

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

**Caracterização e Avaliação de Atividades
Biológicas da Lectina da Vagem de
Caesalpinia ferrea (CfePL)**

NEILA CAROLINE DE ARAÚJO XIMENES

Recife -2009

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

NEILA CAROLINE DE ARAÚJO XIMENES

CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA
LECTINA DA VAGEM DE *Caesalpinia ferrea* (CfePL)

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Tereza dos Santos Correia

Co-orientadoras: Prof^a Dr^a Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho

Prof^a Dr^a Maria das Graças Carneiro da Cunha

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

CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA
LECTINA DA VAGEM DE *Caesalpinia ferrea* (CfePL)

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

Ximenes, Neila Caroline de Araújo

**Caracterização e avaliação de atividades biológicas da lectina da Vagem de
Caesalpinia ferrea/ Neila Caroline de Araújo Ximenes. – Recife: O Autor, 2009**

121 folhas: il., fig., tab.

**Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.
CCB. Ciências Biológicas, 2009.**

Inclui bibliografia

**1. Lectinas. 2. Caesalpinia ferrea. 3. Atividade antimicrobiana. 4.
Atividade inseticida I Título.**

577.112

CDU (2.ed.)

UFPE

572.6

CDD (22.ed.)

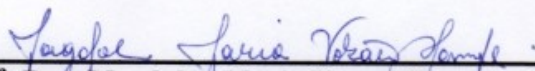
CCB – 2009- 73

**CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DA LECTINA DA VAGEM DE *Caesalpinia
ferrea* (CfePL)**

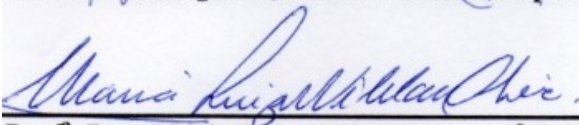
Banca Examinadora:



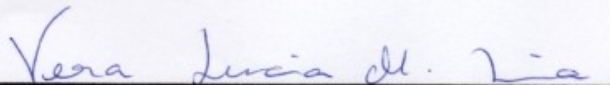
Profª. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia – Orientadora (UFPE)



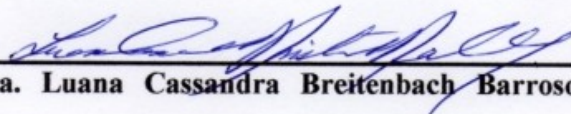
Profª. Dra. Magdolna Maria Vozari Hampe – 1º Examinador (UFRGS)



Profª. Dra. Maria Luiza Vilela Oliva – 2º Examinador (UNIFESP)



Profª. Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima – 3º Examinador (UFPE)



**Profª.Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho – 4º Examinador
(UFPE)**

**Tudo é possível para aquele que crê.
Pois o meu Deus é o Deus do
impossível.**

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, por Ele estar sempre comigo em todos os momentos, por ter me escolhido para servi-lo e por estar me ensinando a viver neste mundo.

Ao meu esposo, Paulo Luiz, pela compreensão, apoio, carinho, dedicação e por todo amor

Aos, meus pais, Nelson e Carmelita por todo amor, carinho, educação, apoio e confiança em todos os momentos, por sempre acreditarem em mim e por me ensinarem que servir a Deus é mais importante do que tudo.

À Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia, como pessoa, professora, orientadora por muitos anos de convivência e confiança, pelo aprendizado e oportunidade de crescimento profissional

À Profa. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho pelo incentivo, atenção, otimismo, por seus ensinamentos e co-orientação.

À Profa. Dra. Maria das Graças Carneiro da Cunha pela confiança, oportunidade e co-orientação.

À Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva pela atenção, apoio e incentivo.

A Coordenação, professores e funcionários do Doutorado em Ciências Biológicas

À Maria Barbosa Reis, pela amizade, carinho, ensinamentos, otimismo, compreensão e por tudo.

Ao João Virgílio, pela amizade e ajuda técnica.

Aos amigos do Laboratório de Glicoproteínas, pela amizade, carinho, troca de conhecimentos, em especial a Fernando, Felipe, Romero, Cynthia, Michele, Regina, Flávia, Adriana, Cristina, Roberto, Thiago, Vanessa, Sandro, Carlos, Andréa, Luciana, Emannuel, Amanda, Gisely, e Lidiane.

Aos meus irmãos Nielson, Neilson e Rodrigo, a minha cunhada Patrícia, ao meu sobrinho Nícolas e minha Tia Mércia, por estarem sempre torcendo por mim e dispostos a ajudar.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pelo suporte financeiro.

