

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

**LECTINA E METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DO CERNE DE
Myracrodruon urundeuva: ATIVIDADES ANTIOXIDANTE,
ANTIFÚNGICA SOBRE *Fusarium* E TERMITICIDA SOBRE
*Nasutitermes corniger***

THIAGO HENRIQUE NAPOLEÃO

ORIENTADORA: Prof^ª Dra. PATRÍCIA MARIA GUEDES PAIVA

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. ROBERTO ARAÚJO SÁ

**RECIFE
2009**

THIAGO HENRIQUE NAPOLEÃO

LECTINA E METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DO CERNE DE
Myracrodruon urundeuva: ATIVIDADES ANTIOXIDANTE,
ANTIFÚNGICA SOBRE *Fusarium* E TERMITICIDA SOBRE *Nasutitermes*
corniger

ORIENTADORA: Prof^ª Dra. PATRÍCIA MARIA GUEDES PAIVA

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. ROBERTO ARAÚJO SÁ

RECIFE
2009

Napoleão, Thiago Henrique

Lectina e metabólitos secundários do cerne de *Myracrodruon urundeuva*: atividades antioxidante, antifúngica sobre *Fusarium* e termicida sobre *Nasutitermes corniger* / Thiago Henrique Napoleão. – Recife: O Autor, 2009.

65 folhas : il., fig., tab.

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

Inclui bibliografia.

1. Lectinas 2. Aroeira-do-sertão 3. Atividade antioxidante 4. Atividade antifúngica I Título.

572.6 CDD (22.ed.)

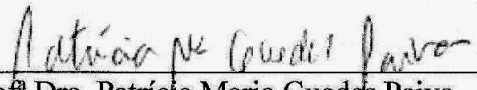
UFPE/CCB–2009–163

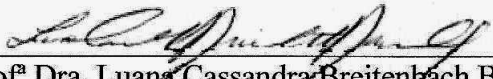
THIAGO HENRIQUE NAPOLEÃO

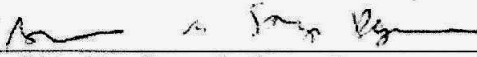
LECTINA E METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DO CERNE DE
Myracrodruon urundeuva: ATIVIDADES ANTIOXIDANTE,
ANTIFÚNGICA SOBRE *Fusarium* E TERMITICIDA SOBRE *Nasutitermes*
corniger

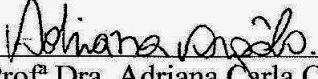
Dissertação apresentada para o cumprimento
parcial das exigências para obtenção do título de
Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela
Universidade Federal de Pernambuco.

Aprovado por:


Prof^a Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva – Presidente


Prof^a Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho


Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra


Prof^a Dra. Adriana Carla Cavalcante Malta Argôlo

Data: 25 / 08 / 2009

*Aos meus pais, Rosângela e Luiz Carlos,
e aos meus irmãos, Daniella e Guilherme.*

“Ir à luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão, perder com classe e viver com ousadia. Pois o triunfo pertence a quem se atreve, e a vida é muito bela para ser insignificante”.

(Charles Chaplin)

SUMÁRIO

	Pág.
AGRADECIMENTOS	7
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS	10
RESUMO	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUÇÃO	13
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
2.1. Mecanismos de defesa das plantas	15
2.2. Madeiras	16
2.2.1. Características	16
2.2.2. Resistência das madeiras ao ataque de insetos e microrganismos	17
2.3. Substâncias naturais com ação inseticida	18
2.3.1. Metabólitos secundários	19
2.3.2. Lectinas	20
2.3.2.1. Purificação e caracterização de lectinas	21
2.3.2.2. Aplicações biotecnológicas	22
2.3.2.3. Papel fisiológico e propriedades biológicas das lectinas de plantas	23
2.3.2.4. Lectinas com atividade inseticida	23
2.4. A aroeira-do-sertão, <i>Myracrodruon urundeuva</i> (Anacardiaceae)	26
2.4.1. Lectinas de <i>M. urundeuva</i>	29
2.5. Cupins	30
2.5.1. O gênero <i>Nasutitermes</i>	33
3. OBJETIVOS	35
3.1. Geral	35
3.2. Específicos	35
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
5. ARTIGO 1	48
Induction of mortality on <i>Nasutitermes corniger</i> (Isoptera, Termitidae) by <i>Myracrodruon urundeuva</i> heartwood lectin	

5.1. CONCLUSÕES – ARTIGO 1	54
6. ARTIGO 2	55
Antioxidant, <i>Fusarium</i> growth inhibition and <i>Nasutitermes corniger</i> repellent activities of secondary metabolites from <i>Myracrodruon urundeuva</i> heartwood	
6.1. CONCLUSÕES – ARTIGO 2	64
7. CONCLUSÕES	65

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela graça da vida, pela saúde, pela oportunidade de conviver com todos que me cercam e pela confiança, acima e apesar de tudo.

Aos meus pais, Rosângela e Luiz Carlos, pelo amor, carinho, paciência, apoio e incentivo ao longo de todos os meus dias e principalmente nessa minha jornada acadêmica.

Aos meus irmãos, Daniella e Guilherme, pelo amor, convívio e desafios enfrentados juntos durante todos esses anos.

A toda minha família pelo amor, incentivo e confiança.

À professora Patrícia Paiva, pelo apoio, estímulo, confiança, exemplo, incentivo, amizade e orientação durante toda a Graduação e o Mestrado.

Ao professor Roberto Sá, pela amizade, confiança, ensinamentos e tudo mais que proporcionou para o meu crescimento como pessoa e pesquisador, desde o meu primeiro dia no laboratório.

Às professoras Luana Coelho e Tereza Correia pelo apoio e exemplo dispensados.

Aos meus grandes amigos e companheiros Nataly e Francis, pela amizade inabalável, sincera, confiante e divertida que nos une desde o início da graduação, que perdura hoje e continuará para sempre.

Ao meu grande amigo Emmanuel, pela amizade sincera e por todo o apoio, companheirismo, confiança e generosidade.

Aos grandes amigos Edna, Andreza, Paulo, Emmanuela, Lidiane, Luciana, Thâmarah, Thamara, Maiara, Tati, Breno, Taísa, Nathália, Liana e Syllas pela amizade que nos uniu, nos une e unirá para sempre.

A todos os amigos que fazem ou fizeram parte do Laboratório de Glicoproteínas durante esses cinco anos de convivência, em especial: Giselly, Fernando, Felipe, Michele, Regina, Andréa Sales, Kézia, Rodrigo, Adriana, Lucíola, Ana Luiza, Juliene, Amanda, Cris, Mariana, Neila, Vanessa, Flávia, Andréa Santos, Erika, Maria, Cynthia, Romero, Zé Roberto, Bernardo, Raiana, Cynarha e Mércia.

Aos demais amigos, de todos os lugares e épocas, Lígia, Carla, Ana Paula, Túlio, Simone, Mariella, Buonafina, Bela, Carol, Juliana, Elô, Laura, Paulo, Mirela, Alice, Rafael, Amanda, Bruninho, Brunão, Artur, Sheila, Edson, Diele, Ferrugem e todos os demais.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica da UFPE, em especial Seu João, Neide, Miron e Djalma.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. (A) Esquema da estrutura anatômica de uma madeira. (B) Corte transversal do tronco de um exemplar de <i>Taxus sp.</i> evidenciando o cerne e o albúneo bem definidos.	16
Figura 2. Representação esquemática de aglutinação por lectinas.	21
Figura 3. <i>Myracrodruon urundeuva</i> . (A) Casca; (B) madeira; (C) toras de aroeira.	27
Figura 4. <i>Myracrodruon urundeuva</i> . (A) Aspecto geral; (B) indivíduo do Cerrado que já perdeu parte de suas folhas; (C) folhas; (D) inflorescência; (E) flores.	28
Figura 5. Cromatografia em coluna de quitina para isolamento de MuBL (A) e MuHL (B). Eletroforeses de MuBL (a) e MuHL (b) em gel de poliacrilamida em condições nativas para proteínas básicas (1) e em condições desnaturantes (2).	29
Figura 6. Localização de ninhos e galerias de alguns gêneros de cupins.	30
Figura 7. Cupins do gênero <i>Nasutitermes</i> . (A) Rainha de <i>Nasutitermes euphratae</i> ; (B) operário; (C) soldado; (D) ninho de <i>Nasutitermes</i> , construído no solo.	34
 <u>ARTIGO 1</u>	
Fig. 1. Effect of contact with <i>M. urundeuva</i> heartwood lectin on <i>N. corniger</i> workers (A) and soldiers (B). Treatments were lectin at concentrations of 0.1 (–), 0.2 (◊), 0.4 (♦), and 0.8 mg.ml ⁻¹ (Δ). 0.15 M NaCl was used as negative control (□). Each point represents the mean ± S.D. of five experiments.	51
 <u>ARTIGO 2</u>	
Fig. 1. Growth in PDA medium of <i>F. decemcellulare</i> (A), <i>F. lateritium</i> (B), <i>F. moniliforme</i> (C), <i>F. oxysporum</i> (D) and <i>F. solani</i> (E) at presence of methanolic (Δ) and saline (▲) extracts, distilled water (□, negative control) and 10 ppm cercobin (○, positive control). Each point represents the mean ± SD of three experiments.	59
Fig. 2. Survival of workers (A and C) and soldiers (B and D) of <i>N. corniger</i> at presence of methanolic (A and B) and saline (C and D) extracts at concentrations of 0.25 (▲) 0.5 (◊), 1.0 (♦), 2.0 (■) and 3.0 (Δ) mg ml ⁻¹ . Distilled water (□) was used as negative control. Each point represents the mean ± SD of five experiments. The concentration required to kill 50% of insects in each treatment (LC ₅₀) was determined using probit analysis with a reliability interval of 95%.	60
Fig. 3. Aspects of termite repellence assay at time zero in a superior view (A) and after 6 (B) 11 (C) and 13 (D) days of test in an inferior view. The samples evaluated were distilled water (1) and methanolic extract at concentrations of 0.5 (2), 1.0 (3), 2.0 (4) and 3.0 (5) mg ml ⁻¹ . The arrows indicate insects and closed gallery next to the well containing ME at 3.0 mg ml ⁻¹	61

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1. Lectinas de plantas com ação inseticida.	24
<u>ARTIGO 1</u>	
Table 1. Summary of lectin isolation from <i>M. urundeuva</i> heartwood	50

RESUMO

Cerne de *Myracrodruon urundeuva* é resistente à biodeterioração por fungos e cupins que promovem danos severos à madeira. Este trabalho descreve as atividades antioxidante, antifúngica e repelente contra *Nasutitermes corniger* de metabólitos secundários de cerne de *M. urundeuva* e atividade termiticida da lectina de cerne de *M. urundeuva* (MuHL). Extrato salino (ES, preparação com atividade hemaglutinante) e extrato metanólico (EM, sem atividade hemaglutinante) contêm compostos fenólicos, ácido gálico, flavonóides, luteolina, derivados cinâmicos, proantocianidinas, taninos hidrolisáveis e leucoantocianidinas. Ambos ES e EM mostraram atividade antioxidante e foram efetivos na inibição do crescimento de *Fusarium*. ES foi eficiente contra *F. decemcellulare*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum*, e *F. solani*, mas ele teve pouco efeito contra *F. lateritium*. EM praticamente não teve efeito sobre *F. decemcellulare* e foi mais ativo do que ES contra *F. lateritium*. ES induziu mortalidade de *N. corniger* (CL₅₀ de 1,81 mg/mL para soldados e 2,59 mg/mL para operários) e não teve atividade repelente. EM não teve atividade termiticida, mas foi um bom repelente. A presença de MuHL foi detectada em ES. MuHL foi isolada por cromatografia de afinidade (coluna de quitina) e o efeito da lectina sobre *N. corniger* foi avaliado pelos ensaios termiticida e repelente. MuHL foi submetida a tratamento com tripsina e analisada para a presença de contaminantes não protéicos. A atividade da lectina foi inibida pelo monossacarídeo N-acetilglicosamina e adsorveu na coluna de quitina. A preparação lectínica foi livre de metabólitos secundários que podem promover a mortalidade de insetos. Contato com lectina em todas as concentrações induziu mortalidade dos cupins. Os valores de CL₅₀ foram 0,248 mg/mL para operários e 0,199 mg/mL para soldados, após 4 dias. Ensaio repelente indicou que a lectina não induziu um efeito de rejeição. A lectina permaneceu ativa após incubação com tripsina bovina. Este é o primeiro relato do efeito tóxico de lectinas sobre térmitas. As bioatividades detectadas assinalam a possibilidade da participação de metabólitos secundários e MuHL na resistência do cerne de *M. urundeuva* à biodeterioração. Adicionalmente, os resultados indicam o uso de resíduos de madeira como fonte de agentes bioativos naturais.

Palavras-chaves: Antioxidante; *Fusarium*; Lectina; *Myracrodruon urundeuva*; *Nasutitermes corniger*; metabólitos secundários.

ABSTRACT

Myracrodruon urundeuva heartwood is resistant to biodeterioration by fungus and termites that can promote severe damage in wood. This report describes antioxidant, antifungal and *Nasutitermes corniger* repellent activities of secondary metabolites from *M. urundeuva* heartwood and termiticide activity of *M. urundeuva* heartwood lectin (MuHL). Saline (SE, active hemagglutinin preparation) and methanolic (ME, without hemagglutinating activity) extracts contain phenolic compounds, gallic acid, flavonoids, luteolin, cinamic derivatives, proanthocyanidins, hydrolysable tannins, and leucoanthocyanidins. Both SE and ME showed antioxidant activity and were effective in *Fusarium* growth inhibition. SE was efficient against *F. decemcellulare*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum*, and *F. solani* but it had little effect against *F. lateritium*. ME practically had no effect on *F. decemcellulare* and was more active than SE against *F. lateritium*. SE induced mortality of *Nasutitermes corniger* (LC₅₀ of 1.81 mg/mL for soldiers and 2.59 mg/mL for workers) and had no repellent activity. ME had no termiticidal activity but was a good repellent. The presence of MuHL was detected in SE. MuHL was isolated by affinity chromatography (chitin column) and lectin's effect on *N. corniger* was evaluated by termiticidal and repellence assays. MuHL was submitted to trypsin treatment and analyzed for the presence of non-protein contaminants. Lectin activity was inhibited by N-acetylglucosamine monosaccharide and adsorbed on a chitin column. The lectin preparation obtained was free of secondary plant metabolites that can promote insect mortality. Contact with lectin in all concentrations induced mortality of termites. The values of LC₅₀ were 0.248 mg/mL for workers and 0.199 mg/mL for soldiers, after 4 days. Repellence assay indicated that the lectin did not induce a rejection effect. The lectin remained active after incubation with bovine trypsin. This is the first report of lectin's toxic effect on termites. The detected bioactivities points out the possibility of participation of secondary metabolites and MuHL in the resistance of *M. urundeuva* heartwood to biodeterioration. Additionally, the results indicate the use of wood residues a source of natural bioactive agents.

Keywords: Antioxidant; *Fusarium*; Lectin; *Myracrodruon urundeuva*; *Nasutitermes corniger*; Secondary metabolites.

1. INTRODUÇÃO

Insetos e plantas mantêm complexos mecanismos de interações na natureza que podem ser benéficos para ambos ou para apenas um deles. Grande parte da evolução das interações entre insetos e plantas tem sido ao nível químico. As plantas adquiriram um vasto “arsenal” de estratégias de defesa em resposta à pressão de patógenos e herbívoros, a fim de aumentar as chances de sobrevivência e reprodução (EDWARDS & WRATTEN, 1981; DEL-CLARO & SILINGARDI, 2001).

As estratégias de defesa das plantas contra herbívoros envolvem a participação de fatores físicos e químicos. A defesa química é proporcionada por substâncias tóxicas e repelentes produzidas pela planta. A co-evolução bioquímica entre plantas e predadores levou à diversificação e especialização dos mecanismos de defesa, de tal forma que, por exemplo, plantas que não apresentam perigo para o homem podem ser altamente tóxicas para outros grupos de animais, como pássaros, peixes e principalmente insetos (HARBORNE, 1993).

As toxinas de plantas podem ser compostos do metabolismo primário, como algumas proteínas de defesa, ou do metabolismo secundário, como alcalóides, e aminoácidos não-protéicos, como a canavanina e a cianoalanina (HARBORNE, 1993). Lectinas, proteínas que se ligam a carboidratos, são amplamente encontradas em plantas e apresentam atividades antimicrobiana e inseticida (MACEDO *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2008; SÁ *et al.*, 2009a; SÁ *et al.*, 2009b).

Os ecossistemas florestais constituem uma complexa base de recursos naturais que proporciona mercadorias e serviços para o desenvolvimento social, cultural e econômico, principalmente nos países em desenvolvimento (MBURU *et al.*, 2007). As madeiras estão entre os produtos naturais de maior importância e têm sido superexploradas em países tropicais, inclusive visando o financiamento da industrialização e a quitação de débitos externos (PRIMACK & RODRIGUES, 2001). Muitas vezes, mesmo quando o corte de árvores é feito legalmente, o manejo da madeira é realizado de forma inadequada. Em algumas indústrias madeireiras na Região Amazônica, a perda em volumes de toras chega a 60%, principalmente devido à deterioração por fungos e insetos, principalmente cupins, e às condições inadequadas de armazenamento (SALES-CAMPOS *et al.*, 2000; ABREU *et al.*, 2002).

Sabe-se que algumas árvores apresentam madeira que não é atacada pelos principais agentes biodeterioradores. Conhecidas como “madeiras-de-lei”, são

intensamente exploradas e impactadas devido a essa elevada resistência. O conhecimento dos fatores – físicos e químicos – que conferem resistência a madeiras é de suma importância para recomendação da utilização das peças, bem como para evitar custos econômicos e ambientais desnecessários com a reposição de peças deterioradas. Assim, o impacto sobre as florestas remanescentes é reduzido, uma vez que o emprego de madeiras com menor risco de deterioração e de métodos eficientes de tratamento de madeiras menos resistentes pode reduzir o corte de árvores (PAES *et al.*, 2004; PAES *et al.*, 2007). A preservação de madeiras através de tratamentos físicos e químicos levanta outra importante questão econômico-ambiental. A preocupação com o uso de substâncias químicas de alta toxicidade ao ambiente tem levado à busca por novas estratégias como, por exemplo, o tratamento térmico (HILL *et al.*, 2005).

Devido a suas propriedades, a aroeira-do-sertão, *Myracrodruon urundeuva*, tem sido principalmente utilizada na confecção de cercas, estacas e postes e se tornou uma das espécies de plantas lenhosas mais ameaçadas no mundo (LORENZI, 2000; LEITE, 2002; ALMEIDA-CORTEZ *et al.*, 2007). *M. urundeuva* está incluída na lista de espécies ameaçadas do Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA, 1992) na categoria “vulnerável” e entre as espécies prioritárias para conservação no Brasil listadas pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (LEITE, 2002). A nível mundial, *M. urundeuva* está citada (como *Astronium urundeuva*) no Livro Vermelho de Espécies Ameaçadas de Extinção da União Mundial para a Conservação da Natureza (IUCN, 2007) para todas as áreas de ocorrência.

Visando identificar compostos presentes no cerne de *M. urundeuva* com atividade deletérea sobre fitopatógenos, esse trabalho investigou: (1) o efeito de metabólitos secundários e da lectina do cerne de *M. urundeuva* (MuHL, do inglês *M. urundeuva heartwood lectin*) quanto às atividades termiticida e repelente sobre cupins *Nasutitermes corniger*; (2) a presença de atividade antioxidante em extrato metanólico do cerne; e (3) a atividade antifúngica de extrato metanólico do cerne contra espécies de *Fusarium*.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Mecanismos de defesa das plantas

A evolução do conhecimento dentro da Bioquímica Ecológica tem iluminado os diversos graus de complexas interações e adaptações co-evolucionárias que ocorrem entre plantas e plantas, plantas e animais e animais e animais. As plantas desenvolveram mecanismos de resposta e defesa a agressões de predadores e infecções por microrganismos. Dessa forma, elas sempre conseguiram dominar as paisagens do planeta apesar de, teoricamente, os herbívoros e patógenos terem a capacidade de destruí-las em larga escala (HARBORNE, 1993; RICKLEFS, 2003).

A dimensão dos danos causados por fitopatógenos e pestes de insetos depende do hábito e do tamanho da população do agente causador e da resistência da planta ao tipo de ataque (KOGAN, 1994). A resistência é a manifestação da interação entre a planta, o herbívoro ou patógeno e o ambiente, em consequência de uma evolução paralela durante um longo período de tempo. A maioria das estratégias que as plantas utilizam para reduzir os danos causados por herbívoros envolvem a associação com outras espécies, a fuga espacial e temporal, o desenvolvimento de mecanismos que permitam tolerar a presença do herbívoro ou o confronto, através do uso de defesas químicas e físicas (KENNEDY & BARBOUR, 1992; HARBORNE, 1993; RAVEN *et al.*, 2004).

Adaptações morfológicas relacionadas à defesa das plantas incluem, por exemplo, espinhos, acúleos e caules rígidos. A defesa química das plantas ao ataque de microrganismos e herbívoros pode ser mediada por diversas substâncias, incluindo metabólitos primários (por exemplo, proteínas de defesa) e secundários (por exemplo, alcalóides, flavanóides, taninos e rotenóides). Esses compostos agem de diferentes maneiras, apresentando efeitos repelente, deterrente (afastador) alimentar, deterrente de oviposição, inibidor de crescimento e tóxico, por exemplo. Os metabólitos secundários têm elevada eficiência, apesar do alto custo energético de síntese (HARBORNE, 1993; CAVALCANTE *et al.*, 2006). Proteínas de plantas que podem estar envolvidas em mecanismos de defesa são: as lectinas, as proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs), os inibidores de proteases e glicohidrolases, as arcelinas, as quitinases, a canatoxina e formas modificadas de proteínas de reserva (CARLINI & GROSSI-DE-SÁ, 2002; MACEDO *et al.*, 2003).

2.2. Madeiras

2.2.1. Características

A madeira é o material orgânico de maior durabilidade, sendo um biopolímero natural constituído principalmente por celulose, hemicelulose e lignina, que são os principais responsáveis pelas propriedades físicas e químicas. Ocorrem ainda outras substâncias variáveis em quantidade e estrutura, chamadas de extrativos. Metabólitos secundários (alcalóides, flavonóides, terpenóides e outros compostos fenólicos) presentes em madeiras estão entre os compostos chamados de extrativos. O papel dos extrativos na madeira vem sendo estudado e, geralmente, parecem estar envolvidos como auxiliares nos processos de sustentação e defesa. A madeira tem diversas formas de utilização devido a suas características energética, química e modelável (LEPAGE *et al.*, 1986; DEKA *et al.*, 2002).

A estrutura complexa das madeiras, esquematizada de forma geral na Figura 1A, varia de acordo com os aspectos da fisiologia de cada árvore, mas o corte transversal do tronco de uma planta lenhosa revela, exceto em alguns casos, a presença de dois tecidos bem distintos (Figuras 1A e 1B): o cerne, que é a parte central, mais escura, e o alburno, a zona mais clara (RAVEN *et al.*, 2004).

