domínio não-relacionado. Esse domínio diferente pode ter uma atividade enzimática bem definida ou outra atividade biológica, mas age independentemente dos outros domínios de ligação a carboidratos. Superlectinas consistem exclusivamente de pelo menos dois domínios de ligação a açúcares diferentes. Esse pode ser considerado um grupo especial de quimerolectinas, consistindo de dois domínios estruturalmente e funcionalmente diferentes de ligação a carboidratos (VAN DAMME et al., 1996).

1.3.5. Lectinas ligadoras de quitina

Lectinas ligadoras de quitina têm sido isoladas de diversas fontes, incluindo bactérias, insetos, plantas e mamíferos. Muitas delas apresentam atividade antifúngica, uma vez que a

quitina é o componente-chave da parede celular de fungos (TRINDADE et al., 2006; SITOHY et al., 2007).

Lectinas de plantas, em particular, têm sido estudadas sob vários aspectos, incluindo seu potencial antifúngico, devido à sua atuação em proteger as plantas, podendo ser exploradas através da introdução de material genético que codifique a expressão deste tipo de lectina atóxica ao homem (VAN DAMME et al., 1996; FIELDS & KORUNIC, 2000).

As lectinas ligantes de quitina também têm sido estudadas do ponto de vista estrutural. As mais estudadas são aquelas pertencentes à família das heveínas, assim chamadas por possuírem em comum o domínio heveínico como motivo estrutural de reconhecimento da quitina. A heveína é uma lectina constituída por 43 aminoácidos (cerca de 4,5 kDa), encontrada na seringueira (*Hevea brasiliensis*). É especialmente rica em resíduos de glicina e cisteína e sua estrutura é mantida por 4 pontes dissulfeto, o que lhe confere uma estabilidade notável, característica que se estende às demais lectinas da família das heveínas. Mesmo depois de aquecida a 90 °C por 10 minutos, a heveína ainda inibe o crescimento de fungos (NEUMANN et al., 2004).

1.3.6. Propriedades biológicas e potencial biotecnológico de lectinas

As lectinas, por terem a habilidade de se ligar a mono e oligossacarídeos, apresentam uma variedade de efeitos biológicos, alguns dos quais servindo como base para a aplicação de lectinas na investigação de atividades químicas e biológicas, tais como ação contra insetos (COELHO et al., 2007), fungos (SITOHY et al., 2007), bactérias (SANTI-GADELHA et al., 2006) e inibição do crescimento de células tumorais (PETROSSIAN et al., 2007).

A observação de que a lectina com atividade antifúngica isolada de *Phaseolus vulgaris* exerceu forte ação inibitória sobre a protease HIV-1 (NG et al., 2002) é mais um exemplo do potencial aplicativo dessas proteínas.

Lectinas têm sido utilizadas na detecção e separação de glicoconjugados (PAIVA et al., 2003); na determinação de tipos sanguíneos (KHANG et al., 1990) e diagnóstico de processos de desenvolvimento, diferenciação e transformação neoplásica (LI et al., 2007, *in press*) e no tratamento de condições pré-cancerosas (WROBLEWSKI et al., 2001).

A lectina de *Cratylia mollis* (feijão camaratu) foi capaz de isolar a enzima lecitina colesterol aciltransferase, importante no metabolismo do colesterol (LIMA et al., 1997); o complexo pôde ser, então, utilizado para o estudo de glicoproteínas de soro humano.

Algumas lectinas de planta apresentam ação inseticida, o que possibilita o uso destas proteínas como bioinseticida, atuando sobre larvas de insetos que causam danos à produção agrícola (MACEDO et al., 2007).

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 em sistemas de liberação de drogas. Lectina de folhas de *Bauhinia monandra* (pata-de-vaca) e a lectina de *Lens culinaris* (lentilha) foram incorporadas e também adsorvidas na superfície de nanopartículas, mostrando ser ferramentas potenciais em medicamentos de administração oral, com liberação controlada (RODRIGUES et al., 2003).

Algumas lectinas são capazes de atuar sobre linfócitos, fazendo com que tais células passem de um estado quiescente para um estado de crescimento e proliferação. A lectina da babosa *Aloe arborescens* (KOIKE et al, 1995) e a lectina de semente de *Cratylia mollis* (MACIEL et al., 2004) são alguns exemplos de lectinas com atividade mitogênica que podem ser utilizadas em ensaios *in vitro*.

1.3.6.1. Atividade antimicrobiana

Muitas substâncias, inclusive proteínas, estão sendo avaliadas quanto ao seu efeito antimicrobiano. As proteínas antimicrobianas, em animais, constituem parte do sistema imune inato. Em plantas, elas também estão envolvidas no mecanismo de defesa (YE & NG, 2001). Proteínas isoladas de tecidos vegetais mostraram forte atividade antibacteriana (ORDÓÑEZ et al. 2006) e antifúngica (WANG & NG 2003; WANG & BUNKERS, 2000).

A habilidade que lectinas de plantas têm em reagir com carboidratos expostos na superfície celular de micróbios tornou possível o emprego dessas biomoléculas como sondas diagnósticas para identificação de bactérias patogênicas, que estão baseadas na reação de aglutinação seletiva entre lectina e bactéria (DOYLE & SLIFKIN, 1994).

Ratanapo et al. (2001) mostraram a interação de duas lectinas com especificidade para ácido N-glicosilneuramínico contra bactérias fitopatogênicas, propondo uma possível função na defesa de plantas.

Lectinas parcialmente purificadas a partir de sete plantas medicinais do Sul da África foram avaliadas quanto ao efeito antibacteriano frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* através de método de aglutinação, apresentando efeito inibitório no crescimento das mesmas (GAIDAMASHVILI & VAN STANDEN, 2002).

Athamna et al. (2006) analisaram os diferentes padrões de aglutinação de bactérias promovidas por 23 lectinas e mostraram que a interação lectina-bactéria é uma boa ferramenta para identificar rapidamente espécies de *Mycobacterium*. Além disso, a atividade antimicrobiana de lectinas (RATANAPO et al., 2001) estimula a avaliação delas como novos antibióticos.

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

Atividade antifúngica foi observada em uma lectina isolada de sementes de *Castanea mollissima* (castanha-da-China) frente aos fungos *B. cinerea*, *M. arachidicola* e *Physalospora piricola* (WANG & NG, 2003), bem como na lectina de sementes de *Talisia esculenta* (pitombeira), a qual inibiu o crescimento dos fungos *F. oxysporum*, *Colletotrichum lindemuthianum* e *Saccharomyces cerevisiae* através da interação da lectina com as estruturas dos fungos (FREIRE et al., 2002). Xu et al. (1998) purificaram e caracterizaram uma lectina da *Gastrodia elata*, que inibiu o crescimento de hifas dos fungos fitopatógenos *Valsa ambiens*, *Rhizoctonia solani*, *Gibberella zaeae*, *Ganoderma lucidum* e *B. cinerea*.

Lectinas também têm sido usadas com grande sucesso como indicadores de fungos, uma vez que esses compostos são altamente específicos aos carboidratos presentes na parede celular dos mesmos (ZABEL & MORRELL, 1992). O conhecimento do perfil sacarídico na superfície fúngica habilita o uso de lectinas como promissoras sondas celulares, que podem servir como carreadores de agentes antifúngicos que utilizam, como alvos específicos, os carboidratos existentes na superfície da célula do microorganismo (LEAL et al., 2007).

1.3.6.1.1 Bactérias

As bactérias são organismos unicelulares, procariontes e pertencentes ao reino Monera. Sua classificação é feita de acordo com a constituição da parede celular em dois grupos: Gram-positivas (+) e Gram-negativas (-). As bactérias Gram-positivas apresentam em sua parede celular polissacarídeos, ácidos teicóicos e peptidoglicanos, enquanto as Gram-negativas apresentam na sua parede celular peptidoglicanos, lipídeos, proteínas e lipopolissacarídeos (TRABULSI, 2000).

Dentre as bactérias Gram (+), destaca-se *Staphylococcus aureus*, de forma esférica, geralmente com distribuição em cachos irregulares semelhantes a cachos de uvas. É um patógeno responsável por muitas infecções graves nos seres humanos. Pode provocar endocardite, osteomielite hematogênica aguda, meningite ou infecção pulmonar, entre outras. Outras bactérias Gram (+) são as do gênero *Streptococcus*, de forma esférica, tipicamente formando pares ou cadeias durante o seu crescimento. Apresentam-se amplamente distribuídas na natureza. Podem estar presentes na flora humana normal, como também estar associadas a importantes doenças humanas, que podem ser atribuídas, em parte, à infecção por *Streptococcus* (TRABULSI, 2000; CANTÓN et al., 2007).

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

Jacobs et al. (1985) descreveram um grande número de bactérias vivendo endofiticamente como *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *Corynebacterium sp.* e *Erwinia herbicola*. O possível papel dessas bactérias endofíticas no desenvolvimento de processos patogênicos em plantas tem sido relatado, sugerindo-se que essas bactérias também podem se tornar patógenos oportunistas (COTHER & DOWLING, 1986).

1.3.6.2. Fungos

Os fungos são organismos não-fotossintéticos que crescem como uma massa de filamentos (hifas) entrelaçados e ramificados, conhecida como micélio. Os fungos, em sua maioria, têm sua parede celular constituída por celulose ou quitina (JAWETZ et al., 1991). Esses microrganismos são ubíquos, encontrados no solo, água, vegetais, homem e detritos em geral (TRABULSI, 2000). Interagem com a natureza das mais variadas maneiras, podendo agir tanto de forma benéfica como deletéria.

Os fungos fitopatogênicos são os causadores de uma série de doenças nas mais variadas espécies do reino vegetal. A maioria destes fungos ocorre nas regiões tropicais e são responsáveis por cerca de 90% de todas as doenças conhecidas (MIRANDA, 2000), destruindo plantações de várias culturas de interesse econômico, causando substanciais prejuízos para o setor agrícola. O gênero *Fusarium* pertence à subdivisão Deuteromycotina, Classe Hyphomycetes, ordem Moniliales, família Tuberculariaceae (AINSWORTH & BISBY, 1973). Caracteriza-se por apresentar micélio extensivo e cotonoso, frequentemente produzindo coloração rósea, púrpura ou amarela no meio de cultura. Apresentam microconídios abundantes, geralmente unicelulares, ovóides, formados em conidióforos simples ou ramificados; e macroconídios também abundantes, falcados e multiseptados. Produzem estruturas reprodutivas como clamidósporos e esclerócios (MIRANDA, 2000).

Alguns fungos fitopatogênicos, principalmente do gênero *Fusarium*, apresentam importantes implicações na saúde das plantas e uma variedade de vertebrados, incluindo o homem (ZHANG et al., 2006), e é um importante patógeno na aquicultura de camarões (SOUHEIL et al., 1999). O micélio desses fungos invade o tecido vascular da planta, junto com os conídios, bloqueando os vasos do xilema, obstruindo a passagem de água, resultando na murcha das plantas, mudança na coloração da folhagem, colapso e morte da planta. *Fusarium* também produz toxinas que contribuem para a murcha das plantas, afetando a permeabilidade das membranas celulares, interrompendo o metabolismo celular. Variedades de *F. oxysporum* são fungos particularmente importantes por atacarem colheitas de tomate, banana, batata doce e pêra (ALEXOPOULOS et al., 1996).

F. solani pode ser encontrado no solo e em ampla variedade de plantas e animais. Como fungo fitopatogênico, algumas variedades ocasionam podridão de raiz e caule, causando a morte da planta infectada (SAMSON *apud* MIRANDA, 2000). O fungo *F. moniliforme* é o principal patógeno associado à deterioração de sementes, morte de plântulas, podridão radicular, do colmo e da espiga de milho no Brasil (SARTORI et al., 2007).

F. decemcellulare é citado na literatura como sendo um dos principais causadores de doenças da parte aérea. Em plantas de cacau (*Theobroma cacao* Linn.), é causador da galha-de-pontos-verdes. A doença se caracteriza por intumescimento anormal das almofadas florais e excessiva produção de botões florais, resultando na não-formação de frutos (DALLA PRIA & CAMARGO, 1997). Em plantas de erva-mate (*Ilex paraguariensis*), causa superbrotamento, excessiva brotação ao longo dos ramos em pontos próximos. Ocorre também uma tumoração ao longo dos ramos, caracterizado por crescimento desuniforme e

exagerado de tecidos. As flores e frutos jovens geralmente caem prematuramente e os talos ficam totalmente secos (POLETTO et al., 2006).

1.3.6.2 Atividade inseticida

Várias lectinas de plantas tem mostrado efeitos entomotóxicos a insetos das ordens Coleoptera, Homoptera e Lepidoptera quando esses se alimentam (CARLINI & GROSSI-DE-SÁ, 2002; VASCONCELOS & OLIVEIRA, 2004). Entre elas, a lectina isolada de leguminosa, *Canavalia ensiformis*, mostrou ser altamente tóxica para o coleóptero *Callosobruchus maculatus* (CARLINI & UDEDIBIE, 1997) e uma lectina com especificidade à manose (TEL) purificada de sementes de *Talisia esculenta*, também foi tóxicas para esse coleóptero quando aplicada em dieta artificial. TEL, também apresentou toxicidade para larvas de *Zabrotes subfasciatus* (MACEDO et al., 2002).

O mecanismo de ação das lectinas inseticidas é ainda desconhecido, mas tem sido demonstrado que algumas lectinas ligam-se às vilosidades do epitélio intestinal dos insetos, promovendo uma disfunção das células epiteliais, responsáveis pela assimilação de nutrientes para as células e absorção de substâncias potencialmente perigosas. No caso das lectinas ligadoras de quitina, pode ocorrer a ligação à membrana peritrófica da região intestinal, prevenindo ou aumentando os movimentos entre o espaço endoperitrófico e exoperitrófico (CHRISPEELS & RAIKHEL, 1991; PEUMANS & VAN DAMME, 1995; ZHU-SALZMAN & SALZMAN, 2001; MACEDO et al., 2003; TRIGUEIROS et al., 2003).

Outra possibilidade do efeito tóxico inclui a ligação das lectinas as enzimas digestivas glicosiladas presentes no intestino dos insetos. Potente atividade inseticida foi demonstrada pelas lectinas ligadoras de quitina WGA (do trigo, *Triticum aestivum*), PHA (do feijão comum, *Phaseolus vulgaris*) e BmoLL (da pata-de-vaca, *Bauhinia monandra*) (MURDOCK et al., 1990; CARLINI E GROSSI-DE-SÁ, 2002; MACEDO et al., 2002; MACEDO et al., 2007). A BmoLL, mostrou ação inseticida para larvas de *C. maculatus*, *Zabrotes subfasciatus* e *Anagasta kuehniella* (MACEDO et al., 2007).

Não existem relatos de lectinas com ação larvicida sobre *Aedes aegypti*, porém uma lectina isolada do fungo *Xerocomus chrysenteron*, denominada XCL, apresentou propriedade inseticida, sendo tóxica para o díptero *Drosophila melanogaster* e para o hemíptero *Acyrtosiphon pisum*. XCL apresentou alta atividade inseticida com CL₅₀ (Concentração necessária para matar 50% da população testada) de 0,4mg/mL comparada à lectina de leguminosa *Lathyrus ochru* (TRIGUEIROS et al., 2003) com CL₅₀ de 8,5mg/mL.

1.4. *Aedes aegypti* E A DENGUE

O dengue, arbovirose transmitida pelo mosquito *Aedes aegypti*, que ataca mundialmente 50 a 100 milhões de pessoas anualmente, com mais de 20 mil mortes (WHO, 2008), é uma infecção reemergente causada por diferentes sorotipos virais (DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4) e que se manifesta de diferentes formas clínicas, algumas graves e letais, como a febre de dengue hemorrágica (OMS, 2002).

A forma clássica é uma doença de baixa letalidade, mesmo sem tratamento específico. No entanto, incapacita temporariamente as pessoas para o trabalho. Na febre hemorrágica do dengue a febre é alta, com manifestações hemorrágicas, hepatomegalia e insuficiência circulatória. A letalidade é significativamente maior do que na forma clássica, dependendo da capacidade de atendimento médico-hospitalar da localidade (MELTZER & SCHWARTZ, 2009).

O dengue trata-se, caracteristicamente, de uma enfermidade presente em áreas tropicais e subtropicais, uma vez, que as condições ambientais favorecem o desenvolvimento dos vetores. Várias espécies de mosquitos do gênero *Aedes* podem servir como transmissores do vírus do dengue (OMS, 1997). No Brasil, duas delas estão hoje instaladas em alta densidade: *A. aegypti* e *A. albopictus* (JOHNSON et al., 2002).