Sumário

Lista de Abreviaturas	II
Lista de Figuras.....	IV
Lista de Tabelas	V
Resumo	VI
Abstract.....	VII
1. Introdução	1
1.1 Lectina	1
1.1.1 Generalidades.....	1
1.1.2 Purificação	6
1.1.3 Caracterização.....	9
1.1.4 Propriedades Biológicas	11
1.2 Leguminosas	13
1.2.1 <i>Caesalpinia ferrea</i> Mart.....	14
1.3. As defesas das plantas.....	15
1.4 Microrganismos	16
1.4.1 Bactérias.....	16
1.4.2 Fungos.....	6
1.5 Atividade Antimicrobiana.....	21
1.6 Substâncias Naturais com Ação Inseticida	24
1.7 Cupins	26
2 Objetivos.....	29
2.1 Objetivo Geral.....	29
2.2 Objetivos Específicos	29
3 Referências Bibliográficas	30
4. Artigos	51
4.1. Artigo 1: A NEW THERMOSTABLE <i>Caesalpinia ferrea</i> POD LECTIN WITH ANTIMICROBIAL ACTIVITY	52
4.2. Artigo 1: Growth inhibition of <i>Candida albicans</i> by <i>Caesalpinia ferrea</i> Pod Lectin.....	81
4.3. Artigo 3: Insecticidal activity of <i>Caesalpinia ferrea</i> pod lectin on <i>Nasutitermes corniger</i> (Isoptera: Termitidae)	99
5. Conclusões	121

LISTA DE ABREVIATURAS

AA = Antimicina A
AH = Atividade Hemaglutinante
AHE = Atividade Hemaglutinante específica
AJL-1 = Lectina de *Anguilla japonica*
AIDS = Síndrome da deficiência adquirida
AOX = Ubiquinol oxidase alternativa
BAA-A = Aglutinina de *Bunodeopsis antilliensis* específica para eritrócitos tipo A
BAA-B = Aglutinina de *Bunodeopsis antilliensis* específica para eritrócitos tipo B
BmoLL = Lectina das folhas de *Bauhinia monandra*
CfePL = Lectina da vagem de *Caesalpinia ferrea*
CFU = Unidade formadora de colônia
CM = Carboximetil
CML = Lectina de *Cordyceps militaris*
Con A = Concanavalina A
CRC = Cadeia respiratória clássica
DEAE = Dietilaminoetil
DNA = Ácido desoxirribonucléico
DPA = Ácido diaminopimílico
EDTA = Ácido etilenodiaminotetracético
ED₅₀ = Dose efetiva (50%)
FPLC = Cromatografia líquida de rápida resolução
GlcNAc = N-acetil-D-glicosamina
GOL = Lectina de alga vermelha *Gracilaria ornata*
HPLC = Cromatografia líquida de alta resolução (alta pressão)
HPLC =RP- Cromatografia líquida de alta resolução em fase reversa
KCN = Cianeto de potássio
LC₅₀ = Concentração letal (50%)
MAC = Concentração mínima aglutinante
MBC = Concentração mínima bactericida
MFC = Concentração mínima fungicida
MgCl₂ = Cloreto de magnésio

MIC = Concentração mínima inibitória

NaCl = Cloreto de sódio

NADH = Nicotinamida adenina de nucleotídeo

PAGE = Eletroforese em gel de poliacrilamida

PAR = Cadeia respiratória paralela

PMSF = Fenil-metil-sufonil-fluoreto

RIPs = Proteína inativadora de ribossomo

RNA = Ácido ribonucleico

SDS = Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecilsulfato de sódio

TEL = Lectina de *Talisia esculenta*

TLC = Cromatografia líquida em camada delgada

TxLCI = Lectina do bulbo de tulipa

XLC = Lectina de *Xerocomus chrysenteron*

Lista de Figuras

INTRODUÇÃO

Figura 1: Árvore (A), flor (B) e fruto (C) de <i>C. ferrea</i> Mart. ex Tul. var. <i>ferrea</i> . Fonte: Lorenzi (2002)	15
Figura 2: Curva de crescimento de microrganismo	19
Figure 3: Representação esquemática do transporte de elétrons em <i>Candida albicans</i> .	20
Figura 4: Esquema das principais estruturas ou etapas metabólicas afetadas por antibióticos	22
ARTIGOS:	51
Artigo 1: A NEW THERMOSTABLE <i>Caesalpinia ferrea</i> POD LECTIN WITH ANTIMICROBIAL ACTIVITY	52
Figura 1: Cromatografia do isolamento e perfil eletroforético de CfePL	75
Figura 2: Efeito de íons, temperatura, pH e glicoproteínas na AH de CfePL.....	76
Figura 3: Caracterização de CfePL	77
Artigo 2: Growth inhibition of <i>Candida albicans</i> by <i>Caesalpinia ferrea</i> Pod Lectin ...	81
Figura 1: Curva de crescimento de <i>Candida albicans</i>	96
Figura 1: Efeito de CfePL no consumo de oxigênio na respiração mitocondrial de <i>Candida albicans</i>	97
Figura 1: Efeito de CfePL no consumo de oxigênio na respiração celular de <i>Candida albicans</i>	98
Artigo 3: Insecticidal activity of <i>Caesalpinia ferrea</i> pod lectin on <i>Nasutitermes corniger</i> (Isoptera: Termitidae)	99
Figura 1: Percentual de sobrevivência dos operários de <i>N. corniger</i> em presença de CfePL	119
Figura 2: Efeito do Contato de CfePL: sobre os soldados de <i>N. corniger</i>	120