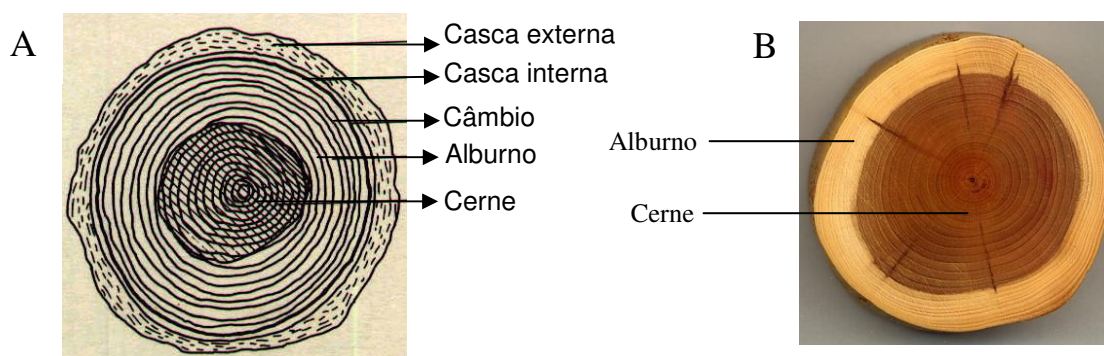


Figura 1. (A) Esquema da estrutura anatômica de uma madeira. (B) Corte transversal do tronco de um exemplar de *Taxus sp.* evidenciando o cerne e o alburno bem definidos.

A: retirado de Silva (2000). B: http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Taxus_wood.jpg

O alburno é formado por células vivas responsáveis pelo transporte da seiva bruta e por processos metabólicos de digestão e respiração. Já o cerne, considerado um tecido morto por alguns autores, é formado por células contendo material que proporciona suporte

e resistência estrutural. A cor escura do cerne está relacionada com o aumento no teor de compostos fenólicos que são sintetizados nas células do parênquima. À medida que novas células são produzidas pelo câmbio, a parte mais interna do alburno é convertida em cerne (OLIVEIRA *et al.*, 1986; SILVA, 2002; RAVEN *et al.*, 2004). Ainda permanece questionável o fato do cerne ser um tecido realmente morto (SHIGO, 2001).

2.2.2. Resistência das madeiras ao ataque de insetos e microorganismos

Segundo o IBAMA, são chamadas de madeira-de-lei todas as árvores de grande porte que apresentam características de resistência à deterioração. A resistência natural de uma madeira a agentes deterioradores físicos, químicos e biológicos varia entre espécies e dentro da mesma árvore, sendo proveniente do potencial genético de cada indivíduo (PANSIN & ZEEUW, 1980; BOTELHO *et al.*, 2000). A resistência à deterioração biológica tem sido atribuída aos já mencionados extrativos e outras substâncias fenólicas complexas que são tóxicas a fungos, cupins e besouros. Os extrativos também estão relacionados com a proteção contra estresse biótico e abiótico e a manutenção da integridade estrutural (HUNT & GARRATT, 1967; FINDLAY, 1985; CHANG *et al.*, 1999; BECERRA *et al.*, 2002; PAES *et al.*, 2002; BRAND *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2007).

Extrativos e outras substâncias encontradas em madeiras também protegem o cerne devido à sua atividade antioxidante (SCHULTZ & NICHOLAS, 2002; SAMPATH-WILEY *et al.*, 2008). Os antioxidantes protegem o organismo da ação dos radicais livres (por exemplo, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, como o radical hidroxil e peroxinitrito, ONOO⁻) e da sua produção não controlada *in vivo*, que pode provocar danos em lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (SOLER-RIVAS *et al.*, 2000). Compostos antioxidantes nas plantas são induzidos em resposta a fatores que possam elevar a concentração de espécies reativas de oxigênio e outros radicais livres, como infecções por fitopatógenos, estresse hídrico e variações sazonais de temperatura e luminosidade (BRAY *et al.*, 2000; KUK *et al.*, 2003; BULBOVAS *et al.*, 2005). Estudos demonstraram que o uso do antioxidante sintético di-terc-butil-metil-fenol ou hidroxitolueno butilado (BHT) aumentou a atividade e diminuiu a depleção de biocidas orgânicos quando foi co-adicionado em uma solução para tratamento de madeiras (SCHULTZ *et al.*, 2006).

Extratos de madeiras resistentes têm sido avaliados quanto à atividade inseticida e antimicrobiana. Becerra *et al.* (2002) encontraram uma correlação entre a concentração de

diterpenos fenólicos e a resistência de madeiras de espécies da família Podocarpaceae aos fungos *Fusarium fujikuroi* e *Fusarium ciliatum*. Grace *et al.* (1989) demonstraram os efeitos repelente e tóxico do extrato metanólico da madeira do ipê-amarelo (*Tabebuia ochracea*, Bignoniaceae) contra *Reticulitermes hesperus* (Rhinotermitidae). Em estudo comparativo da ação dos extratos clorofórmicos das madeiras de espécies de ipê (*Tabebuia sp.*) e itaúba (*Mezilaurus sp.*, Lauraceae), Cabrera *et al.* (2001) mostraram que ambos extratos apresentam compostos tóxicos para o cupim-de-madeira-seca *Cryptotermes brevis* (Kalotermitidae). Um óleo essencial isolado do cerne de *Calocedrus macrolepis* var. *formosana* apresentou potenciais tóxico e repelente contra cupins da espécie *Coptotermes formosanus* (CHENG *et al.*, 2007).

2.3. Substâncias naturais com ação inseticida

Uma substância que seja letal, repelente, deterrente ou inibidora para insetos é classificada como inseticida (ADDOR, 1994). Os inseticidas são amplamente utilizados para controlar populações de espécies-praga que atacam construções e plantações e espécies que transmitem agentes etiológicos de doenças que acometem humanos, que podem inclusive levar à morte.

Substâncias inorgânicas sintéticas foram utilizadas em larga escala a partir da Segunda Guerra Mundial para controlar insetos. Em seguida, vários compostos orgânicos, principalmente inseticidas clorados e organofosforados passaram a ser sintetizados, muitas vezes a partir de produtos que ocorrem naturalmente em algumas plantas (como os análogos de piretróides). Contudo, o uso desses inseticidas começou a ganhar diversas restrições, devido ao fato de que esses inseticidas começaram a apresentar efeitos deletérios e persistentes no ambiente e terminavam por selecionar os indivíduos mais resistentes. Além disso, provocavam distúrbios de saúde graves em trabalhadores das grandes lavouras (PRIMACK & RODRIGUES, 2001; VIEGAS JÚNIOR, 2003).

Dessa forma, a procura por novos compostos de origem natural aumentou, se mostrando como uma alternativa ecológica promissora. A variedade de compostos produzidos pelas plantas envolvidos em mecanismos de defesa contra herbívoros e patógenos tem sido intensamente explorada na busca por produtos naturais que possam ser utilizados no controle de pragas e na manutenção da fitossanidade. A identificação de novas substâncias naturais inseticidas aumenta as possibilidades de rotatividade, minimizando a aquisição de resistência pelos insetos. Atualmente, uma substância

inseticida ecologicamente viável para ser utilizada no controle químico de pragas deve ser eficiente em baixas concentrações e não apresentar toxicidade frente a plantas e outros animais (VIEGAS JÚNIOR, 2003; CAVALCANTE *et al.*, 2006).

Extratos brutos e soluções de óleos voláteis ou de proteínas de plantas são preparações naturais que têm efeito tóxico para insetos (SADEGHI *et al.*, 2006; LIANG *et al.*, 2009; TAVARES *et al.*, 2009). O estudo da atividade inseticida de extratos vegetais não tem como propósito a utilização direta dessas soluções e sim, o conhecimento da composição e dos mecanismos de ação de componentes ativos isolados, para que, na prática, os tratamentos se baseiem na aplicação dos componentes ativos de maior eficiência (CABRERA *et al.*, 2001). O uso direto de extratos é considerado viável quando aplicado de forma integrada, associado a outros métodos de controle, por apresentar um efeito relativamente duradouro (CAVALCANTE *et al.*, 2006; TAVARES *et al.*, 2009).

Compostos fenólicos de plantas, tais como os taninos hidrolisáveis, apresentam efeito deletério sobre herbívoros, incluindo insetos. Harborne (1993) relatou que estes compostos estariam implicados no processo digestivo destes animais, dificultando-o em decorrência da complexação dos taninos com proteínas ligadas à produção de enzimas digestivas.

2.3.1. Metabólitos secundários

Os metabólitos secundários estão presentes nas plantas superiores e apresentam grande diversidade, podendo ser separados em nitrogenados (alcalóides, aminoácidos não-protéicos, aminas, alcalmidas, glicosídeos cianogênicos e glicosinolatos) e não-nitrogenados (monoterpenos, diterpenos, triterpenos, tetraterpenos, sesquiterpenos, saponinas, flavonóides, esteróides, cumarinas). A diversidade é ainda maior, uma vez que esses compostos principais originam diversos derivados, de acordo com o tecido ou órgão da planta e o estágio de desenvolvimento (WINK, 2003).

Os metabólitos secundários estão presentes na planta em um estado ativo ou em um estado que será ativado em caso de ferimentos, infecções ou quando penetram o corpo de um herbívoro, por exemplo. Os efeitos dos metabólitos secundários sobre herbívoros são diversos. Várias interações específicas entre metabólitos secundários e proteínas (enzimas, receptores, canais iônicos e proteínas estruturais) e outros componentes celulares tem sido descritas.

Alcalóides atuam como agonistas ou antagonistas de neurotransmissores e neuroreceptores ou podem se intercalar no DNA ou induzir a alquilação, resultando em distúrbios na replicação e transcrição. Outros metabólitos como fenóis, terpenóides e saponinas afetam herbívoros e microorganismos através de mecanismos menos específicos. Taninos e outros fenóis podem formar pontes de hidrogênio e ligações iônicas com uma grande variedade de proteínas, induzindo modificações conformacionais que podem levar a perda de atividade e função. Terpenos lipofílicos podem influenciar o ambiente das biomembranas. As saponinas, que apresentam amplos efeitos citotóxico e antimicrobiana, são compostos anfifílicos capazes de interagir fortemente com membranas, formando poros e induzindo distúrbios na permeabilidade celular (WINK, 2003).

2.3.2. Lectinas

Relatos têm mostrado a atividade inseticida de lectinas de plantas contra insetos das ordens Lepidoptera (mariposas e borboletas), Coleoptera (besouros), Diptera (moscas e mosquitos) e Homoptera (cigarras, pulgões e cochonilhas) (ISIDRO *et al.*, 2001; CARLINI & GROSSI-DE-SÁ, 2002; MACEDO *et al.*, 2003; TRIGUEROS *et al.*, 2003; SADEGHI *et al.*, 2006; MACEDO *et al.*, 2007; COELHO *et al.*, 2007; SÁ *et al.*, 2009b).

As lectinas são proteínas ou glicoproteínas que ligam a carboidratos, sendo capazes de induzir a aglutinação de diferentes tipos de células ao interagirem com glicoconjugados presentes na superfície celular (Figura 2). As lectinas não têm origem imunológica (GOLDSTEIN *et al.*, 1980; KENNEDY *et al.*, 1995; PEUMANS & VAN DAMME, 1995; CORREIA *et al.*, 2008).

As lectinas estão presentes em todos os reinos da natureza, sendo encontradas em bactérias (IMBERT *et al.*, 2004), algas (LEITE *et al.*, 2005), fungos (KHAN *et al.*, 2007), líquens (SILVA *et al.*, 2009), invertebrados – esponjas (MOURA *et al.*, 2006), cnidários (FENTON-NAVARRO *et al.*, 2003), moluscos (WANG *et al.*, 2007), crustáceos (RITTDACH *et al.*, 2007) e insetos (OURTH *et al.*, 2005) – e vertebrados – peixes (TERADA *et al.*, 2007), répteis (LI *et al.*, 2005), aves (HOGENKAMP *et al.*, 2006) e mamíferos (OLA *et al.*, 2007). Em plantas, as lectinas têm sido isoladas de sementes (SANTOS *et al.*, 2009), folhas (COELHO & SILVA, 2000), flores (ITO, 1986), cascas (INA *et al.*, 2005; SÁ *et al.*, 2009b), rizomas (BAINS *et al.*, 2005) e raízes (WANG & NG, 2006).

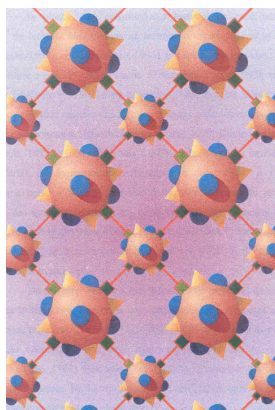


Figura 2. Representação esquemática de aglutinação por lectinas. Lectina  e ligantes da superfície celular , , . Fonte: Kennedy *et al.*, 1995).

2.3.2.1. Purificação e caracterização de lectinas

A primeira etapa na purificação de lectinas é a extração de proteínas em solução salina ou tampão. A detecção de lectinas em uma amostra é feita explorando a capacidade dessas proteínas de aglutinarem células. O ensaio de hemaglutinação é o mais utilizado devido à simplicidade de realização e observação da aglutinação dos eritrócitos, que podem ser previamente tratados ou não (PAIVA & COELHO, 1992; FREIRE *et al.*, 2002). A utilização de diferentes eritrócitos pode revelar uma possível afinidade maior por células de determinado animal.

Alguns agentes químicos, como taninos, lipídeos ou cátions divalentes, em altas concentrações, podem promover dispersão dos eritrócitos, dando uma falsa impressão de formação de rede de aglutinação. Por isso, é necessária a confirmação do caráter aglutinante do fenômeno devido à ação de lectinas, por meio da realização de ensaio de inibição da atividade hemaglutinante por monossacarídeos ou glicoproteínas (CORREIA *et al.*, 2008). A inibição da atividade hemaglutinante define, adicionalmente, a especificidade da lectina. O teste de hemaglutinação é também um método simples que possibilita caracterizar a atividade lectínica em diferentes condições experimentais, como em valores diferentes de pH e temperatura e na presença de enzimas e outras substâncias que podem alterar a atividade da proteína.

Caso apresentem atividade, os extratos são submetidos ao fracionamento salino com sulfato de amônio, que precipita as proteínas e promove purificação parcial (COELHO & SILVA, 2000). Em seguida, as frações obtidas são submetidas à diálise

exaustiva, para eliminar pequenas moléculas, como carboidratos e sal. Técnicas cromatográficas purificam as lectinas de acordo com tamanho da molécula (cromatografia de filtração em gel), carga (cromatografia de troca iônica) e afinidade específica de ligação a carboidratos (cromatografia de afinidade). Métodos eletroforéticos são utilizados para a caracterização estrutural de lectinas, assim como para estabelecer o grau de pureza das mesmas. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) para proteínas nativas revela a natureza de carga líquida da proteína purificada e PAGE sob condições desnaturantes (na presença de dodecilsulfato de sódio) e redutoras (na presença de β -mercaptoetanol) desdobra a proteína em suas subunidades constituintes e revela a massa molecular das mesmas. Além disso, coloração específica com o reativo de Schiff no gel de poliacrilamida pode indicar a natureza glicoprotéica da proteína (PAIVA & COELHO, 1992; KENNEDY *et al.*, 1995; COELHO & SILVA, 2000; PAIVA *et al.*, 2006; SÁ *et al.*, 2009b).

2.3.2.2. Aplicações biotecnológicas

Devido às suas diversas propriedades biológicas, as lectinas apresentam uma vasta gama de aplicações biotecnológicas, com os mais diversos fins. Atualmente, as lectinas aparecem como ferramentas de destaque no campo da tecnologia de bioreconhecimento. Na área conhecida como lectinômica, técnicas de *microarrays* utilizando lectinas têm sido desenvolvidas como ferramentas eficientes para decifrar o glicocódigo que reflete o estado fisiológico da célula (GEMEINER *et al.*, 2009). Com base na elevada capacidade de reconhecimento de carboidratos, as lectinas se tornaram importantes ferramentas no isolamento, em estudos estruturais e no mapeamento de oligossacarídeos e glicoconjugados (HAYUNGA *et al.*, 1986; MONZO *et al.*, 2007; XIE *et al.*, 2009). Colunas das lectinas imobilizadas de *Canavalia ensiformis* (QIU *et al.*, 2007) e de *Cratylia mollis* (LIMA *et al.*, 1997) foram eficientes na separação de glicoproteínas de soro humano.

O reconhecimento entre lectinas e carboidratos permite a utilização das lectinas na Histologia e Patologia como ferramentas em ensaios citoquímicos para localização de glicoconjugados e resíduos glicosilados (FRANCESCHINI *et al.*, 2000; PEDINI *et al.*, 2001) e como ferramentas histoquímicas para análises de estruturas de tecidos humanos normais e alterados (BELTRÃO *et al.*, 1998; BELTRÃO *et al.*, 2009).

Athamna *et al.* (2006) analisaram os diferentes padrões de aglutinação de bactérias promovidos por 23 lectinas e mostraram que a interação lectina-bactéria é uma

boa ferramenta para identificar rapidamente espécies de *Mycobacterium*. A atividade antimicrobiana de lectinas (RATANAPO *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2008; SÁ *et al.*, 2009a) estimula a avaliação delas como novos antibióticos.

2.3.2.3. Papel fisiológico e propriedades biológicas das lectinas de plantas

Nas plantas, vários papéis fisiológicos têm sido atribuídos às lectinas, dentre os quais destacam-se a possível ação defensora contra microorganismos patógenos e insetos, a participação no mecanismo de nodulação em leguminosas, a estocagem e mobilização de proteínas e carboidratos de reserva e o alongamento da parede celular (KENNEDY *et al.*, 1995; HIRSCH, 1999; ISIDRO *et al.*, 2001; LIMPENS & BISSELING, 2003; CARLINI & GROSSI-DE-SÁ, 2002; PAES *et al.*, 2002). Além disso, as lectinas têm se mostrado importantes na ativação de algumas enzimas, como fosfatases (AOYAMA *et al.*, 2001) e galactosidases (BRECHTEL *et al.*, 2001). A lectina de sementes de *Erythrina indica* (EiSL) está envolvida na ativação de uma α -manosidase necessária para o desenvolvimento das sementes (KESTWAL *et al.*, 2007).

As lectinas apresentam diversas atividades biológicas, como: aglutinação de células (PAIVA e COELHO, 1992), estimulação de linfócitos (PAJIC *et al.*, 2002), macrófagos (ANDRADE *et al.*, 1999) e neutrófilos (TIMOSHENKO *et al.*, 1995), atividade antiinflamatória (ASSREUY *et al.*, 1999), antitumoral (ELSASSER-BEILE *et al.*, 2001), antifúngica (FREIRE *et al.*, 2002; SÁ *et al.*, 2009a; SANTANA *et al.*, 2009) antibacteriana (OLIVEIRA *et al.*, 2008; SÁ *et al.*, 2009b), hipotensiva (WANG *et al.*, 1996) e inseticida.

2.3.2.4. Lectinas com atividade inseticida

Várias lectinas de plantas superiores mostraram efeito entomotóxico (Tabela 1). Atividade inseticida também já foi descrita para a lectina da alga vermelha *Gracilaria ornata*, que foi tóxica para *Callosobruchus maculatus*, e para a lectina do cogumelo *Xerocomus chrysenteron*, que afetou a mosca *Drosophila melanogaster* e o hemíptero *Acyrtosiphon pisum* (TRIGUEROS *et al.*, 2003; LEITE *et al.*, 2005).

Tabela 1. Lectinas de plantas com ação inseticida

Inseto afetado	Lectina (s)	Planta de origem	Referência
<i>Acyrtosiphon pisum</i> (Hemiptera)	ConA	<i>Canavalia ensiformis</i>	Sauvion <i>et al.</i> (2004)
<i>Aedes aegypti</i>	MuBL MuHL	<i>Myracrodruon urundeuva</i>	Sá <i>et al.</i> (2009b)
<i>Anagasta kuehniella</i> (Lepidoptera)	ACLEC	<i>Annona coriacea</i>	Coelho <i>et al.</i> (2007)
	BmoLL	<i>Bauhinia monandra</i>	Macedo <i>et al.</i> (2007)
	KpLec	<i>Koelreuteria paniculata</i>	Macedo <i>et al.</i> (2003)
<i>Atta opaciceps</i> (Hymenoptera)	ConBr	<i>Canavalia brasiliensis</i>	Isidro <i>et al.</i> (2001)
<i>Bactrocera curcubitae</i> (Diptera)	AHL	<i>Arisaema helleborifolium</i>	Kaur <i>et al.</i> (2006)
<i>Callosobruchus maculatus</i> (Coleoptera)	BmoLL	<i>Bauhinia monandra</i>	Macedo <i>et al.</i> (2007)
	ConA	<i>Canavalia ensiformis</i>	Sadeghi <i>et al.</i> (2006)
	GNA	<i>Galanthus nivalis</i>	”
	GSII	<i>Griffonia simplicifolia</i>	Zhu-Salzman <i>et al.</i> (1998)
	KpLec	<i>Koelreuteria paniculata</i>	Macedo <i>et al.</i> (2003)
	PHA	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Sadeghi <i>et al.</i> (2006)
	PNA	<i>Arachis hypogaea</i>	”
	PTL	<i>Psophocarpus tetragonolobus</i>	Gatehouse <i>et al.</i> (1991)
	STA	<i>Solanum tuberosum</i>	Murdock <i>et al.</i> (1990)
<i>Chrysoperla carnea</i> (Neuroptera)	TEL	<i>Talisia esculenta</i>	Macedo <i>et al.</i> (2002)
	WGA	<i>Triticum aestivum</i>	Sadeghi <i>et al.</i> (2006)
<i>Corcyra cephalonica</i> (Lepidoptera)	ACLEC	<i>Annona coriacea</i>	Coelho <i>et al.</i> (2007)
<i>Chrysoperla carnea</i> (Neuroptera)	GNA	<i>Galanthus nivalis</i>	Hogervorst <i>et al.</i> (2006)
<i>Dysdercus cingulatus</i> (Homoptera)	ASAL	<i>Allium sativum</i>	Bandyopadhyay <i>et al.</i> (2001)
<i>Lucilia cuprina</i> (Diptera)	ConA	<i>Canavalia ensiformis</i>	Eisemann <i>et al.</i> (1994)
	Lentil lectin	<i>Lens culinaris</i>	”
	WGA	<i>Triticum aestivum</i>	”
<i>Lypaphis erysimi</i> (Homoptera)	ASAL	<i>Allium sativum</i>	Bandyopadhyay <i>et al.</i> (2001)

<i>Nilaparvata lugens</i> (Hemiptera)	ConA	<i>Canavalia ensiformis</i>	Powell <i>et al.</i> (1995)
	GNA	<i>Galanthus nivalis</i>	”
	PHA	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Powell <i>et al.</i> (1993)
<i>Ostrinia nubilalis</i> (Lepidoptera)	BPA	<i>Bauhinia purpurea</i>	Czapla & Lang (1990)
	RCA	<i>Ricinus communis</i>	”
<i>Zabrotes subfasciatus</i> (Coleoptera)	BmoLL	<i>Bauhinia monandra</i>	Macedo <i>et al.</i> (2007)
	TEL	<i>Talisia esculenta</i>	Macedo <i>et al.</i> (2002)

A maioria dos testes de atividade inseticida com lectinas envolve a incorporação dessas proteínas na dieta dos insetos (CARLINI & GROSSI-DE-SÁ, 2002). Em alguns casos, são utilizadas variações transgênicas de plantas da dieta natural dos insetos que expressam a lectina de uma outra planta resistente ao ataque do mesmo inseto (CZAPLA & LANG, 1990; SAHA *et al.*, 2006). Sadeghi *et al.* (2006) avaliaram o efeito deterrente de 14 lectinas na oviposição de *C. maculatus*; a PHA, lectina de *Phaseolus vulgaris*, apresentou maior atividade (78%).