A transmissão da doença é iniciada quando a fêmea, da espécie vetora, é contaminada, quando realiza um repasto sangüíneo em um indivíduo infectado em fase virêmica da doença, tornando-se, após um período de 10 a 14 dias, capaz de transmitir o vírus por toda sua vida (transmissão transovariana) através de suas picadas. O ciclo de vida do *A. aegypti* compreende quatro fases: ovo, larva (quatro estágios larvários, denominados L1, L2, L3 e L4), pupa e adulto. Em condições favoráveis de temperatura, umidade e disponibilidade de alimento, o tempo transcorrido entre o estágio de ovo a adulto varia em média de 10 a 13 dias (FORATTINI, 1965).

A fase larvária caracteriza o período de alimentação e crescimento. As larvas passam a maior parte do tempo alimentando-se principalmente de material orgânico acumulado nas paredes e fundo dos depósitos contendo água limpa. Após essa fase, surgem as pupas, que não se alimentam. É nesta fase que ocorre a metamorfose do estágio larval para o adulto.

Como ocorre em outros insetos alados, o adulto representa um importante vetor de dispersão. Entretanto, com o *A. aegypti*, é provável que haja mais transporte passivo de ovos e larvas em recipientes do que dispersão ativa pelo inseto adulto devido à grande resistência à dessecação, que, nos ovos, pode chegar a mais de um ano (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

Na tentativa de manter a incidência das enfermidades transmitidas por insetos sob controle, são destinadas, continuamente, quantias significativas de recursos para programas contra os vetores e o controle químico de culicídeos utilizando inseticidas, como Temephos, Malathion e Fenitrothion, constitui a principal medida adotada pelos Programas de Saúde Pública. Entretanto, em diferentes partes do mundo e no Brasil, tem sido registrada a resistência desses dípteros a esses inseticidas convencionais (JANTAN et al., 2005; CARVALHO et al., 2004).

O controle específico para o mosquito *A. aegypti* pode ser direcionado aos estágios imaturos aquáticos, para os adultos, ou para ambos simultaneamente (SERVICE, 1996). O método ideal para controlar e prevenir a infestação de mosquitos ocorre através do uso de larvicidas (CEPLEANU, 1983; GLUBER, 1989). Em estratégias para os estágios imaturos, pode-se utilizar o controle biológico, através de organismos predadores, patógenos e parasitas naturais, capazes de parasitar ou preda os mosquitos em várias fases evolutivas. Algumas linhagens de bactérias entomopatogênicas, do gênero *Bacillus*, produzem toxinas protéicas com um alto grau de especificidade a insetos vetores que, quando ingeridas, provocam mortalidade das larvas (REGIS et al., 2007). No entanto, os insetos podem desenvolver resistência a este recurso de controle biológico (JAYARAMAN et al., 2005)

A busca por inseticidas naturais ganhou enorme impulso depois da descoberta dos efeitos indesejáveis aos ecossistemas dos inseticidas sintéticos (PINTO et al., 2002). Assim, novos compostos com atividades larvicida e inseticida se tornam importantes devido ao aumento dramático da incidência de doenças transmitidas por insetos (OMENA et al., 2007). Então, existe uma necessidade em todo o mundo de encontrar alternativas que sejam promissoras em sua eficácia, facilmente biodegradáveis, contribuindo com o ambiente e também de baixo custo financeiro (DHARMAGADDA et al., 2005 ; KIRAN et al., 2006).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- Avaliar as lectinas da entrecasca (MuBL) e cerne (MuHL) de *Myracrodruon urundeuva* quanto a atividade antimicrobiana e inseticida.

2.2. Objetivos específicos

- Isolar as lectinas do cerne e entrecasca de *M. urundeuva*;
- Avaliar a atividade antifúngica da lectina isolada do cerne de *M. urundeuva* (MuHL).
- Avaliar a atividade antibacteriana de preparações do cerne: extrato salino, preparação lectínica e lectina isolada.
- Determinar a concentração mínima inibitória (CMI), concentração mínima bactericida (CMB) e concentração mínima aglutinante (CMA) para MuHL;
- Avaliar a atividade antifúngica da lectina de *M. urundeuva* através da porcentagem de inibição do crescimento fúngico em placas de Petri.
- Avaliar o efeito larvicida das preparações do cerne e entrecasca (extrato salino e fração) e da lectina isolada contra o quarto estágio larval (L4) de *Aedes aegypti*.
- Analisar estatisticamente os resultados obtidos.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AINSWORTH, G. C.; BISBY, G. R. **Dictionary of the fungi**. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, 1973. 445p

ALEXOPOULOS C. J.; MIMS C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. 4^a ed. New York: John Wiley & Sons, 1996

ARAÚJO, E. L. Produção de Plantas Medicinais para Programas de Fitoterapia em Saúde Pública no Brasil. **ISHS Acta Horticulturae** 569: I Latin-American Symposium on the Production of Medicinal, Aromatic and Condiments Plants, 2002.

ATHAMNA, A. et al. Rapid identification of *Mycobacterium* species by lectin agglutination. **Journal of Microbiological Methods**, v. 65, n. 2, p. 209-215, 2006.

BALANDRIN, M.F.; KINGHORN, A.D.; FARNSWORTH, N.R. Plant-derived natural products in drug discovery and development. An overview. In: A.D. Kinghorn and M.F. Balandrin, Editors, **Human Medicinal Agents from Plants, ACS Symposium Series 534**, American Chemical Society, Washington, USA (1993) ISBN 0-8412-2705-5, p. 2–12. 1993.

BARKLEY, F. A. Anacardiaceae: Rhoideae: *Astronium*. **Phytologia**, v. 16, n. 2, p. 107–152, 1968.

BARROSO, G. M. et al. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. v. 2. 1. ed. Minas Gerais: Ed. Imprensa Universitária, 1991.

BIES, C.; LEHR, C.; WOODLEY, J. F. Lectin-mediated drug targeting: history and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 4, p. 425-435, 2004.

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. 3^aed. ESAM. Fortaleza. v.42, p. 540. 1976.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional de Saúde. Dengue instruções para pessoal de combate ao vetor : manual de normas técnicas. - 3. ed., rev. - Brasília : Ministério da Saúde : Fundação Nacional de Saúde, 2001.

BRASIL. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Balanço Dengue 1º de janeiro até 11 de abril de 2009. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br>. Ministério da Saúde, Brasília. Acesso em 18 agosto. 2009

CANTÓN, R.; UNAL, S.; FARRELL, D. J. Antibacterial resistance patterns in *Streptococcus pneumoniae* isolated from elderly patients: PROTEKT years 1–5 (1999–2004). **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 30, n. 6, p. 546-550, 2007.

CARBALLEIRA LOPEZ, G. A.; MILANO, S. Avaliação da durabilidade natural da madeira e de produtos usados na sua proteção. In: LEPAGE, E. S. et al. **Manual de preservação de madeiras**, v. 2. São Paulo: IPT, p.473-521. 1986.

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

CARLINI, C. R., UDEDIBIE, A. B. Comparative effects of processing methods on hemagglutinating and antitryptic activities of *Canavalia ensiformis* and *Canavalia braziliensis* seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 45, n.11, p.4372-4377, 1997.

CARVALHO et al., Susceptibilidade de larvas de *Aedes aegypti* ao inseticida Temephos no Distrito Federal. **Revista Saúde Pública**, v. 38, p.623-629, 2004.

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

CEPLEANU, F. Validation and application of three benchtop bioassays for screening of crude plant extracts and subsequent activity-guided isolation. Tese de Doutorado, Faculte des Sciences, Universite de Lausanne, Lausanne, 1983.

CHANG, S. T. et al. Antifungal compounds in the ethyl acetate soluble fraction of the extractives of Taiwania (*Tawiania cryptomerioides* Hayata) heartwood. **Holzforchung**, v. 53, p. 487-490, 1999.

CHAPAGAIN, B. P.; SAHARAN, V.; WIESMAN, Z. Larvicidal activity of saponins from *Balanites aegyptiaca* callus against *Aedes aegypti* mosquito. **Bioresource Technology**, v. 99, n.5, p. 1165-1168, 2008.

CHENG, J. et al. Expression of arabinogalactan proteins involved in Taxol production by immobilized *Taxus cuspidata* cells. **Journal of Biotechnology**, v. 133, n. 1, p. 96-102, 2008.

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

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, n. 3, p. 406-414, 2007.

CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G. Lectins, carbohydrate recognition molecules: are they toxic?. In: Yasir Hasan Siddique. (Org.). **Recent Trends in Toxicology**. Kerala, India: Transworld Research Network, v. 37, p. 47-59. 2008.

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

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

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

DALLA PRIA, M.; CAMARGO, L.E.A. Doenças do Cacaueiro (*Theobroma cacao*) In: KIMATI, H. et al. **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 3. ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1997. p. 176-183.

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

DHARMAGADDA, V. S. S. et al. Larvicidal activity of *Tagetes patula* essential oil against three mosquito species. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1235–1240, 2005.

DHINGRA, V.; RAO, K. V.; NARASU, M. L. Artemisinin: present status and perspectives **Biochemical Education**, v. 27, n. 2, p. 105-109, 1999.

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

DOYLE. R. J.; SLIFKIN, M. **Lectin–Microorganism Interactions**, New York: Marcel Decker, Inc., 1994.

DURHAM, M.; REGNIER, F. E. Targeted glycoproteomics: Serial lectin affinity chromatography in the selection of O-glycosylation sites on proteins from the human blood proteome. **Journal of Chromatography A**, v. 1132, n. 1-2, p. 165-173, 2006.

FAO. Databook on endangered tree and shrub species and provenances. **FAO Forestry Paper** v. 77. Roma, 1986.

FERNÁNDEZ-ALONSO, J.L et al. Lectin prospecting in Colombian Labiatae. A systematic-ecological approach. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, n. 6, p. 617-633, 2003.

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

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

FORATTINI, O. P. Entomologia Médica. São Paulo, Faculdade de Saúde pública, v.2 416p, 1965.

FREIRE, M. G. M. et al.. 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.

GABOR, F. et al. The lectin-cell interaction and its implications to intestinal lectin-mediated drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews** v. 56, n.4, p. 459-480, 2004.

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

GARRIDO, M. A. O.; POGGIANI, F. Características silviculturais de cinco espécies indígenas plantadas em povoamentos puros e misto. **Silvicultura em São Paulo**, v. 13, p. 33-48, 1979.

GLUBER, D. Aedes aegypti and Aedes aegypti-borne disease control in the 1990_s: top down or bottom up. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 40, p. 571-578, 1989.

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

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

IMBERT, A. et al. Structures of the lectins from *Pseudomonas aeruginosa*: insights into the molecular basis for host glycan recognition. **Microbes and Infection**, v. 6, n. 2, p. 221-228, 2004.

IMS HEALTH – GLOBAL PHARMACEUTICAL SALES. 1998 – 2005. Disponível em: <www.imshealth.com>. Acesso em: 12 set. 2009.

INA, C. et al. Screening for and purification of novel self-aggregatable lectins reveal a new functional lectin group in the bark of leguminous trees. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1726, n. 1, p. 21-27, 2005.

INGKANINAN, K.; HERMANS-LOKKERBOL, A. C. J; VERPOORTE, R.. Comparison of some centrifugal partition chromatography systems for a general separation of plant extracts. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies** v. 22, n. 6, p. 885-896, 1999.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS – IBAMA. **Lista oficial oficial de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção**. Diário Oficial, Brasília, 23 de jan. p. 869-873. 1992.

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

JANTAN, I. et al. Insecticidal activities of the leaf oils of eight Cinnamomum species against *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **Pharmaceutical Biol**, v.43, p.526-532, 2005.

JAWETZ, E. et al. **Microbiologia Médica**. 18^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1991.

JAYARAMAN, K. S. et al. Indian Bt gene monoculture, potential time bomb. **Nature Biotechnology**, v. 23, n. 158, 2005.

JOHNSON, B. W. et al. Vector competence of Brazilian *Aedes aegypti* and *A. albopictus* for a Brazilian yellow fever virus isolate. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, n. 6, p. 611-613, 2002.

KALSO, E. How different is oxycodone from morphine? **Pain**, v. 132, n. 3, p. 227-228, 2007.

KANG, N. Q.; JEAN-LEUE, G.; JOHAN, H. A blood group A specific lectin from the seed of *Crotalaria striata*. **Biochemistry and Biophysical Acta**, v. 1033, n. 2, p. 210-213, 1990.

KAVALALI, G. et al. Hypoglycemic activity of *Urtica pilulifera* in streptozotocin-diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 84, n. 2-3, p. 241-245, 2003.

KENNEDY, J. F. et al. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 26, n. 3, p. 219-30, 1995.

KIRAN, S. R. et al. Composition and larvicidal activity of leaves and stem essential oils of *Chloroxylon swietenia* DC against *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 2481-2484, 2006.

KOIKE, T. et al. 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. 1205-1210, 1995.

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

LATHA, V. L.; RAO, R. N.; NADIMPALLI, S. K. Affinity purification, physicochemical and immunological characterization of a galactose-specific lectin from the seeds of *Dolichos lablab* (Indian lablab beans). **Protein Expression and Purification**, v. 45, n. 2, p. 296-306, 2006.

LEAL, A. et al. **Novo método para marcação com lectinas em fungo filamentoso**. In: 5º Congresso Brasileiro de Micologia, Programação e resumos, Recife, 2007.

LEITE, E. J. State-of-knowledge on *Myracrodruon urundeuva* Fr. Allemão (Anacardiaceae) for genetic conservation in Brazil. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, v. 5, n. 3, p. 193-206, 2002.

LEITE, Y. F. M. M. et al. 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.

LEONICER, D.; MITSCHLER, L.A. **Organic Chemistry of Drug Synthesis**. New York: Wiley, v.1, p. 298.1977.

LEPAGE, E. S. et al. Métodos de tratamento. In: LEPAGE, E. S. (coord.). **Manual de preservação de madeiras**, v. 2. São Paulo: IPT, 1986. p. 343-419.

LI, Y. R. et al. A novel lectin with potent antitumor, mitogenic and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from the edible mushroom *Pleurotus citrinopileatus*. **Biochimica et Biophysica Acta**, *in press*, 2007.

LIMA, V. L. M. et al. Immobilized *Cratylia mollis* lectin as potential matrix to isolate plasma glycoproteins including lecithin cholesterol acyltransferase. **Carbohydrate Polymers**, v. 33, n. 1, p. 27-32, 1997.

LIMPENS, E.; BISSELING, T. Signaling in symbiosis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, n. 4, p. 343-350, 2003.

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

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

MACEDO, M. L. R. et al. *Talisia esculenta* lectin and larval development of *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1571, n. 2, p.83-88, 2002.

MACEDO, M. L. R. et al. Purification and characterization of an N-acetylglucosamine-binding lectin from *Koeleria paniculata* seeds and its effect on the larval development of *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) and *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 10, p. 2980-2986, 2003.

MACEDO, M. L. R. et al. 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**, v. 146, n. 4, p. 486-498, 2007.

MACIEL, E. V. M. et al.. Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. **Biologicals** v. 32, n. 1, p. 57-60, 2004.

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

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

MANN, J. et al. **Natural Products: their Chemistry and Biological Significance**. 1st Ed. New York – USA Longman Scientific & Technical. p. 1-2. 1994.

MATOS, F.J.A. et al. **Aroeira do Sertão (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.). Estudo farmacognóstico, químico e farmacológico**. 2. ed. Fortaleza: Edições UFC.1995.

MELTZER, E., SCHWARTZ, E. A travel medicine view of dengue and dengue hemorrhagic fever. **Travel Medicine and Infectious Disease** article in press. 2009.

MICIELI, M. V.; CAMPOS, R. E. Oviposition activity and seasonal pattern of a population of *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (L.) (Diptera:Culicidae) in subtropical Argentina. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 659-663, 2003.

MIRANDA, I. R. **Características morfofisiológicas e polimorfismo de DNA de isolados de *Fusarium oxysporum* f.sp. *passiflorae* do Nordeste do Brasil**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Pernambuco. Biologia dos Fungos. Recife. 2000.

MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A.; QUEIROZ, C. R. A. A. Studies on polyphenols of *Myracrodruon urundeuva* wood. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 10, n. 6, p. 447-452, 1999.

MOREIRA, R. A. et al. Isolation and partial characterization of a lectin from *Artocarpus incisa* L. seeds. **Phytochemistry**, v. 47, n. 7, p. 1183-1188, 1998.

MOURA, R. M. et al. CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*: Isolation, characterization and its effects on pathogenic bacteria and *Leishmania* promastigotes. **Comparative Biochemistry and Physiology A**, v. 145, n. 4, p. 517-523, 2006.

NEUMANN D. et al. Computational modeling of the sugar-lectin interaction. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 4, p. 437-457, 2004.