Lista de Tabelas

Artigo 1: A NEW THERMOSTABLE <i>Caesalpinia ferrea</i> POD LECTIN WITH ANTIMICROBIAL ACTIVITY	52
Tabela 1: Microrganismo	78
Tabela 2: Resumo da purificação de CfePL	79
Tabela 3: Atividade antimicrobiana de CfePL	80

RESUMO

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas, de origem não imunológica que se ligam reversivelmente e especificamente a carboidratos. *Caesalpinia ferrea* é uma planta com ampla distribuição no Brasil, sendo utilizada em medicina popular. Neste trabalho a lectina da vagem sem as sementes, de *Caesalpinia ferrea* (CfePL) foi purificada, caracterizada e avaliada biologicamente. CfePL foi avaliada quanto a potencial ação contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos, na inibição do crescimento celular e respiração celular e mitocondrial de *Candida albicans* e como proteína inseticida para a espécie de cupins *Nasutitermes corniger*. CfePL foi obtida por fracionamento salino de um extrato bruto a 10% seguida de cromatografia em coluna de quitina. CfePL aglutina eritrócitos de humanos, galinha, coelho e rato, é principalmente inibida por glicoproteínas (caseína, e as do soro de coelho e soro fetal bovino), é termoestável (ativa após aquecimento a 100 °C, 12 h), a sua atividade hemaglutinante (AH) é estimulada pelos íons (Ca^{2+} e Mg^{2+}); e em diferentes valores de pH (4,5; 5,0; 5,5; 7,5) é aumentada, sendo quase totalmente abolida em pH 9,0. Após tratamento com enzimas proteolíticas CfePL manteve-se estável. CfePL migrou com uma única banda na eletroforese para proteínas nativas básicas e uma banda polipeptídica de massa 8 kDa em SDS-PAGE com ou sem agente redutor e cromatografia de filtração em gel. A sua porção carboidrato foi estimada em 6,8%. CfePL inibe o crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e de fungos, os melhores resultados caracterizados pelos halos de inibição (17mm) foram com *Escherichia coli* e *Colletotrichum gloesporioides*, com uma concentração mínima inibitória de 10 µg/mL frente a estes dois microrganismo e a *Streptococcus* sp.; CfePL (40 µg/ml) inibe totalmente o crescimento celular de *C. albicans*. Nas concentrações de 25 µg/ml e 40 µg/ml foi observada uma inibição de 30% e 45 %, após 2 h de incubação na respiração celular de *C. albicans* e na mitocondrial uma inibição de 45% e 90%, respectivamente. CfePL apresenta ação inseticida e não repelente contra *N. corniger*. CfePL é purificada em quantidades de miligramas por uma metodologia simples, e demonstra ser um potente agente antimicrobiano de baixo custo, com amplo espectro de ação, apresentando, também, ação inseticida.

Palavras Chaves: Lectina, *Caesalpinia ferrea*, atividade antimicrobiana, atividade inseticida.