Os mecanismos pelos quais as lectinas exercem seu efeito inseticida são pouco conhecidos e tem ganhado interesse nos últimos anos. A maioria das lectinas entomotóxicas é resistente à degradação proteolítica no trato digestivo de insetos e a resistência de algumas lectinas ao ambiente proteolítico do intestino de insetos tem sido considerada como uma estratégia de defesa desenvolvida por algumas plantas (BRUNELLE *et al.*, 2004). Estudos demonstraram que algumas lectinas se ligam à borda escovada da membrana das células epiteliais do trato intestinal de insetos ou, no caso das lectinas ligadoras de quitina, interferem na formação e integridade da matriz peritrófica dos insetos (FITCHES & GATEHOUSE, 1998; CARLINI & GROSSI-DE-SÁ, 2002; COELHO *et al.*, 2007; MACEDO *et al.*, 2007; SÁ *et al.*, 2009b).

A matriz peritrófica forma uma delicada membrana no intestino médio do inseto, separando o alimento do epitélio intestinal. Ocorre na maioria dos insetos (exceto em Hemiptera) e é formada por uma rede de microfibrilas, normalmente de quitina, que podem estar inseridas em uma matriz de proteínas e glicoproteínas. A matriz tem permeabilidade relativa e confere proteção contra a invasão por microorganismos (CHAPMAN, 1998; TELLAM *et al.*, 1999).

Algumas lectinas inseticidas afetam a ação de enzimas glicosiladas e proteínas assimilatórias ou podem inativar ribossomos (GATEHOUSE *et al.*, 1995; CARLINI & GROSSI-DE-SÁ, 2002).

2.4. A aroeira-do-sertão, *Myracrodruon urundeuva* (Anacardiaceae)

Myracrodruon urundeuva (Figura 3), descrita por Francisco Allemão & Cysneiro em 1862, é uma anacardiácea que ocorre desde o México até a Argentina (BARKLEY, 1968; GARRIDO & POGGIANI, 1979). No Brasil, é conhecida como aroeira, aroeira-do-sertão, aroeira-preta, aroeira-do-campo, aroeira-verdadeira ou urundeúva, entre outras denominações. A denominação “aroeira” é uma corruptela de “arara” e “eira”, com significado de “árvore da arara”. Já o termo urundeúva é de origem tupi-guarani e possui o significado “não se deteriora na água” (LORENZI, 2000; ALMEIDA-CORTEZ *et al.*, 2007).

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 com até 2000 mm de precipitação anual. Distribui-se em ampla faixa do território brasileiro, desde o Maranhão até o Paraná, sendo mais freqüente nos estados de Minas Gerais, Bahia, São Paulo, Mato Grosso e Goiás (LORENZI, 2000). A aroeira-do-sertão não é encontrada na Floresta Amazônica (RECORD & HESS *apud* LEITE, 2002).

Na Caatinga e no Cerrado, os indivíduos alcançam de 5 a 15 m de altura e 15 a 60 cm de diâmetro, enquanto alguns podem chegar a 30 m de altura e 100 cm de diâmetro em regiões de florestas tropicais (FAO, 1986). A aroeira-do-sertão é encontrada regularmente em solos ricos e sobrevive a longos períodos de baixa umidade (LEITE *et al.*, 2002; GARRIDO & POGGIANI, 1979). O tamanho da árvore é diretamente proporcional à disponibilidade de água (MUÑOZ, 1990).

A aroeira-do-sertão é uma árvore decídua (Figura 3B) com um tronco reto e cilíndrico (LÓPEZ, 1987). As folhas são compostas imparipinadas (Figura 3C), com 10 a 30 cm de comprimento, ápice ligeiramente acuminado e borda serrada. As inflorescências consistem em racemos (Figura 3D), formando cachos nas pontas de ramos sem folhas. As flores (Figura 3E) são unissexuais e hipóginas e apresentam 5 pétalas. As sépalas são persistentes e permanecem ao redor do fruto, uma drupa esférica com 3 a 4 mm de diâmetro (FAO, 1986; LEITE, 2002).

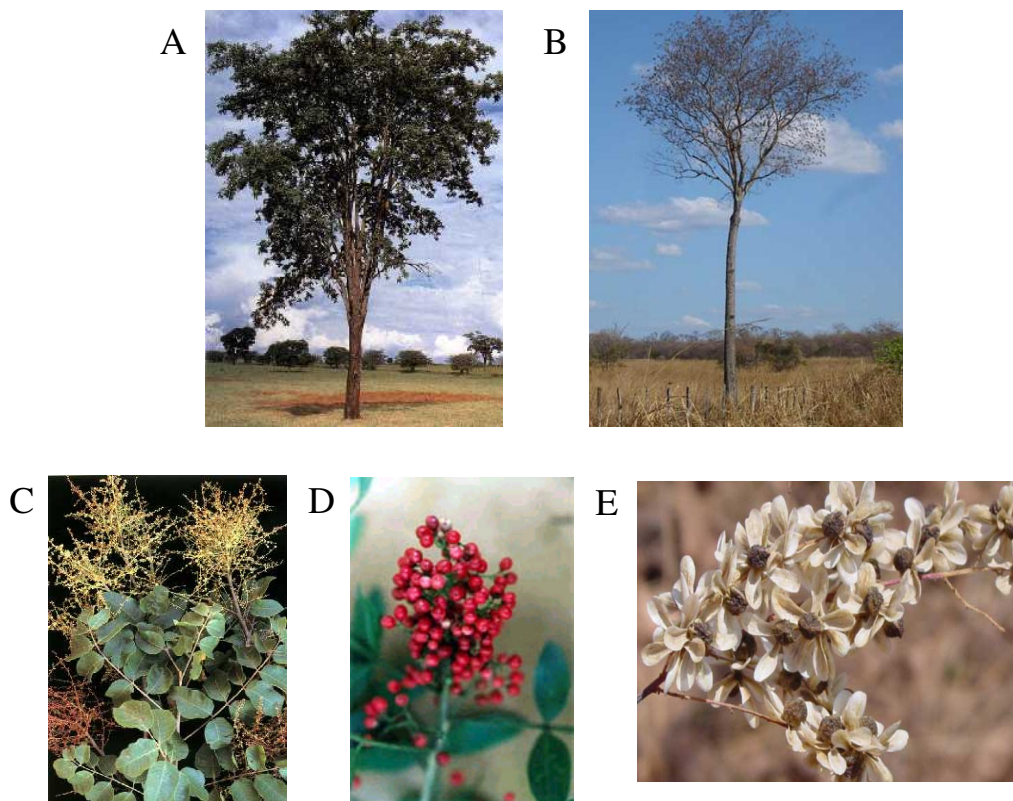


Figura 3. *Myracrodruon urundeuva*. (A) Aspecto geral; (B) indivíduo do Cerrado que já perdeu parte de suas folhas; (C) folhas; (D) inflorescência; (E) flores.

A, C e D: retirado de Lorenzi (2000). B e E: ©Fernando Tatagiba.

A floração ocorre geralmente após a queda das folhas, entre os meses de Novembro e Janeiro, no Brasil. Abelhas da espécie *Trigona spinipes* foram descritas como agentes polinizadores e as sementes são dispersas pelo vento. O tempo de dormência pode variar entre as variedades encontradas (*M. urundeuva* var. *urundeuva* e *M. urundeuva* var. *candollei*), com a germinação ocorrendo após 4 a 7 dias, ou somente após 2 semanas, dependendo das condições do local (LEITE, 2002).

A casca é marrom-escura (Figura 4A), apresentando escamas nos indivíduos mais velhos, sendo mais lisa nos mais jovens (RIZZINI, 1978). A infusão da entrecasca é um dos remédios mais utilizados na medicina popular contra doenças respiratórias e urinárias (NAPRALERT, 2001). Extratos aquosos da casca apresentaram também atividades antiulcerogênica, anticolinérgica (MENEZES *et al.*, 1986), antiinflamatória (RAO *et al.*, 1986), antidiarréica e analgésica (ALMEIDA-CORTEZ *et al.*, 2007).

A madeira de *M. urundeuva* (Figuras 4B e 4C) não apresenta listras, é muito densa (densidade de 1,19 g/cm³) e com elevada resistência mecânica, sendo incluída entre as

madeiras-de-lei. O alburno é bem diferenciado do cerne e pode ser facilmente decomposto. O cerne de *M. urundeuva* é uniforme, de coloração vermelho-cereja ou, quando exposto ao ar, vermelho-amarronzado escuro. A madeira é extremamente resistente à biodeterioração, mesmo quando caída no solo, sendo uma das mais tradicionalmente escolhidas na indústria de móveis e construção civil, naval e hidráulica. Também é utilizada na produção de carvão vegetal (LÓPEZ, 1987; MORAIS *et al.*, 1999; LORENZI, 2000).

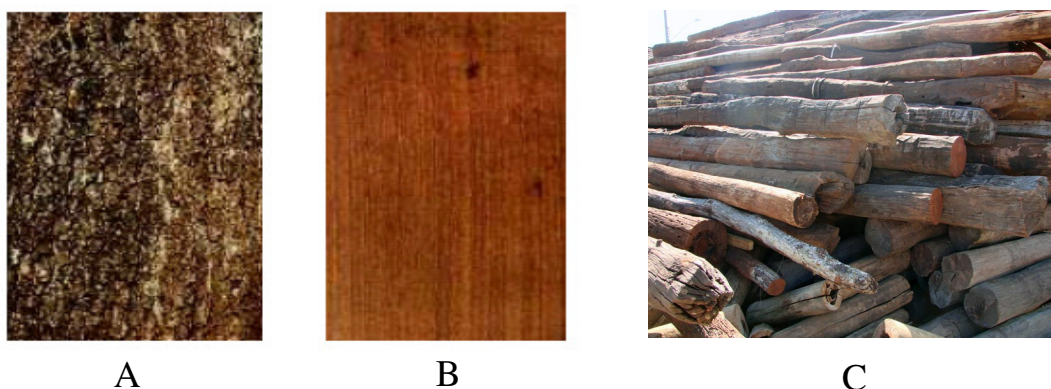


Figura 4. *Myracrodruon urundeuva*. (A) Casca; (B) madeira; (C) toras de aroeira.

A e B: retirado de Lorenzi (2000). C: ©Porto Seguro Madeiras.

Devido à intensa exploração de suas propriedades, principalmente para confecção de cercas, estacas e postes, a aroeira-do-sertão se tornou uma das espécies de plantas lenhosas mais ameaçadas no mundo, figurando na lista de espécies ameaçadas de organizações (governamentais ou não) de defesa do meio ambiente. Os principais fatores que ameaçam a aroeira-do-sertão são a destruição do habitat (principalmente no Cerrado e na Caatinga, que têm sofrido com a devastação e o uso excessivo e/ou inadequado da terra) e a superexploração da madeira (LEITE, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2007).

A ameaça de extinção e o interesse mundial em fitoterápicos têm estimulado o desenvolvimento de estratégias de conservação de plantas medicinais. O grande valor da aroeira-do-sertão relacionado à produção de fármacos e à sua madeira faz dela uma das espécies que mais precisam de medidas de conservação. Nesse sentido, estudos visando à obtenção de informações sobre a biologia, ecologia, manejo e silvicultura da aroeira-do-sertão que sejam relevantes para sua conservação genética e valorização como um recurso sustentável têm se tornado cada vez mais necessários (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Resultados obtidos no estudo da possibilidade de desenvolvimento de *M. urundeuva* em plantações se mostraram contraditórios e o uso de plantações comerciais da aroeira-do-sertão não tem sido considerado a principal estratégia de conservação, ainda que

existam possibilidades. Leite (2002) considera que a conservação efetiva de *M. urundeuva* em território brasileiro se encontra ameaçada devido à falta de conhecimentos sobre a biologia reprodutiva da espécie e à ausência de medidas mais eficazes das instituições responsáveis que visem regulamentar a conservação dessa espécie.

2.4.1. Lectinas de *M. urundeuva*

Extratos salinos da casca, cerne e alburno de *M. urundeuva* foram avaliados quanto à atividade hemaglutinante. A presença de lectinas foi detectada na casca e no cerne (SÁ *et al.*, 2009b). A atividade hemaglutinante dos extratos de casca e cerne de *M. urundeuva* foi caracterizada parcialmente por Sá *et al.* (2009b), que isolaram as lectinas MuBL (do inglês *M. urundeuva* bark lectin) e MuHL através de cromatografia de afinidade em coluna de quitina (Figura 5). MuBL e MuHL são proteínas termoestáveis inibidas por N-acetilglicosamina e que podem ser isolada em quantidades miligramas. As lectinas foram avaliadas por eletroforese em condições nativas e desnaturantes, revelando serem proteínas de natureza básica de massas moleculares de 14,4 (MuHL) e 14,0 (MuBL) kDa (Figura 5). MuBL e MuHL apresentaram atividade larvicida sobre *Aedes aegypti*. MuHL também apresentou atividade antifúngica sobre bactérias e fungos, inclusive do gênero *Fusarium* (SÁ *et al.*, 2009a; SÁ *et al.*, 2009b).

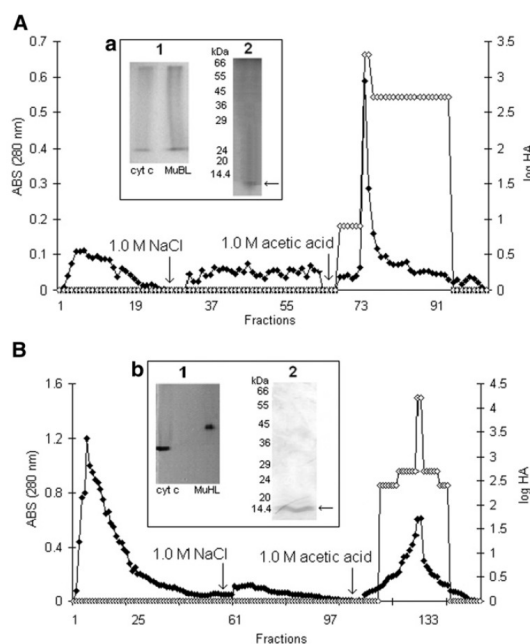


Figura 5. Cromatografia em coluna de quitina para isolamento de MuBL (A) e MuHL (B). Eletroforeses de MuBL (a) e MuHL (b) em gel de poliacrilamida em condições nativas para proteínas básicas (1) e em condições desnaturantes (2). Fonte: SÁ *et al.* (2009).

2.5. Cupins

Os cupins ou térmitas (Ordem Isoptera) constituem um grande grupo de insetos eusociais, sem exceções, que vivem em colônias compostas por várias castas e indivíduos em diferentes estágios de desenvolvimento (HOJO *et al.*, 2005). Os cupins vivem em ninhos ou cupinzeiros (Figura 6) e as tarefas relacionadas à reprodução, defesa e limpeza estão divididas entre as castas, que são diferenciadas morfologicamente (BERTI FILHO, 1993).

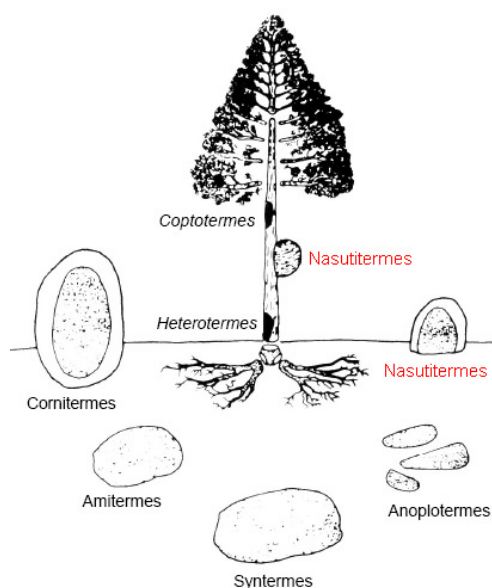


Figura 6. Localização de ninhos e galerias de alguns gêneros de cupins.

(BERTI FILHO, 1993; ZANETTI *et al.*, 2002).

A cabeça é livre, de forma e tamanho variáveis. Olhos compostos estão presentes nas formas aladas e, nos cupins superiores, em lugar dos ocelos, há uma depressão chamada fontanela, que possui um poro central no qual se abre uma glândula cefálica que secreta um líquido com função de defesa. O aparelho bucal é mastigador e bem desenvolvido e o tórax achatado, com o protórax destacado. O órgão auditivo está situado nas pernas, na tíbia anterior. O abdome é volumoso, sésil e com 10 segmentos. Os dois pares de asas são membranosos e o desenvolvimento é por paurometabolia (ovo→ninf→adulto) (GALLO *et al.*, 1988).

Os indivíduos alados (aleluias) são temporários e responsáveis pela reprodução sexuada da colônia. Os reprodutores voam do ninho no crepúsculo. Após o vôo, caem no chão, livram-se de suas asas e então realizam a primeira cópula, ao encontrarem um

parceiro. Formado o casal real, eles encontram um local adequado e iniciam a instalação do ninho, que inicialmente consiste em poucas galerias e uma câmara nupcial, onde a fêmea realiza as posturas e o casal copula outras vezes. Os novos indivíduos constituirão as demais castas e o cupinzeiro cresce rapidamente, podendo atingir milhões de indivíduos. A rainha, que quando completamente desenvolvida pode apresentar uma relação entre o abdome e o resto do corpo de 200:1 em algumas espécies, pode viver de 6 a 10 anos, ovipositando até cerca de 50 mil ovos em toda sua vida (ZANETTI *et al.*, 2002).

As formas ápteras são permanentes e podem ser férteis ou estéreis. Dentre as férteis, estão o casal real após o vôo e as rainhas e os reis de substituição, que substituem o casal quando esse morre ou uma colônia é fragmentada. Dentre os indivíduos gerados, encontram-se algumas ninfas que se desenvolverão em formas aladas, as quais, por sua vez, formarão novas colônias. As formas estéreis constituem as castas de operários e soldados. Os soldados defendem a colônia. São cegos e apresentam mandíbulas bem desenvolvidas, que são utilizadas para defesa e não para mastigação. Os operários são também, normalmente, cegos e cuidam da prole, forrageiam alimento e constroem o ninho. Por serem fototrópicos negativos, desenvolvem suas atividades na escuridão (PFDAT, 1985; GALLO *et al.*, 1988; BERTI FILHO, 1993; ZANETTI *et al.*, 2002).

No Brasil ocorrem as famílias Kalotermitidae (cupins primitivos que atacam madeira seca e não constroem ninhos; principais gêneros: *Cryptotermes* e *Neotermes*), Rhinotermitidae (constroem ninhos subterrâneos, atacando plantas vivas e madeira morta; principais gêneros: *Coptotermes* e *Heterotermes*), Termitidae (principal família dos cupins, constroem diferentes tipos de ninhos e têm hábito alimentar variado, como, por exemplo, folhas, madeira e húmus; principais gêneros: *Cornitermes*, *Nasutitermes*, *Syntermes* e *Anoplotermes*) e Serritermitidae (contendo apenas duas espécies, *Serritermes serrifer* e *Glossotermes oculatus*) (PEDROSA-MACEDO *et al.*, 1993; ZANETTI *et al.*, 2002).

De acordo com o hábito, os cupins podem ser classificados em: *xilófagos*, que vivem no interior de troncos e madeiras e não entram em contato com o solo; *arborícolas*, que constroem ninhos que se comunicam com o solo em troncos de árvores ou em paus em decomposição; e *humívoros*, que vivem em ninhos feitos no chão, se alimentando de húmus. Alguns grupos apresentam características de mais de uma classe (HORN, 1988; BERTI FILHO, 1993; ZANETTI *et al.*, 2002).

Os cupins são capazes de se alimentar de materiais ricos em celulose como madeira, papel, plantas vivas e de matéria orgânica em decomposição. Constroem galerias e câmaras à medida que vão se alimentando do local onde se estabeleceram (GALLO *et*

al., 1988). A capacidade de aproveitar a celulose como fonte energética se deve à presença de uma comunidade simbiótica de microrganismos encontrada no trato intestinal dos cupins (FRÖHLICH *et al.*, 2007). Essa microbiota é capaz de hidrolisar a celulose e a hemicelulose, fermentar e despolimerizar produtos a ácidos graxos de cadeia curta, que são absorvidos pelo hospedeiro, e fixar nitrogênio, além de estar envolvida no metabolismo de hidrogênio (BRUNE, 1998; FRÖHLICH *et al.*, 2007; WARNECKE *et al.*, 2007). O trato digestivo de um cupim é um excelente modelo de um microambiente altamente estruturado e compartimentalizado, contendo vários microhabitats físico-quimicamente distintos (BRUNE & FRIEDRICH, 2000).

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

Por outro lado, cerca de 10% das espécies conhecidas de isópteros estão registradas como pragas. Os principais danos causados pelos cupins são conseqüências da sua capacidade de “digerir” a celulose. Os cupins estão entre os mais severos agentes destruidores da madeira (PAES & VITAL, 2000) e também danificam uma variedade de materiais que variam de telas de papel a materiais não-celulósicos tais como o betume do asfalto e folhas de metal (BULTMAN *et al. apud* CHENG *et al.*, 2007).

Os cupins atacam madeiras não-resistentes penetrando no tronco da árvore através de duas rotas principais: a casca e as raízes. Alguns cupins são capazes de penetrar pelas raízes das árvores e construir galerias no interior do tronco, destruindo o cerne e deixando as árvores ocas. Quando mortas, essas madeiras se tornam ainda mais suscetíveis ao ataque. Estimou-se que os prejuízos causados pela ação de cupins sobre madeiras e outros materiais contendo celulose excedam US\$ 50 bilhões anuais mundialmente (KORB, 2007).

O controle de cupins tem sido convencionalmente feito com inseticidas organofosforados e piretróides, que podem ser tóxicos para outros seres vivos e apresentam considerável risco de contaminação ambiental. Extratos de diversas partes das plantas, extrativos de madeiras e entrecascas, feromônios, análogos do hormônio juvenil e inibidores da síntese de quitina são tidos como potenciais componentes de produtos alternativos para combater espécies-praga de cupins, sem oferecer grande perigo ao meio ambiente (SOGABE *et al.*, 2000; CABRERA *et al.*, 2001; CHEN *et al.*, 2004).

2.5.1. O gênero *Nasutitermes*

Alguns gêneros da família Termitidae estão presentes em todas as regiões equatoriais do mundo (PEARCE & WAITE, 1994). Os cupins nasutos da subfamília Nasutiterminae, a mais diversificada da ordem Isoptera (KAMBHAMPATI & EGGLETON, 2000), são assim chamados porque a cabeça dos soldados se estreita na parte anterior, em uma projeção semelhante a um nariz, que é utilizada para defesa, emitindo substâncias adesivas ou tóxicas (HOJO *et al.*, 2005).

O gênero *Nasutitermes* (Figura 7) tem distribuição mundial e é um dos mais ricos em espécies. O número de indivíduos em um ninho (Figura 7D) pode chegar a 3 milhões e a longevidade máxima das colônias de *Nasutitermes* varia de 40 a 80 anos (KAMBHAPATTI & EGGLETON, 2000). Com 200 espécies distribuídas por todas as regiões tropicais, constroem ninhos no tronco ou no sistema radicular de árvores e acima ou abaixo do nível do solo (Figura 6) (SCHEFFRAHN *et al.*, 2002; ALBUQUERQUE *et al.*, 2005). As espécies de *Nasutitermes* estão entre as mais abundantes que podem se alimentar de madeiras (MIURA *et al.*, 2000). Edwards & Mill (1986) listaram 12 espécies de *Nasutitermes* que são capazes de danificar construções.

Enquanto gênero, os *Nasutitermes* são morfologicamente bem diferenciados da grande maioria dos cupins pelo aspecto bem característico da cabeça nos soldados (Figura 7C), mas a classificação ao nível de espécie não é uma tarefa fácil (CONSTANTINO, 1992; MIURA *et al.*, 2000; SCHEFFRAHN *et al.*, 2002).