NG, T. B. et al. Inhibitory effects of antifungal proteins on human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase, protease and integrase. **Life Sciences** v. 70, p. 927-935, 2002

OLIVEIRA, D. K.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G. **Different lectins in *Spondias tuberosa* (umbu)**. In: XXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), 2000, Caxambu.

OLIVEIRA, J. T. A. et al. Purification and physicochemical characterization of a cotyledonary lectin from *Luetzelburgia auriculata*. **Phytochemistry** v. 61, p. 301-310, 2002.
OMENA, M. C. et al. Larvicidal activities against *Aedes aegypti* of some Brazilian medicinal plants. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2549-2556, 2007.

ORDÓÑEZ R. M. et al. Antimicrobial activity of glycosidase inhibitory protein isolated from *Cyphomandra betacea* Sendt. fruit. **Peptides**, v. 27, p.1187-1191, 2006.

PAES, J. B.; VITAL, B. R. Resistência natural da madeira de cinco espécies de eucalipto a cupins subterrâneos, em testes de laboratório. **Revista Árvore**, v. 24, n. 1, p. 97-104, 2000.

PAES, J. B. et al. Resistência natural de sete madeiras ao cupim subterrâneo (*Nasutitermes corniger* Motsch.) em ensaio de preferência alimentar. **Revista Brasileira de Ciências Agrícolas**, v. 2, n. 1, p. 57-62, 2007.

PAIVA, P. M. G., et al. Purification and primary structure determination of two Bowman-Birk type trypsin isoinhibitors from *Cratylia mollis* seeds. **Phytochemistry**, v. 67, n. 6, p. 545-552, 2006.

PETROSSIAN, K.; BANNER, L. R.; OPPENHEIMER, S. B. Lectin binding and effects in culture on human cancer and non-cancer cell lines: Examination of issues of interest in drug design strategies. **Acta Histochemica**, v. 109, n. 6, p. 491-500, 2007.

PEUMANS, W. J.; ROUGÉ, P.; VAN DAMME, E. J. M. The tomato lectin consists of two homologous chitin-binding modules separated by an extensin-like linker. **Biochemical Journal**, v. 376, p. 717-724, 2003.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, v. 109, n. 2, p. 347-352, 1995.

_____. Plant lectins: versatile proteins with important perspectives in biotechnology. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 15, p. 199 - 228, 1998.

PINTO, A. C. et al., Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e Perspectivas. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.

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

PLÁ, A et al. Isolation of a lectin from *Cayaponia martiana* (Cucurbitaceae) fruits extract. In: 21st international lectin meeting, 2004, Kanagawa. **Trends in Glycoscience and Glycotechnology**, v. 16, p. 39, 2004

PLETSCH, M. Compostos Naturais Biologicamente Ativos – Aplicação da Biotecnologia à Produção de Compostos Naturais Biologicamente Ativos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, 1997.

POLETO, I. et al. Zoneamento e identificação de *Fusarium* spp. causadores de podridão de raízes em plantios de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) na região do Vale do Taquarí, RS. **Ciência Florestal**, v. 16, n. 1, p. 1-10. 2006.

PORRAS, F. et al. Isolation of the receptor for the *Amaranthus leucocarpus* lectin from human T lymphocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1724, n. 1-2, p. 155-162, 2005.

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

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

REGIS, L. et al. Bacteriological larvicides of dipteran disease vectors. **Trends in Parasitology**, v. 17, n. 8, p. 377-380, 2001.

RODRIGUES, J. S. et al. Novel core (polyester)-shell(polysaccharide) nanoparticles: protein loading and surface modification with lectins. **Journal of Controlled Release**, v. 92, p. 103-112, 2003.

ROJO, M. A. et al. Isolation and characterization of a new D-galactose-binding lectin from *Sambucus racemosa* L. **Protein and Peptide Letters**, v. 10, n. 3, p. 287-293, 2003.

ROUGÉ, P. et al. 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. 91-97, 2003.

SÁ, R.A. et al. Antibacterial and antifungal activities of *Myracrodruon urundeuva* heartwood. **Wood Science and Technology** v. 43, p. 85-95. 2009a.

SANDES, A.R.R.; DI BLASI, G. Biodiversidade e Diversidade Química e genética; Aspectos relacionados com a propriedade intelectual no Brasil. In: **Biotecnologia Ciências & Desenvolvimento**. n.13 ano II, p.28, 2000.

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

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

SARTORI, A. F.; REIS, E. M.; CASA, R. T.. Transmission of *Fusarium moniliforme* from seeds to corn seedlings. **Fitopatol. bras.** , Brasília, v. 29, n. 4, 2004 . Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010041582004000400018&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 17 Out 2007.

SERVICE, M. W. Medical entomology for students. 1ed. Chapman & Hall, London, 278p, 1996.

SHARON, N.; LIS, H. Legumes lectins – a large family of homologous proteins. **FASEB J**, v. 4, p. 3198-3208, 1990.

_____. How proteins bind carbohydrates: lessons from legume lectins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v. 50, p. 6586-6591, 2002.

SILVA, A. C. **Madeiras da Amazônia: características Gerais, nome vulgar e usos**. Manaus: Sebrae, 2002.

SILVA, M. D.C. et al. Purified *Cladonia verticillaris* lichen lectin: Insecticidal activity on *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae). **International Biodeterioration & Biodegradation**v, 63, n. 3, p. 334-340. 2009.

SITOHY, M.; DOHEIM, M.; BADR, H. Isolation and characterization of a lectin with antifungal activity from Egyptian *Pisum sativum* seeds. **Food Chemistry**, v. 104, n. 3, p. 971-979, 2007.

SMITH, N. et al. **Flowering plants of the Neotropics**. Princeton: University Press, 2004.

SOUHEIL, H. et al. Pathogenic and toxic effects of *Fusarium oxysporum* (Schlecht.) on survival and osmoregulatory capacity of *Penaeus japonicus* (Bate). **Aquaculture**, v. 178, n. 3-4, p. 209-224, 1999.

SPILATRO, S. R. et al.. Characterization of a new lectin of soybean vegetative tissues. **Plant Physiology**, v. 110, p. 825-834, 1996.

SUIÇA. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Dengue bulletin: Epidemic dengue/dengue haemorrhagic fever: A global public health problem in the 21st century. 1997.

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

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

SUSEELAN, K. N. et al. Purification and characterization of a lectin from wild sunflower (*Helianthus tuberosus L.*) tubers. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 407, p. 241-247, 2002.

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

TRABULSI, R. **Microbiologia**. 3^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2000.

TRIGUEIROS, V. et al. Xerocomus chrysenteron lectin: identification of a new pesticidal protein. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1621, p. 292-298, 2003.

TRINDADE, M. B. et al. Structural characterization of novel chitin-binding lectins from the genus *Artocarpus* and their antifungal activity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1764, p. 146-152, 2006.

UMETSU, K.; YAMASHITA, K.; SUZUKI, T. Purification and carbohydrate-binding specificities of a blood type B binding lectin from hemolymph of a crab (*Charybdis japonica*). **Journal of Biochemistry**, v. 109, p. 718-721, 1991.

VAN DAMME, E. J. M. et al. The NeuAc(α -2,6)-GalNAc-binding lectin from elderberry (*Sambucus nigra*) bark type-2 ribosome-inactivating protein with an usual specificity and structure. **European Journal of Biochemistry**, v. 235, p. 128-137, 1996.

_____ Plant Lectins: A Composite of Several Distinct Families of Structurally and Evolutionary Related Proteins with Diverse Biological Roles. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 17, n. 6, p. 575-592, 1998.

VASCONCELOS, I. M.; OLIVEIRA, J. T. A. Antinutritional properties of plant lectins. **Toxicon**, v. 44, p. 1737-1747, 2004.

- VELÁZQUEZ G. **Perspectivas quanto as políticas da OMS na globalização e acesso aos medicamentos.** Discurso en el Seminario Internacional de Política de Medicamentos: Equidad y Acceso, Itacuruçá, junho de 2000.
- VIANA, A. M. A. **Isolamento, caracterização parcial e atividades biológicas da lectina de entrecasca de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi.).** Dissertação de Mestrado. Bioquímica. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2002.
- VIANA, G. S. B. et al. **Aroeira do Sertão (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.): estudo botânico, farmacognóstico, químico e farmacológico.** 2ª ed. Fortaleza: Edições UFC, 1995.
- WANG, H. X.; BUNKERS, G. J. Potent heterologous antifungal proteins from cheeseweed (*Malva parviflora*). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 279, p. 669-673, 2000.
- WANG, H.X.; NG, T. B. Purification of Castamollin, a novel antifungal protein from Chinese chestnuts. **Protein Expression & Purification**, v. 32, p. 44-51, 2003.
- WANG, H. X.; NG, T. B. Concurrent isolation of a Kunitz-type trypsin inhibitor with antifungal activity and a novel lectin from *Pseudostellaria heterophylla* roots. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 342, n. 1, p. 349-353, 2006.
- WAUTERS, G.; CHARLIER, J.; JANSSENS, M. Agglutination of pYV1 *Yersinia enterocolitica* strains by agglutinin from *Mangifera indica*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 3, p. 772-774, 1995.
- WHO, Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. World Health Organization, Geneva, Switzerland. 2008.
- WINTER, H. C.; MOSTAFAPOUR, K.; GOLDSTEIN, I. J. The mushroom *Marasmius oreades* lectin is a blood group type B agglutinin that recognizes the Gal α 1,3Gal and Gal α 1,3Gal β 1,4GlcNAc porcine xenotransplantation epitopes with high affinity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 17, p. 14996-15001, 2002.
- WITITSUWANNAKUL, R.; WITITSUWANNAKUL, D.; SAKULBORIRUG, C. A lectin from the bark of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*). **Phytochemistry**, v. 47, n. 2, p. 183-187, 1998.
- WROBLEWSKI, S. et al. Potencial of lectin-N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide copolymerdrug conjugates for the treatment of pre-cancerous conditions. **Journal of Controlled Release**, v. 74, p. 283-293, 2001.
- WU, J. H. et al. Carbohydrate recognition factors of the lectin domains present in the Ricinus communis toxic protein (ricin). **Biochimie**, V. 88, N. 2, P. 201-217, 2006.
- XU, Q. et al. Purification and characterization of a novel anti-fungal protein from *Gastrodia elata*. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 36, n. 12, p. 899-905, 1998
- YE, X. Y.; NG, T. B. Peptides from pinto bean and red bean with sequence homology to cowpea 10-KDA protein precursor exhibit antifungal, mitogenic, and HIV-1 reverse

transcriptase-inhibitory activities. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.285, p. 424-429, 2001.

ZABEL, R. A.; MORRELL, J. J. **Wood microbiology: decay and its prevention**. Academic Press. 1^a ed. 1992

ZENTENO, E. et al. Specificity of the isolectins from the plant cactus *Machaerocereus eruca* for oligosaccharides from porcine stomach mucin. **Glycoconjugate Journal**, v. 12, p. 699–706, 1995.

ZHANG, N. et al. Members of the *Fusarium solani* species complex that cause infections in both humans and plants are common in the environment. **American Journal of Ophthalmology**, v. 142, n. 5, p. 897, 2006.

ZHU-SALZMAN, K.; SALZMAN, R.A. Functional mechanics of the plant defensive *Griffonia simplicifolia* lectin II: resistance to proteolysis is independent of glycoconjugate binding in the insect gut. **Journal of Economic Entomology**, v. 94, p. 1280–1284, 2001.

4. CAPÍTULO 1



***Myracrodruon urundeuva* heartwood contains lectin with antibacterial and antifungal activities**

Publicado no periódico “Wood Science and Technology”
(Volume 43, p 85-90, 2009)

Wood Sci Technol (2009) 43:85–95
DOI 10.1007/s00226-008-0220-7

ORIGINAL

Antibacterial and antifungal activities of *Myracrodruon urundeuva* heartwood

Roberto A. Sá · Francis S. Gomes · Thiago H. Napoleão ·
Nataly D. L. Santos · Carla M. L. Melo · Norma B. Gusmão ·
Luana C. B. B. Coelho · Patrícia M. G. Paiva · Lothar W. Bieber

Received: 12 October 2007 / Published online: 20 September 2008
© Springer-Verlag 2008

Abstract The aim of this work was to isolate a lectin from *Myracrodruon urundeuva* heartwood and to evaluate its antimicrobial activity against bacteria and fungi that attack plants, including woods. The lectin was isolated from heartwood through affinity chromatography on a chitin column monitored by hemagglutination assay. The lectin inhibited Gram-negative and Gram-positive bacteria and was more effective than antifungal Cercobin in growth inhibition of phytopathogenic fungi. The detected antimicrobial activity reveals the possible role of the lectin in the resistance of *M. urundeuva* heartwood against deteriorative biological agents. The *M. urundeuva* lectin is the first bioactive peptide found in heartwood, probably stored as a chemical protection against biodegradation.

Abbreviations

CFU Colony forming units
F₁ 40–60% fraction
HA Hemagglutinating activity
MAC Minimal agglutinating concentration
MBC Minimal bactericide concentration
MIC Minimal inhibitory concentration
NA Nutrient Agar medium

R. A. Sá · L. W. Bieber
Departamento de Química Fundamental, CCEN, Universidade Federal de Pernambuco,
Recife, PE, Brazil

F. S. Gomes · T. H. Napoleão · N. D. L. Santos · L. C. B. B. Coelho · P. M. G. Paiva (✉)
Departamento de Bioquímica, CCB, Universidade Federal de Pernambuco,
Avenida Prof Moraes Rego s/n, 50670-420, Cidade Universitária, Recife, PE, Brazil
e-mail: ppaivaufpe@yahoo.com.br

C. M. L. Melo · N. B. Gusmão
Departamento de Antibióticos, CCB, Universidade Federal de Pernambuco,
Recife, PE, Brazil

NB Nutrient Broth medium
SHA Specific hemagglutinating activity
YNB Yeast nitrogen base medium

Introduction

Wood contains a core part called heartwood considered a dead tissue of high durability against physical and biological degradation (Silva 2002). The natural durability of the heartwood depends on the resistance to the action of deteriorative agents including microorganisms (Khan et al. 2006; Omar et al. 2000). Bacterial contamination is able to affect wood permeability and structure and to predispose wood to fungal attack (Clausen 1995).

Food contamination by microorganisms has been associated with human diseases. Bacteria and some phytopathogenic fungi, like *Fusarium oxysporum*, have important implications for plant and human health (Di Pietro et al. 2003; Wang and Ng 2003). Peptides and proteins have been evaluated as antibiotics for control of pathogens (Wang and Bunkers 2000).

Lectins are proteins that recognize carbohydrates (Santos et al. 2005) and have been considered as participants in plant defence mechanisms (Gaidamashvili and van Staden 2002; Freire et al. 2002). Interaction of lectin with teicoic and teicuronic acids, peptidoglycans and lipopolysaccharides present in bacterial cellular walls result in antibacterial activity (Ratanapo et al. 2001). Lectins can also bind fungal structures. Antifungal activity was detected for lectins isolated from *Castanea mollissima* against *Botrytis cinerea* and *Physalospora piricola* (Wang and Ng 2003) and from *Talisia esculenta* against *F. oxysporum*, *Colletotrichum lindemuthiaum* and *Saccharomyces cerevisiae* (Freire et al. 2002).

Myracrodruon urundeuva Fr. All. (aroeira-do-sertão) is broadly distributed in Brazil. Considered a hardwood, it is very dense (density = 1.0–1.21 g cm⁻³), elastic and resistant to microorganisms (Morais et al. 1999; Mainieri and Chimelo 1989). Evaluation with the fungi *Postia placenta* and *Neolentinus lepideus* (Paes et al. 2002) showed that *M. urundeuva* heartwood is more resistant to these organisms than *Tabebuia impetiginosa* (ipê) and *Senna siamea* (cássia). *M. urundeuva* wood is widely used in Brazil in the construction of buildings.

Lectin activity was detected by hemagglutinating activity in *M. urundeuva* heartwood. This paper reports on the effect of *M. urundeuva* heartwood lectin on bacterial and fungal growth.

Materials and methods

Plant material

Myracrodruon urundeuva Fr. All. was collected in the State of Maranhão, Northeastern Brazil. A voucher specimen was identified and deposited under

number 054 in Herbário Aluisio Bittencourt, Centro de Estudos Superiores de Caxias, Universidade Estadual do Maranhão. A sample of the central heartwood from a tree of 6 m height and 20 cm diameter was air dried and powdered (40 mesh).