ABSTRACT

Lectins are proteins or glycoproteins of non-immune origin that bind carbohydrates specifically and reversibly. *Caesalpinia ferrea* is a plant with widely distributed in Brazil and is used in popular medicine. In this work the lectin from *Caesalpinia ferrea* pod (CfePL) was purified, characterized and applied biology. CfePL was evaluated as a potential action against Gram-positive, Gram-negative bacteria and fungi; inhibition of cell growth and cell respiration and mitochondrial inhibition of *Candida albicans* and as insecticidal protein for the specie of termite *Nasutitermes corniger*. CfePL was obtained by fractionation of a crude extract of 10% followed by chromatography on a column of chitin. CfePL agglutinate erythrocytes of human, chicken, rabbit and mouse, is mainly inhibited by glycoproteins (casein and whey rabbit fetal bovine serum). CfePL is thermostable (active after heating to 100 °C, 12 h); its hemagglutinating activity (HA) is stimulated by ions (Ca^{2+} and Mg^{2+}) and it is active at pH values (4.5, 5.0, 5, 5, 7.5), but it is almost completely abolished in pH 9.0. After treatment with proteolytics enzymes CfePL remained stable. CfePL migrated with a single band after electrophoresis to native basic proteins and a polypeptide band of MW 8 kDa after SDS-PAGE, with or without reducing agent. With was confirmed by gel filtration chromatography, its carbohydrate portion was estimated at 6.8%. CfePL inhibited the proliferation of bacteria Gram-positive and Gram-negative and fungi, the most potent effect (halo, 17mm) were with *Escherichia coli* and *Colletotrichum gloesporioides*, showing a minimum inhibitory concentration (10µg/mL) towards these micro and *Streptococcus* sp.; CfePL (40µg/ml) completely inhibited cell growth of *Candida albicans*. At concentration of 25µg/ml and 40µg/ml an inhibition of 30% and 45% after 2 h of incubation of cell respiration of *Candida albicans* was observed and an inhibition of 45% and 90% respectively of mitochondrial respiration. CfePL action has not repellent and action has insecticide against *N. corniger*. CfePL, purified, with low coast, in quantities of milligrams, has broad spectrum of antimicrobial action and presents action insecticide.

Keywords: *Caesalpinia ferrea* lectin, antimicrobial activity, insecticidal activity.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Lectinas

1.1.1 Generalidades

As proteínas estão entre os quatro grandes grupos de macromoléculas biológicas mais abundantes que ocorrem em todas as células, estão no centro da ação dos processos biológicos e são extremamente versáteis em suas funções. Elas estão envolvidas no metabolismo celular, por exemplo, como enzimas, inibidores de enzimas, hormônios, proteínas de transporte, estruturais, de reserva, de defesa, que geram forças mecânicas e eletroquímicas.

Dentre as proteínas caracterizadas existe um grupo denominado lectina, que teve seu primeiro relato, descrito em 1888, quando Stilmark estudando a toxicidade de *Ricinus communis* (mamona) observou que a presença de uma proteína no extrato da planta, denominado ricina, aglutinava eritrócitos (Sharon e Lis, 1988); pouco tempo depois, em 1889 foi observado por Hellin no extrato tóxico de *Abrus precatorius* (jeriquiti) a presença de outra proteína, a abrina, que também aglutinava células sanguíneas, porém o estudo destas proteínas só começou a ganhar ímpeto em 1960 (Sharon e Lis, 1991), abrindo uma vasta área de aplicação para estas proteínas (Gabor *et al.*, 2001).

Estas proteínas encontradas em plantas foram denominadas primeiramente de aglutininas, hemaglutininas, fitoaglutininas ou fitohemaglutininas (Sharon e Lis, 1988). O termo Lectina, (originado do latim, “Lectus”, que significa escolhido, selecionado), foi introduzido por Boyd e Shapleigh no ano de 1954, devido à capacidade de ligar-se a carboidratos de uma forma não-covalente, aglutinar seletivamente eritrócitos de um grupo sanguíneo específico (Peumans e Van Damme, 1995).

Em 1980, Goldstein *et al.* definiram as lectinas como proteínas ou glicoproteínas de origem não imunológica, que apresentam dois ou mais sítios de ligação a carboidratos, aglutinam células vegetais e/ou animais e precipitam polissacarídeos, glicoproteínas, glicoconjugados de forma reversível. Ubíquas na natureza se ligam reversivelmente a mono e oligossacarídeos de glicoconjugados (Peumans e Van

Damme, 1995), podendo apresentar a existência de um sítio adicional de natureza hidrofóbica, o qual determina e aciona interações entre as proteínas (Barondes *et al.*, 1988, Sharon e Lis, 1990).

Avanços na análise estrutural e molecular das lectinas redefiniram o termo. De acordo com a nova definição, as lectinas de planta são todas as proteínas que possuem no mínimo um domínio não catalítico que se liga reversivelmente a um mono ou oligossacarídeo específico, estendendo o conceito para as proteínas que se comportam de forma completamente diferente com relação às suas propriedades de aglutinação e/ou precipitação de glicoconjugados (Peumans e Van Damme, 1995;1998).

As lectinas são amplamente distribuídas na natureza, podendo ser encontradas em microorganismos, animais (invertebrados e vertebrados) e em plantas, onde foram feitas as primeiras investigações. Nos microorganismos, os fungos têm sido os mais estudados, para o isolamento, detecção e purificação de lectinas (Kawagishi *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 2003; Ngai e Ng, 2004; Goldstein *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2008). Mas as bactérias e cianobactérias também são avaliadas, mas com menos frequência (Syed *et al.*,1999; Yamaguchi *et al.*, 1999).