Os *Nasutitermes* têm sido favorecidos pelo desequilíbrio ambiental, demonstrando acentuados sinais de nocividade. Por isso, têm sido considerados como uma nova ameaça aos centros urbanos, ainda que não tão agressiva como *Coptotermes havilandi*, espécie de maior expressão urbana. Buscam preferencialmente as partes altas das edificações, sendo visíveis em telhados, forros e vãos estruturais (FIGUEIREDO, 2004). No Semi-Árido brasileiro, os *Nasutitermes* têm invadido o meio urbano, atacando móveis e estruturas de construções (PAES *et al.*, 2002).

N. corniger é amplamente distribuída nas América do Sul e Central (SCHEFFRAHN *et al.*, 2005; ADAMS *et al.*, 2007). Ocorre em quase todo o Brasil. Os soldados têm mandíbulas vestigiais e uma glândula frontal que contém substâncias de defesa, incluindo vários tipos de terpenóides (CHUAH *et al.*, 1989) e proteínas específicas (HOJO *et al.*, 2005).

A estrutura das colônias varia consideravelmente dentro de populações de *N. corniger*, assim como acontece com outras espécies de cupins. A maioria das colônias é composta por famílias simples, com uma única rainha e um único rei, e formada por múltiplos ninhos escuros e de superfície rugosa, construídos em árvores ou no solo, que são conectados por túneis (ATKINSON & ADAMS, 1997). Os cupins que vivem em ninhos de uma mesma colônia não são agressivos entre si. Contudo, operários e soldados de *N. corniger* são agressivos com indivíduos de outras colônias, sendo travadas longas batalhas quando cupins de colônias vizinhas entram em contato (ADAMS & LEVINGS, 1987).

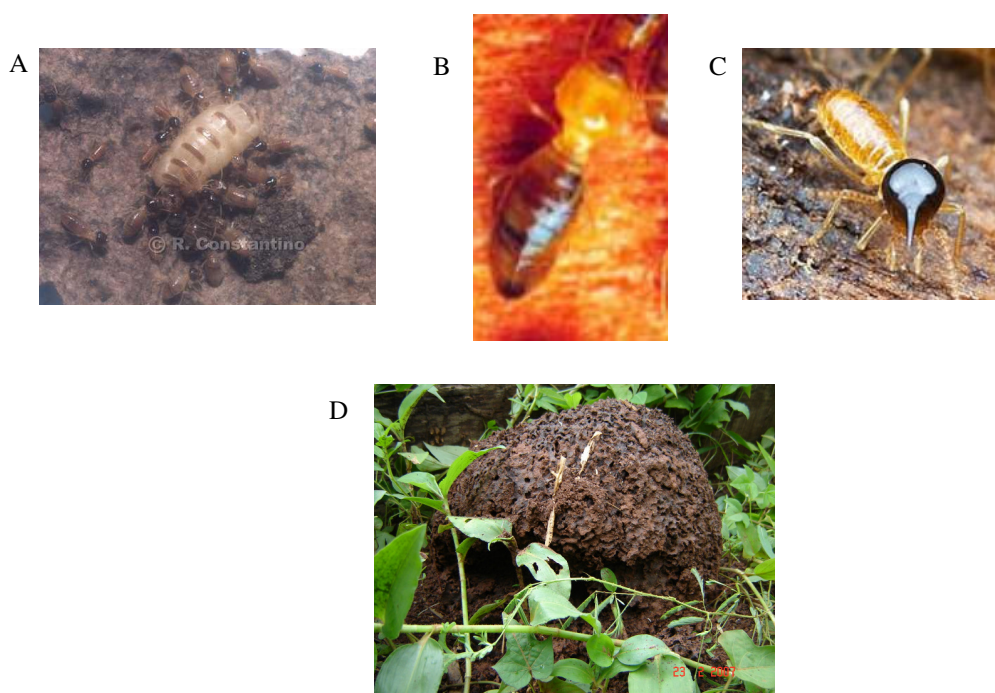


Figura 7. Cupins do gênero *Nasutitermes*. (A) Rainha de *Nasutitermes euphratae*; (B) operário; (C) soldado; (D) ninho de *Nasutitermes*, construído no solo.

(A: © Reginaldo Constantino).

Cupins dessa espécie destroem madeira dura ou mole, beneficiada ou não. Grupos de *N. corniger* foram encontrados atacando madeiras de caucho (*Micrandra sp.*, Euphorbiaceae) e virola (*Virola surinamensis*, Myristicaceae) e descritos como tendo preferência pela região do cerne (ABREU *et al.*, 2002). Madeiras como a da aroeira (*M. urundeuva*), do louro-pardo (*Cordia trichotoma*), da jurema-preta (*Mimosa tenuiflora*) e do sabiá (*Mimosa caesalpinifolia*) demonstraram elevada resistência à ação de cupins de *N. corniger*, enquanto o marmeleiro preto (*Croton sonderianus*) foi severamente atacado

(PAES *et al.*, 2002; PAES *et al.*, 2007). Colônias de *N. corniger* também foram encontrados atacando estruturas de madeira de museus (BRAZOLIN *et al.*, 2004).

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

- Avaliar a atividade da lectina e metabólitos secundários do cerne de *Myracrodruon urundeuva* contra cupins de *Nasutitermes corniger* e a atividade dos metabólitos secundários quanto às atividades antioxidante e antifúngica.

3.2. Específicos

- Avaliar a presença de metabólitos secundários e de atividade hemaglutinante em extratos salino (ES) e metanólico (EM) do cerne de *M. urundeuva*.
- Isolar a lectina do cerne de *M. urundeuva* (MuHL) através fracionamento com sulfato de amônio e cromatografia de afinidade.
- Avaliar a presença de metabólitos secundários em preparações da lectina isolada
- Avaliar os extratos e MuHL quanto às atividades termiticida e repelente sobre cupins *N. corniger*
- Determinar o efeito da tripsina na atividade hemaglutinante de MuHL
- Avaliar os extratos salino e metanólico quanto à atividade antifúngica sobre *Fusarium*
- Avaliar os extratos salino e metanólico quanto à atividade antioxidante

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, R. L. S. *et al.* Avaliação de danos por insetos em toras estocadas em indústrias madeireiras de Manaus, Amazonas, Brasil. **Revista Árvore**, v. 26, n. 6, p. 789-796, 2002.

ADAMS, E. S.; ATKINSON, L.; BULMER, M. S. Relatedness, recognition errors, and colony fusion in the termite *Nasutitermes corniger*. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 61, n. 8, p. 1195-1201, 2007.

ADAMS, E. S.; LEVINGS, S. C. Territory size and population limits in mangrove termites. **Journal of Animal Ecology**, v. 56, n. 3, p. 1069-1081, 1987.

ADDOR, R. W. Insecticides. In: GODFERY, C. R. A. (ed.). **Agrochemicals from natural products**. New York: Marcel Dekker Inc., 1994. p. 1-62.

ALBUQUERQUE, A. C. *et al.* Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e *Metarhizium acridum* var. *acridum* sobre *Nasutitermes coxipoensis* (Holmgren) (Isoptera: Termitidae). **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 4, p. 585-592, 2005.

ALMEIDA-CORTEZ, J. S. *et al.* **Caatinga**. Coleção Biomas do Brasil. 1. ed. São Paulo: Harbra, 2007.

ANDRADE, J. L. *et al.* Lectin-induced nitric oxide production. **Cellular Immunology**, v. 194, n. 1, p. 98-102, 1999.

AOYAMA, H. *et al.* Endogenous lectin as a possible regulator of the hydrolysis of physiological substrates by soybean seed acid phosphatase. **Phytochemistry**, v. 58, n. 2, p. 221-225, 2001.

ASSREUY, A. M. S. *et al.* Prevention of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis by glucose-mannose binding plant lectins. **The Journal of Urology**, v. 16, p. 1988-1993, 1999.

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

ATKINSON, L.; ADAMS, E. S. The origins and relatedness of multiple reproductive colonies of the termite *Nasutitermes corniger*. **Proceedings of the Royal Society: Biological Sciences**, v. 264, n. 1385, p. 1131-1136, 1997.

BAINS, J. S. *et al.* Novel lectins from rhizomes of two *Acorus* species with mitogenic activity and inhibitory potential towards murine cancer cell lines. **International Immunopharmacology**, v. 5, n. 9, p. 1470-1478, 2005.

BANDYOPADHYAY, S.; ROY, A.; DAS, S. Binding of garlic (*Allium sativum*) leaf lectin to the gut receptors of homopteran pests is correlated to its insecticidal activity. **Plant Science**, v. 161, n. 5, p. 1025-1033, 2001.

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

BECERRA, J. *et al.* Antifungal and antibacterial activity of diterpenes isolated from wood extractables of Chilean Podocarpaceae. **Boletín de la Sociedad Chilena de Química**, v. 47, p. 151-157, 2002.

BELTRÃO, E. I. C. *et al.* Binding evaluation of isoform 1 from *Cratylia mollis* lectin to human mammary tissues. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 74, n. 3, p. 125-134, 1998.

BELTRÃO E.I. *et al.* Acridinium ester conjugated to Concanavalin A as chemiluminescent histochemistry marker. **New Biotechnology**, v. 255, p. 20, 2009.

BERTI FILHO, E. **Cupins ou térmitas. Manual de Pragas em Florestas**, v. 3. Piracicaba: IPEF/SIF, 1993.

BOTELHO, G. M. L.; SANTANA, M. A. E.; ALVES, M. V. S. Caracterização química, durabilidade natural e tratabilidade da madeira de seis espécies de eucaliptos plantadas no Distrito Federal. **Revista Árvore**, v. 24, n. 1, p. 115-121, 2000.

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

BRAZOLIN, S. *et al.* O problema de fungos e insetos xilófagos no museu de arte sacra de Salvador – BA. **ABRACOR – Textos técnicos**. 2004. Disponível em: http://www.abracor.com.br/novosite/pdfs/insetos_museu_arte_sacra.pdf. Acesso em: 28 out. 2007.

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

BRECHTEL, R.; WÄTZIG, H.; RÜDIGER, H. The lectin from the mushroom *Pleurotus ostreatus*: a phosphatase-activating protein that is closely associated with an α -galactosidase activity. **Plant Science**, v. 160, n. 5, p. 1025-1033, 2001.

BRUNE, A. Termite guts: the world's smallest bioreactores. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 16-21, 1998.

BRUNE, A.; FRIEDRICH, M. Microecology of the termite gut: structure and function on a microscale. **Current Opinion in Microbiology**, v. 3, p. 263-269, 2000.

BULBOVAS, P. *et al.* Variação sazonal em antioxidantes em folhas de plantas jovens de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 28, p. 687-696, 2005.

CABRERA, R. R.; LELIS, A. T.; BERTI FILHO, E. Ação de extratos das madeiras de ipê (*Tabebuia* sp., Bignoniaceae) e de itaúba (*Melizarus* sp., Lauraceae) sobre o cupim-de-madeira-seca *Cryptotermes brevis* (Isoptera, Kalotermitidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 68, n. 1, p. 103-106, 2001.

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

CAVALCANTE, G. M.; MOREIRA, A. F. C.; VASCONCELOS, S. D. Potencialidade inseticida de extratos aquosos de essências florestais sobre mosca-branca. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 41, n. 1, p. 9-14, 2006.

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

CHAPMAN, R. F. **The insects: structure and functions**. London: Cambridge University Press, 1998.

CHEN, K. *et al.* Termite feeding deterrent from Japanese larch wood. **Bioresource Technology**, v. 95, n. 2, p. 129-134, 2004.

CHENG, S. *et al.* Anti-termite activities of essential oils from coniferous trees against *Coptotermes formosanus*. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 2, p. 456-459, 2007.

CHUAH, C. H.; GOH, S. H.; THO, Y. P. Interspecific variation in defense secretions of Malaysian termites from the genus *Nasutitermes* (Isoptera, Nasutiterminae). **Journal of Chemical Ecology**, v. 15, n. 2, p. 549-563, 1989.

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, n. 5, 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 C**, v. 146, n. 3, p. 406-414, 2007.

CONSTANTINO, R. Abundance and diversity of termites (Insecta: Isoptera) in two sites of primary rain forest in Brazilian Amazonia. **Biotropica**, v. 24, n. 3, p. 420–430, 1992.

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

CZAPLA, T.H.; LANG, B.A. Effect of plant lectins on the larval development of european corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) and southern corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 83, n. 6, p. 2480-2485, 1990.

DEKA, M.; SAIKIA, C.N.; BARUAH, K.K. Studies on thermal degradation and termite resistant properties of chemically modified wood. **Bioresource Technology**, v. 84, n. 2, p. 151–157, 2002.

DEL-CLARO, K.; SILINGARDI, H. M. T. Toma lá, dá cá: insetos e plantas mantêm relações complexas de coexistência; em alguns casos, ganham os insetos, noutros, as plantas. **Cultivar Hortaliças e Frutas**, v. 5, 2001.

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

EDWARDS, P. J.; WRATTEN, S. D. **Ecologia das interações entre insetos e plantas**. Temas de Biologia, v. 27. São Paulo, EPU/EDUSP. 1981.

EISEMANN, C. H. *et al.* Larvicidal activity of lectins on *Lucilia cuprina* - mechanism of action. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 72, n. 1, p. 1–10, 1994.

ELSASSER-BEILE, U. *et al.* Antitumoral effect of recombinant mistletoe lectin on chemically induced urinary bladder carcinogenesis in a rat model. **Cancer**, v. 91, p. 998–1004, 2001.

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

FENTON-NAVARRO, B. *et al.* Purification and structural characterization of lectins from the cnidarian *Bunodeopsis antillienis*. **Toxicon**, v. 42, p. 525–532, 2003.

FIGUEIREDO, L. R. *Nasutitermes*: uma nova ameaça para os grandes centros urbanos. **Boletim Bay Pro Professional**, v. 3, p. 1, 2004.

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

FITCHES, E.; GATEHOUSE, J.A. 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*). **Journal of Insect Physiology**, v. 44, p. 1213-1224, 1998.

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

FREIRE, 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.

FRÖHLICH, J. *et al.* Occurrence of rhizobia in the gut of the higher termite *Nasutitermes nigriceps*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 30, n. 1, p. 68–74, 2007.

GALLO, D. *et al.* **Manual de entomologia agrícola**. 2. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1988.

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.

GATEHOUSE, A. M. R. *et al.* Biochemical basis of insect resistance in winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus*) seeds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 55, n. 1, p. 63-74, 1991.

GEMEINER *et al.* Lectinomics: II. A highway to biomedical/clinical diagnostics. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 1-15, 2009.

GOLDSTEIN, I. J. *et al.* What should be called a lectin? **Nature**, v. 255, p. 66-69, 1980.

GRACE, J. K.; WOOD, D. L.; FRANKIE, G. W. Behaviour and survival of *Reticulitermes hesperus* Banks (Isoptera: Rhinotermitidae) on selected sawdusts and wood extracts. **Journal of Chemical Ecology**, v. 15, n. 1, p. 128-139, 1989.

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

HAYUNGA, E. G.; SUMMER, M. P. Characterization of surface glycoprotein on *Schistosoma mansoni* adult worms by lectin affinity chromatography. **Journal of Parasitology**, v. 72, n. 2, p. 283-291, 1986.

HILL, C.A.S. *et al.* An investigation of cell wall micropore blocking as a possible mechanism for the decay resistance of anhydride modified wood. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 55, p. 69-76, 2005.

HIRSCH, A. M. Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) in legume nodulation **Current Opinion in Plant Biology**, v. 2, p. 320-326, 1999.

HOGENKAMP, A. *et al.* Characterization and expression sites of newly identified chicken collectins. **Molecular Immunology**, v. 43, n. 10, p. 1604-1616, 2006.

HOGERVORST, P. A. M. *et al.* Direct effects of snowdrop lectin (GNA) on larvae of three aphid predators and fate of GNA after ingestion. **Journal of Insect Physiology**, v. 52, p. 614-624, 2006.

HOJO, M. *et al.* Identification of soldier-caste specific protein in the frontal gland of nasute termite *Nasutitermes takasagoensis* (Isoptera: Termitidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 35, n. 4, p. 347-354, 2005.

HORN, D. J. **Ecological approach to pest management**. New York: Guilford, 1988.

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

IBAMA. Lista oficial das espécies da flora ameaçadas de extinção. **Diário Oficial**. Portaria 006/92-N 15 jan. 1992.

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.

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.

ISIDRO, R. *et al.* Ação de lectina de sementes de *Canavalia brasiliensis* Mart. sobre o comportamento da saúva do Nordeste (*Atta opaciceps* Borgmeier, 1939). **Revista de la Facultad de Agronomía**, v. 27, p. 77-89, 2001.

ITO, Y. Occurrence of lectins in leaves and flowers of *Sophora japonica*. **Plant Science**, v. 47, n. 2, p. 77-82, 1986.

IUCN. *Astronium urundeuva*. In: **2007 IUCN Red List of Threatened Species**, 2007.

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

KAUR, M. *et al.* A tuber lectin from *Arisaema helleborifolium* Schott with anti-insect activity against melon fruit fly, *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) and anti-cancer effect on human cancer cell. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 445, n. 1, p. 156-165, 2006.

KENNEDY, G. G.; BARBOUR, J. D. Resistance variation in natural and managed systems. In: FRITZ, R. S.; SIMMS, E. L. (eds.). **Plant Resistance to herbivores and pathogens**. Chicago: The University of Chicago Press, 1992. p. 13-41.

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

KESTWAL, R. M. *et al.* Characterization of α -mannosidase from *Erythrina indica* seeds and influence of endogenous lectin on its activity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1770, n. 1, p. 24-28, 2007.

KHAN, F.; AHMAD, A.; KHAN, M. I. Purification and characterization of a lectin from endophytic fungus *Fusarium solani* having complex sugar specificity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 457, n. 2, p. 243-251, 2007.

KOGAN, M. Plant resistance in pest management. In: METCALF, R. L.; LUCKMANN, W. H. **Introduction to insect pest management**. New York: Wiley-Interscience Publication, 1994. p. 103-146.

KORB, J. Termites. **Current Biology**, v. 17, p. R995-R999, 2007.

KUK, Y. I. *et al.* Antioxidative enzymes offer protection from chilling damage in rice plants. **Crop Science**, v. 43, p. 2109-2117, 2003.

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.

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, W. *et al.* A C-type lectin-like protein from *Agkistrodon acutus* venom binds to both platelet glycoprotein Ib and coagulation factor IX/factor Xq,qq. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 332, n. 3, p. 904-912, 2005.

LIANG, Z.R.; LI, D.W.; PENG, S.M. Effects of seed extracts from *Trichosanthes kirilowii* Maxim on antifedding and growth and development of *Pleris rapae* L. **New Biotechnology**, v. 255, p. 251, 2009.

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.

LÓPEZ, J. A. **Árboles comunes del Paraguay**. Ñande Yvirá Mata Kuera. Asunción: Cuerpo de Paz, 1987.

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.

MBURU, F. *et al.* Evaluation of thermally modified *Grevillea robusta* heartwood as an alternative to shortage of wood resource in Kenya: characterisation of physicochemical properties and improvement of bio-resistance. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 18, p. 3478–3486, 2007.

MENEZES, A. M. S.; RAO, V. S. N.; FONTELES, M. C. Anti-ulcerogenic activity of *Astronium urundeuva*. **Fitoterapia**, v. 57, n. 4, p. 253–256, 1986.

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.

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.

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

MIURA, T.; ROISIN, Y.; MATSUMOTO, T. Molecular phylogeny and biogeography of the nasute termite genus *Nasutitermes* (Isoptera: Termitidae) in the Pacific tropics. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 17, n. 1, p. 1-10, 2000.

MUÑOZ, J. D. **Anacardiaceae. Flora del Paraguay**. Geneve: Missouri Botanical Garden, 1990.

MURDOCK, L. L. *et al.* Biological effects of plant lectins on the cowpea weevil. **Phytochemistry**, v. 29, n. 1, p. 85-89, 1990.

NAPRALERT. **Natural Products Alert Database**. Chicago: University of Illinois, 2001.

OLA, M. S. *et al.* Purification and some properties of galectin-1 derived from water buffalo (*Bubalus bubalis*) brain. **Cell Biology International**, v. 31, n. 6, p. 578-85, 2007.

OLIVEIRA, A. M. F. *et al.* Agentes destruidores de madeira. In: LEPAGE, E. S. (coord.). **Manual de preservação de madeiras**, v. 1. São Paulo: IPT, 1986. p.99-278.

OLIVEIRA, M.D.L. *et al.* Purification of a lectin from *Eugenia uniflora* L. seeds and its potential antibacterial activity. **Letters in Applied Microbiology**, v. 46, p. 371-376, 2008.

OLIVEIRA, R. L. C. *et al.* Conservation priorities and population structure of woody medicinal plants in an area of Caatinga vegetation (Pernambuco State, NE Brazil). **Environmental Monitoring Assessment**, v. 132, n. 1-3, p.189–206, 2007.

OURTH, D. D.; NARRA, M. B.; CHUNG, K. T. Isolation of mannose-binding C-type lectin from *Heliothis virescens* pupae. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 335, n. 4, p. 1085-1089, 2005.

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.

PAES, J. B. *et al.* Resistência das madeiras de aroeira (*Myracrodruon urundeuva*), cássia (*Senna siamea*) e ipê (*Tabebuia impetiginosa*) a fungos e cupins xilófagos em condições de laboratório. **Floresta e Ambiente**, v. 9, p. 135-144, 2002.

PAES, J. B.; MORAIS, V. M.; LIMA, C. R. Resistência natural de nove espécies de madeiras do semi-árido brasileiro a fungos xilófagos em condições de laboratório. **Revista Árvore**, v. 28, n. 2, p. 275-282, 2004.

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.

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.

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

PAJIC, I. *et al.* A novel lectin from the sponge *Haliclona cratera*: isolation, characterization and biological activity. **Comparative Biochemistry and Physiology C**, v. 132, n. 2, p. 213-221, 2002.

PANSHIN, A. J.; ZEEUW, C. **Text book of wood technology**. 4. ed. New York: Mc Graw Hill, 1980.

PEARCE, M. J.; WAITE, B. S. A list of termite genera (Isoptera) with comments on taxonomic changes and regional distribution. **Sociobiology**, v. 23, n. 3, p. 247-263, 1994.

PEDINI, V. *et al.* Carbohydrate histochemistry of lamb duodenum. **Acta Histochemica**, v. 103, n. 3, p. 315-323, 2001.

PEDROSA-MACEDO, J. H. **Pragas florestais do sul do Brasil. Manual de Pragas em Florestas**, v. 2. Piracicaba: IPEF/SIF, 1993.

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

PFADT, R. E. **Fundamentals of Applied Entomology**. 4. ed. New York: Macmillan, 1985.

POWELL, K. S. *et al.* Antimetabolic effects of plant-lectins and plant and fungal enzymes on the nymphal stages of 2 important rice pests, *Nilaparvata lugens* and *Nephotettix cinctipes*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 66, n. 2, p. 119-126, 1993.

POWELL, K .S. *et al.* Antifeedant effects of plant-lectins and an enzyme on the adult stage of the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 75, n. 1, p. 51-59, 1995.

PRIMACK, R. B.; RODRIGUES, E. **Biologia da conservação**. Londrina: Editora Planta, 2001.

QIU, R.; ZHANG, X.; REGNIER, F. E. A method for the identification of glycoproteins from human serum by a combination of lectin affinity chromatography along with anion exchange and Cu-IMAC selection of tryptic peptides. **Journal of Chromatography B**, v. 845, n. 1, p. 143-150, 2007.

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.

RAO, V. S. N. *et al.* Effect of *Astronium urundeuva* Engl. (aroeira) in experimental colitis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.19, p. 568-569, 1986.