Lectin isolation

Powdered heartwood (10 g) was suspended in 0.15 M NaCl (100 mL) and homogenized in a magnetic stirrer (16 h; 4°C) providing a crude extract (70 mL). Soluble proteins in the crude extract were fractionated with ammonium sulphate (40% saturation, 4 h; 25°C). The precipitated material was removed by centrifugation and the supernatant was brought to 60% saturation of ammonium sulphate (4 h; 25°C). The precipitated 40–60% fraction (F₁) was collected by centrifugation (3,000 g, 15 min; 4°C), dissolved in 0.15 M NaCl and dialyzed (5-kDa cut-off membrane) against distilled water (4 h) and 0.15 M NaCl (4 h). The dialyzed F₁ was loaded (2.0 mL; 20.6 mg protein) onto a chitin column (Sigma, USA; 7.5 × 1.5 cm) previously equilibrated with 0.15 M NaCl. The washing step used 0.15 M NaCl (100 mL). The lectin activity was recovered by elution with 1.0 M acetic acid (100 mL). The hemagglutinating fraction (lectin, 80 mL) was then dialyzed against 0.15 M NaCl (1 L) during 4 h at 4°C, dried by lyophilization and resuspended in 0.15 M NaCl. Protein concentration was determined using serum albumin (31–500 µg mL⁻¹) as standard (Lowry et al. 1951).

Hemagglutinating activity

Hemagglutinating activity (HA) and HA inhibitory assay were carried out in microtitre plates (Kartell S.P.A., Italy) according to Paiva and Coelho (1992). The evaluated preparations (50 µL) were serially twofold diluted in 0.15 M NaCl prior to addition of 2.5% (v/v) suspension of rabbit erythrocytes (50 µL). The HA (titer) was defined as the lowest lectin concentration in the sample which showed hemagglutination. Specific HA (SHA) was defined as the ratio between the titer and protein concentration (mg mL⁻¹).

HA inhibitory assay was performed by dilution of lectin (50 µL) in 200 mM *N*-acetylglucosamine solution and incubation (45 min) prior to addition of 2.5% (v/v) suspension of rabbit erythrocytes (50 µL).

Antibacterial activity assay

Gram-positive (*Bacillus subtilis* ATCC-6633, *Corynebacterium callunae* ATCC-5991, *Staphylococcus aureus* ATCC-6538 and *Streptococcus faecalis* ATCC-6057) and Gram-negative (*Escherichia coli* ATCC-25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC-29665 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-27853) bacterial strains were provided by Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Brazil. Stationary cultures were maintained in nutrient agar (NA) and stored at 4°C. Bacteria were cultured in nutrient broth (NB) and incubated under permanent

shaking at 37°C overnight. The culture concentrations were adjusted turbidimetrically at a wavelength of 600 nm to 10^5 – 10^6 colony forming units (CFU).mL⁻¹.

Disk diffusion method (Bauer et al. 1966) was used. A total of 0.5 mL of inoculum (10^5 – 10^6 CFU mL⁻¹) was added to warm NA (100 mL, 43°C); the solution was distributed in sterile Petri plates (90 × 15 mm) in portions of 10 mL and allowed to solidify. Aliquots (15 µL) of crude extract, F₁ or purified lectin containing 725, 309 and 15 µg of protein, respectively, were impregnated on sterile paper disks (6 mm diameter) and placed on agar. Negative and positive controls were 0.15 M NaCl and amoxicilin (1 mg mL⁻¹), respectively. Plates were incubated at 37°C for 24 h. A transparent inhibition zone around the paper disk revealed antimicrobial activity. Zones of growth inhibition were measured in millimeter.

Minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericide concentration (MBC)

MIC and MBC were determined according to Courvalin et al. (1988). Purified lectin (0.2 mL, 300 µg) was added to an assay tube containing 1.8 mL of NA. After being homogenized, successive dilutions were proceeded moving 0.2 mL of the previous tube content to another tube containing 1.8 mL of NA. Thereafter, 0.2 mL of microorganism suspensions (exponential phase of growth; 1.5×10^8 CFU mL⁻¹; 0.5 in McFarland scale) were inoculated in all tubes. Control tubes contained NA medium and microorganism. MIC corresponds to the lowest lectin concentration able to inhibit the visible growth of microorganism.

MBC was determined starting from the MIC assay tubes. Dilutions of 1:10,000 of each tube were performed and aliquots (10 µL) were sowed in Petri plates containing NA medium. The number of CFU grown in plates was determined. The MBC corresponds to the minimum concentration of sample that reduced the number of CFU to 0.1% of the initial concentration.

Bacterial agglutination assay

For a quantitative determination of agglutinating activity, the minimum agglutinating concentration (MAC) was registered. Overnight bacterial cultures were diluted at a ratio of 1:100 with NB. Agglutination assay was performed in microtiter plates with twofold serial dilutions of purified lectin (100 µL of 0.6 mg mL⁻¹ solution) in 0.15 M NaCl. An aliquot (100 µL) of diluted bacterial suspension was added in each well. MAC was determined by visual agglutination after overnight incubation of plates at 37°C.

The bacterial agglutination promoted by purified lectin was inhibited by addition of *N*-acetylglucosamine monosaccharide. The lectin (50 µL) was mixed with equal volume of carbohydrate solution (200 mM). After incubation at 27°C for 30 min, 100 µL of microorganism was added and the bacterial agglutination assay continued.

Antifungal activity

Fusarium solani (URM-2480), *F. oxysporum* (URM-2489), *F. moniliforme* (URM-3226), *F. decemcellulare* (URM-3006) and *F. lateritium* (URM-2491) were obtained from Culture Collections at University Recife Mycologia (URM), Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, Brazil. *F. fusarioides* and *F. verticilloides* were provided by Laboratório de Fungos do Solo, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brazil.

Antifungal activity was performed according to Cunico et al. (2004). The method has been modified by application of *M. urundeuva* lectin in solid yeast nitrogen base (YNB) medium rather than YNB liquid used by Cunico et al. (2004). Purified lectin was filtered using a 0.45- μm sterile syringe filter (Minisart[®]). Next, the lectin (50 μL ; 50 μg) was spread on solidified YNB medium in Petri plates (100 \times 15 mm²). A fungal mycelium disk (0.625 cm in diameter) was disposed in the center of the Petri plate. All assays were carried out in triplicate. A 0.15 M NaCl saline solution and 10 ppm Cercobin in 0.15 M NaCl were used as negative and positive controls, respectively. The plates were incubated at 28°C for 72 h. Antifungal activity was indicated by a reduction of the fungal growth zone (diameter) in the plates.

Statistical analysis

The computer package GraphPad Prism, version 4.02 was used for statistical analysis. Data were expressed as a mean \pm standard deviation (SD).

Results

Myracrodruon urundeuva heartwood crude extract was submitted to ammonium sulphate treatment; F₁ showed high protein concentration (10.3 mg mL⁻¹) and HA (32,768) with rabbit erythrocytes. F₁ HA was inhibited by *N*-acetylglucosamine suggesting the use of *N*-acetylglucosamine matrix (chitin) for lectin isolation by affinity chromatography. The adsorbed lectin activity in the column (1.33 mg of protein) was recovered with 1.0 M acetic acid and showed high HA (SHA of 1,273).

Crude extract, F₁ and purified lectin showed antibacterial effect on *S. aureus*, *S. faecalis*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *C. callunae* and *K. pneumoniae*. The growth inhibition zones obtained through the diffusion assay in the disk are shown in Table 1.

Minimal inhibitory (MIC) and minimum bactericide (MBC) concentration values were determined for purified lectin (Table 2). The lowest MIC value (0.58 $\mu\text{g mL}^{-1}$) was obtained for *S. aureus* and the MBC for this bacterium was 8.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Minimal agglutinating concentration (MAC) showed lowest value (2.34 $\mu\text{g mL}^{-1}$) for *S. aureus* (Table 2); the assay indicated the minimum lectin concentration able to agglutinate the bacteria. *K. pneumoniae* was the least sensitive microorganism (MIC of 9.37 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and MAC of 9.37 $\mu\text{g mL}^{-1}$). The results

Table 1 Antibacterial activity from *Myracrodruon urundeuva* heartwood preparations

Microorganism	Diameter of clearing zone (mm) ^a		
	Crude extract	F ₁	Purified lectin
<i>Bacillus subtilis</i> (+)	11.6 ± 0.6	11.3 ± 0.6	15.8 ± 0.8
<i>Corynebacterium callunae</i> (+)	11.8 ± 0.8	12.6 ± 0.6	17.1 ± 0.3
<i>Staphylococcus aureus</i> (+)	16.6 ± 0.6	14.5 ± 0.5	14.1 ± 0.5
<i>Streptococcus faecalis</i> (+)	10.3 ± 0.6	10.3 ± 0.6	16.8 ± 0.8
<i>Escherichia coli</i> (–)	10.0 ± 1.0	16.1 ± 0.3	15.9 ± 0.6
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (–)	19.5 ± 0.5	16.5 ± 0.5	16.0 ± 0.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (–)	22.5 ± 0.5	16.5 ± 1.4	14.6 ± 0.6

+, Gram-positive; –, Gram-negative bacteria

^a Including diameter of paper disk

Table 2 MIC and MAC values of purified lectin

Microorganism	MIC	MAC
<i>Bacillus subtilis</i> (+)	2.34	4.68
<i>Corynebacterium callunae</i> (+)	1.17	4.68
<i>Staphylococcus aureus</i> (+)	0.58	2.34
<i>Streptococcus faecalis</i> (+)	2.34	4.68
<i>Escherichia coli</i> (–)	1.17	9.37
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (–)	9.37	9.37
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (–)	4.68	9.37

MIC and MAC expressed as $\mu\text{g mL}^{-1}$ of purified lectin. Lectin initial concentration, MIC assay = 1.5 mg mL^{-1} ; MAC assay = 0.6 mg mL^{-1}

+, Gram-positive bacteria; –, Gram-negative bacteria

shown in Table 2 also reveal that the heartwood lectin was more effective on Gram-positive than on Gram-negative bacteria.

The effect of lectin on *Fusarium* was compared with fungal growth in the negative control (Figs. 1b, 2b) and antifungal activity of the positive control (Figs. 1c, 2c). Purified lectin showed antifungal activity against *Fusarium* strains (Figs. 1, 2); *F. decemcellulare* revealed the slowest growth among assayed fungi and purified lectin retarded even more the growth of this fungus (Fig. 1a, d). Figures 1 and 2 showed that the best lectin inhibitory activity was observed after 72 h. High percentage of growth inhibition was obtained for *F. oxysporum* ($60.8\% \pm 2.9$), *F. decemcellulare* ($51.1\% \pm 3.8$) and *F. fusarioides* ($51.1\% \pm 1.9$).

Discussion

The detection of HA in *M. urundeuva* heartwood may indicate that its natural resistance to deteriorative biological agents is due to the presence of lectin. In

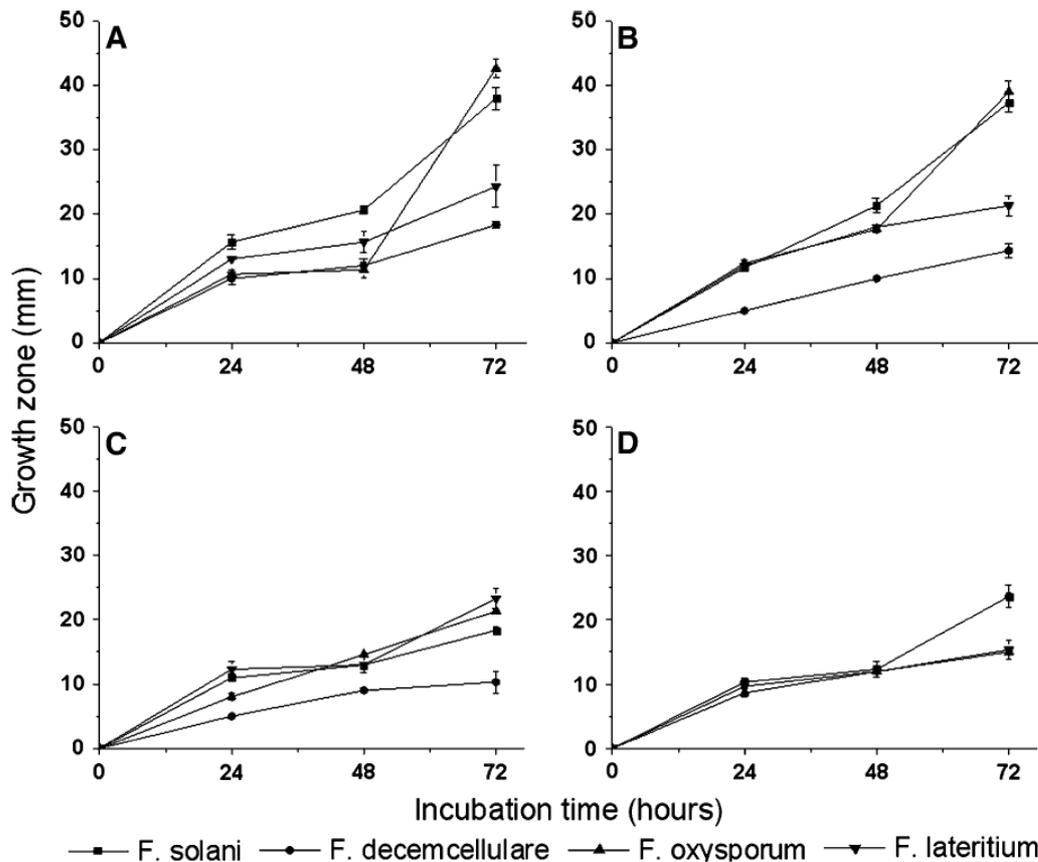


Fig. 1 Growth zones of the fungi *F. solani*, *F. decemcellulare*, *F. oxysporum* and *F. lateritium* in YNB medium. The conditions of the assays were: **a** only the mycelial disk, **b** 0.15 M NaCl (negative control), **c** 10 ppm Cercobin and **d** purified lectin (50 µg) in 0.15 M NaCl. Each point represents the mean ± SD of three experiments

plants, antimicrobial proteins are involved in defence mechanisms (Ye and Ng 2002) and proteins isolated from vegetal tissues showed potent antibacterial (Ordóñez et al. 2006) and antifungal (Wang and Ng 2003; Wang and Bunkers 2000) activities. Bioactive proteins exhibit potential use as natural antibiotics.

Myracrodruon urundeuva lectin showed antibacterial activity against all tested species although the highest inhibitory action on bacteria growth was detected for *S. aureus*. The determined MIC ($0.58 \mu\text{g mL}^{-1}$) revealed a strong antibacterial activity of lectin. Growth inhibition as well as bactericide property (MBC of $8.1 \mu\text{g mL}^{-1}$) of *M. urundeuva* lectin were higher than those described for lectin isolated from *Eugenia uniflora* seeds (MIC of $1.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ and MBC of $16.5 \mu\text{g mL}^{-1}$; Oliveira et al. 2008).

Myracrodruon urundeuva lectin agglutinated all tested bacteria, but *S. aureus* was the most sensitive (MAC of $2.34 \mu\text{g mL}^{-1}$). Agglutination of *S. aureus* was also observed with lectins isolated from *E. uniflora* seeds (Oliveira et al. 2008) and *Combretum mkhuzense* bark (Gaidamashvili and van Staden 2002) with MAC of 0.25 and $5 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectively.