Nos animais invertebrados elas são freqüentemente encontradas na hemolinfa, mas podem estar no plasma, soro e fluido celômico. Como por exemplo, em protozoários (Babal e Russel, 1999), insetos (Chen *et al.*, 1999; Ourth *et al.*, 2005), moluscos (Banerjee *et al.*, 2004;Takahashi *et al.*, 2008), crustáceos (Alpuche *et al.*,2005; Yang *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2008), anêmona (Fenton-Navarro *et al.*, 2003), esponjas (Moura *et al.*, 2006) e entre outros.

Em animais vertebrados, elas têm sido isoladas de peixes (Murayama *et al.*, 1997; Bazil e Entlicher, 1999), bovinos (Ye e Ng, 2000), de anfíbios (Leverivray *et al.*, 1985) e outros organismos. No ser humano, elas estão presentes em diferentes tecidos e células (Kuipers *et al.*, 2003; Bouwman *et al.*, 2006; Wallis *et al.*, 2007), no pulmão (Dumphy *et al.*, 2002; Sorensen *et al.*, 2007), em placenta (Solleux e Coleman, 2003), em células dendríticas (Kanazawa *et al.*, 2004; Kanazawa *et al.*, 2007) entre outras.

As plantas constituem ricas fontes de lectinas e sua distribuição ocorre em raízes, folhas, flores, frutos, sementes, rizomas, tubérculos, bulbos, vagens, entrecascas, cerne, servindo como materias de análise no isolamento dessas moléculas (Ratanapo *et al.*, 2001; Sá *et al.*, 2008a).

Estas proteínas ou glicoproteínas têm sido detectadas, purificadas e isoladas principalmente de semente de leguminosas, devido à sua abundância, uma vez que lectinas constituem aproximadamente 10% do total de proteínas solúveis em sementes, como únicas ou múltiplas formas moleculares (Sharon e Lis, 1990; Paiva e Coelho, 1992; Konozy *et al.*, 2003).

Muitas lectinas são freqüentemente detectadas e isoladas de sementes (Correia e Coelho, 1995; Moreira *et al.*, 1998; Macucka *et al.*, 1999; Freire *et al.*, 2002; Singha *et al.*, 2007; Susseeland *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2008) por ser um tecido geralmente mais rico em lectina.

Outros tecidos também estão sendo utilizados para detecção, isolamento e purificação destas moléculas, embora com menos freqüência. Como por exemplo, cascas de árvores (Wititsuwannakul *et al.*, 1998), folhas (Coelho e Silva, 2000; Macedo *et al.*, 2007; Rameshavarani e Nadimpalli, 2008), frutos (Peumans *et al.*, 1998; Oliveira *et al.*, 2003; Wang e Ng, 2006), entrecasca (Rojo *et al.*, 2003, Ina *et al.*, 2005; Nascimento *et al.*, 2008), em raízes (Naeem *et al.*, 2001; Wang e Ng, 2006), bulbos (Bertrand *et al.*, 1998; Parisi *et al.*, 2008), tubérculos (Kaur *et al.*, 2006), rizomas (Citores *et al.*, 1997; Chu e Ng, 2006), coleótilos (Martinez e Cordoba, 2000), cotilédones (Nomura *et al.*, 1998; Oliveira *et al.*, 2002), cerne (Sá *et al.*, 2008a) e outros tecidos e órgãos.

As lectinas apresentam uma grande diversidade estrutural e o aspecto comum entre estas moléculas é a presença de pelo menos um sítio específico de ligação a carboidrato, em cada cadeia polipeptídica.

Cada lectina liga-se a um carboidrato específico ou grupo de carboidratos em oligossacarídeos ou glicoproteínas, através de seus sítios de ligação que tendem a se localizar na superfície da molécula protéica, e a seletividade da ligação é obtida através de pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas, interações de van der Waals e coordenação metálica, entre o carboidrato e a proteína (Sharon e Lis, 2002). Pequenas alterações na estrutura da molécula protéica podem levar a modificações na orientação do carboidrato ligado a ela, portanto, altera a especificidade da lectina (Ng *et al.*, 1996).

Pelo fato da lectina aglutinar eritrócitos, a sua presença é observada através de ensaios de aglutinação, nos quais uma diluição seriada da lectina é efetuada, antes da incubação com o eritrócito. O ensaio de hemaglutinação é comumente o mais utilizado

por promover uma fácil visualização desta propriedade da lectina de aglutinar células eritrocitárias.