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

RICKLEFS, R. E. **A economia da natureza**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

RITTIDACH, W.; PAIJIT, N.; UTARABHAND, P. Purification and characterization of a lectin from the banana shrimp *Fenneropenaeus merguensis* hemolymph. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1770, n. 1, p. 106-114, 2007.

RIZZINI, C. T. **Árvores e madeiras úteis do Brasil: manual de dendrologia brasileira**. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 1978.

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

SÁ *et al.* Larvicidal activity of *Myracrodruon urundeuva* lectins on *Aedes aegypti*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C, Toxicology and Pharmacology**, v. 149, p. 300-306, 2009b.

SADEGHI, A. *et al.* Deterrent activity of plant lectins on cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (F.) oviposition. **Phytochemistry**, v. 67, n. 18, p. 2078-2084, 2006.

SALES-CAMPOS, C.; ABREU, R. L. S.; VIANEZ, B. F. Condições de uso e processamento de madeira nas indústrias madeireiras de Manaus, Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 30, n. 2, p. 319-331, 2000.

SAHA, P. *et al.* Transgenic rice expressing *Allium sativum* leaf lectin with enhanced resistance against sap-sucking insect pests. **Planta**, v. 223, n. 6, p. 1329-1343, 2006.

SAMPATH-WILEY, P., NEEFUS, C.D., JAHNKE, L.S. Seasonal effects of sun exposure and emersion on intertidal seaweed physiology: Fluctuations in antioxidant contents, photosynthetic pigments and photosynthetic efficiency in the red alga *Porphyra umbilicalis* Kützinger (Rhodophyta, Bangiales). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 361, p. 83-91, 2008.

SANTANA, G.M.S. *et al.* Isolation of lectin from *Opuntia ficus-indica* cladodes. **Acta Horticulturae**, v. 811, p. 281-286, 2009.

SANTOS *et al.* Isolation of a seed coagulant *Moringa oleifera* lectin. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 504-508, 2009.

SAUVION, N. *et al.* Binding of the insecticidal lectin Concanavalin A in pea aphid *Acyrtosiphon pisum* (Harris) and induced effects on the structure of midgut epithelial cells. **Journal of Insect Physiology**, v. 50, p. 1137-1150, 2004.

SCHEFFRAHN, R. H. *et al.* *Nasutitermes costalis* (Isoptera: Termitidae) in Florida: first record of a non-endemic establishment by a higher termite. **Florida Entomologist**, v. 85, n. 1, p. 273-275, 2002.

SCHEFFRAHN, R. H. *et al.* Synonymy of Neotropical Arboreal Termites *Nasutitermes corniger* and *N. costalis* (Isoptera: Termitidae: Nasutitermitinae), with Evidence from Morphology, Genetics, and Biogeography. **Annals of the Entomological Society of America** v. 98, p. 273-281, 2005.

SCHULTZ, T. P.; NICHOLAS, D. D. Development of environmentally-benign wood preservatives based on the combination of organic biocides with antioxidants and metal chelators. **Phytochemistry**, v. 61, n. 5, p. 555-560, 2002.

SCHULTZ, T.P. *et al.* Effect of the antioxidant BHT on reducing depletion of chlorothalonil in treated wood after 54 months of ground-contact exposure. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 57, p. 45-50, 2006.

SHIGO, A. L. Canker rots and the heart rot myth. **Tree Care Industry** v. 11, n. 8, 2001.

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

SILVA, C.A. *et al.* Biodeterioration of brazilwood *Caesalpineia echinata* Lam. (Leguminosae-Caesalpinioideae) by rot fungi and termites. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 60, p. 285-292, 2007.

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

SOGABE, A. *et al.* Termiticidal substances from the heartwood of *Cryptomeria japonica* D.Don. **Mokuzai Gakkaishi**, v. 46, p. 124-131, 2000.

SOLER-RIVAS, C., ESPÍN, J.C., WICHES, H.J. An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs. **Phytochemical Analysis**, v. 11, p. 1-9, 2000.

TAVARES, W.S. *et al.* Potential use of Asteraceae extracts to control *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and selectivity to their parasitoids *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) and *Telenomus remus* (Hymenoptera: Scelionidae). **Industrial Crops and Products**, doi:10.1016/j.indcrop.2009.07.007, 2009.

TERADA, T. *et al.* Structural characterization of a rhamnose-binding glycoprotein (lectin) from Spanish mackerel (*Scomberomorus niphonius*) eggs. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1770, n. 4, p. 617-629, 2007.

TIMOSHENKO, A. V.; CHERENKEVICH, S. N.; GABIUS, H. J. *Viscum album* agglutinin-induced aggregation of blood cells and the lectin effects on neutrophil function. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 49, n. 3, 153-158, 1995.

TRIGUEROS, V. *et al.* *Xerocomus chrysenteron* lectin: identification of a new pesticidal protein. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1621, n. 3, p. 292-298, 2003.

VASCONCELLOS, A. *et al.* Cupins de duas florestas de restinga do nordeste brasileiro. **Iheringia - Série Zoologia**, v. 95, n. 2, p. 127-131, 2005.

VIEGAS JÚNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 390-400, 2003.

WANG, H. *et al.* Cloning and characterization of a novel C-type lectin from Zhikong scallop *Chlamys farreri*. **Molecular Immunology**, v. 44, p. 722-773, 2007.

WANG, H. X. *et al.* Hypotensive and vasorelaxing activities of a lectin from the edible mushroom *Tricholoma mongolicum*. **Pharmacology & Toxicology**, v. 79, n. 6, p. 318-323, 1996.

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.

WARNECKE *et al.* Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite. **Nature**, v. 450, p. 560-565, 2007.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. **Phytochemistry**, v. 64, p. 3-19, 2003.

XIE, M. *et al.* Lectin-modified trifunctional nanobiosensors for mapping cell surface glycoconjugates. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, p. 1311-1317, 2009.

ZANETTI, R. *et al.* **Manejo integrado de cupins**. Lavras: UFLA, 2002.

ZHU-SALZMAN, K. *et al.* Carbohydrate binding and resistance to proteolysis control insecticidal activity of *Griffonia simplicifolia* lectin II (GSII). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, p. 15123-15128, 1998.

5. ARTIGO 1

INDUCTION OF MORTALITY ON *Nasutitermes corniger* (ISOPTERA, TERMITIDAE) BY *Myracrodruon urundeuva* HEARTWOOD LECTIN

ARTIGO PUBLICADO NO PERIÓDICO “International Biodeterioration and
Biodegradation”

(Volume 62, Issue 4, p. 460-464, December 2008)



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,*}

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

^bDepartamento de Bioquímica-CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-420 Recife, Pernambuco, Brazil

^cDepartamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Dois Irmãos, 52171-030 Recife, Pernambuco, Brazil

^dDepartamento de Ciências Farmacêuticas-CCS, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50740-521 Recife, Pernambuco, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 October 2007

Accepted 30 April 2008

Available online 14 July 2008

Keywords:

Heartwood

Lectin

Myracrodruon urundeuva

Nasutitermes corniger

Trypsin resistance

ABSTRACT

Termites are eusocial insects that can promote severe damage in wood. The presence of lectins, carbohydrate-binding proteins that have shown entomotoxic activity, was detected in the saline extract from *Myracrodruon urundeuva*, a termite-resistant heartwood. The purpose of this work was to evaluate the effect of *M. urundeuva* heartwood lectin on termites of *Nasutitermes corniger*. The lectin isolated by affinity chromatography (chitin column) was submitted to trypsin treatment and analyzed for the presence of non-protein contaminants. Lectin's effect on *N. corniger* was evaluated by termiticidal and repellence assays. Lectin activity was inhibited by *N*-acetylglucosamine monosaccharide and adsorbed on a chitin column. The lectin preparation obtained was free of secondary plant metabolites that can promote insect mortality. Contact with lectin in all concentrations induced mortality of termites. The values of LC₅₀ were 0.248 mg ml⁻¹ for workers and 0.199 mg ml⁻¹ for soldiers, after 4 days. Repellence assay indicated that the lectin did not induce a rejection effect. The lectin remained active after incubation with bovine trypsin. This is the first report of lectin's toxic effect on termites. The effect of *M. urundeuva* lectin on *N. corniger* survival points out the possibility of using this bioactive peptide to aid resistance of *M. urundeuva* heartwood to termites.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Termites constitute the main group of eusocial insects. They are able to feed on woods because of the presence of symbiotic cellulose decomposing bacteria in the gut of many species (Breznak, 1982; Hojo et al., 2005). Termites have been responsible for the major damage in wood, and biodegradation by termites is economically one of the most serious problems for wood utilization (Hunt and Garratt, 1967; Deka et al., 2002; Cheng et al., 2007).

Termitidae is the main family of termites and the subfamily Nasutiterminae is the most diversified group in Isoptera (Kambhampati and Eggleton, 2000). *Nasutitermes* is a genus broadly distributed in the tropics and can build nests in trees, roots, or soil. *Nasutitermes* species worldwide are known to damage several wooden parts in buildings. They preferentially build their nests in roofs, linings, and structural spans (Edwards and Mill, 1986; Scheffrahn et al., 2002). *Nasutitermes corniger* is one of the most dominant and broadly distributed species of the genus (Scheffrahn

et al., 2005) and wood can be a component of its diet (Vasconcellos et al., 2005).

Myracrodruon urundeuva (aroeira-do-sertão, Anacardiaceae) is broadly distributed in Brazil. Considered a hardwood, it is very dense, elastic, and resistant to termites (Mainieri and Chimelo, 1989). The physical and chemical protections of the very resistant wood of *M. urundeuva* have been investigated by evaluation of extractives (Paes et al., 2002), but the isolation of compounds responsible for this resistance is still lacking. The elucidation of the biochemical processes involved in natural resistance of durable woods is very important if we are to prevent additional expenses with the replacement of spoiled parts, increase the durability of other woods that are less resistant through chemical treatments or biotechnological applications, and reduce the impact on hardwoods in remaining forests (Chang et al., 2000; Paes et al., 2002).

Plant resistance to insect pests can be mediated by primary (e.g., proteinase and amylase inhibitors, thionins, and lectins) and secondary metabolites (e.g., alkaloids, tannins, and rotenoids) (Chrispeels and Raikhel, 1991; Peumans and Van Damme, 1995). Several organic substances extracted from vegetal tissues as essential oils, tannins, flavanoids, and proteins have been evaluated

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

for their repellent, deterrent, inhibitory, and toxic properties against pest and invader insects (Cavalcante et al., 2006) as termites (Arihara et al., 2004), weevils (Sadeghi et al., 2006), and mosquitoes (Dharmagadda et al., 2005). Jacobson (1989) included Anacardiaceae species among the promising botanical sources of insecticide substances due to the diversity of allelopathic effects that are described for this botanical family. The impact of inorganic and synthetic chemical insecticides on the environment has stimulated the search for compounds that occur naturally and can act as termite toxicants (Chen et al., 2004).

Lectins, proteins that agglutinate cells by carbohydrate recognition (Santos et al., 2005), are widely distributed among plants and are included among the best known plant proteins supposedly involved in defense mechanisms (Gatehouse et al., 1995; Peumans and Van Damme, 1995; Carlini and Grossi-de-Sá, 2002). Lectins have shown entomotoxic activities on larvae of cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (Macedo et al., 2004) and melon fruit fly *Bactrocera cucurbitae* (Kaur et al., 2006), developing stages of *C. maculatus* (Leite et al., 2005), and mature forms of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* (Sauvion et al., 2004), and it has been suggested that lectins may be explored for pest control or by genetic engineering aiming to increase plant resistance to insects (Carlini and Grossi-de-Sá, 2002; Saha et al., 2006).

Lectin activity was detected in *M. urundeuva* heartwood. In this report termiticidal and repellent effects of *M. urundeuva* lectin on *N. corniger* were evaluated.

2. Materials and methods

2.1. Isolation of lectin from *M. urundeuva* heartwood

M. urundeuva heartwood was collected in the state of Maranhão, in northeastern Brazil. A representative specimen is archived under number 054 at the Herbarium Aluisio Bittencourt, Centro de Estudos Superiores de Caxias (CESC), Universidade Estadual do Maranhão, Brazil.

Powdered heartwood (10 g) was suspended in 0.15 M NaCl (100 ml). After homogenisation in a magnetic stirrer (16 h at 4 °C), followed by filtration through gauze and centrifugation (3,000g, 15 min), the supernatant (crude extract) was taken as starting material. Soluble proteins in the crude extract were fractionated with ammonium sulphate and the 40–60% fraction (40–60F) containing 20.6 mg of protein was then loaded onto a chitin (Sigma, USA) column (7.5 × 1.5 cm) equilibrated (20 ml h⁻¹ flow rate) with 0.15 M NaCl. The washing step used 0.15 M NaCl (100 ml). The lectin was recovered by eluting the column with 1.0 M acetic acid (80 ml) and submitted to dialysis (4 °C, 4 h) against 0.15 M NaCl (1 l) for eluent elimination. Protein concentration was determined according to Lowry et al. (1951) using bovine serum albumin as standard.

2.2. Hemagglutinating activity assay

Hemagglutinating activity (HA) was carried out in microtiter plates (Kartell S.P.A., Italy) according to Paiva and Coelho (1992) using human (A, AB, and B) or rabbit erythrocytes treated with glutaraldehyde (Bing et al., 1967). The evaluated preparations (50 µl) were serially twofold diluted in 0.15 M NaCl before addition of 2.5% (v/v) suspension of erythrocytes (50 µl). The HA inhibitory assay used 200 mM *N*-acetylglucosamine monosaccharide solution. The lectin (50 µl) was serially twofold diluted in monosaccharide solution and incubation (45 min, 27 °C) was performed before addition of 2.5% (v/v) suspension of rabbit erythrocytes (50 µl). HA (titer) was defined as the lowest lectin concentration in the sample that showed hemagglutination. Specific HA was defined as the ratio between the titer and protein concentrations (mg ml⁻¹).

2.3. Phytochemical evaluation in thin layer chromatography (TLC)

The isolated lectin (15 µl containing 15 µg of protein) was submitted to phytochemical evaluation using silica gel TLC sheets (Merck, Germany). Different systems of development and adequate visualization techniques were used: 1% iron alum for hydrolysable tannins (Stiasny, 1912); vanillin–hydrochloric acid for condensed tannins and leucoanthocyanidins (Robertson et al., 1957); Dragendorff's reagent for alkaloids (Wagner and Bladt, 1996); sulphuric vanillin for terpenes and iridoids (Wagner and Bladt, 1996); Lieberman–Burchard reagent for steroids (Harbone, 1991); anisaldehyde for saponins (Wagner and Bladt, 1996); Neu's reagent for gallic acid (Neu, 1956) and flavonoids (Markhan, 1982); and UV light for coumarins (Wagner and Bladt, 1996).

2.4. Termiticidal assay

N. corniger identification was performed by Dr. Luiz Roberto Fontes (Superintendência de Controle de Endemias, SUCEN, Brasil). Termite colonies were maintained in the vegetation house at the Departamento de Agronomia of Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Termiticidal activity was evaluated by a no-choice bioassay based on the method described by Kang et al. (1990). Each experimental unit consisted of a Petri plate (90 × 15 mm) with the deep plate covered by filter paper. A filter paper disk of 4 cm diameter soaked with 200 µl of lectin (0.1, 0.2, 0.4, or 0.8 mg ml⁻¹) or 0.15 M NaCl (negative control) solutions was put in each plate. A total of 20 active termites (workers and soldiers, in the proportion of 4:1, respectively) were transferred to each plate. Plates were maintained at 28 °C in darkness. Evaluation of insect survival was made daily until the death of all insects. Bioassay was achieved in quintuplicate and survival rates were obtained for each treatment and expressed as mean ± SD. Student's *t*-test was established using Origin™ 6.0 (Microcal, USA). Significant differences between groups were at *p* < 0.05. The concentration required to kill 50% of insects in each treatment (LC₅₀) after 4 days was determined from the data obtained with a concentration range between 0.1 and 0.8 mg ml⁻¹ using the Probit Analysis method (Statplus, 2006) with a reliability interval of 95%.

2.5. Repellence assay

An assay based on Su et al. (1982) was used for evaluation of repellent activity. Petri plates (100 × 15 mm) were filled up with 2% agar solution until there was no space between the superior surface of agar and plate covers. After solidification, wells are made in the agar by removal of a central cylinder 25 mm in diameter and eight peripheral cylinders (6 mm diameter). In each peripheral well a filter paper soaked with 15 µl of lectin (0.2, 0.4, and 0.8 mg ml⁻¹) or 0.15 M NaCl (negative control) solutions was placed. Each treatment solution was present in duplicate in a plate. Termites (16 workers and 4 soldiers) were then transferred to the central well. Assays were made in triplicate. The plates were maintained at 28 °C in darkness and followed for 15 days for the following: absence or presence of termites in lectin and 0.15 M NaCl treated wells, standards of tunnel construction in agar, and closing by insects of constructed galleries.

2.6. Evaluation of lectin activity after trypsin treatment

Bovine trypsin (0.1 mg ml⁻¹ in 0.1 M Tris–HCl, pH 8.0; 500 µl) was incubated (37 °C, 60 min) with the lectin (0.2 mg ml⁻¹ in 0.15 M NaCl; 500 µl). The enzyme reaction was stopped by heating (100 °C for 20 min). A control tube containing lectin (0.2 mg ml⁻¹ in 0.15 M NaCl; 500 µl) in 0.1 M Tris, pH 8.0 (500 µl) was submitted to the same two steps. Control and test tubes were evaluated by HA. The enzyme activity was also evaluated before and after test tube heating according to Kakade et al. (1969) by incubation (30 min at 37 °C) of tube test aliquot (100 µl) with 4 mM *N*-α-benzoyl-DL-arginyl-p-nitroanilide substrate (30 µl) dissolved in dimethyl sulfoxide and diluted with Tris buffer. The enzyme reaction was stopped with 10% (v/v) acetic acid (50 µl). The substrate hydrolysis was followed by measurement of absorbance at 405 nm (Oliva et al., 2000).

3. Results

Table 1 shows the summary of lectin isolation from *M. urundeuva* heartwood. In the first step of the lectin isolation approach, proteins of *M. urundeuva* were solubilized with 0.15 M NaCl. From 10 g of powder, 952 mg of proteins was detected by Lowry's method. The next step corresponded to salting-out using ammonium sulphate and the most active fraction 40–60% (40–60F) contained 146 mg of protein.

HA of 40–60F was adsorbed on chitin and was eluted from the column with 1.0 M acetic acid. The lectin (1.3 mg) isolated by chromatography was active with all tested erythrocytes. Specific HA detected were as follows: rabbit (2,560), human A (1,280),

Table 1
Summary of lectin isolation from *M. urundeuva* heartwood

Sample	Total protein (mg)	HA (titer ⁻¹)	SHA	Purification (times)
Extract	952	32,768	2409	1.0
40–60F	146	32,768	3181	1.3
Lectin	9.3	1024	2560	1.1

Hemagglutinating activity (HA) titer was defined as the lowest lectin concentration able to produce visible hemagglutination. SHA (specific HA) was calculated from the ratio of titer to protein concentration (mg/ml). Purification was measured as the ratio between the SHA in the stage and SHA of extract.

B (2,560), and AB (2,560) erythrocytes. When the HA of lectin in the presence of *N*-acetylglucosamine was determined, the specific HA for rabbit erythrocytes was 49.7.

A sample of isolated lectin was submitted to TLC to evaluate the presence of non-protein contaminants. The chromatograms revealed a total absence of flavonoids, condensed proanthocyanidins, leucoanthocyanidins, alkalis, polyphenols, coumarins, cinamic derivatives, hydrolyzable tannins, saponins, steroids, iridoids, and terpenes (monoterpenes, sesquiterpenes, diterpenes, and triterpenes).

Resistance of lectin to proteolytic degradation was evaluated by determination of HA after incubation of lectin with bovine trypsin. The same titer (32^{-1}) was detected with lectin incubated or not with the enzyme. HA was not affected by heating to 100°C (titer of 32^{-1}). The enzyme activity assay showed that active enzyme (A405 nm = 0.175) was not able to hydrolyze the substrate after heating (A405 nm = 0.046).

Termiticidal activity of lectin on *N. corniger* (Fig. 1) was evaluated. Contact with lectin in all concentrations induced mortality of termites. For workers (Fig. 1A), treatments with the highest lectin concentrations (0.4 and 0.8 mg ml^{-1}) induced death of all insects after 8 days, while 0.1 and 0.2 mg ml^{-1} concentrations promoted 100% mortality after 10 and 9 days, respectively. The relation between lectin concentration and termiticidal effect was also detected when the survival rate was observed everyday. The 0.4 and 0.8 mg ml^{-1} concentrations promoted a survival rate of 50% on the second day, while 0.1 and 0.2 mg ml^{-1} concentrations did so on the third day. In the negative control 100% mortality was detected only after 18 days and survival lower than 50% was observed after 13 days. Statistical analysis using Student's *t*-test ($p < 0.05$) showed that the effects of 0.4 and 0.2 mg ml^{-1} concentrations on workers

were not significantly different after the sixth day. LC_{50} of 0.248 mg ml^{-1} was determined after 4 days.

Fig. 1B shows lectin's effect on soldiers. The termiticidal activity was higher on soldiers than on workers since 100% mortality was observed in less time at all lectin concentrations tested: at 4 (0.8 mg ml^{-1}), 5 (0.4 and 0.2 mg ml^{-1}), and 7 days (0.1 mg ml^{-1}) as well as by determination of LC_{50} of 0.199 mg ml^{-1} . In the negative control, soldiers showed high resistance in an artificial environment since a survival rate of 50% was determined after 14 days. Statistical analysis using Student's *t*-test ($p < 0.05$) showed that results were significantly different.

In the repellence assay, tunnels were built by *N. corniger* with no relation to the presence of lectin or negative control. No gallery was closed and termites were observed exploring treated and non-treated wells, indicating that lectin does not induce a rejection effect.

4. Discussion

M. urundeuva heartwood characteristics such as durability and resistance to deteriorative biological agents have stimulated its use in Brazilian civil construction. This paper reports the termiticidal activity of a lectin isolated from *M. urundeuva* heartwood. The purification protocol yielded lectin in milligram quantities and with high HA stimulating evaluation of lectin as a bioactive component of heartwood.

Chemical plant defense involves secondary metabolites of low molecular weight as well as lectins. HA of *M. urundeuva* heartwood was inhibited by *N*-acetylglucosamine monosaccharide. Linkage of monosaccharide or glycoprotein to lectin carbohydrate-binding sites avoids binding of lectin to cell surface glycoconjugates and HA is not detected (Kennedy et al., 1995). Lectin activity was adsorbed on the chitin matrix. Plant lectins with *N*-acetylglucosamine specificity and chitin binding property mainly act by interaction with peritrophic membranes of insects. They show toxic effects on Coleoptera (Murdock et al., 1990; Zhu-Salzman et al., 1998), Homoptera (Powell et al., 1995), Hemiptera (Habibi et al., 1998) and Lepidoptera (Czapla and Lang, 1990).