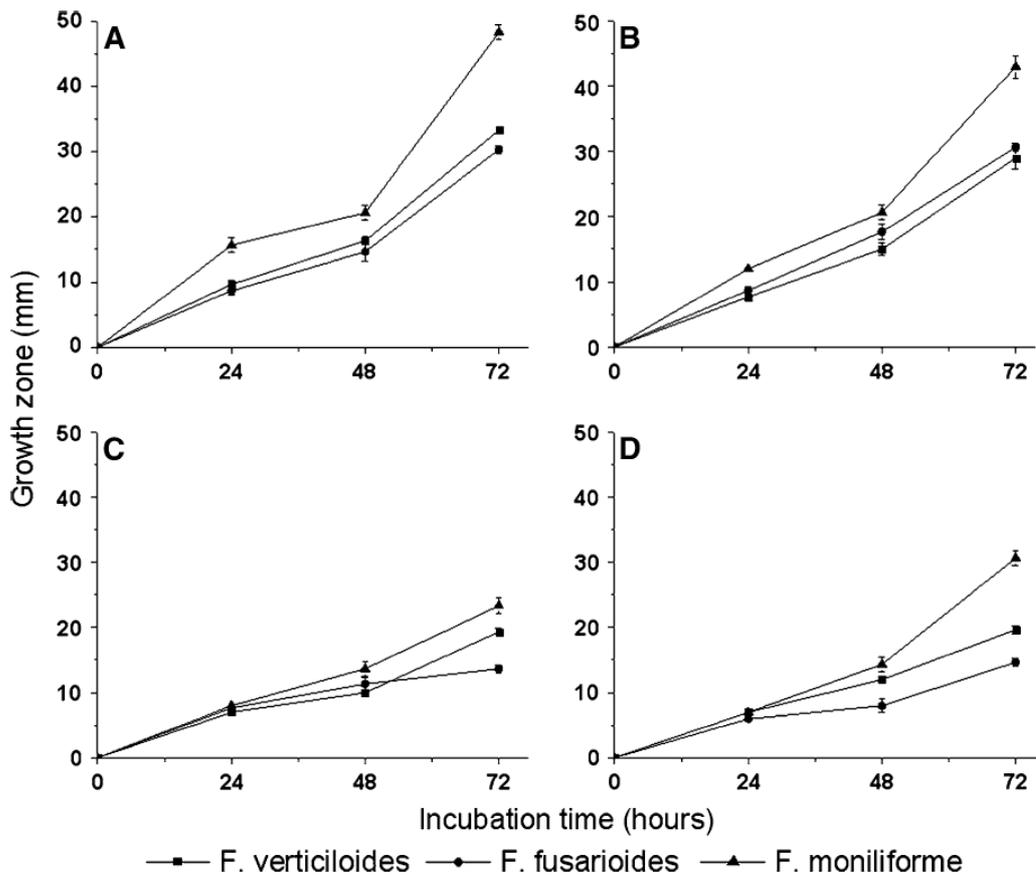


Fig. 2 Growth zones of the fungi *F. verticilloides*, *F. fusarioides* and *F. moniliforme* in YNB medium. The conditions of the assays were: **a** only the mycelial disk, **b** 0.15 M NaCl (negative control), **c** 10 ppm Cercobin and **d** purified lectin (50 µg) in 0.15 M NaCl. Each point represents the mean \pm SD of three experiments

Lectin binding to carbohydrates of bacterial cellular walls has been speculated in antibacterial activity (Gaidamashvili and van Staden 2002; Ratanapo et al. 2001; Tasumi et al. 2004). The possible role of endophytic bacteria such as *B. subtilis*, *P. aeruginosa* and *Corynebacterium* sp. (Jacobs et al. 1985) in the pathogenic plant process development has been reported and it was suggested that these bacteria could become opportunistic pathogens (Cothier and Dowling 1986).

Inhibition of *M. urundeuva* heartwood lectin HA by *N*-acetylglucosamine stimulated the evaluation of its antifungal activity against plant and human pathogenic species of *Fusarium*. Chitin (*N*-acetylglucosamine polymer) is the key component of fungal cell wall and chitin-binding proteins with antifungal properties include chitinases (Van Damme et al. 1993; Vergauwen et al. 1998), chitinase-like proteins (Lam et al. 2000; Ye et al. 2000), chitin-binding proteins (Van den Bergh et al. 2004; Huang et al. 2000) and lectins (Goza et al. 1993; Fakhoury and Woloshuk 2001). The lectin isolated from a Romanian dihaploid variety of wheat inhibited *Fusarium* growth (Ciopraga et al. 1999).

Myracrodruon urundeuva lectin showed antifungal activity in all assayed fungi. Results indicate the important role of the lectin in growth inhibition of *F. lateritium*

and *F. oxysporum*, as evidenced by inhibition superior to positive control Cercobin. *F. oxysporum* has also been reported as an opportunistic human pathogen (Di Pietro et al. 2003).

The antifungal activity of *M. urundeuva* heartwood was detected using only 50 µg of lectin, a quantity much lower than 225 µg determined for a chitin-binding lectin isolated from *Artocarpus* sp. on *F. moniliforme* (Trindade et al. 2006), revealing the high ability of heartwood lectin to inhibit fungal growth. The quantity of *M. urundeuva* lectin able to inhibit *F. oxysporum* and *F. solani* growths was also lower than that described for chitinase (60 µg) from *Phaseolus mungo* seeds (Ye and Ng 2005).

The antifungal activity of lectins has been related to interference in spore germination, probably in a very initial stage of the process, extending the latent period that precedes germination (Lis and Sharon 1981). Chitin-binding proteins have shown to affect fungal growth and development, disturbing the synthesis and/or deposition of chitin in cell wall (Selitrennikoff 2001).

Conclusion

The detection of antibacterial and antifungal activities of *M. urundeuva* heartwood lectin provides an initial evidence of the lectin as a bioactive component involved in heartwood durability. Furthermore, the effect of *M. urundeuva* lectin on *F. oxysporum* growth stimulates its evaluation as an antibiotic for pathogen control. *M. urundeuva* lectin is the first bioactive peptide identified in heartwood, i.e. dead cells, probably stored as a chemical protection against biodegradation.

Acknowledgments The authors express their gratitude to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and to the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for research grants. Authors are deeply grateful to Maria Barbosa Reis da Silva (for the technical assistance) and to Msc. Gonçalo Mendes da Conceição (for the identification of the botanical material).

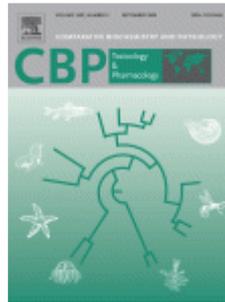
References

- Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M (1966) Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 45:493–496
- Ciopraga J, Gozia O, Tudor R, Brezua L, Doyle RJ (1999) *Fusarium* sp. growth inhibition by wheat germ agglutinin. *Biochim Biophys Acta* 1428:424–432
- Clausen CA (1995) Bacterial associations with decaying wood: a review. *Int Biodeterior Biodegradation* 37:101–107
- Cother EJ, Dowling V (1986) Bacteria associated with internal breakdown of onion bulbs and their role in disease expression. *Plant Pathol* 35:329–336
- Courvalin P, Goldstein F, Philippon A, Sirot J (1988) L'antibiogramme. MPC Vigot, Paris
- Cunico MM, Carvalho JLS, Silva VC, Montrucchio DP, Kerber VA, Grigoletti Júnior A, Auer CG, Miguel MD, Miguel OG (2004) Avaliação antifúngica de extratos obtidos de *Ottonia martiana* Miq. (Piperaceae) sobre três fitopatógenos. *Arq Inst Biol* 71:141–143
- Di Pietro A, Madrid MP, Caracul Z, Delgado-Jarana J, Roncero MIG (2003) *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. *Mol Plant Pathol* 4:315–325

- Fakhoury AM, Woloshuk CP (2001) Inhibition of growth of *Aspergillus flavus* and fungal α -amylases by a lectin-like protein from *Lablab purpureus*. Mol Plant Microbe Interact 14:955–961
- Freire MGM, Gomes VM, Corsini RE, Machado OLT, De Simone SG, Novello JC, Marangoni S, Macedo MLR (2002) Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth. Plant Physiol Biochem 40:61–68
- Gaidamashvili M, van Staden J (2002) Interaction of lectin-like proteins of South African medicinal plants with *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*. J Ethnopharmacol 80:131–135
- Gozia O, Ciopraga J, Bentia T, Lungu M, Zamfirescu I, Tudor R, Roseanu A, Nitu F (1993) Antifungal properties of lectin and new chitinases from potato tubers. C R Acad Sci III 316:788–792
- Huang X, Xie WJ, Gong ZZ (2000) Characterization and antifungal activity of a chitin binding protein from *Ginkgo biloba*. FEBS Lett 478:123–126
- Jacobs MJ, Bugbee WM, Gabrielson DA (1985) Enumeration, location, and characterization of endophytic bacteria within sugar beet roots. Can J Bot 63:1262–1265
- Khan MR, Olomoso AD, Barewai Y (2006) Antimicrobial activity of the *Maniltoa schefferi* extracts. Fitoterapia 77:324–326
- Lam YM, Wang HX, Ng TB (2000) A robust cysteine-deficient chitinase-like antifungal protein from inner shoots of the edible chive *Allium tuberosum*. Biochem Biophys Res Commun 279:74–80
- Lis H, Sharon N (1981) Lectins in higher plants. In: Marcus A (ed) The biochemistry of plants: a comprehensive treatise, vol. 6. Academic Press, New York, pp 371–447
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 193:265–275
- Mainieri C, Chimelo JP (1989) Fichas de características de madeiras brasileiras. IPT, São Paulo
- Morais SAL, Nascimento EA, Queiroz CRAA (1999) Studies on polyphenols of *Myracrodruon urundeuva* wood. J Braz Chem Soc 10:447–452
- Oliveira MDL, Andrade CAS, Santos-Magalhães NS, Coelho LCBB, Teixeira JA, Carneiro-da-Cunha MG, Correia MTS (2008) Purification of a lectin from *Eugenia uniflora* L. seeds and its potential antibacterial activity. Lett Appl Microb 46:371–376
- Omar S, Lemonnier B, Jones N, Ficker C, Smith ML, Neema C, Towers GHN, Goel K, Arnason JT (2000) Antimicrobial activity of extracts of eastern North American hardwood trees and relation to traditional medicine. J Ethnopharmacol 73:161–170
- Ordóñez RM, Ordóñez AAL, Sayago JE, Moreno MIN, Isla MI (2006) Antimicrobial activity of glycosidase inhibitory protein isolated from *Cyphomandra betacea* Sendt. fruit. Peptides 27:1187–1191
- Paiva PMG, Coelho LCBB (1992) Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (camaratu bean). Appl Biochem Biotechnol 36:113–118
- Paes JB, Morais VM, Lima CR (2002) Resistência das madeiras de aroeira (*Myracrodruon urundeuva*), cássia (*Senna siamea*) e ipê (*Tabebuia impetiginosa*) a fungos e cupins xilófagos em condições de laboratório. Flor Amb 9:135–144
- Ratanapo S, Ngamjunyaporn W, Chulavatnatol M (2001) Interaction of a mulberry leaf lectin with a phytopathogenic bacterium, *P. syringae* pv *mori*. Plant Sci 160:739–744
- Santos AFS, Argolo ACC, Coelho LCBB, Paiva PMG (2005) Detection of water soluble lectin and antioxidant component from *Moringa oleifera* seeds. Water Res 39:975–980
- Selitrennikoff CP (2001) Antifungal proteins. Appl Environ Microbiol 67:2883–2894
- Silva AC (2002) Madeiras da Amazônia: características gerais, nome vulgar e usos. Sebrae, Manaus
- Tasumi S, Yang W, Usami T, Tsutsui S, Ohira T, Kawazoe I, Wilder MN, Aida K, Suzuki Y (2004) Characteristics and primary structure of galectin in the skin mucus of the Japanese eel, *Anguilla japonica*. Dev Comp Immunol 28:325–335
- Trindade MB, Lopes JLS, Soares-Costa A, Monteiro-Moreira AC, Moreira RA, Oliva MLV, Beltrami LM (2006) Structural characterization of novel chitin-binding lectins from the genus *Artocarpus* and their antifungal activity. Biochim Biophys Acta 1764:146–152
- Van Damme EJM, Willems P, Torrekens S, Van Leuven F, Peumans WJ (1993) Garlic (*Allium sativum*) chitinases: characterization and molecular cloning. Physiol Plant 87:177–186
- Van den Bergh KP, Rouge P, Proost P, Coosemans J, Krouglova T, Engelborghs Y, Peumans WJ, Van Damme EJ (2004) Synergistic antifungal activity of two chitin-binding proteins from spindle tree (*Euonymus europaeus* L.). Planta 219:221–232
- Vergauwen R, Van Leuven F, Van Laere A (1998) Purification and characterization of strongly chitin-binding chitinase from salicylic acid-treated leek (*Allium porrum*). Physiol Plant 104:175–182

-
- Wang X, Bunkers GJ (2000) Potent heterologous antifungal proteins from cheeseweed (*Malva parviflora*). *Biochem Biophys Res Commun* 279:669–673
- Wang HX, Ng TB (2003) Purification of castamollin, a novel antifungal protein from chinese chestnuts. *Protein Expr Purif* 32:44–51
- Ye XY, Ng TB (2002) A new antifungal protein and a chitinase with prominent macrophage-stimulating activity from seeds of *Phaseolus vulgaris* cv. *pinto*. *Biochem Biophys Res Commun* 290:813–819
- Ye X, Ng TB (2005) A chitinase with antifungal activity from the mung bean. *Protein Expr Purif* 40:230–236
- Ye XY, Wang HX, Ng TB (2000) Dolichin, a new chitinase-like antifungal protein isolated from field beans (*Dolichos lablab*). *Biochem Biophys Res Commun* 269:155–159

5. CAPÍTULO 2



Larvicidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* on *Aedes aegypti*

Publicado no periódico:

“Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology”

(Volume 149, p.300-306, 2009)



Contents lists available at ScienceDirect

Comparative Biochemistry and Physiology, Part C

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cbpcLarvicidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* on *Aedes aegypti*

Roberto Araújo Sá^a, Nataly Diniz de Lima Santos^b, Clécia Sipriano Borges da Silva^a,
Thiago Henrique Napoleão^b, Francis Soares Gomes^b, Benildo Sousa Cavada^c,
Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho^b, Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro^a,
Lothar Wilhelm Bieber^a, Patrícia Maria Guedes Paiva^{b,*}

^a Departamento de Química Fundamental, CCEN, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brazil

^b Departamento de Bioquímica, CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Professor Moraes Rêgo, s/n, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil

^c Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici, 60455-900, Fortaleza, Ceará, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 June 2008

Received in revised form 8 August 2008

Accepted 10 August 2008

Available online 15 August 2008

Keywords:

Aedes aegypti

Bark

Heartwood

Larvicidal activity

Lectin

Myracrodruon urundeuva

ABSTRACT

Aedes aegypti transmits etiologic agents of yellow fever and dengue. Vaccine for dengue virus is not available and vector control is essential to minimize dengue incidence. This report deals with the larvicidal activity of lectins isolated from *Myracrodruon urundeuva* bark (MuBL) and heartwood (MuHL). The lectins were isolated by ammonium sulphate treatment of crude extracts followed by chromatography on chitin. MuBL and MuHL were evaluated by electrophoresis under native (PAGE) and denaturing conditions (SDS-PAGE). Carbohydrate specificity of lectins was evaluated by hemagglutinating activity (HA) inhibition assay using *N*-acetyl-D-glucosamine and by affinity chromatography on *N*-acetyl-D-glucosamine immobilized in agarose gel. Larvicidal activity against *A. aegypti* was investigated with the extracts, salt fractions and isolated lectins. MuBL and MuHL were characterized by PAGE as basic proteins of molecular masses of 14.0 and 14.4 kDa, respectively. The interaction of lectins with *N*-acetylglucosamine was detected by inhibition of HA by monosaccharide and lectin adsorptions on *N*-acetyl-D-glucosamine matrix. All *M. urundeuva* preparations promoted larvae mortality. LC₁₆, LC₅₀ and LC₈₄ values of 0.077, 0.125, 0.173 for MuBL and 0.03, 0.04 and 0.05 mg/mL for MuHL were obtained. To our knowledge this is the first report of larvicidal activity of lectins against *A. aegypti*.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Insect-transmitted diseases are important health problems in tropical regions. In the order Diptera are included popular insects as the flies and the mosquitoes. *Aedes aegypti* (Culicidae) occurs in Asia, Africa and Central and South America and transmits virus of *Flavivirus* genus, etiologic agents of human diseases like dengue and yellow fever (Roberts, 2002).

Yellow fever immunization programs have reduced the risk of outbreaks in some endemic countries and the disease still occurs in epidemic patterns only in some countries of Africa. In America, tropical regions of Bolivia, Brazil, Colombia, Ecuador, Peru and Venezuela are considered places of high risk and the vaccination is obligatory for visitors (World Health Organization, 2001).

On the other hand, there is no vaccine for dengue fever. It can be caused by four serotypes of the DEN arbovirus and clinically can happen in asymptomatic forms, classic dengue fever, hemorrhagic

dengue fever and other more severe forms. Worldwide, 2.5 billion of people are in risk to acquire the disease and 50 million are infected every year, characterizing a pandemic (World Health Organization, 2002). Dengue outbreaks are re-emerging in Brazil. Cases of dengue registered by Brazilian federal organ reached 345,922 in 2006 and 559,954 in 2007 (<http://portal.saude.gov.br>). There are no effective vaccines; vector control is the only form to minimize the transmission of the virus.

Currently, most insecticides are non-selective and can be harmful to other organisms and to the environment. An approach to obtain new efficient, safe and selective insecticides is the study of natural models such as the defensive mechanisms of plants (Ciccía et al., 2000). Bioactive organic compounds produced by plants can act as repellent, oviposition or food deterrents, growth inhibitors, and toxins (Ezeonu et al., 2001; Carlini and Grossi-de-Sá, 2002). Thus, crude plant extracts have been screened as natural and biodegradable forms to control pests and vectors of infectious diseases (Omena et al., 2007). Plant essential oils are, in some cases, highly active and economically viable for insect control. For example, larvicidal activity of essential oils from *Hyptis fruticosa*, *Hyptis pectinata* and *Lippia gracilis* has been reported (Silva et al., 2008).