Os eritrócitos utilizados no ensaio podem ser de origem humana ou de outros animais, tratados enzimaticamente (Banerjee *et al.*, 2004; Jung *et al.*, 2007) ou quimicamente (Coelho e Silva, 2000; Gaidamasvili *et al.*, 2002), aumentando a sensibilidade das células a lectina, e não tratados (Wititsuwannakul *et al.*, 1998; Mo *et al.*, 2000).

As lectinas podem apresentar distintos valores de atividade hemaglutinante com eritrócitos de diferentes animais e podem ser específicas para determinado tipo sanguíneo, como a lectina de *Salvia bogotensis*, que só aglutina eritrócitos humanos Tn (Vega e Pérez, 2006), a lectina BAA-A de *Bunodeopsis antillensis* (Fenton-Navarro *et al.*, 2003) e a de *Tachypleus tridentatus* (Nagai, 1999), específicas para eritrócito tipo A, e as lectinas de *Charybdis japonica* (Umetsu, 1991), a do cogumelo *Marasmius oreades* (Winter *et al.*, 2002) e a aglutinina-B (BAA-B) de *Bunodeopsis antillensis*, (Fenton-Navarro, *et al.*, 2003), específicas para eritrócitos tipo B. Diferentemente uma lectina fúngica da espécie *Cordyceps militaris*, denominada CML, aglutina eritrócitos de ratos e camundongos, mas não aglutina eritrócitos do grupo ABO (Jung *et al.*, 2007). Outras lectinas, no entanto, são caracterizadas como não específicas para grupos sanguíneos (Sampietro *et al.*, 2001; Banerjee *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2008).

Outra forma de avaliar a presença de lectinas na amostra é através de ensaios de precipitações de polissacarídeos ou glicoproteínas (Yamaguchi *et al.*, 1998; Goldstein *et al.*, 2007). Somente a aglutinação de eritrócitos não é suficiente para comprovar a presença de lectina, pois alguns agentes, como taninos, lipídeos ou cátions divalentes em altas concentrações podem aglutinar eritrócitos (Rüdger, 1998). Faz-se necessário realizar ensaio de inibição da atividade hemaglutinante (AH) com carboidratos para comprovar a presença da lectina (Correia e Coelho, 1995; Sharon e Lis, 2001).

A especificidade da lectina é definida em função do monossacarídeo que, em menor concentração, possua a maior habilidade para inibir sua atividade hemaglutinante ou precipitação de glicoconjugados; entretanto algumas lectinas não possuem um monossacarídeo inibidor e são inibidas por oligossacarídeos (Wälti *et al.*, 2008), glicoproteínas e/ou polissacarídeos (Thakur *et al.*, 2007). As lectinas são agrupadas de acordo com a ligação ao carboidrato e os grupos de especificidades são: glicose/manose;

galactose; galactose/N-acetilgalactosamina, fucose, N-acetilglicosamina, ácido siálico e grupos glicanos complexos (Peumans e Van Damme, 1998; Audette *et al.*, 2000).

Muitas lectinas necessitam de íons metálicos como Ca^{++} , Mg^{++} , Mn^{++} e outros que estão presentes no sítio de ligação e/ou adjacentes a ele, para poder exercer suas atividades biológicas. Os aminoácidos que coordenam o íon metálico incluem asparagina e ácido aspártico. A presença destes íons é considerada como um coadjuvante auxiliar na manutenção da estrutura terciária da lectina em uma conformação favorável para a ligação do carboidrato, mas não interage diretamente com o carboidrato (Audette *et al.*, 2000; Sharon e Lis, 2001).

Com base na estrutura geral das proteínas as lectinas de plantas têm sido subdivididas em: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas (Peumans e Van Damme, 1998). Merolectinas são pequenas e simples, devido à sua natureza monovalente, são incapazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados, um exemplo é a lectina Heveína que se liga a quitina, obtida do látex de *Hevea brasiliensis*. Hololectinas apresentam dois ou mais sítios de ligação para carboidratos, idênticos ou muito homólogos; devido à sua natureza di ou multivalente aglutinam células e/ou precipitam glicoconjugados. A maioria das lectinas de planta pertence a este grupo. Conforme Van Damme *et al.* (1998), a concanavalina A (Con A) é um exemplo de hololectina. Quimerolectinas são proteínas que possuem um ou mais sítios de ligação a carboidratos e outro adicional com atividade enzimática (ou outra atividade biológica) que funciona independentemente daquele de ligação a carboidratos. Dependendo do número de sítios de ligação a carboidratos as quimerolectinas podem agir como merolectinas ou hololectinas. A ricina de *Ricinus communis* L. e a lectina de *Viscum álbum* L. exemplificam este grupo de lectinas (Olsnes e Kozlov, 2001). Superlectinas são proteínas que apresentam exclusivamente pelo menos dois sítios de ligação a carboidratos diferente e podem ser consideradas como um grupo especial de hololectinas. Um exemplo é a lectina do bulbo de tulipa TxLCI, a qual possui dois sítios de ligação a carboidratos, sendo um para manose e outro para N-acetilgalactosamina.