Termites consume many types of food, for example humus and cellulosic materials such as paper and wood. The evaluation of *M. urundeuva*'s lectin effect on *N. corniger* was performed using filter paper soaked with the protein. The assay revealed a termiticidal effect of lectin and yielded different LC_{50} values for soldier and worker castes. Insecticide action on the *Coptotermes formosanus* termite was detected for plant constituents. Oils isolated from leaves of *Calocedrus formosana* and from *Calocedrus macrolepis* heartwood showed anti-termite activity with LC_{50} of 27.6 mg g^{-1} and 1.7 mg g^{-1} , respectively (Cheng et al., 2004; Cheng et al., 2007). This is the first report of the action of lectin on termites. The insecticidal effect of plant lectins generally is evaluated by bioassays that include the lectin in artificial diets offered to insects and it has been suggested that the toxic action of lectins is related to their binding to glycoproteins present in the digestive tract of insects (Macedo et al., 2007). The lectins from *Talisia esculenta* and *Galanthus nivalis* showed insecticidal effect on *C. maculatus* (Coleoptera) and three aphid predators – *Chrysoperla carnea* (Neuroptera), *Adalia bipunctata*, and *Coccinella septempunctata* (Lepidoptera) – respectively, when the insects were fed with seeds (*T. esculenta*) or a sucrose solution (*G. nivalis*) containing these lectins at 1% (w/w) concentration (Macedo et al., 2002; Hogervorst et al., 2006).

M. urundeuva heartwood lectin was active after incubation with bovine trypsin. The detection of HA after contact with a protease found in similar forms in the digestive system of insects (Coelho et al., 2007) may indicate that the termiticidal effect of heartwood may be due to the presence of active lectin. The insecticide lectin

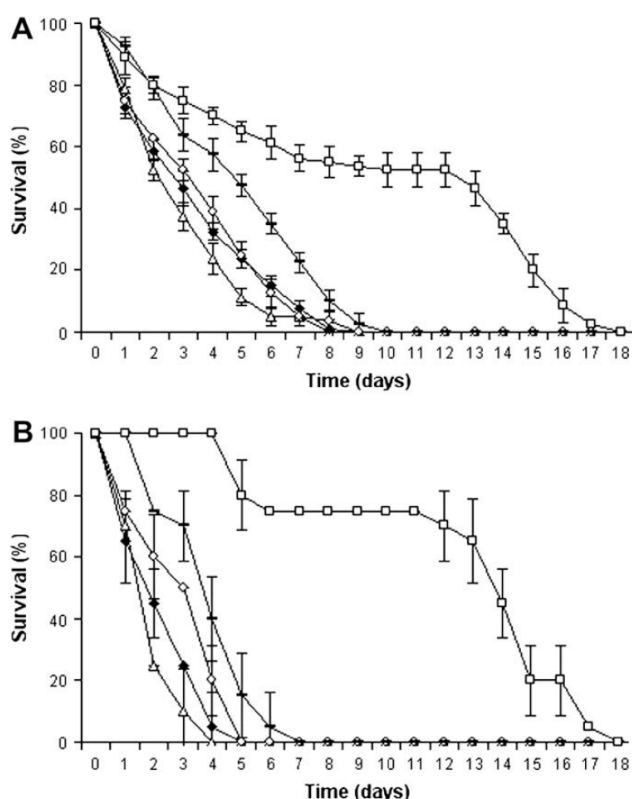


Fig. 1. Effect of contact with *M. urundeuva* heartwood lectin on *N. corniger* workers (A) and soldiers (B). Treatments were lectin at concentrations of 0.1 (—), 0.2 (◇), 0.4 (◆), and 0.8 mg ml^{-1} (△); 0.15 M NaCl was used as negative control (□). Each point represents the mean $\pm$ S.D. of five experiments.

from *Bauhinia monandra* was resistant to digestion by trypsin (Macedo et al., 2007) and it has been suggested that entomotoxic lectins resistant to proteolytic degradation in the insect gut may interfere with the digestive and nutrient absorption processes (Zhu-Salzman et al., 1998; Zhu-Salzman and Salzman, 2001; Macedo et al., 2004; Macedo et al., 2007).

Aiming to investigate if lectin's effect on termites was due to repellent action, the assay in agarose gel evaluated the building of tunnels and closing of galleries by insects. Tunneling termites can react to the presence of possibly toxic substances by closing galleries to avoid contact with these substances (Su et al., 1982). The lectin of *M. urundeuva* showed no repellent property, suggesting that the anti-termite activity was due to its toxicity.

The lectin preparation that was tested was free of alkalis, saponins, polyphenolic substances, and terpenoid compounds, plant secondary metabolites that can promote insect mortality (Cavalcante et al., 2006). This result corroborates the important role of the lectin described in the resistance of *M. urundeuva* heartwood to termites.

Due to intense exploitation, *M. urundeuva* is cited in the Brazilian Threatened Flora Red List of IUCN (The World Conservation Union). The danger of extinction is one of the stimuli for a chemical evaluation of *M. urundeuva*'s chemical properties. The effect of *M. urundeuva* lectin on *N. corniger* survival suggests the possibility of participation of this bioactive peptide in the resistance of *M. urundeuva* heartwood to termites. The investigation of termiticidal activity is a positive step in the search for new natural insecticidal agents. Genes coding for entomotoxic lectins have been introduced, rendering transgenic plants less susceptible to insect attack (Schuler et al., 1998; Hilder and Boulter, 1999). The elucidation of the mechanism of action of the lectin, including the possible resistance to degradation by enzymes of the termite digestive system, is in progress.

Acknowledgements

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

References

- Arihara, S., Umeyama, A., Bando, S., Kobuke, S., Imoto, S., Ono, M., Yoshikawa, K., Amita, K., Hashimoto, S., 2004. Termiticidal constituents of the black-heartwood of *Cryptomeria japonica*. *Mokuzai Gakkaishi* 50, 413–421.
- Bing, D.H., Weyand, J.G., Stavinsky, A.B., 1967. Hemagglutination with aldehyde-fixed erythrocytes for assay of antigens and antibodies. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 124, 1166–1170.
- Breznak, J.A., 1982. Intestinal microbiota of termites and other xylophagous insects. *Annual Review of Microbiology* 36, 323–343.
- Carlini, C.R., Grossi-de-Sá, M.F., 2002. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon* 40, 1515–1539.
- Cavalcante, G.M., Moreira, A.F.C., Vasconcelos, S.D., 2006. Potencialidade inseticida de extratos aquosos de essências florestais sobre mosca-branca. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 41, 9–14.
- Chang, S., Wang, S., Cheng, S., 2000. Environmental effects on the color of sugi (*Cryptomeria japonica* D. Don) heartwood. *Journal of Wood Science* 46, 390–394.
- Cheng, S., Chang, H., Wu, C., Chang, S., 2007. Anti-termite activities of essential oils from coniferous trees against *Coptotermes formosanus*. *Bioresource Technology* 98, 456–459.
- Cheng, S., Wu, C., Chang, H., Kao, Y., Chang, S., 2004. Antitermitic and antifungal activities of essential oil of *Calocedrus formosana* leaf and its composition. *Journal of Chemical Ecology* 30, 1957–1967.
- Chen, K., Ohmura, W., Doi, S., Aoyama, M., 2004. Termite feeding deterrent from Japanese larch wood. *Bioresource Technology* 95, 129–134.
- Chrispeels, M.J., Raikhel, N.V., 1991. Lectins, lectin genes and their role in plant defense. *Plant Cell* 3, 1–9.
- Coelho, M.B., Marangoni, S., Macedo, M.L.R., 2007. Insecticidal action of *Annona coriacea* lectin against the flour moth *Anagasta kuehniella* and the rice moth *Corcyra cephalonica* (Lepidoptera: Pyralidae). *Comparative Biochemistry and Physiology C* 146, 406–414.
- Czapla, T.H., Lang, B.A., 1990. Effect of plant lectins on the larval development of European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) and southern corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Economic Entomology* 83, 2480–2485.
- Deka, M., Saikia, C.N., Baruah, K.K., 2002. Studies on thermal degradation and termite resistant properties of chemically modified wood. *Bioresource Technology* 84, 151–157.
- Dharmagadda, V.S.S., Naik, S.N., Mittal, P.K., Vasudevan, P., 2005. Larvicidal activity of *Tagetes patula* essential oil against three mosquito species. *Bioresource Technology* 96, 1235–1240.
- Edwards, R., Mill, A.E., 1986. *Termites in Buildings: Their Biology and Control*. Rentokil, London.
- Gatehouse, A.M.R., Powell, K.S., Van Damme, E.J.M., Peuman, W.J., Gatehouse, J.A., 1995. Insecticidal properties of plant lectins: their potential in plant protection. In: Pustzai, A., Bardocz, S. (Eds.), *Lectins: Biomedical Perspectives*. Taylor and Francis, London, pp. 35–58.
- Habibi, J., Backus, E.A., Czapla, T.H., 1998. Subcellular effects and localization of binding sites of phytohemagglutinin in the potato leafhopper, *Empoasca fabae* (Insecta: Homoptera: Cicadellidae). *Cell and Tissue Research* 294, 561–571.
- Harbone, J.B., 1991. *Phytochemical Methods: a Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*. Chapman & Hall, London.
- Hilder, V.A., Boulter, D., 1999. Genetic engineering of crop plants for insect resistance – a critical review. *Crop Protection* 18, 177–191.
- Hogervorst, P.A.M., Ferry, N., Gatehouse, A.M.R., Wäckers, F.L., Romeis, J., 2006. Direct effects of snowdrop lectin (GNA) on larvae of three aphid predators and fate of GNA after ingestion. *Journal of Insect Physiology* 52, 614–624.
- Hojó, M., Morioka, M., Matsumoto, T., Miura, T., 2005. Identification of soldier-caste specific protein in the frontal gland of nasute termite *Nasutitermes takasagoensis* (Isoptera: Termitidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35, 347–354.
- Hunt, G.M., Garratt, G.A., 1967. *Wood Preservation*. Mc Graw Hill, New York.
- Jacobson, M., 1989. Botanical pesticides: past, present and future. In: Arnason, J.T., Philogene, B.J.R., Morand, P. (Eds.), *Insecticides of Plant Origin*. American Chemical Society, Washington, pp. 110–119.
- Kakade, M.L., Rackis, J.J., Mcghee, J.G., 1969. An evaluation of natural vs synthetic substrates for measuring the anti tryptic activity of soy bean samples. *Cereal Chemistry* 46, 518–526.
- Kambhampati, S., Eggleton, P., 2000. Taxonomy and phylogeny of termites. In: Abe, T., Bignell, D.E., Higashi, M. (Eds.), *Termites: Evolution, Sociality, Symbiosis, Ecology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 1–23.
- Kang, H.Y., Matsushima, N., Sameshima, K., Takamura, N., 1990. Termite resistance tests of hardwoods of Kochi growth. The strong termiticidal activity of kagonoki (*Litsea coreana* Leveillé). *Mokuzai Gakkaishi* 36, 78–84.
- Kaur, M., Singh, K., Rup, P.J., Saxena, A.K., Khan, R.H., Ashraf, M.T., Kamboj, S.S., Singh, J., 2006. A tuber lectin from *Arisaema helleborifolium* Schott with anti-insect activity against melon fruit fly, *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) and anti-cancer effect on human cancer cell. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 445, 156–165.
- Kennedy, J.F., Paiva, P.M.G., Correia, M.T.S., Cavalcanti, M.S.M., Coelho, L.C.B.B., 1995. Lectins: versatile proteins of recognition. *Carbohydrate Polymers* 26, 219–230.
- Leite, Y.F.M.M., Silva, L.M.C.M., Amorim, R.C.N., Freire, E.A., Jorge, D.M.M., Grangeiro, T.B., Benevides, N.M.B., 2005. Purification of a lectin from the marine red alga *Gracilaria ornata* and its effect on the development of the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Biochimica et Biophysica Acta* 1724, 137–145.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265–275.
- Macedo, M.L.R., Freire, M.G.M., Novello, J.C., Marangoni, S., 2002. *Talisia esculenta* lectin and larval development of *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Biochimica et Biophysica Acta* 1571, 83–88.
- Macedo, M.L.R., Freire, M.G.M., Castro, M.M., 2004. Mechanisms of the insecticidal action of TEL (*Talisia esculenta* lectin) against *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 56, 84–96.
- Macedo, M.L.R., Freire, M.G.M., Silva, M.B.R., Coelho, L.C.B.B., 2007. Insecticidal action of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Comparative Biochemistry and Physiology A* 146, 486–498.
- Mainieri, C., Chimelo, J.P., 1989. *Fichas de características de madeiras brasileiras*. IPT, São Paulo.
- Markhan, K.R., 1982. *Techniques of Flavonoid Identification*. Academic Press, London.
- Murdock, L.L., Huesing, J.E., Nielsen, S.S., Pratt, R.C., Shade, R.E., 1990. Biological effects of plant lectins on the cowpea weevil. *Phytochemistry* 29, 85–89.
- Neu, R.A., 1956. A new reagent for differentiating and determining flavones on paper chromatograms. *Naturwissenschaften* 43, 82.
- Oliva, M.L.V., Souza-Pinto, J.C., Batista, I.F.C., Araújo, M.S., Silveira, V.F., Auerswald, E.A., Mentele, R., Eckerskorn, C., Sampaio, U.M., Sampaio, C.A.M., 2000. *Leucaena leucocephala* serine proteinase inhibitor: primary structure and action on blood coagulation, kinin release and rat paw edema. *Biochimica et Biophysica Acta* 7, 64–74.
- Paes, J.B., Moraes, V.M., Lima, C.R., 2002. Resistência das madeiras de aroeira (*Myracrodruon urundeuva*), cássia (*Senna siamea*) e ipê (*Tabebuia impetiginosa*)

- a fungos e cupins xilófagos em condições de laboratório. *Floresta e Ambiente* 9, 135–144.
- Paiva, P.M.G., Coelho, L.C.B.B., 1992. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (amaratu bean). *Applied Biochemistry and Biotechnology* 36, 113–118.
- Peumans, W.J., Van Damme, E.J.M., 1995. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiology* 109, 347–352.
- Powell, K.S., Gatehouse, A.M.R., Hilder, V.A., Gatehouse, J.A., 1995. Antifeedant effects of plant-lectins and an enzyme on the adult stage of the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 75, 51–59.
- Robertson, E.H., Cartwright, R.A., Wood, D.J., 1957. The flavones of tea. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 7, 637–646.
- Sadeghi, A., Van Damme, E.J.M., Peumans, W.J., Smagghe, G., 2006. Deterrent activity of plant lectins on cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (F.) oviposition. *Phytochemistry* 67, 2078–2084.
- Saha, P., Majumder, P., Dutta, I., Ray, T., Roy, S.C., Das, S., 2006. Transgenic rice expressing *Allium sativum* leaf lectin with enhanced resistance against sap-sucking insect pests. *Planta* 223, 1329–1343.
- Santos, A.F.S., Argolo, A.C.C., Coelho, L.C.B.B., Paiva, P.M.G., 2005. Detection of water soluble lectin and antioxidant component from *Moringa oleifera* seeds. *Water Research* 39, 975–980.
- Sauvion, N., Nardonb, G., Febvay, G., Gatehouse, A.M.R., Rahbé, Y., 2004. Binding of the insecticidal lectin Concanavalin A in pea aphid *Acyrtosiphon pisum* (Harris) and induced effects on the structure of midgut epithelial cells. *Journal of Insect Physiology* 50, 1137–1150.
- Scheffrahn, R.H., Cabrera, B.J., Kern Jr., W.J., Su, N.Y., 2002. *Nasutitermes costalis* (Isoptera: Termitidae) in Florida: first record of a non-endemic establishment by a higher termite. *Florida Entomologist* 85, 273–275.
- Scheffrahn, R.H., Krecek, J., Szalanski, A.L., Austin, J.W., 2005. Synonymy of neotropical arboreal termites *Nasutitermes corniger* and *N. costalis* (Isoptera: Termitidae: Nasutitermitinae), with evidence from morphology, genetics, and biogeography. *Annals of the Entomological Society of America* 98, 273–281.
- Schuler, T.H., Poppy, G.M., Kerry, B.R., Denholm, I., 1998. Insect resistant transgenic plants. *Trends in Biotechnology* 16, 168–175.
- Stiasny, E., 1912. *The Qualitative Detection and Differentiation of Vegetable Tannins*. Collegium, Haltingen.
- Su, N., Tamashiro, M., Yates, J.R., Haverty, M.L., 1982. Effects of behavior in the evaluation of insecticides for prevention of or remedial control of the Formosan subterranean termite. *Journal of Economic Entomology* 75, 188–193.
- Vasconcellos, A., Mélo, A.C.S., Segundo, E.M.V., Bandeira, A.G., 2005. Cupins de duas florestas de restinga do nordeste brasileiro. *Iheringia. Série Zoologia* 95, 127–131.
- Wagner, H., Bladt, S., 1996. *Plant Drug Analysis*, second ed. Springer, New York.
- Zhu-Salzman, K., Shade, R.E., Koiwa, H., Salzman, R.A., Narasimhan, M., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., Murdock, L.L., 1998. Carbohydrate binding and resistance to proteolysis control insecticidal activity of *Griffonia simplicifolia* lectin II (GSLI). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 15123–15128.
- Zhu-Salzman, K., Salzman, R.A., 2001. Functional mechanics of the plant defensive *Griffonia simplicifolia* lectin II: resistance to proteolysis is independent of glycoconjugate binding in the insect gut. *Journal of Economic Entomology* 94, 1280–1284.

5.1. CONCLUSÕES – ARTIGO 1

- A lectina do cerne de *M. urundeuva* foi isolada em cromatografia em coluna de quitina com elevada atividade hemaglutinante frente a diferentes eritrócitos.
- A atividade da lectina permaneceu após tratamento com tripsina, indicando resistência à degradação proteolítica.
- A lectina apresentou alta toxicidade para cupins da espécie *N. corniger* (com maior efeito nos soldados), mas não promoveu efeito repelente.
- A preparação da lectina isolada foi livre de metabólitos secundários, indicando que o efeito tóxico sobre cupins não foi devido à presença desses contaminantes bioativos.

6. ARTIGO 2

**ANTIOXIDANT, *Fusarium* GROWTH INHIBITION AND *Nasutitermes corniger*
REPELLENT ACTIVITIES OF SECONDARY METABOLITES FROM
Myracrodruon urundeuva HEARTWOOD**

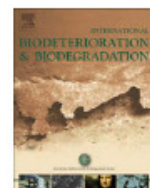
ARTIGO PUBLICADO NO PERIÓDICO “International Biodeterioration and
Biodegradation”

(Volume 63, Issue 4, p. 470-477, June 2009)



Contents lists available at ScienceDirect

International Biodeterioration & Biodegradation

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ibiodAntioxidant, *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,*}

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

^bDepartamento de Bioquímica-CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-420 Recife, Pernambuco, Brazil

^cDepartamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Dois Irmãos, 52171-030 Recife, Pernambuco, Brazil

^dDepartamento de Ciências Farmacêuticas-CCS, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50740-521 Recife, Pernambuco, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 October 2008

Received in revised form

6 January 2009

Accepted 9 January 2009

Available online 20 February 2009

Keywords:

Antioxidant

*Fusarium**Myracrodruon urundeuva**Nasutitermes corniger*

Secondary metabolites

ABSTRACT

Myracrodruon urundeuva heartwood is resistant to biodeterioration and lectin purified from heartwood showed antifungal and termiticidal activities. This report deals with antioxidant, antifungal and termite repellent activities of secondary metabolites from *M. urundeuva* heartwood. Saline (SE, active hemagglutinin preparation) and methanolic (ME, without hemagglutinating activity) extracts contain phenolic compounds, gallic acid, flavonoids, luteolin, cinamic derivatives, proanthocyanidins, hydrolysable tannins, and leucoanthocyanidins. Both SE and ME showed antioxidant activity and were effective in *Fusarium* growth inhibition. SE was efficient against *Fusarium decemcellulare*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium oxysporum*, and *Fusarium solani* but it had little effect against *Fusarium lateritium*. ME practically had no effect on *F. decemcellulare* and was more active than SE against *F. lateritium*. SE induced mortality of *Nasutitermes corniger* (LC₅₀ of 1.81 mg ml⁻¹ for soldiers and 2.59 mg ml⁻¹ for workers) and had no repellent activity. ME had no termiticidal activity but was a good repellent. The detected bioactivities point out the possibility of participation of secondary metabolites in the resistance of *M. urundeuva* heartwood to biodeterioration. Additionally, the results indicate the use of wood residues, as extracts, a source of natural bioactive agents.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Degradation of woods by fungi or insects (termites and beetles) is one of the most important limiting factors for wood utilization (Highley, 1999; Cheng et al., 2007). In some industries in the Amazon region, the loss in wooden parts reaches 60% due to inadequate storage conditions and deterioration by fungi and insects (Sales-Campos et al., 2000; Abreu et al., 2002), and the natural resistance of many hardwoods or timbers causes over-exploitation (Primack and Rodrigues, 2001). Extraction or synthesis of substances involved in hardwood protection against biodegradation can be a source of natural compounds for the treatment of less resistant woods with a minimal environmental impact.

Myracrodruon urundeuva Fr. All. is broadly distributed in Brazil. Its heartwood has economic importance due its utilization in Brazilian building industry, but is in risk of extinction (Brazilian

Threatened Flora Red List of IUCN). *M. urundeuva* heartwood has low content of structural polymer cellulose and high content of lignin and secondary metabolites (Morais et al., 1999). Paes et al. (2002) evaluating the resistance of *M. urundeuva* wood to *Postia placenta* and *Neolentinus lepideus* fungi and *Nasutitermes corniger* termites demonstrated that the attack of phytopathogens was more intense in sapwood than heartwood. Additionally, it was revealed that the natural resistance was not related to wood specific weight but significant relation was achieved between fungal attack and content of extractives soluble in hot water. Recently, a hemagglutinating protein (lectin) has been isolated from saline extract from *M. urundeuva* heartwood and showed toxic effect on *N. corniger* (Sá et al., 2008), *Aedes aegypti* larvae (Sá et al., 2009b) and antifungal effect on *Fusarium decemcellulare*, *Fusarium fusarioides*, *Fusarium lateritium*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* and *Fusarium verticillioides* (Sá et al., 2009a). The authors pointed out the possibility of participation of this lectin in the resistance of *M. urundeuva* heartwood to biodegradation.

Secondary metabolites (alkaloids, flavonoids, terpenoids, and other phenolic compounds) in woods are called extractives and can

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

be found in resiniferous channels, xylem rays and at cellular level (Cambie et al., 1984). They are known to participate in plant defence mechanism by their repellent or attractive properties, protection against biotic and abiotic stresses, and maintenance of structural integrity of plants (Becerra et al., 2002; Silva et al., 2007). Hydric stress, radiation, temperature changes, luminosity, environmental pollution and infections by microbial phytopathogens can elevate the concentration of reactive species of oxygen or other free radicals that cause oxidative damage to plant membrane lipids, nucleic acids, and proteins. It has been suggested that wood extractives can protect heartwood by free radical scavenger (antioxidant) mechanism and glutathione, ascorbic acid, tocopherol, carotenoids, flavonoids, mannitol as well as hydroquinones correspond to plant antioxidative defence system (Larson, 1988; Schultz and Nicholas, 2002; Sampath-Wiley et al., 2008).

Degradation of non-durable woods by fungi is related to action of fungal enzymes on plant cell wall including extensive oxidative depolymerization of polymeric polysaccharides (Green and Highley, 1997; Silva et al., 2007). *Fusarium* species are able to attack woods when the humidity is favourable. Becerra et al. (2002) correlated concentration of phenolic diterpenes with wood resistance to *Fusarium fujikuroi* and *Fusarium ciliatum* suggesting in situ *Fusarium* inhibition. Study conducted to identify the relationships between climatic conditions, wood species and distribution of biodeteriorating agents on *Celtis mildbraedii*, *Ceiba pentandra* and *Pterygota macrocarpa* woods indicated *F. solani* as the most abundant and common fungi isolated from all wood samples. *F. oxysporum*, *Fusarium sacchari*, and *F. decemcellulare* occurred only sporadically. The authors suggested that prophylactic treatment should be done against these organisms aiming wood preservation (Apetorgbor et al., 2004). Plant extract with antifungal activity against *F. oxysporum* was also suggested as alternative to inhibition of this phytopathogenic fungi aiming to reduce yield losses (Khalil and Dababneh, 2007).