* Corresponding author. Tel.: +55 8121268540; fax: +55 8121268576.
E-mail address: ppaivaufpe@yahoo.com.br (P.M.G. Paiva).

Lectins, ribosome-inactivating proteins (RIPs), inhibitors of enzymes, glycohydrolases, arcelins, chitinases, canatoxin and modified forms of storage proteins are examples of proteins that are related with defensive mechanisms of plants. All these protein classes showed entomotoxic activities on Coleoptera and some of them demonstrated toxic effect on other insect orders (Carlini and Grossi-de-Sá, 2002).

Lectins are hemagglutinating proteins widely distributed among plants (Santos et al., 2005). The lectin binding to carbohydrates of plasmatic membranes promotes erythrocyte network resulting in the agglutinating phenomenon. Plant lectins with entomotoxic activity have been already described.

This carbohydrate recognition property is involved in the lectin entomotoxic activity on larvae, developing stages and mature forms of insects (Bandyopadhyay et al., 2001; Macedo et al., 2002; Macedo et al., 2004; Sauvion et al., 2004; Leite et al., 2005; Kaur et al., 2006). Lectins can be explored for insect control or by genetic engineering aiming to increase resistance of plants to insects (Carlini and Grossi-de-Sá, 2002; Saha et al., 2006). The midgut of insects contains a membrane, the peritrophic matrix, which separates the contents of the gut lumen from the digestive epithelial cells lining the midgut. It has been suggested that chitin and glycosylated proteins containing *N*-acetylglucosamine of peritrophic matrix are the targets for lectin binding (Tellam et al., 1999). Lectin with chitin-binding property isolated from *Annona coriacea* seeds promoted larval mortality of flour moth *Anagasta kuehniella* and the larvicidal activity was related to lectin binding to chitin components in the insect gut, interaction with glycoconjugates on the surface of epithelial cells along the digestive tract, binding to the sugar moiety of glycosylated digestive enzymes or assimilatory proteins and resistance to insect digestive proteases (Coelho et al., 2007). Bruchid beetle larvae of *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* were sensible to *Bauhinia monandra* leaf lectin that, although belongs to the galactose group of specificity, was able to bind to chitin, a polymer of *N*-acetylglucosamine (Macedo et al., 2007).

Lectins toxic to Diptera insects were already isolated from plants. The asialofetuin-binding *Arisaema helleborifolium* lectin showed anti-insect activity towards second instar larvae of the melon fruit fly *Bactrocera cucurbitae* with LC_{50} value of 0.016 mg/mL (Kaur et al., 2006) and the wheat germ agglutinin (a *N*-acetylglucosamine specific lectin) showed larvicidal activity on the blow fly *Lucilia cuprina* (Eisemann et al., 1994). However there are no reports of lectin toxicity on *A. aegypti*.

Myracrodruon urundeuva is broadly distributed in Brazil and it is one of numerous Caatinga plants with great importance in traditional medicine (Leite, 2002; Albuquerque and Oliveira, 2007). *M. urundeuva* bark is used for treatment of pains and infections in the genito-urinary system, skin, subcutaneous tissues and digestive system. Decoction, infusion in water and syrup are some of the manners of popular use (Monteiro et al., 2006). Dimeric chalcones isolated from bark showed analgesic effects and anti-inflammatory activity (Viana et al., 2003) and tannins showed anti-ulcer and anti-inflammatory effect in rats (Souza et al., 2006).

M. urundeuva is considered a hardwood, very dense, elastic and resistant to microorganisms and termites. Its heartwood has low content of structural polymer cellulose and high content of lignin and extractives. Proanthocyanidins, gallic and ellagic acids, flavanols, flavanols and ellagitannins were detected (Morais et al., 1999). Resistance of woods to deterioration has been attributed to presence of phenolic substances (Findlay, 1985), however Paes et al. (2002) evaluating the effect of *Postia placenta* and *Neolentinus lepideus* fungi and *Nasutitermes corniger* termites on *M. urundeuva*, demonstrated that the heartwood natural resistance was not related to content of secondary metabolites extracted in hot water.

This study was undertaken due to the resistance of *M. urundeuva* wood to insect biodegradation. Additionally, insecticide activity has been detected in the lectin isolated from *M. urundeuva* heartwood,

which promoted mortality of termite *N. corniger* (Sá et al., 2008). Hemagglutinating activity (HA) was also detected in crude extracts of *M. urundeuva* bark. This paper reports the larvicidal activity against *A. aegypti* of crude preparations and isolated lectins from bark and heartwood of this species.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

M. urundeuva (Engl.) Fr. Allemão belongs to the Division Magnoliophyta, Class Magnoliopsida, Subclass Rosidae, Order Sapindales, Family Anacardiaceae and its vernacular names are "aroeira do sertão" in portuguese and "urundel" in Spanish (Leite, 2002). Bark and heartwood were collected in the State of Maranhão, northeastern Brazil and a voucher specimen, identified by Mr. Gonçalo Mendes da Conceição, is archived under number 054 at the Herbarium Aluisio Bittencourt, Centro de Estudos Superiores de Caxias (CESC), Universidade Estadual do Maranhão, Brazil.

2.2. Hemagglutinating activity (HA)

HA assay was carried out in microtiter plates (Kartell S.P.A., Italy) according to Paiva and Coelho (1992) using suspension (2.5% v/v) of rabbit erythrocytes treated with glutaraldehyde (Bing et al., 1967). HA (titer), defined as the reciprocal of the highest dilution of the sample promoting full agglutination of erythrocytes, was reckoned as one hemagglutination unit (Chumkhunthod et al., 2006). Specific HA (SHA) was defined as the ratio between the titer and protein concentration (unit/mg). HA inhibitory assay was performed by incubation (45 min) of lectin sample with 200 mM *N*-acetylglucosamine monosaccharide solution before erythrocyte suspension addition.

2.3. Preparation of crude extracts and protein fractionation

Powdered (40 mesh) bark or heartwood (10 g) was suspended in 0.15 M NaCl (100 mL). After homogenisation in a magnetic stirrer (16 h at 4 °C), followed by filtration through gauze and centrifugation (3000 g, 15 min), clear supernatants (crude extracts) were obtained. The bark (BE) and heartwood (HE) extracts were evaluated for protein concentration according to Lowry et al. (1951) using serum albumin as standard and for HA.

Soluble proteins in BE and HE were fractionated with ammonium sulphate at the saturations of 20%, 40%, 60% and 80% (w/v) according to Green and Hughes (1955). The resulting fractions solubilized in 0.15 M NaCl were submitted to dialysis (5000 Da cut-off membrane, 4 °C) against distilled water (4 h) followed by 0.15 M NaCl (4 h). The dialyzed fractions were evaluated for protein concentration and HA. The most active fractions, 20–40% supernatant from bark extract (BF) and 40–60% precipitate from heartwood extract (HF), were used for isolation of bark (MuBL) and heartwood lectins (MuHL), respectively. The same fractions were also used in the larvicidal assays.

2.4. Purification of MuBL and MuHL

BF (2.0 mL; 7.4 mg of protein) and HF (2.0 mL; 25.6 mg of protein) were loaded onto a chitin column (Sigma, USA, 7.5×1.5 cm) equilibrated at 20 mL/h flow rate with 0.15 M NaCl (100 mL). The unabsorbed proteins were eluted with equilibrating solution until the absorbance at 280 nm was negligible. Then the adsorbed proteins were eluted with 1.0 M acetic acid, pH 5.0, containing 1.0 M NaCl (100 mL). The fractions obtained with acetic acid from both columns were pooled, exhaustively dialyzed against 0.15 M NaCl (1 L) for eluent elimination and evaluated for protein content and HA. The purified proteins of fractions from BE and HE are denominated MuBL and MuHL, respectively.

2.5. Evaluation of MuBL and MuHL binding on *N*-acetyl-D-glucosamine column

To evaluate the affinity of MuBL and MuHL for *N*-acetylglucosamine, ammonium sulphate fractions from BE (BF; 2.0 mL, 15.8 mg of proteins) and HE (HF; 2.0 mL, 19.4 mg of proteins) were loaded onto a column (7.5 cm × 1.5 cm) of *N*-acetyl-D-glucosamine immobilized in agarose gel (Sigma, USA) equilibrated at 20 mL/h flow rate with 0.15 M NaCl (100 mL). After sample application the matrix was washed with equilibrating solution until the absorbance at 280 nm was negligible. The elution step was performed using 0.1 M sodium acetate in 0.15 M NaCl (30 mL), followed by 0.1 M Glycine-HCl pH 2.6 (30 mL) and 0.1 M Glycine-NaOH pH 9.0 (60 mL). The eluted fractions (2.0 mL) were evaluated for protein concentration and HA.

2.6. Effect of exposure to sunlight on MuBL and MuHL activities

The effect of sunlight (UV radiation index 10; Brazilian Science and Technology Ministry – CPTEC/INPE; each UVI unit corresponds to 25 mW m⁻² of energy) on MuBL and MuHL activities was evaluated. Samples of lectins (MuBL, 0.125 mg/mL; HA of 128⁻¹; MuHL, 0.04 mg/mL, HA of 64⁻¹) were exposed to sunlight at 09:00 h on 06 May 2008 until 17:00 h at Recife, Pernambuco, Brazil. The temperature and HA of lectin samples were determined every 60 min up to 480 min using thermometer and rabbit erythrocytes, respectively. The assay was performed in triplicate.

2.7. Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

MuBL and MuHL were evaluated by PAGE for native basic (7.5% (w/v) gel) and acidic (10% (w/v) gel) proteins according to Reisfeld et al. (1962) and Davis (1964), respectively. Electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulphate (SDS-PAGE) and β-mercaptoethanol was performed on 12% (w/v) gel according to Laemmli (1970). Polypeptide bands and standards (bovine serum albumin, 66,000 Da, ovalbumin, 45,000 Da, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, 36,000 Da, carbonic anhydrase, 29,000 Da, trypsin inhibitor, 20,000 Da, α-lactalbumin, 14,400 Da from Sigma, USA) were stained with Coomassie Brilliant Blue in 10% acetic acid (0.02%, v/v).

2.8. *Aedes aegypti* larvae

A. aegypti Linn. belongs to the Phylum Arthropoda, Class Hexapoda, Order Diptera, and Culicidae Family and its common name is dengue mosquito. Eggs were hatched in distilled water at a temperature in the range 25–27 °C. Cat food was offered to larvae; when reaching the fourth-stage (L4) larvae were separated and used for evaluation of the larvicidal activities.

2.9. Larvicidal assay

The larvicidal activity was evaluated using an adaptation of the World Health Organization (1981) method described by Navarro et al. (2003). In a previous assay to determine the survival of larvae in NaCl solutions at different concentrations no mortality was detected until 0.112 M NaCl (corresponding to 15 mL of 0.15 M NaCl plus 5 mL of distilled water). Thus NaCl concentration in test solutions containing lectin and negative controls was not higher than 0.112 M ranging from 0.014 to 0.108 M. The HA was also assayed at the same NaCl concentrations and the activity was not altered. A stock solution of BE (protein concentration: 12.77 mg/mL) in 0.15 M NaCl was used to provide a series of test solutions in the protein concentration range 5–10 mg/mL, obtained by dilution of the stock solution with distilled water. The same conditions were used in bioassays with BF (stock solution at 10.98 mg/mL of protein; test concentration range: 5 to 7 mg/mL), MuBL (stock solution at 0.28 mg/mL; test concentration

range: 0.07 to 0.130 mg/mL), HE (stock solution at 25 mg/mL of protein; test concentration range: 14–16 mg/mL), HF (stock solution at 12.9 mg/mL of protein; test concentration range: 0.7 to 1.2 mg/mL), and MuHL (stock solution at 0.27 mg/mL; test concentration range: 0.037 to 0.05 mg/mL).

The final volume of larvicidal assay was 20 mL of test solution or negative control and contained 20–25 larvae in initial L4 stage. The assays were performed in triplicate. The rate of mortality of the larvae was determined after 24 h incubation at 28 ± 2 °C.

2.10. Statistical analysis

Statistical analysis of the experimental data was performed using the computer software StatPlus® 2006 (AnalystSoft, Canada) to find the lethal protein concentrations required to kill 16% (LC₁₆), 50% (LC₅₀) and 84% (LC₈₄) of larvae in 24 h by probit analysis with a reliability interval of 95% and the software Origin 8.0® (Microcal, Northampton, USA) to establish regression equations ($Y = \text{mortality}$; $X = \text{concentrations}$) and regression coefficient values (Chowdhury et al., 2008).

3. Results and discussion

M. urundeuva durability and resistance to deteriorative biological agents (fungi and insects) have stimulated its use in Brazilian building industry. Sá et al. (2008) isolated a lectin from *M. urundeuva* heartwood (MuHL) and determined its effect on termites (*N. corniger*); MuHL induced mortality of workers and soldiers with values of LC₅₀ of 0.248 mg/mL and 0.199 mg/mL, respectively. Repellence assay was also performed and indicated that lectin did not induce rejection effect. The authors pointed out the possibility of participation of this lectin in the natural resistance of *M. urundeuva*. Lectin activity was also detected in *M. urundeuva* bark, tissue more superficial than heartwood considering the anatomy of wood. This paper reports the effect of lectins isolated from bark (MuBL) and heartwood (MuHL) on *A. aegypti* larvae.

Saline extracts from bark (BE) and heartwood (HE) showed specific HA of 976 and 2409, respectively. Addition of ammonium sulphate to BE and HE resulted in pre-purification of lectins in the 20–40% supernatant (BF) and 40–60% precipitate fraction (HF), respectively. The purification step leads to an increase of BF specific HA in relation to the initial extract. Determined values were 3034 for BF and 2540 for HF.

When the HA assay was performed at the presence of *N*-acetylglucosamine the specific HA of BF and HF was reduced to 1462 and 50, respectively, and the HA of MuBL and MuHL was abolished. The residual HA of salt fractions with monosaccharide was probably due to the presence of tannins at these impure preparations. The assay was used to evaluate truthful agglutination. Pseudo-agglutination induced by other plant compound was abolished since HA of pure lectins was totally inhibited by carbohydrate confirming the lectin nature of the hemagglutination phenomenon.

The linkage of the monosaccharide to lectin carbohydrate binding sites avoids binding of lectin to glycoconjugates of erythrocyte surface and HA is reduced or abolished. The HA inhibition assays evaluate the specificity of lectin carbohydrate binding site (Ng and Lam, 2002; Thakur et al., 2007).

The interaction of *M. urundeuva* lectins with *N*-acetylglucosamine was also investigated through chromatography of ammonium sulphate fractions on columns containing *N*-acetylglucosamine immobilized in agarose gel (Fig. 1). The lectins from bark and heartwood were adsorbed on the matrix and were recovered with 0.1 M Glycine-NaOH pH 9.0. The eluted MuBL and MuHL showed specific HA of 25 and 29, respectively.

To isolate the lectins, BF and HF were charged on chitin columns since lectins that recognize *N*-acetylglucosamine were already purified by chromatography on this polysaccharide matrix (Santi-

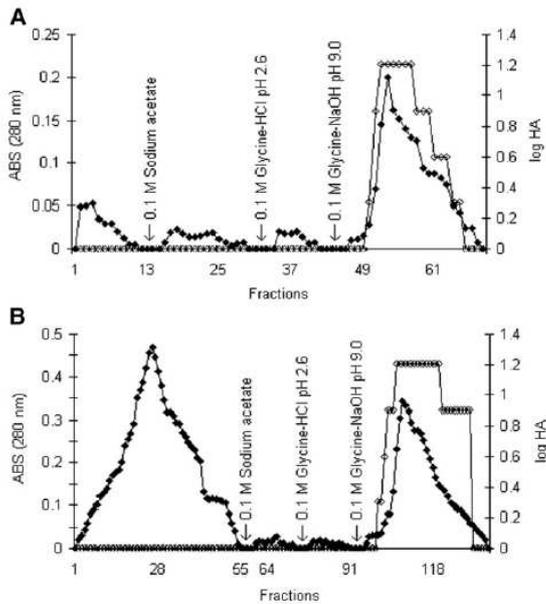


Fig. 1. Chromatography of (A) BF – 20–40% supernatant from bark extract and (B) HF – 40–60% precipitate from heartwood extract on columns of *N*-acetyl-D-glucosamine immobilized in agarose gel. Washing step used 0.15 M NaCl. Arrows demonstrate eluents added. Fractions of 2.0 mL were collected and evaluated for hemagglutinating activity (HA). ABS 280 nm (◆), log HA (◇).

Gadella et al., 2006; Trindade et al., 2006). The adsorbed *M. urundeuva* lectins were eluted with 1.0 M acetic acid (Fig. 2) and 19% and 7% of chromatographed protein were recovered as MuBL (specific HA of 3,938) and MuHL (specific HA of 2,560), respectively. One gram of bark and heartwood provided 0.63 and 1.0 mg of MuBL and MuHL, respectively. The elution with acetic acid of active lectins reveals the structural stability of them to low pH value.