As lectinas também têm sido classificadas dentro de sete grupos relacionados entre si do ponto de vista estrutural e especificidade a carboidratos (Van Damme *et al.*, 1998), são elas: as lectinas quitina-ligantes contendo domínio de heveína, lectinas do floema de curcubitáceas, lectinas de leguminosas (García-Pino *et al.*, 2006), proteínas

inativadoras de ribossomo tipo 2 (Pelosi *et al.*, 2005; Stirpe *et al.*, 2007), lectinas de monocotiledôneas ligantes de manose, lectina relacionada à jacalina (Barre *et al.*, 2004) e a família das amarantáceas. As três últimas apresentam características estruturais semelhantes como exclusivamente β estrutura (Wright, 1997). As lectinas de leguminosas são as mais estudadas e caracterizadas, elas apresentam homologia na seqüência de aminoácidos e na conformação tridimensional.

Os papeis fisiológicos das lectinas de plantas não estão ainda bem definidos. Com base na localização em diferentes tecidos e nas suas propriedades gerais, muitas funções têm sido sugeridas, dentre elas, as lectinas podem atuar como proteínas de reserva de nitrogênio, como fatores de reconhecimento específico, como proteínas envolvidas no mecanismo de defesa contra vírus, insetos, microrganismos, nematóides e animais herbívoros predadores interagindo com glicogonjugados presentes nesses organismos e interferindo no crescimento, desenvolvimento e fisiologia dos mesmos (Peumans e Van Damme, 1995; Mackukar *et al.*, 1999; Freire *et al.*, 2002; Sá *et al.*, 2008a). Outras funções, como, fenômenos relativos à defesa e/ou regulação e sinalização celular (Jiang *et al.*, 2006), moléculas participantes na organização celular, na fagocitose, na proteção celular, no mecanismo de crescimento da parede celular, na mitose induzida, no transporte de carboidratos e fixação destes nos tecidos vegetais (Peumans e Van Damme, 1995; Rüdiger, 1998).

1.1.2 Purificação

Por causa da amplitude de propriedades e aplicações em diversas áreas da medicina clínica, bem como, em pesquisa química e biológica, lectinas têm sido purificadas por métodos convencionais cromatografias ou por eletroforese que se baseiam nos aspectos gerais das proteínas que são carga elétrica, tamanho e solubilidade, propriedades exibidas pelas mesmas, que variam de uma proteína para outra.

A primeira etapa para a purificação de lectinas de planta é a extração em solução salina, como no caso do isolamento das sementes de *Talisia esculenta* (Freire *et al.*, 2002), das de *Cratylia mollis* (Paiva e Coelho 1992; Correia e Coelho, 1995) ou usando tampões como na obtenção das lectinas de cotilédones de *Luetzelburgia auriculata* (Oliveira *et al.*, 2002), das sementes de *Cratylia floribunda* (Sol *et al.*, 2007) e da

entrecasca de *Crataeva tapia* (Nascimento *et al.*, 2008). A solução é misturada ao triturado do vegetal de forma a constituir um extrato bruto com concentração determinada, em período de tempo e condições de temperatura definidos, sob agitação constante. Fazendo com que aumente a solubilidade das proteínas do triturado, o extraído é posteriormente filtrado e o sobrenadante é centrifugado para a obtenção de um extrato bruto.

Após a extração segue-se a purificação parcial, utilizando o fracionamento salino; baseado na separação de moléculas de acordo com suas diferenças de solubilidade. A precipitação utilizando sais neutros é possível, pois estes, em função de sua força iônica, afetam a solubilidade das proteínas, em concentrações reduzidas, eles aumentam a solubilidade das proteínas (“Salting in”), mas quando a força iônica é aumentada, mais sais são adicionados ocorre uma redução da solubilidade das proteínas e estas podem ser precipitadas (“Salting out”). Desta forma, diferentes fracionamentos podem ser procedidos para a purificação parcial de várias lectinas num extrato, já que proteínas diferentes apresentam reações diferentes em resposta a concentrações de sais. O sal mais utilizado é o sulfato de amônio devido sua alta solubilidade permitir a precipitação protéica em soluções com elevada força iônica e por não desnaturar as proteínas (Heu *et al.*, 1995).