Extractives from species of Podocarpaceae family showed antifungal activity on *Aspergillus* sp., *F. fujikuroi*, *F. ciliatum*, *Mucor miehei*, *Nematospora coryli*, *Paecilomyces variotii* and *Penicillium notatum* and the authors suggested that the wood resistance to fungus attack was due to the high concentration of phenolic diterpenes (Becerra et al., 2002). It has been suggested that tannin–protein interaction explains insecticide and antimicrobial activities of tannins (Aerts et al., 1999).

Termites are able to feed on woods because of the presence of symbiotic cellulose decomposing microorganisms in their gut (Breznak, 1982; Hojo et al., 2005). *Nasutitermes* species are broadly distributed in the tropics worldwide and cause damage in buildings, preferentially attacking roofs, linings, and structural spans (Edwards and Mill, 1986; Scheffrahn et al., 2002). *N. corniger* is one of the most dominant and broadly distributed species of the genus and is able to invade the urban environment attacking wood employed in structures of buildings (Scheffrahn et al., 2005; Vasconcellos et al., 2005; Paes et al., 2007). It has been suggested that natural resistance of *Caesalpinia echinata* heartwood to termite *Cryptotermes brevis* is due to presence of wood toxic extractives (Silva et al., 2007) and termiticidal activity on termite *Coptotermes formosanus* was already detected in vegetal oil from heartwood from coniferous tree (Cheng et al., 2007). The treatment of woods, i.e., the incorporation of substances that promote improvement in resistance, has been used worldwide for reduction of wood loss, preventing expenses with replacement of spoiled parts and, consequently, reducing the impact on remaining forests. In Brazil, the annual production of treated wood in 2005 was about 685,000 m³ and only 3% was used for building industry. This amount is very small in comparison to United States estimate of treated wood annual production of 15 million m³ with more than 70% used in building industry (Silva, 2006; Paes et al., 2007).

This work reports the phytochemical analysis of methanolic and saline extracts from *M. urundeuva* heartwood and the investigation of their antioxidant, antifungal and termiticidal activities. The tissue was chosen since it is considered to be resistant to phytopathogen attack. The study of secondary metabolites present in *M. urundeuva* heartwood may contribute to understand the causes of its natural durability and additionally, may indicate a new source of extractives for treatment of less resistant woods.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

M. urundeuva (Engl.) Fr. Allemão belongs to the Division Magnoliophyta, Class Magnoliopsida, Subclass Rosidae, Order Sapinales, Family Anacardiaceae and its popular names are “aroeira do sertão” in Portuguese and “urundel” in Spanish (Leite, 2002). A sample of *M. urundeuva* central heartwood from a tree of 6 m of height and 20 cm of diameter was 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. *M. urundeuva* heartwood extracts

The heartwood was air dried and powdered (40 mesh). Saline extract (SE) was obtained by soaking the powdered heartwood (10 g) in 0.15 mol kg⁻¹ NaCl (100 ml) and magnetic stirring for 16 h at 4 °C. After filtration, the homogenate was filtered through gauze, centrifuged (3000g, 15 min, 4 °C), and the supernatant was dialyzed (against distilled water for 4 h at 4 °C) and dried by lyophilisation to yield SE. Methanolic extract (ME) was obtained by soaking the powdered material (3 g) in methanol (10 ml) at 25 °C for 3 h. After extraction, the mixture was filtered and evaporated to dryness on a rotary evaporator to yield ME. The extracts were diluted in methanol or water and used in phytochemical analysis, hemagglutinating activity assay, antioxidant determination as well as biological assays.

Powdered sapwood (40 mesh, 10 g) was extracted with 0.15 mol kg⁻¹ NaCl (100 ml) by 16 h at 4 °C under magnetic stirring. After filtration and centrifugation (3000g, 15 min, 4 °C) of filtrate, the supernatant was dialyzed (against distilled water for 4 h at 4 °C) and dried by lyophilisation to yield sapwood extract.

2.3. Hemagglutinating activity

Hemagglutinating activity 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). Hemagglutinating activity (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 hemagglutinating activity was defined as the ratio between the titer and protein concentration (unit mg⁻¹).

2.4. Total phenol content

Total phenol content of SE and ME was determined by the Folin-Ciocalteu method based on the reduction of phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent by phenols in alkaline solution (Morais et al., 1999). Folin-Ciocalteu reagent (1:10 solution in distilled water; 2.5 ml) and sodium carbonate (75 g l⁻¹ solution in distilled water; 2 ml) were added to SE or ME (0.5 mg ml⁻¹ solution

in distilled water; 0.5 ml) as well as tannic acid (standard calibration curve: $9.6\text{--}48\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$ solutions in distilled water; 0.5 ml), and the mixtures were kept at $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 5 min. After cooling for 30 min, the absorbance was measured at 760 nm.

2.5. Phytochemical evaluation by thin layer chromatography (TLC)

A sample (15 μl) of SE and ME (1.0 mg ml^{-1} in methanol) was submitted to phytochemical evaluation using silica gel TLC sheets (60F254 aluminium backed, Merck Germany). Different systems of development and adequate visualization techniques were used: 1% (w/v) iron alum for hydrolysable tannins (Stiasny, 1912), Neus reagent for gallic acid (Neu, 1956) and flavonoids (Markhan, 1982), vanillin–hydrochloric acid for condensed tannins and leucoanthocyanidins (Roberts et al., 1956), Lieberman–Burchard reagent for steroids (Harborne, 1991), Dragendorff's reagent for alkaloids, vanillin–sulphuric acid for terpenes and iridoids, anisaldehyde for saponins and UV light for coumarins [all last four techniques described by Wagner and Bladt (1996)].

2.6. DPPH free radical scavenging activity

Qualitative assay of free radical scavenger capacity (antioxidant activity) from SE and ME (1.0 mg ml^{-1} in methanol; 2 μl) as well as ascorbic acid, catechin, epigallocatechin and epigallocatechin gallate standards (1.0 mg ml^{-1} in methanol; 2 μl) was performed according to Soler-Rivas et al. (2000) using dot-blots on thin layer chromatography (TLC) stained with a 0.4 mM 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH) solution. The dilutions of applied samples were 1:2, 1:4 and 1:8. Positive results were observed by yellow color on silica sheet.

Quantitative assay for antioxidant activity from solutions (1.0 mg ml^{-1} in methanol) of SE, ME as well as ascorbic acid and catechin standards was performed according to Brand-Williams et al. (1995) and Soler-Rivas et al. (2000) with slight modification. An aliquot (20 μl) of each solution was mixed with 980 μl of DPPH methanolic solution (90 μM) to a final volume of 1 ml. Absorbance at 515 nm was read using a spectrophotometer and the disappearance of DPPH was monitored by decrease in absorbance, which was recorded after 0, 1, 2, 3, 4, and 5 min, and subsequently every 5 min up to 30 min. The concentration of DPPH in the reaction mixture was calculated using a calibration curve according to the linear regression $A_{515\text{nm}} = 0.00853 + 0.00929[\text{DPPH}]$ ($R^2 = 0.99695$), being [DPPH] expressed in mg ml^{-1} . The percentage of remaining DPPH (%DPPH_{REM}) was calculated according to Brand-Williams et al. (1995), as follows: $\% \text{DPPH}_{\text{REM}} = [\text{DPPH}]_T / [\text{DPPH}]_{T_0} \times 100$ where T is the time when absorbance was determined and T₀ is the time zero.

The determination of inhibition percentage (IP) was made adding SE and ME (50 μl) to 90 μM methanolic solution of DPPH (2 ml) and the absorbance (515 nm) at the steady state was determined. IP was calculated according the expression: $\text{IP} = 100[(A_{T_0} - A_{T_S})/A_{T_0}]$ where A_{T_0} is the absorbance at time zero and A_{T_S} is the absorbance in steady state. The IP corresponds to the amount of total DPPH that was inhibited, i.e., the DPPH that reacted with antioxidant at steady state. Results were expressed as % of inhibition of the oxidant agent (reduction of DPPH).

2.7. Antifungal activity

Fusarium species were obtained from Culture Collections of University Recife Mycologia (URM, Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, Brazil). *F. solani* (URM-2490), *F. oxysporum* (URM-2489), *F. moniliforme* (URM-3226), *F. decem-cellulare* (URM-3006) and *F. lateritium* (URM-2491) were identified

by Dr. Débora Maria Massa Lima (Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, Brazil).

Antifungal activity was performed according to Cunico et al. (2004). The method has been modified by application of samples in solid potato-dextrose agar (PDA) medium rather than liquid medium used by Cunico et al. (2004). SE and ME (1.0 mg ml^{-1} in distilled water) were filtered using a 0.45 μm sterile syringe filter (Minisart®). Next, the samples (50 μl) were spread on solidified PDA medium in Petri plates (100 $\times$ 15 mm) and a fungal mycelium disk (0.625 cm in diameter) was disposed in the center of Petri plate. Distilled water was used as negative control and all assays were carried out in triplicate. The plates were incubated at $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 72 h. Antifungal activity was indicated by a reduction of the fungal growth zone (diameter) in the plates in comparison to negative controls.

2.8. Termiticidal activity

Colonies of *N. corniger*, identified by Dr. Luiz Roberto Fontes (Superintendência de Controle de Endemias, SUCEN, Brazil) were maintained in the vegetation house at the Departamento de Agronomia of Universidade Federal Rural de Pernambuco. Termiticidal activity was evaluated by a no-choice bioassay based on the method described by Kang et al. (1990). Each experimental unit consisted of a Petri plate (90 $\times$ 15 mm) with the lower plate covered by filter paper. A filter paper disk (4 cm of diameter) impregnated with 200 μl of SE or ME (0.5, 1.0, 2.0 and 3.0 mg ml^{-1} in distilled water) was put in each plate. A total of 20 active termites (workers and soldiers, in the proportion of 4:1, respectively) was transferred to each plate and the plates were maintained at $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ in darkness. Evaluation of insect survival was made daily until the death of all insects. Distilled water was used in negative control. Bioassay was achieved in quintuplicate and survival rates (%) were obtained for each treatment.

2.9. Repellence activity

Assay based on Su et al. (1982) was used for evaluation of repellent activity. Petri plates (100 $\times$ 15 mm) were filled up with 2% agar solution until there was no space between the superior surface of agar and plate covers. After solidification, wells are made in agar by the removal of a central cylinder with 25 mm diameter and 10 peripheral cylinders (6 mm diameter). In each peripheral well was put a filter paper soaked with 15 μl of SE and ME (0.5, 1.0, 2.0 and 3.0 mg ml^{-1} in distilled water) or distilled water (negative control) solutions. Each treatment solution was present in double in each plate. Termites (16 workers and 4 soldiers) were then transferred to central well and the plates were maintained at $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ in darkness. Assay was made in triplicate and the parameters' absence or presence of termites in peripheral wells, construction standards of tunnels in agar and closing by insects of constructed galleries were observed during 15 days.

2.10. Statistical analysis

Regression equations in quantitative assay for antioxidant activity were established using Origin 6.0 program (Microcal, Northampton, MA, USA). Statistical analysis of antifungal activity was performed using GraphPad Prism version 4.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA) and data were expressed as a mean of three assays $\pm$ SD. The data from termiticidal assay were expressed as a mean of five experiments $\pm$ SD and analyzed by Student's *t*-test (significance at $p < 0.05$) using Origin 6.0 program. The lethal concentration required to kill 50% (LC₅₀) of workers or soldiers in 4 days was determined by probit analysis

with a reliability interval of 95% using the computer software StatPlus® 2006 (AnalystSoft, Canada).

3. Results

3.1. Evaluation of hemagglutinating activity and secondary metabolites

Methanol extracted highest phenol content and the values obtained for total phenol of SE and ME were 10 and 27 mg per g of dry heartwood, respectively. Hemagglutinating activity (titer of 32,768) was detected in SE and was absent in ME and sapwood extract.

TLC chromatograms showed the presence in both extracts of cinamic derivatives, flavonoids, gallic acid, luteolin, proanthocyanidins (condensed tannins), hydrolysable tannins, and leucoanthocyanidins but with less intensity in SE. No alkaloids, coumarins, iridoids, phenylpropanoid glycosides, saponins, steroids, and terpenes were present in the extracts.

3.2. Antioxidant activity

The ability of SE and ME to act as a free radical scavenger was revealed by DPPH reduction on TLC sheet. Antioxidant activity was

detected after 30 min and the extracts showed high (DPPH) radical-scavenging activity, similar to ascorbic acid, catechin, epigallocatechin and epigallocatechin gallate (positive controls).

The capacity of SE and ME for scavenging free radicals was also quantified by determination of IP values. The steady state was reached in less than 10 min and the amount of DPPH radical that reacted with SE and ME was 84.7% and 91.1%, respectively.

3.3. Antifungal activity

The extracts from *M. urundeuva* heartwood showed antifungal activity (Fig. 1) but differences were detected in relation to the effect on growth of tested fungi. SE was efficient against *F. decemcellulare* (inhibition of $46.7\% \pm 6.7$), *F. moniliforme* ($50.4\% \pm 2.6$), *F. oxysporum* ($50\% \pm 0.0$) and *F. solani* ($68.5\% \pm 3.1$) but it had little effect against *F. lateritium* ($14\% \pm 2.8$). ME had almost no effect on *F. decemcellulare* with minimal growth inhibition ($9.5\% \pm 4.1$) and was more active than SE on *F. lateritium* (growth inhibition of $25\% \pm 0.0$).

The effect of SE and ME on *Fusarium* was compared with fungus growth in water (negative control) and in presence of antifungal cercobin (positive control). SE was more efficient than cercobin in inhibiting the growth of *F. oxysporum* and *F. lateritium* and promoted effect similar to the antifungal on *F. decemcellulare* and *F.*

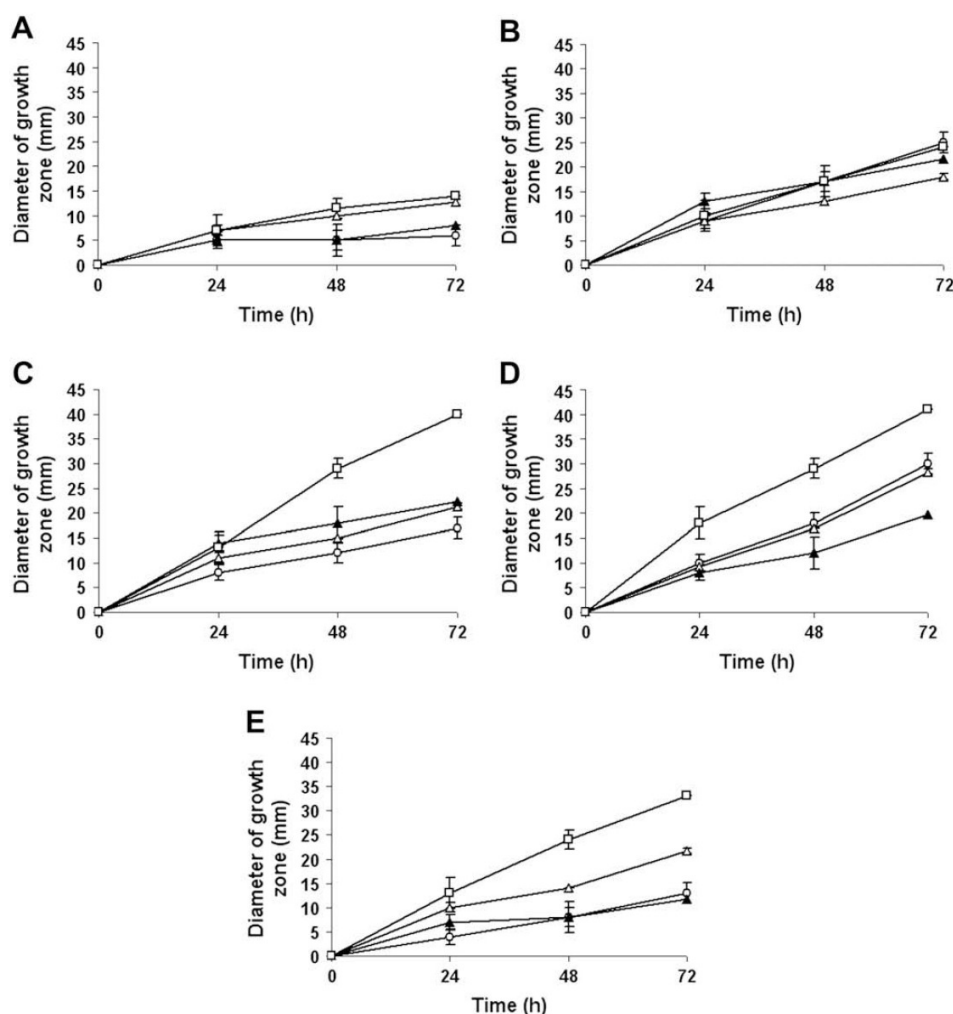


Fig. 1. Growth in PDA medium of *F. decemcellulare* (A), *F. lateritium* (B), *F. moniliforme* (C), *F. oxysporum* (D) and *F. solani* (E) at presence of methanolic (Δ) and saline ($\blacktriangle$) extracts, distilled water ($\square$, negative control) and 10 ppm cercobin ($\circ$, positive control). Each point represents the mean $\pm$ SD of three experiments.

solani (Fig. 1A, B, D, and E). ME was more efficient than cercobin in inhibiting the growth of *F. lateritium*, promoted effect similar on *F. oxysporum* and had no effect on *F. decemcellulare* (Fig. 1A, B, and D). The extracts showed lower antifungal activity than cercobin against *F. moniliforme* (Fig. 1C).

3.4. Termiticidal and repellent activities

The effect of SE and ME on *N. corniger* was performed using filter paper soaked with the extracts and the insect mortality was evaluated daily during 22 days. The survival rate (%) for soldiers and workers in contact with ME was similar to that determined for insects in contact with water (Fig. 2A). Thus, the extract had no termiticidal activity since the detected mortality in all ME concentrations was not statistically different to the control.

SE showed termiticidal activity with LC_{50} values of 1.81 and 2.59 $mg\ ml^{-1}$ for soldiers and workers after 4 days, respectively and the assay revealed that soldiers (Fig. 2C) were more sensible than workers (Fig. 2D) to SE. Statistical analysis using Student's *t*-test showed that data of all SE concentrations tested on soldiers were significantly different ($p < 0.05$) while on workers the 0.5 and 1.0 $mg\ ml^{-1}$ concentrations were not significantly different to control.

The building of tunnels and closing of galleries by insects was investigated by assay in agar (Fig. 3) aiming to determine if extracts promote repellent action on termites. Tunneling termites can react to the presence of possibly toxic substances by closing galleries to avoid contact with these substances (Su et al., 1982). SE was not repellent since no gallery was closed and termites were observed exploring peripheral wells treated with the extract. ME had repellent property since termites closed the gallery constructed next to the peripheral well containing ME. After 6 days termites were opening a gallery to the well of highest (3 $mg\ ml^{-1}$) ME

concentration (Fig. 3B); the same gallery was partially closed after 11 days and totally after 13 days (Fig. 3C and D). The gallery to 1 $mg\ ml^{-1}$ well was opened and partially closed after 11 (Fig. 3C) and 13 days (Fig. 3D), respectively. After 11 days of test termites were observed near the negative control wells (Fig. 3C) and at the end of the observation period, termites were mainly found in the center of plate (Fig. 3D).

4. Discussion

The resistance of *M. urundeuva* heartwood to biological agents stimulated studies that aimed the identification of constituents that may be involved in the defence mechanism. It has been suggested that the structure of *M. urundeuva* lignin and phenolic compounds could account for the resistance but this seems not sufficient to explain the wood durability (Morais et al., 1999). In fact, recently, a lectin was also suggested as bioactive molecule in the defence mechanism of *M. urundeuva* heartwood (Sá et al., 2008, 2009a, 2009b). The present work is another step in the study of chemical resistance of *M. urundeuva* heartwood and we report antioxidant, antifungal and termite repellent activities of extracts with and without hemagglutinating activity.

TLC chromatograms revealed the presence of secondary metabolites in SE and ME. The composition of a methanolic extract from *M. urundeuva* wood has been already analyzed by ^{13}C -NMR spectrum (proanthocyanidins) and high performance liquid chromatography detected flavonoids, ellagic acid, hydrolysable tannins, and gallic acid (Morais et al., 1999). The choice of the concentration of NaCl in SE used here aimed to minimize eventual decreasing in phenol solubility since it has been demonstrated that phenol solubility decreased when NaCl concentration increased from 0.5 to 3.5 $mol\ kg^{-1}$ by salting-out effect (Noubigh et al., 2007).

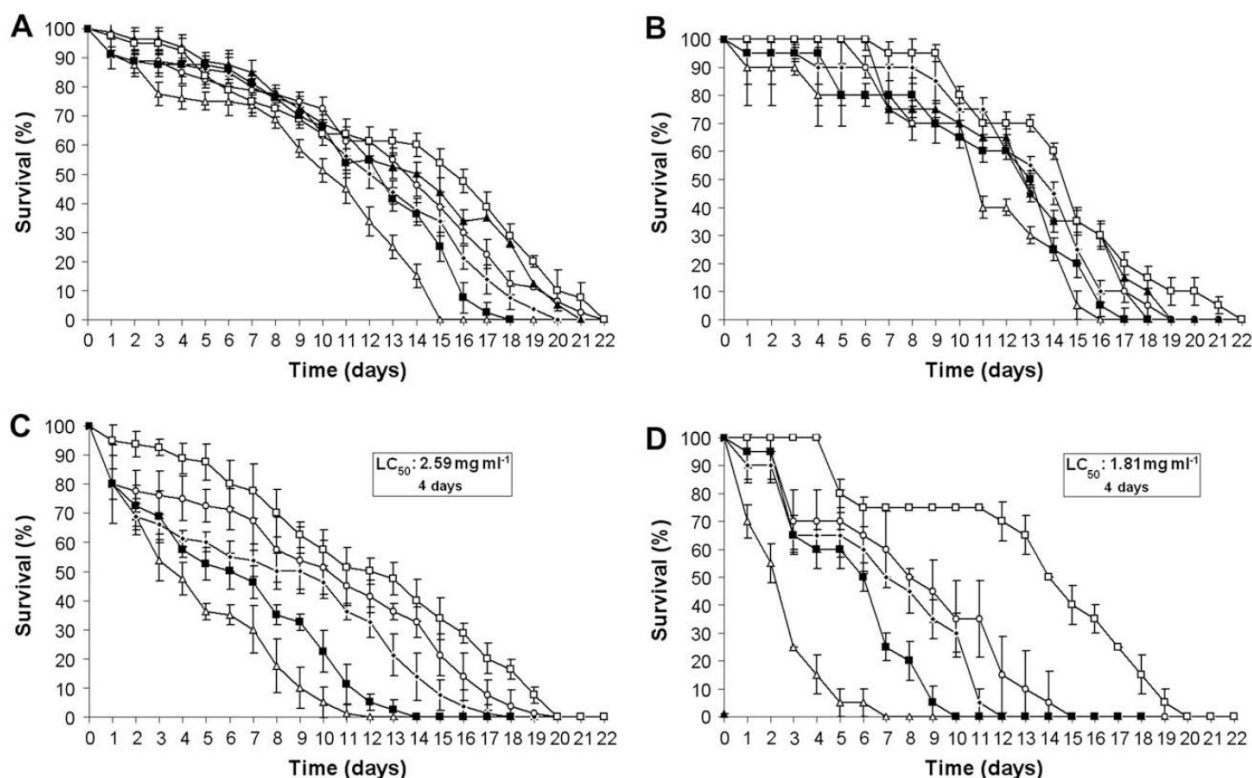


Fig. 2. Survival of workers (A and C) and soldiers (B and D) of *N. corniger* at presence of methanolic (A and B) and saline (C and D) extracts at concentrations of 0.25 (▲) 0.5 (◇), 1.0 (◆), 2.0 (■) and 3.0 (△) $mg\ ml^{-1}$. Distilled water (□) was used as negative control. Each point represents the mean $\pm$ SD of five experiments. The concentration required to kill 50% of insects in each treatment (LC_{50}) was determined using probit analysis with a reliability interval of 95%.