Evaluation of MuBL and MuHL by electrophoresis showed single polypeptide bands in PAGE for native basic proteins (Fig. 2, insets a1 and b1). No band in PAGE for acidic proteins was detected in both cases. Electrophoresis under native conditions separate proteins according to molecule net charges and is able to evaluate the homogeneity of protein (Monti et al., 2008). The detection of single band only in PAGE for basic proteins revealed that both lectins have positive net charge and that the established purification protocols yielded homogeneous lectins. Subunit composition of MuBL and MuHL was determined by SDS-PAGE. Single band of apparent molecular mass of 14.0 for MuBL and 14.4 kDa for MuHL were detected under reducing conditions (Fig. 2, insets a2 and b2). When SDS-PAGE was performed at non-reducing conditions the same electrophoretic pattern was observed revealing that MuBL and MuHL did not contain peptide chains linked by disulphide bridges.

To our knowledge MuHL is the unique lectin obtained from heartwood but lectins have been isolated from bark of *Morus nigra*, *Sambucus nigra* and *Hevea brasiliensis* (Kaku et al., 1990; Wititsuwannakul et al., 1998; Van Damme et al., 2002). The lectins of *M. urundeuva* resembles to them regarding to be proteins of single chain but of lower molecular weight since molecular masses of 16, 30 and 40 kDa were determined to *M. nigra*, *S. nigra* and *H. brasiliensis* lectins, respectively. The bark lectins do not belong to a single group of specificity, but display affinity for different monosaccharides such as galactose, fucose, mannose and similar to MuBL and MuHL, *N*-acetylglucosamine (Lutsik and Antonuk, 1982; Ueno et al., 1992; Van Damme et al., 2002). A bark lectin with glycoprotein binding property was already isolated (Aristoteli and Willcox, 2006). Bark lectins also

did not show specificity to a single erythrocyte type showing HA with rabbit and human types (Wititsuwannakul et al., 1998).

The effect of sunlight exposure on MuBL and MuHL was evaluated since radiation and temperature are able to affect the native structure of proteins leading to loss of activity (Miller et al., 1998; Ramos et al., 2006). The HA of MuBL and MuHL remained the same after its exposure to sunlight. The temperature of assay was monitored and varied from 27 °C (09:00 h to 12:00 h and 15:00 to 17:00 h) to 30 °C (12:00 h to 15:00 h). The result indicates that the lectins of bark and heartwood were stable proteins at environmental conditions of Northeast of Brazil, an important characteristic for their use in *A. aegypti* control programs. The stability of lectins from *M. urundeuva*, similar to other plant lectins was probably dependent upon several structural characteristics. The compact globular structures of lectins due to high number of hydrophobic interactions, hydrogen bonds and disulphide bridges (intra and inter chains), molecular aggregation and glycosylation in general results in high structural stability of native lectins (Moreno et al., 2008; Kawsar et al., 2008).

The larvicidal activity from BE, HE, BF, HF and lectins (MuBL and MuHL) purified by chitin chromatography was evaluated on *A. aegypti* fourth-stage larvae, one of the most important mosquito species in Brazilian public health sector. All preparations were able to kill *A. aegypti* larvae at 24 h and the LC₁₆, LC₅₀ and LC₈₄ values are summarized in Table 1. The evaluation of larvicidal activity revealed that purification protocols yielded preparations with lower LC values than initial crude preparations. The 20–40% supernatant fraction (BF) from BE and 40–60% fraction (HF) showed LC₅₀ lower than the values obtained for the extracts, revealing that partial purification of lectins by salt precipitation promoted increment in larvicidal effect. The

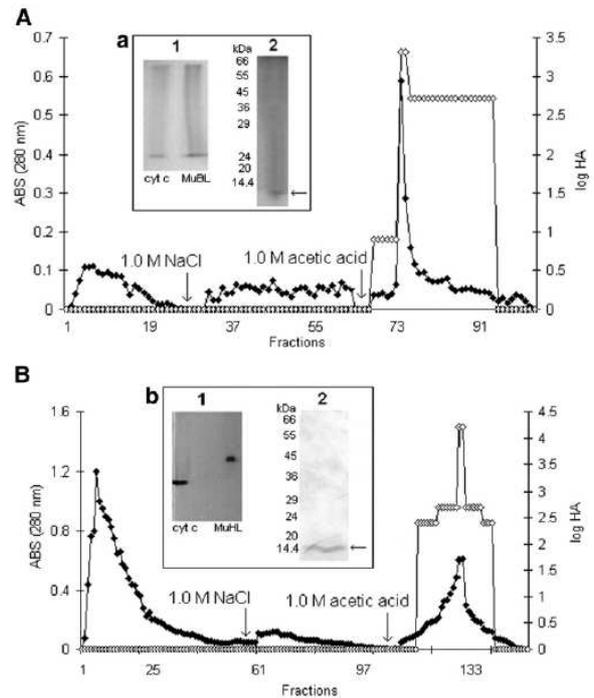


Fig. 2. Chromatography of BF, 20–40% supernatant from bark extract (A), and HF, 40–60% precipitate from heartwood extract (B), on chitin columns. Washing step used 0.15 M NaCl. Arrows demonstrate eluents added. Fractions of 2.0 mL were collected and evaluated for hemagglutinating activity (HA). ABS 280 nm (◆), log HA (◇). PAGE for native basic proteins of MuBL (inset a1) and MuHL (inset b1). SDS-PAGE under reducing conditions for MuBL (inset a2) and MuHL (inset b2). Cytochrome c (insets a1 and b1) and molecular weight markers (insets a2 and b2) were used as standards in electrophoresis.

Table 1
Larvicidal activity on *A. aegypti* larvae from *M. urundeuva* bark and heartwood

Sample	Protein concentration (mg/mL) ^a				Simple linear regression ^c
	LC ₁₆	LC ₅₀	LC ₈₄	SE LC ₅₀ ^b	
Bark					
Extract	5.25	8.81	12.36	0.4811	Y = -34.285 + 9.5714X (R ² = 0.973)
20–40% supernatant	4.61	5.83	7.05	0.1702	Y = -112.346 + 27.83673X (R ² = 0.973)
MuBL	0.077	0.125	0.173	0.0070	Y = -38.8461 + 0.71154X (R ² = 0.976)
Heartwood					
Extract	13.73	14.86	16.00	0.1717	Y = -396 + 30X (R ² = 0.969)
40–60% precipitate	0.68	0.93	1.17	0.0351	Y = -79.0540 + 139.189X (R ² = 0.975)
MuHL	0.033	0.04	0.048	0.0009	Y = -132.1292 + 4493.392X (R ² = 0.977)

^a Lethal concentrations of proteins required to kill 16% (LC₁₆), 50% (LC₅₀) and 84% (LC₈₄) of *A. aegypti* L4 larvae in 24 h.

^b Standard errors (SE) for LC₅₀ values calculated by probit analysis using Statplus® 2006 software.

^c Simple linear regression and regression coefficient values (R²) established using Origin 8.0® software. Y: mortality rate (%); X: protein concentration (mg/mL).

chitin chromatographic step also enhanced the larvicidal activity and MuBL and MuHL showed LC₅₀ of 0.125 mg/mL and 0.04 mg/mL, respectively. After the 24 h bioassay the HA of bark and heartwood preparations remained the same determined at the beginning of the experiment revealing that lectins are not inactivated during the bioassay. As mentioned above 1 g of *M. urundeuva* bark or heartwood contains 0.63 and 1.0 mg of MuBL and MuHL, i.e. 5 and 25 times greater concentration than the LC₅₀ determined for MuBL and MuHL respectively.

Similarly to MuBL and MuHL, plant lectins with affinity for *N*-acetylglucosamine and chitin-binding property were insecticidal for many insects (Chrispeels and Raikhel, 1991; Zhu-Salzman et al., 1998; Macedo et al., 2003; Macedo et al., 2007). The *N*-acetylglucosamine monosaccharide is the monomeric unit of chitin, a major polysaccharide component of the arthropod exoskeleton and peritrophic matrix found in the midgut of insects (Bobelmann et al., 2007; Muthukrishnan et al., 2007). It is suggested that binding of lectin specific to *N*-acetylglucosamine to the peritrophic matrix interferes in the digestion and absorption of nutrients (Peumans and Van Damme, 1995; Zhu-Salzman et al., 1998; Zhu-Salzman and Salzmann, 2001; Carlini and Grossi-de-Sá, 2002; Macedo et al., 2004; Macedo et al., 2007). The deleterious effect of lectin on these metabolic processes leads to death of the insect by nutritional deprivation (Fitches and Gatehouse, 1998). The integrity of peritrophic matrix, which has important roles in the digestive processes of insects as well as protection of the insect from invasion by microorganisms and parasites (Tellam et al., 1999), is essential for larvae survival. *M. urundeuva* lectins due to their carbohydrate specificity would recognize chitin and *N*-acetylglucosamine residues in glycosylated proteins at the surface of larval peritrophic matrix leading to discontinuity of matrix would promote larvae death.

In fact, lectins with specificity for *N*-acetylglucosamine exhibited binding to peritrophic matrix of *A. aegypti* and it has been suggested that the penetration of the gut epithelium of *A. aegypti* by the *Plasmodium gallinaceum* involved the membrane monosaccharide/parasite lectin interaction (Rudin and Hecker, 1989). The importance of the peritrophic matrix for *A. aegypti* larval development was demonstrated in bioassay using chitin synthesis inhibitor lufenuron. The compound adversely affected *A. aegypti* larval survival indicating its potential for controlling mosquito populations (Moreira et al., 2007).

To our knowledge there is no report of larvicidal activity of purified lectins against *A. aegypti*, but larvicidal activity on *A. aegypti* has been detected in crude plant preparations. Latex of *Calotropis procera*

promoted mortality (100%) of third instar larvae and it has been suggested that the toxic effect should be at least in part due to latex proteins (Ramos et al., 2006). Ethanol extract of *Melia azedarach* leaves showed a strong larvicidal activity with LC₅₀ of 0.76 g/L determined after 96 h of bioassay (Coria et al., 2008). Studies with saponins from *Balanites aegyptiaca* callus produced from in vitro cultures of roots revealed that concentrations of 500 ppm or greater killed 100% of the larvae population and it has been suggested their use as a larvicidal agent against the mosquito (Chapagain et al., 2008).

Essential oils from plants are widely investigated for their insecticide activity. Heartwoods from *Cryptomeria japonica*, *Cunninghamia lanceolata*, *Taiwania cryptomerioides* and *Calocedrus formosana* were sources of larvicidal essential oils with LC₅₀ (µg/mL) of 72.0, 106.4, 79.8 and 75.2, respectively (Cheng et al., 2003). We found that MuHL (LC₅₀ 0.04 mg/mL or 40 ppm) was more efficient than these heartwood oils. MuBL LC₅₀ (0.125 mg/ml or 125 ppm) was lower than that obtained for essential oils from *H. fruticosa* and *H. pectinata* (366 and 502 ppm, respectively) revealing its more strong larvicidal activity (Silva et al., 2008). Cavalcanti et al. (2004) found LC₅₀ values between 60 and 538 ppm for 9 essential oils from branches, leaves or fruits of 9 plants of the Graminae (Poaceae), Labiateae (Lamiaceae), Myrtaceae, Rutaceae, Verbenaceae and Zingiberaceae families. In our study, MuHL showed a LC₅₀ value lower than essential oils described above and MuBL was more toxic than 5 of these oils.

It has been suggested that natural products should be evaluated as alternative insecticides for the control of *A. aegypti* larvae, since they constitute a rich source of bioactive molecules that are biodegradable, nontoxic, and potentially suitable for use in integrated larvae management programs (Silva et al., 2008). The values of LC₅₀ of MuBL and MuHL demonstrate its good larvicidal activity on *A. aegypti*, but the most superficial location of bark in the anatomy of wood gives an advantage: it is easier and safer to the plant to obtain bark tissue for extraction of the lectin. Investigation of experimental formulations of MuHL and MuBL against *A. aegypti* larvae can be made aiming to determine the potentiality of *M. urundeuva* lectins in programs to control dengue vectors.

Some chemicals used to solubilize essential oils in larvicidal assays were Tween 80, dimethyl-sulphoxide (DMSO), acetone or ethanol, for example. MuBL and MuHL are proteins soluble in saline solution (0.15 M NaCl) and the HA was not altered at low concentrations of NaCl as 0.014 M. The 0.15 M NaCl saline solution used to solubilize lectins is of easy manipulation, a very simple and cheap method and has no toxic effect for environment.

The detection of larvicidal activity in wood resistant to insect degradation provides a significant link between plant physiology and biotechnological application sciences. Our study suggests the participation of insecticide lectins from bark and heartwood in *M. urundeuva* defense mechanism.

In conclusion, *M. urundeuva*, a plant known for several uses in traditional medicine and wood utilization, contains active peptides against *A. aegypti* larvae indicating a potential use for bark and heartwood extracts for dengue disease control by impairment of biological cycle of the vector.

Acknowledgements

The authors express their gratitude to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and to the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for research grants. Authors are deeply grateful to Maria Barbosa Reis da Silva for the technical assistance.

References

- Albuquerque, U.P., Oliveira, R.F., 2007. Is the use-impact on native caatinga species in Brazil reduced by the high species richness of medicinal plants? *J. Ethnopharmacol.* 113, 156–170.

- Aristoteli, L.P., Willcox, M.D., 2006. The adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to high molecular weight human tear film species corresponds to glycoproteins reactive with *Sambucus nigra* lectin. *Exp. Eye Res.* 83, 1146–1153.
- Bandyopadhyay, S., Roy, A., Das, S., 2001. Binding of garlic (*Allium sativum*) leaf lectin to the gut receptors of homopteran pests is correlated to its insecticidal activity. *Plant Sci.* 161, 1025–1033.
- Bing, D.H., Weyand, J.G., Stavinsky, A.B., 1967. Hemagglutination with aldehyde-fixed erythrocytes for assay of antigens and antibodies. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 124, 1166–1170.
- Bobelmann, F., Romano, P., Fabritius, H., Raabe, D., Epple, M., 2007. The composition of the exoskeleton of two crustacea: the American lobster *Homarus americanus* and the edible crab *Cancer pagurus*. *Thermochim. Acta* 463, 65–68.
- Carlini, C.R., Grossi-de-Sá, M.F., 2002. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potential as bioinsecticides. *Toxicol.* 40, 1515–1539.
- Cavalcanti, E.S., Morais, S.M., Lima, M.A.A., Santana, E.W.P., 2004. Larvicidal activity of essential oils from Brazilian plants against *Aedes aegypti* L. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 99, 541–544.
- Chapagain, B.P., Saharan, V., Wiesman, Z., 2008. Larvicidal activity of saponins from *Balanites aegyptiaca* callus against *Aedes aegypti* mosquito. *Bioresour. Technol.* 99, 1165–1168.
- Cheng, S.S., Chang, H.T., Chang, S.T., Tsai, K.H., Chen, W.J., 2003. Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* larvae. *Bioresour. Technol.* 89, 99–102.
- Chowdhury, N., Ghosh, A., Chandra, G., 2008. Mosquito larvicidal activities of *Solanum villosum* berry extract against the dengue vector *Stegomyia aegypti*. *BMC Complement. Altern. Med.* 8, 10.
- Chrispeels, M.J., Raikhel, N.V., 1991. Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. *Plant Cell* 3, 1–9.
- Chumkhanthod, P., Rodtong, S., Lambert, S.J., Fordham-Skelton, A.P., Rizkallah, P.J., Wilkinson, M.C., Reynolds, C.D., 2006. Purification and characterization of an N-acetyl-D-galactosamine-specific lectin from the edible mushroom *Schizophyllum commune*. *Biochim. Biophys. Acta* 1760, 326–332.
- Ciccia, G., Cossio, J., Mongelli, E., 2000. Insecticidal activity against *Aedes aegypti* larvae of some medicinal South American plants. *J. Ethnopharmacol.* 72, 185–189.
- Coelho, M.B., Marangoni, S., Macedo, M.L.R., 2007. Insecticidal action of *Annona coriacea* lectin against the flour moth *Anagasta kuehniella* and the rice moth *Coryca cephalonica* (Lepidoptera: Pyralidae). *Comp. Biochem. Physiol. C* 146, 406–414.
- Coria, C., Almiron, W., Valladares, G., Carpinella, C., Ludueña, F., Defago, M., Palacios, S., 2008. Larvicidal and oviposition deterrent effects of fruit and leaf extracts from *Melia azedarach* L. on *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *Bioresour. Technol.* 99, 3066–3070.
- Davis, B.J., 1964. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121, 404–427.
- Eisemann, C.H., Donaldson, R.A., Pearson, R.D., Cadogan, L.C., Vacuolo, T., Tellman, R.L., 1994. Larvicidal activity of lectins on *Lucilia cuprina*: mechanism of action. *Entomol. Exp. Appl.* 72, 1–11.
- Ezeonu, F.C., Chidume, G.I., Udedi, S.C., 2001. Insecticidal properties of volatile extracts of orange peels. *Bioresour. Technol.* 76, 273–274.
- Findlay, W.P.K., 1985. The nature and durability of wood. In: Findlay, W.P.K. (Ed.), *Preservation of Timber in the Tropics*. Martinus Nijhoff/ Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht, pp. 1–13.
- Fitches, E., Gatehouse, J.A., 1998. A comparison of the short and long term effects of insecticidal lectins on the activities of soluble and brush border enzymes of tomato moth larvae (*Lacanobia oleracea*). *J. Insect Physiol.* 44, 1213–1224.
- Green, A.A., Hughes, L., 1955. Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solution of salts and organic solvents. In: Colowick, S., Kaplan, N. (Eds.), *Methods in Enzymology*. Academic Press, New York, pp. 67–90.
- Kaku, H., Peumans, W.J., Goldstein, I.J., 1990. Isolation and characterization of a second lectin (SNA-II) present in elderberry (*Sambucus nigra* L.) bark. *Arch. Biochem. Biophys.* 277, 255–262.
- Kaur, M., Singh, K., Rup, P.J., Saxena, A.K., Khan, R.H., Ashraf, M.T., Kamboj, S.S., Singh, J., 2006. A tuber lectin from *Arisaema helleborifolium* Schott with anti-insect activity against melon fruit fly, *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett), and anti-cancer effect on human cancer cell. *Arch. Biochem. Biophys.* 445, 156–165.
- Kawsar, S.M., Fujii, Y., Matsumoto, R., Ichikawa, T., Tateno, H., Hirabayashi, J., Yasumitsu, H., Dogasaki, C., Hosono, M., Nitta, K., Hamako, J., Matsui, T., Ozeki, Y., 2008. Isolation, purification, characterization and glycan-binding profile of a D-galactose specific lectin from the marine sponge, *Halichondria okadae*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 150, 349–357.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Leite, E.J., 2002. State of knowledge on *Myracrodruon urundeuva* Fr. Allemão (Anacardiaceae) for genetic conservation in Brazil. *Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst.* 5, 193–206.
- Leite, Y.F.M.M., Silva, L.M.C.M., Amorim, R.C.N., Freire, E.A., Jorge, D.M.M., Grangeiro, T.B., Benevides, N.M.B., 2005. Purification of a lectin from the marine red alga *Gracilaria ornata* and its effect on the development of the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Biochim. Biophys. Acta* 1724, 137–145.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Lutsik, M.D., Antoniuik, V.A., 1982. New fucose-specific lectin from the bark of dwarf almond golden rain *Laburnum anagyroides* Medik: purification, properties and immunological specificity. *Biochimica* 47, 1710–1715.
- Macedo, M.L.R., Freire, M.G.M., Novello, J.C., Marangoni, S., 2002. Talisia esculenta lectin and larval development of *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Biochim. Biophys. Acta* 1571, 83–88.
- Macedo, M.L.R., Damico, D.C.S., Freire, M.G.M., Toyama, M.H., Marangoni, S., Novello, J.C., 2003. Purification and characterization of an N-acetylglucosamine-binding lectin from *Koeleria paniculata* seeds and its effect on the larval development of *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) and *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Agric. Food Chem.* 51, 2980–2986.
- Macedo, M.L.R., Castro, M.M., Freire, M.G.M., 2004. Mechanisms of the insecticidal action of TEL (*Talisia esculenta* lectin) against *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 56, 84–96.
- Macedo, M.L.R., Freire, M.G.M., Silva, M.B.R., Coelho, L.C.B.B., 2007. Insecticidal action of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Comp. Biochem. Physiol. A* 146, 486–498.
- Miller, J.H., Fedoronko, D.A., Hass, B.D., Myint, M., Kempner, E.S., 1998. Radiation effects on the native structure of proteins: fragmentation without dissociation. *Arch. Biochem. Biophys.* 352, 281–287.
- Monteiro, J.M., Albuquerque, U.P., Lins-Neto, E.M.F., Araújo, E.L., Amorim, E.L.C., 2006. Use patterns and knowledge of medicinal species among two rural communities in Brazil's semi-arid northeastern region. *J. Ethnopharmacol.* 105, 173–186.
- Monti, D., Ferrandi, E.E., Righi, M., Romano, D., Molinari, F., 2008. Purification and characterization of the enantioselective esterase from *Kluyveromyces marxianus* CBS 1553. *J. Biotechnol.* 133, 65–72.
- Morais, S.A.L., Nascimento, E.A., Queiroz, C.R.A.A., Pilo-Veloso, D., Drumond, M.G., 1999. Studies on polyphenols and lignin of *Astronium urundeuva* wood. *J. Braz. Chem. Soc.* 10, 447–452.
- Moreira, M.F., Santos, A.S., Marotta, H.R., Mansur, J.F., Ramos, I.B., Machado, E.A., Souza, G.H.M.F., Eberlin, M.N., Kaiser, C.R., Kramer, K.J., Muthukrishnan, S., Vasconcelos, A.M.H., 2007. A chitin-like component in *Aedes aegypti* eggshells, eggs and ovaries. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37, 1249–1261.
- Moreno, F.B., Oliveira, T.M., Martil, D.E., Viçoti, M.M., Bezerra, G.A., Abrego, J.R., Cavada, B.S., Azevedo Jr, W.F., 2008. Identification of a new quaternary association for legume lectins. *J. Struct. Biol.* 161, 133–143.
- Muthukrishnan, S., Arakane, Y., Hogenkamp, D., Specht, C.A., Beeman, R.W., Kanost, M.R., Kramer, K.J., Zimoch, L., Merzendorfer, H., 2007. 14.3. Insect chitin synthase genes CHS-A and CHS-B are specialized for synthesis of epidermal cuticle and midgut peritrophic matrix. *Comp. Biochem. Physiol. A* 148, S–57 (Supplement 1).
- Navarro, D.M.A.F., Oliveira, P.E.S., Potting, R.J.P., Brito, A.C., Fital, S.J.F., Sant'Ana, A.E.G., 2003. The potential attractant or repellent effects of different water types on oviposition in *Aedes aegypti* L. (Dipt., Culicidae). *J. Appl. Entomol.* 127, 46–50.
- Ng, T.B., Lam, Y.W., 2002. Isolation of a novel agglutinin with complex carbohydrate binding specificity from fresh fruiting bodies of the edible mushroom *Lyophyllum shimeiji*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290, 563–568.
- Ormena, M.C., Navarro, D.M.A.F., Paula, J.E., Luna, J.S., Lima, M.R.F., Sant'Ana, A.E.G., 2007. Larvicidal activities against *Aedes aegypti* of some Brazilian medicinal plants. *Bioresour. Technol.* 98, 2549–2556.
- Paes, J.B., Morais, V.M., Lima, C.R., 2002. Resistência das madeiras de aroeira (*Myracrodruon urundeuva*), cássia (*Senna siamea*) e ipê (*Tabebuia impetiginosa*) a fungos e cupins xilófagos em condições de laboratório. *Flor. Amb.* 9, 135–144.
- Paiva, P.M.G., Coelho, L.C.B.B., 1992. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (camaratu bean). *Appl. Biochem. Biotechnol.* 36, 113–118.
- Peumans, W.J., Van Damme, E.J.M., 1995. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiol.* 109, 347–352.
- Ramos, M.V., Bandeira, G.P., Freitas, C.D.T., Nogueira, N.A.P., Alencar, N.M.N., Sousa, P.A.S., Carvalho, A.F.U., 2006. Latex constituents from *Calotropis procera* (R. Br.) display toxicity upon egg hatching and larvae of *Aedes aegypti* (Linn.). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 101, 503–510.
- Reisfeld, R.A., Lewis, U.J., Williams, D.E., 1962. Disk electrophoresis of basic protein and peptides on polyacrylamide gels. *Nature* 195, 281–283.
- Roberts, L., 2002. Mosquitoes and disease. *Science* 298, 82–83.
- Rudin, W., Hecker, H., 1989. Lectin-binding sites in the midgut of the mosquitoes *Anopheles stephensi* Liston and *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Parasitol. Res.* 75, 268–279.
- Sá, R.A., Napoleão, T.H., Santos, N.D.L., Gomes, F.S., Albuquerque, A.C., Xavier, H.S., Coelho, L.C.B.B., Bieber, L.W., Paiva, P.M.G., 2008. Induction of mortality on *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae) by *Myracrodruon urundeuva* heartwood lectin. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* doi:10.1016/j.ibiod.2008.04.003.
- Saha, P., Majumder, P., Dutta, I., Ray, T., Roy, S.C., Das, S., 2006. Transgenic rice expressing *Allium sativum* leaf lectin with enhanced resistance against sap-sucking insect pests. *Planta* 223, 1329–1343.
- Santi-Gadelha, T., Gadelha, C.A.A., Aragão, K.S., Oliveira, C.C., Mota, M.R.L., Gomes, R.C., Pires, A.F., Toyama, M.H., Toyama, D.O., Alencar, N.M.N., Criddle, D.N., Assrey, A.M.S., Cavada, B.S., 2006. Purification and biological effects of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) seed lectin. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 350, 1050–1055.
- Santos, A.F.S., Argolo, A.C.C., Coelho, L.C.B.B., Paiva, P.M.G., 2005. Detection of water soluble lectin and antioxidant component from *Moringa oleifera* seeds. *Water Res.* 39, 975–980.
- Sauvion, N., Nardon, G., Febvay, G., Gatehouse, A.M.R., Rahbé, Y., 2004. Binding of the insecticidal lectin Concanavalin A in pea aphid *Acyrtosiphon pisum* (Harris) and induced effects on the structure of midgut epithelial cells. *J. Insect Physiol.* 50, 1137–1150.
- Silva, W.J., Dória, G.A.A., Maia, R.T., Nunes, R.S., Carvalho, G.A., Blank, A.F., Alves, P.B., Marçal, R.M., Cavalcanti, S.C.H., 2008. Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: alternatives to environmentally safe insecticides. *Bioresour. Technol.* 99, 3251–3255.
- Souza, S.M.C., Aquino, L.C.M., Milach Jr, A.C., Bandeira, M.A.M., Nobre, M.E.P., Viana, G.S.B., 2006. Anti-inflammatory and antiulcer properties of tannins from *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae) in rodents. *Phytother. Res.* 21, 220–225.

- Tellam, R.L., Wijffels, G., Wiladsen, P., 1999. Peritrophic matrix proteins. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 29, 87–101.
- Thakur, A., Rana, M., Lakhnpal, T.N., Ahmad, A., Khan, M.I., 2007. Purification and characterization of lectin from fruiting body of *Ganoderma lucidum*. *Biochim. Biophys. Acta* 1770, 1404–1412.
- Trindade, M.B., Lopes, J.L.S., Soares-Costa, A., Monteiro-Moreira, A.C., Moreira, R.A., Oliva, M.L.V., Beltrami, L.M., 2006. Structural characterization of novel chitin-binding lectins from the genus *Artocarpus* and their antifungal activity. *Biochim. Biophys. Acta* 1764, 146–152.
- Ueno, M., Arai, T., Kojima, K., Ogawa, H.K., Matsumoto, I., Seno, N., 1992. Improved affinity chromatographic purification of D-mannose-N-acetyl-glucosamine-specific lectin from the bark of *Sophora japonica* eliminating the loss by sugar specific self-aggregation. *J. Chromatogr.* 597, 197–200.
- Van Damme, E.J., Hause, B., Hu, J., Barre, A., Rougé, P., Proost, P., Peumans, W.J., 2002. Two distinct jacalin-related lectin with a different specificity and subcellular location are major vegetative storage proteins in the bark of the black mulberry tree. *Plant Physiol.* 130, 757–769.
- Viana, G.S.B., Bandeira, M.A.M., Matos, F.J.A., 2003. Analgesic and antiinflammatory effects of chalcones isolated from *Myracrodruon urundeuva* Allemão. *Phytomedicine* 10, 189–195.
- Wititsuwannakul, R., Wititsuwannakul, D., Sakulborirug, C., 1998. A lectin from the bark of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Phytochemistry* 47, 183–187.
- World Health Organization, 1981. Instructions for Determining the Susceptibility or Resistance of Mosquito Larvae to Insecticides. WHO/VBC/81.807, pp. 1–6.
- World Health Organization, 2001. Yellow Fever. Fact sheet 100.
- World Health Organization, 2002. Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever. Fact sheet 117.
- Zhu-Salzman, K., Shade, R.E., Koiwa, H., Salzman, R.A., Narasimhan, M., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., Murdock, L.L., 1998. Carbohydrate binding and resistance to proteolysis control insecticidal activity of *Griffonia simplicifolia* lectin II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 15123–15128.
- Zhu-Salzman, K., Salzman, R.A., 2001. Functional mechanics of the plant defensive *Griffonia simplicifolia* lectin II: resistance to proteolysis is independent of glycoconjugate binding in the insect gut. *J. Econ. Entomol.* 94, 1280–1284.

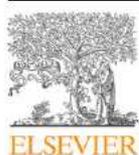
6. CONCLUSÃO

- A lectina do cerne e entrecasca de *M. urundeuva* foi isolada por cromatografia em coluna de quitina com elevada atividade hemaglutinante e em quantidade suficiente para realização dos bioensaios propostos;
- A lectina do cerne inibiu o crescimento de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas e foi mais eficaz que o antifúngico Cercobin na inibição do crescimento de fungos fitopatogênicos;
- A atividade antimicrobiana detectada revela o envolvimento da lectina na resistência do cerne de *M. urundeuva* contra agentes causadores de deterioração biológica;
- A indicação de uma nova lectina atuando como um dos componentes envolvidos nos mecanismos que conferem resistência à madeira reforça um dos aspectos fisiológicos dessas proteínas.
- A ação inseticida de lectinas de *M. urundeuva*, potencializada após a purificação, sobre insetos que não se alimentam de madeira, como é o caso de *Aedes aegypti*, evidencia que sua propriedade inseticida pode ser explorada biotecnologicamente no controle de diversos insetos, inclusive de importância médica.

7. ANEXOS

International Biodeterioration & Biodegradation (impacto: 1,375)

International Biodeterioration & Biodegradation 62 (2008) 460–464



Contents lists available at ScienceDirect

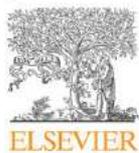
International Biodeterioration & Biodegradation

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ibiod

Induction of mortality on *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae)
by *Myracrodruon urundeuva* heartwood lectin

Roberto A. Sá^a, Thiago H. Napoleão^b, Nataly D.L. Santos^b, Francis S. Gomes^b, Auristela C. Albuquerque^c,
Haroudo S. Xavier^d, Luana C.B.B. Coelho^b, Lothar W. Bieber^a, Patrícia M.G. Paiva^{b,*}

International Biodeterioration & Biodegradation 63 (2009) 470–477



Contents lists available at ScienceDirect

International Biodeterioration & Biodegradation

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ibiod

Antioxidant, *Fusarium* growth inhibition and *Nasutitermes corniger* repellent
activities of secondary metabolites from *Myracrodruon urundeuva* heartwood

Roberto A. Sá^a, Adriana C.C. Argolo^b, Thiago H. Napoleão^b, Francis S. Gomes^b, Nataly D.L. Santos^b,
Carla M.L. Melo^b, Auristela C. Albuquerque^c, Haroudo S. Xavier^d, Luana C.B.B. Coelho^b,
Lothar W. Bieber^a, Patrícia M.G. Paiva^{b,*}

International Biodeterioration & Biodegradation 63 (2009) 334–340



Contents lists available at ScienceDirect

International Biodeterioration & Biodegradation

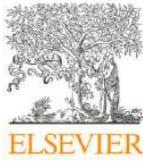
journal homepage: www.elsevier.com/locate/ibiod

Purified *Cladonia verticillaris* lichen lectin: Insecticidal activity on *Nasutitermes*
corniger (Isoptera: Termitidae)[☆]

Michele D.C. 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,*}

Chemosphere (impacto: 3,054)

Chemosphere xxx (2009) xxx–xxx



Contents lists available at ScienceDirect

Chemosphere

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chemosphere



Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae

Juliane S. Coelho^a, Nataly D.L. Santos^a, Thiago H. Napoleão^a, Francis S. Gomes^a, Rodrigo S. Ferreira^a,
Russolina B. Zingali^b, Luana C.B.B. Coelho^a, Sônia P. Leite^c, Daniela M.A.F. Navarro^d, Patrícia M.G. Paiva^{a,*}