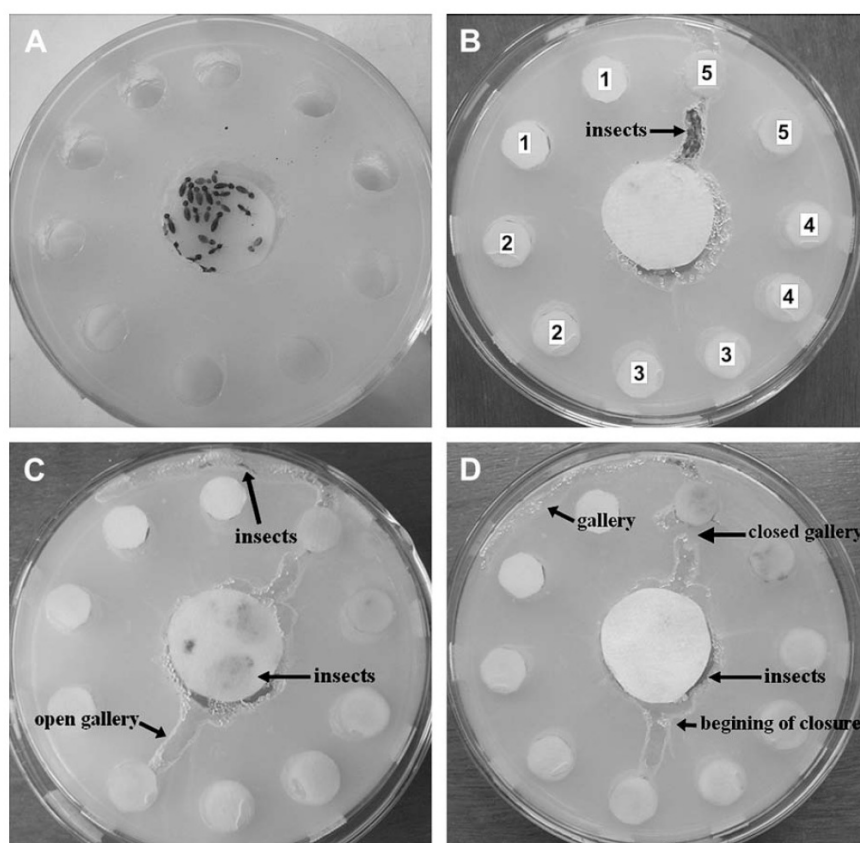


Fig. 3. Aspects of termite repellence assay at time zero in a superior view (A) and after 6 (B) 11 (C) and 13 (D) days of test in an inferior view. The samples evaluated were distilled water (1) and methanolic extract at concentrations of 0.5 (2), 1.0 (3), 2.0 (4) and 3.0 (5) mg ml^{-1} . The arrows indicate insects and closed gallery next to the well containing ME at 3.0 mg ml^{-1} .

Additionally, previous study revealed that 0.15 mol kg^{-1} NaCl was able to solubilize the *M. urundeuva* heartwood lectin (Sá et al., 2008, 2009a,b). Thus, SE would be a preparation richer in bioactive molecules than ME whose extraction process would abolish the hemagglutinating activity. In fact, hemagglutinating activity was detected only in SE.

IP values are a good measure of the antioxidant efficiency of pure compounds or extracts and the IP value obtained for SE and ME revealed high antioxidant activity. Typical IP values of plant tissues with high antioxidant activity were 93% and 75% for *Cassia fistula* stem bark and leaves, respectively (Siddhuraju et al., 2002). A methanolic extract from stem bark of *M. urundeuva* also showed strong antioxidant activity in vitro (Desmarchelier et al., 1999). The presence of phenols, proanthocyanidins and flavonoids in SE and ME would certainly contribute to the antioxidant activity since these compounds are known to be good antioxidants (Erasto et al., 2004; Podsedek, 2007).

Studies have demonstrated that the use of the synthetic antioxidant butylated hydroxytoluene (BHT) enhanced the activity and decreased the depletion of organic biocides when it was co-added in a solution for wood treatment (Schultz et al., 2004; Schultz et al., 2005; Schultz et al., 2006). Extracts of *Castanea sativa* shell and *Eucalyptus globulus* bark with antioxidant activity have been indicated as additives to increase the stability of food and pharmaceutical compositions (Vázquez et al., 2008).

Purified *M. urundeuva* heartwood lectin has already been shown to be an antifungal agent against *Fusarium* (Sá et al., 2009a) with growth inhibition of 60.8% (*F. oxysporum*), 51% (*F. decemcellulare*), 31.8% (*F. moniliforme*), 36% (*F. solani*) and 38.6% (*F. lateritium*) and thus the antifungal activity of SE can be due to lectin presence in this

active hemagglutinin preparation. The antifungal effect of ME, a preparation without hemagglutinating activity, indicates that extractive components with antioxidant activity may contribute to *M. urundeuva* heartwood resistance to fungus attack. Secondary metabolites from plants and antioxidative compounds have been already reported as antifungal agents. It is interesting to notice that *Linum usitatissimum* transgenic plants with increased flavonoid content showed an enhanced antioxidant capacity and improved resistance to *Fusarium* (Lorenc-Kukuła et al., 2007). Essential oils from *Ocimum basilicum* with DPPH free radical scavenging activity inhibited *F. solani* growth (Hussain et al., 2008) and tannins from *Rubus ulmifolius* showed activity against phytopathogenic fungi (Sisti et al., 2008). Flavonoids from *Dianthus caryophyllus* and ethanolic extract of *Varthemia iphionoides* were able to inhibit in 67% and 42.7% the growth of *F. oxysporum*, respectively (Khalil and Dababneh, 2007; Galeotti et al., 2008). Yen et al. (2008) demonstrated that β -thujaplicin and γ -thujaplicin isolated from ethanolic extract of *Calocedrus macrolepis* var. *formosana* heartwood were active compounds against tree pathogenic fungus *F. solani* promoting 50% of growth inhibition at 18 and $24 \mu\text{g ml}^{-1}$, respectively.

SE showed termiticidal activity but no repellent effect. Similarly to SE, *M. urundeuva* heartwood lectin showed termiticidal activity on soldiers and workers (Sá et al., 2008); thus, the mortality of termites by SE was probably due to ingestion of this active principle, although the possibility of secondary metabolites present in the SE with termiticidal activity cannot be discarded. Comparison of termiticidal effect of SE (Fig. 2D) and heartwood lectin on soldiers revealed that SE only promoted 100% of mortality after 7 days at 3.0 mg ml^{-1} while lectin promoted 100% of mortality after 7 days of experiment at 0.1, 0.2, 0.4 and 0.8 mg ml^{-1} concentrations.

The deleterious effect of SE lower than lectin was also detected on workers (Fig. 2C); 100% of mortality was observed after 12, 14, 18 and 19 days with 3.0, 2.0, 1.0 and 0.5 mg ml⁻¹ SE while 0.1 and 0.8 mg ml⁻¹ lectin promoted 100% of mortality after 10 and 8 days of experiment, respectively. The termiticidal efficiency of tested samples was reflected by higher LC₅₀ values of SE (1.81 and 2.59 mg ml⁻¹ for soldiers and workers after 4 days, respectively) higher than isolated lectin (LC₅₀ values of 0.199 and 0.248 mg ml⁻¹ for soldiers and workers after 4 days, respectively). The LC₅₀ value of SE, approximately 10 times higher than isolated lectin, may be justified by the lower amount of lectin in the SE crude preparation. It has been described that sapwood is a *M. urundeuva* tissue lesser resistant to termite attack than heartwood (Paes et al., 2002); the absence of hemagglutinating activity in sapwood extract corroborate with the indication of natural resistance associated to the presence of hemagglutinating activity.

Differently from SE, ME had repellent property but no termiticidal activity. The termiticidal activity of purified lectin from *M. urundeuva* heartwood reported previously and the detected repellent effect of ME suggest that two different mechanisms may be involved in the resistance of heartwood to *N. corniger*, one by lectin toxicity and another by extractives with repellent action. The main difference between SE and ME was the presence of hemagglutinating and termiticidal activities in SE. Probably if lectin is removed from SE, these activities will be eliminated. It has been suggested that termite repellent properties of plant extractives were due to presence of terpenoids, quinones, flavonoids and fatty acids (Scheffrahn, 1991). Another study has demonstrated that essential oil of *Cryptomeria macrolepis* heartwood obtained by stem distillation was termiticidal on *C. formosanus*, showing 100% mortality after 5 days of test and the anti-termite function was due to its toxicity and its repellent action (Cheng et al., 2007).

5. Conclusions

The study of timbers is important for understanding of natural biochemical processes related to natural resistance. The detection of antioxidant, antifungal and termite repellent activities of extractives from *M. urundeuva* heartwood, although may not reflect their complete in vivo role, is a strong indication of their involvement in heartwood durability. This report, together with other published works, contributes to the understanding of defence mechanisms in *M. urundeuva* heartwood and suggests that the resistance to biodeterioration and biodegradation involves antifungal and termiticidal activities of from *M. urundeuva* heartwood lectin plus antioxidant, antifungal and insect repellent activities of secondary metabolites. The activities detected in *M. urundeuva* heartwood may indicate the use of industrial waste of heartwood manual and industrial management as a source of bioactive molecules for wood treatment.

Acknowledgements

The authors express their gratitude to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) for research grants. They are also deeply grateful to Maria Barbosa Reis da Silva (for technical assistance), Msc. Gonçalo Mendes da Conceição (for identification of the botanical material), Dr. Luiz Roberto Fontes (for identification of termite species), and to Departamento de Micologia – UFPE (for the supply of the isolated fungi). L.C.B.B. Coelho and L.W. Bieber are senior investigators of CNPq.

References

- Abreu, R.L.S., Sales-Campos, C., Handa, R.E., Vasconcellos, F.J., Freitas, J.A., 2002. Avaliação de danos por insetos em toras estocadas em indústrias madeiras de Manaus, Amazonas, Brasil. *Revista Árvore* 26, 789–796.
- Aerts, R.J., Barry, T.N., McNabb, W.C., 1999. Polyphenols and agriculture: beneficial effects of proanthocyanidins in forages. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 75, 1–12.
- Apetorgbor, M.M., Darkwa, N.A., Frimpong, O., Agyeman, V.K., 2004. Bio-deteriorating agents associated with three tropical timber species. *Forest Ecology and Management* 195, 311–323.
- Becerra, J., Flores, C., Mena, J., Aqueveque, P., Alarcón, J., Bittner, M., Hernández, V., Hoeneisen, M., Ruiz, E., Silva, M., 2002. Antifungal and antibacterial activity of diterpenes isolated from wood extractables of Chilean Podocarpaceae. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química* 47, 151–157.
- Bing, D.H., Weyand, J.G., Stavinsky, A.B., 1967. Hemagglutination with aldehyde-fixed erythrocytes for assay of antigens and antibodies. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 124, 1166–1170.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT – Food Science and Technology* 28, 25–30.
- Breznak, J.A., 1982. Intestinal microbiota of termites and other xylophagous insects. *Annual Review of Microbiology* 36, 323–343.
- Cambie, R.C., Cox, R.E., Sidwell, D., 1984. Phenolic diterpenoids of *Podocarpus ferrugineus* and other podocarps. *Phytochemistry* 23, 333–336.
- Cheng, S., Chang, H., Wu, C., Chang, S., 2007. Anti-termite activities of essential oils from coniferous tree against *Coptotermes formosanus*. *Bioresource Technology* 98, 456–459.
- Chumkhunthod, 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*. *Biochimica et Biophysica Acta – General Subjects* 1760, 326–332.
- Cunico, M.M., Carvalho, J.L.S., Silva, V.C., Montrucchio, D.P., Kerber, V.A., Grigoletti Júnior, A., Auer, C.G., Miguel, M.D., Miguel, O.G., 2004. Avaliação antifúngica de extratos obtidos de *Ottonia martiana* Miq. (Piperaceae) sobre três fitopatógenos. *Arquivos do Instituto Biológico* 71, 141–143.
- Desmarchelier, C., Romão, R.L., Coussio, J., Ciccia, G., 1999. Antioxidant and free radical scavenging activities in extracts from medicinal trees used in the 'Caatinga' region in northeastern Brazil. *Journal of Ethnopharmacology* 67, 69–77.
- Edwards, R., Mill, A.E., 1986. Termites in Buildings: their Biology and Control. Rentokil, London.
- Erasto, P., Bojase-Moleta, G., Majinda, R.R.T., 2004. Antimicrobial and antioxidant flavonoids from the root wood of *Bolusanthus speciosus*. *Phytochemistry* 65, 875–880.
- Galeotti, F., Barile, E., Curir, P., Dolci, M., Lanzotti, V., 2008. Flavonoids from carnation (*Dianthus caryophyllus*) and their antifungal activity. *Phytochemistry Letters* 1, 44–48.
- Green, F., Highley, T.L., 1997. Mechanism of brown-rot decay: paradigm or paradox. *International Biodeterioration & Biodegradation* 39, 113–124.
- Harborne, J.B., 1991. *Phytochemical Methods: a Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*. Chapman & Hall, London.
- Highley, T.L., 1999. Biodeterioration of wood. In: *Wood Handbook: Wood as an Engineering Material*. USDA Forest Products Laboratory, Washington, pp. 13.1–13.16.
- Hoji, M., Morioka, M., Matsumoto, T., Miura, T., 2005. Identification of soldier-caste specific protein in the frontal gland of nasute termite *Nasutitermes takasagoensis* (Isoptera: Termitidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35, 347–354.
- Hussain, A.I., Anwar, F., Sherazi, S.T.H., Przybylski, R., 2008. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food Chemistry* 108, 986–995.
- Kang, H.Y., Matsushima, N., Sameshima, K., Takamura, N., 1990. Termite resistance tests of hardwoods of Kochi growth. The strong termiticidal activity of kagokoki (*Litsea coreana* Léveillé). *Mokuzai Gakkaishi* 36, 78–84.
- Khalil, A., Dababneh, B.F., 2007. Inhibition of phytopathogenic fungi by extracts from medicinal plants in Jordan. *Journal of Biological Science* 7, 579–581.
- Larson, R.A., 1988. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry* 27, 969–978.
- Leite, E.J., 2002. State of knowledge on *Myracrodruon urundeuva* Fr. Allemão (Anacardiaceae) for genetic conservation in Brazil. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 5, 193–206.
- Lorenc-Kukula, K., Wróbel-Kwiatkowska, M., Starzycki, M., Szopa, J., 2007. Engineering flax with increased flavonoid content and thus *Fusarium* resistance. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 70, 38–48.
- Markhan, K.R., 1982. *Techniques of Flavonoid Identification*. Academic Press, London.
- 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. *Journal of Brazilian Chemical Society* 10, 447–452.
- Neu, R.A., 1956. A new reagent for differentiating and determining flavones on paper chromatograms. *Naturwissenschaften* 43, 82.
- Noubigh, A., Abderrabba, M., Provost, E., 2007. Temperature and salt addition effects on the solubility behaviour of some phenolic compounds in water. *The Journal of Chemical Thermodynamics* 39, 297–303.
- Paes, J.B., Morais, V.M., Lima, C.R., 2002. Resistência das madeiras de aroeira (*Myracrodruon urundeuva*), cássia (*Senna siamea*) e ipê (*Tabebuia impetiginosa*) a fungos e cupins xilófagos em condições de laboratório. *Floresta e Ambiente* 9, 135–144.

- Paes, J.B., Melo, R.R., Lima, C.R., Oliveira, E., 2007. Resistência natural de sete madeiras ao cupim subterrâneo (*Nasutitermes corniger* Motsch.) em ensaio de preferência alimentar. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias* 2, 57–62.
- Paiva, P.M.G., Coelho, L.C.B.B., 1992. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (amaratu bean). *Applied Biochemistry and Biotechnology* 36, 113–118.
- Podsedek, A., 2007. Natural antioxidants and antioxidant capacity of brassica vegetables: a review. *LWT – Food Science and Technology* 40, 1–11.
- Primack, R.B., Rodrigues, E., 2001. *Biologia da Conservação*. Editora Planta, Londrina.
- Roberts, E.A.H., Cartwright, R.A., Wood, D.J., 1956. The flavones of tea. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 7, 637–646.
- Sá, R.A., Gomes, F.S., Napoleão, T.H., Santos, N.D.L., Melo, C.M.L., Gusmão, N.B., Coelho, L.C.B.B., Paiva, P.M.G., Bieber, L.W., 2009a. Antibacterial and antifungal activities of *Myracrodruon urundeuva* heartwood. *Wood Science and Technology* 43, 85–95.
- Sá, R.A., Santos, N.D.L., Silva, C.S.B., Napoleão, T.H., Gomes, F.S., Cavada, B.S., Coelho, L.C.B.B., Navarro, D.M.A.F., Bieber, L.W., Paiva, P.M.G., 2009b. Larvicidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* on *Aedes aegypti*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C, Toxicology and Pharmacology* 149, 300–306.
- 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. *International Biodeterioration & Biodegradation* 62, 460–464.
- Sales-Campos, C., Abreu, R.L.S., Vianez, B.F., 2000. Condições de uso e processamento de madeira nas indústrias madeiras de Manaus, Amazonas, Brasil. *Acta Amazonica* 30, 319–331.
- Sampath-Wiley, P., Neefus, C.D., Jahnke, L.S., 2008. Seasonal effects of sun exposure and emersion on intertidal seaweed physiology: fluctuations in antioxidant contents, photosynthetic pigments and photosynthetic efficiency in the red alga *Porphyra umbilicalis* Kützinger (Rhodophyta, Bangiales). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 361, 83–91.
- Scheffrahn, R.H., 1991. Allelochemical resistance of wood to termites. *Sociobiology* 19, 257–281.
- Scheffrahn, R.H., Cabrera, B.J., Kern Jr., W.J., Su, N.Y., 2002. *Nasutitermes costalis* (Isoptera: Termitidae) in Florida: first record of a non-endemic establishment by a higher termite. *Florida Entomologist* 85, 273–275.
- Scheffrahn, R.H., Krecek, J., Szalanski, A.L., Austin, J.W., 2005. Synonymy of neotropical arboreal termites *Nasutitermes corniger* and *N. costalis* (Isoptera: Termitidae: Nasutitermitinae) with evidence from morphology, genetics, and biogeography. *Annals of the Entomological Society of America* 98, 273–281.
- Schultz, T.P., Nicholas, D.D., 2002. Development of environmentally-benign wood preservatives based on the combination of organic biocides with antioxidants and metal chelators. *Phytochemistry* 61, 555–560.
- Schultz, T.P., Nicholas, D.D., Prewitt, M.L., 2004. Environmentally-benign wood preservatives based on an organic biocide: antioxidant combination: ground-contact efficacy ratings and BHT depletion after four years of exposure. *Holz-forschung* 58, 300–304.
- Schultz, T.P., Nicholas, D.D., Henry, W.P., Pittman Jr., C.U., Wipf, D.O., Goodell, B., 2005. Review of laboratory and outdoor exposure efficacy results of organic biocide: antioxidant combinations, an initial economic analysis and discussion of a proposed mechanism. *Wood & Fiber Science* 37, 175–184.
- Schultz, T.P., Nicholas, D.D., Kirker, G.T., Prewitt, M.L., Diehl, S.V., 2006. Effect of the antioxidant BHT on reducing depletion of chlorothalonil in treated wood after 54 months of ground-contact exposure. *International Biodeterioration & Biodegradation* 57, 45–50.
- Silva, J.C., 2006. Madeira preservada – Os impactos ambientais. *Revista da Madeira* 100. <http://www.remade.com.br> Available from:
- Silva, C.A., Monteiro, M.B.B., Brazolin, S., Lopez, G.A.C., Richter, A., Braga, M.R., 2007. Biodeterioration of brazilwood *Caesalpinia echinata* Lam. (Leguminosae-Caesalpinioideae) by rot fungi and termites. *International Biodeterioration & Biodegradation* 60, 285–292.
- Sisti, M., De Santi, M., Fraternali, D., Ninfali, P., Scoccianti, V., Brandi, G., 2008. Antifungal activity of *Rubus ulmifolius* Schott standardized in vitro culture. *LWT – Food Science and Technology* 41, 946–950.
- Siddhuraju, P., Mohan, P.S., Becker, K., 2002. Studies on the antioxidant activity of Indian Laburnum (*Cassia fistula* L.): a preliminary assessment of crude extracts from stem bark, leaves, flowers and fruit pulp. *Food Chemistry* 79, 61–67.
- Soler-Rivas, C., Espín, J.C., Wichers, H.J., 2000. An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs. *Phytochemical Analysis* 11, 1–9.
- Stiasny, E., 1912. *The Qualitative Detection and Differentiation of Vegetable Tannins*. Collegium, Haltingen.
- Su, N., Tamashiro, M., Yates, J.R., Haverty, M.J., 1982. Effect of behavior in the evaluation of insecticides for prevention of or remedial control of the Formosan subterranean termite. *Journal of Economic Entomology* 75, 188–193.
- Vasconcellos, A., Melo, A.C.S., Segundo, E.M.V., Bandeira, A.G., 2005. Cupins de duas florestas de restinga do nordeste brasileiro. *Iheringia (Série Zoologia)* 95, 127–131.
- Vázquez, G., Fontenla, E., Santos, J., Freire, M.S., González-Álvarez, J., Antorrena, G., 2008. Antioxidant activity and phenolic content of chestnut (*Castanea sativa*) shell and eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) bark extracts. *Industrial Crops and Production* 28, 279–285.
- Wagner, H., Bladt, S., 1996. *Plant Drug Analysis*, second ed. Springer, New York.
- Yen, T., Chang, H., Hsieh, C., Chang, S., 2008. Antifungal properties of ethanolic extract and its active compounds from *Calocedrus macrolepis* var. *formosana* (Florin) heartwood. *Bioresource Technology* 99, 4871–4877.

6.1. CONCLUSÕES – ARTIGO 2

- Extratos salino e metanólico do cerne de *M. urundeuva* foram ricos em metabólitos secundários
- Metabólitos secundários foram observados em maior intensidade e quantidade no extrato metanólico
- Ambos extratos apresentaram atividade antioxidante frente ao radical DPPH.
- Ambos extratos apresentaram atividade antifúngica sobre *Fusarium*
- Somente o extrato salino apresentou atividade termiticida sobre operários e soldados de *N. corniger*.
- Somente o extrato metanólico apresentou atividade repelente sobre *N. corniger*.

7. CONCLUSÃO GERAL

As propriedades biológicas identificadas na lectina MuHL e no extrato metanólico, rico em metabólitos secundários, indicam que o mecanismo de defesa que resulta na resistência do cerne da aroeira a biodeterioração e biodegradação envolve a lectina MuHL, com atividade termiticida e metabólitos secundários com atividades antioxidante, antifúngica contra *Fusarium* e repelente contra cupim.

A investigação da atividade termiticida contribui para a pesquisa de novos agentes inseticidas de origem natural e os dados obtidos neste trabalho sugerem que resíduos provenientes da indústria madeireira podem ser fontes de moléculas bioativas sobre fitopatógenos.