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

Após a extração e purificação parcial, diversos métodos cromatográficos são usados para a purificação das lectinas, entre eles, a cromatografia de troca iônica (Yan *et al.*, 2005), a cromatografia de exclusão molecular (Candy *et al.*, 2003), a cromatografia de afinidade (Naeem *et al.*, 2001) ou em membrana (Sorci *et al.*, 2006). Alguns protocolos de purificação utilizam um ou mais métodos cromatográficos.

A cromatografia que é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição destes entre duas fases, que estão intimamente ligadas. Uma fase é a estacionária e a outra é a móvel. Durante a passagem da fase móvel pela estacionária, os componentes da mistura são distribuídos entre as

duas fases, de tal forma que cada um dos componentes é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferentes dos componentes.

A cromatografia de troca iônica baseia-se na ligação da proteína com os grupos de sinais contrários imobilizados na matriz. A coluna é lavada com solução tampão e as proteínas com nenhuma ou pouca interação com o trocador de íons são excluídas. As proteínas adsorvidas na matriz podem ser eluídas pelo aumento da força iônica ou alteração do pH do meio (Datta *et al.*, 2001). Esse método permite também separação de isoformas de preparações lectínicas, pela utilização de um gradiente salino crescente (Mishra *et al.*, 2004).

Uma das matrizes mais utilizadas neste tipo de cromatografia é a celulose. Como exemplo tem-se a carboximetil (CM) celulose, um trocador catiônico carregado negativamente e a dietilaminoetil (DEAE) celulose, um trocador aniônico, carregado positivamente (Li *et al.*, 2008).

A cromatografia de exclusão molecular ou filtração em gel ou peneira molecular é um método simples e baseia-se na separação de biomoléculas de acordo com seu tamanho. A mistura protéica passa através de uma coluna contendo esferas de gel cujos poros, possuem intervalos de tamanhos relativamente estreitos. As moléculas maiores que não penetram nos poros do gel são eluídas primeiro, enquanto que as moléculas de tamanho menores capazes de penetrar no gel vão passando lentamente, de modo que a separação é de ordem decrescente de massa molar (Heu *et al.*, 1995). Este tipo de cromatografia é usado tanto para obter preparações homogêneas (Bezerra *et al.*, 2001), como para definir a massa molar da proteína nativa (Kawagishi *et al.*, 2001). Estas cromatografias podem ser usadas em técnicas de alta resolução para purificação de lectinas em sistemas como cromatografia líquida de rápida resolução (FPLC, do inglês, Fast Protein Liquid Chromatography) utilizando cromatografia de troca de iônica sobre coluna de Mono Q ou Mono S (Mo *et al.*, 1993, Chung *et al.*, 2001), bem como, exclusão molecular (Jimbo *et al.*, 2000) ainda, cromatografia líquida de alta resolução (alta pressão) (HPLC, do inglês, High-performance (High-pressure) liquid Chromatography).

A cromatografia de afinidade é a mais utilizada, baseia-se no isolamento seletivo de macromoléculas biológicas, utilizando a capacidade das proteínas em se ligarem especificamente a outras moléculas, como as lectinas, que se ligam especificamente a carboidratos, através de ligações não covalentes. Estes ligantes são covalentemente

imobilizados à matriz, promovendo uma fase estacionária seletiva. A amostra é aplicada a matriz, as moléculas sem afinidade passam sem se ligar, enquanto que as moléculas específicas para o mesmo são retidas. A proteína desejada é obtida com alto grau de pureza (Ye e Ng, 2002); alterando-se as condições de pH (Sá *et al.*, 2008), força iônica (Freire *et al.*, 2002) ou pela eluição com uma solução contendo um competidor (Oliveira *et al.*, 2002).

Vários suportes podem ser utilizados na cromatografia de afinidade, como a matriz de celulose, gel de guar, agarose, a quitina, a sepharose, o sephadex. Estas matrizes têm sido muito utilizadas para a purificação de lectinas, tais como, sephadex, polímero de glicose (Correia e coelho, 1995) para lectinas com afinidade para glicose e manose; a quitina (Freire *et al.*, 2002) para lectinas com afinidade para N-acetilglicosamina, o gel de guar (Cavada *et al.*, 1998; Coelho e Silva, 2000) e a sepharose (Candy *et al.*, 2003) ambas para lectinas com afinidade para galactose, bem como sepharose ou agarose contendo carboidratos ou glicoproteínas imobilizadas (Gerlach *et al.*, 2002).

1.1.3. Caracterização

Outras propriedades físico-químicas são avaliadas para a caracterização de lectinas puras, o ensaio de hemaglutinação, utilizado para a detecção é útil para caracterizá-las quanto à especificidade dentro do sistema ABO ou entre eritrócitos de animais. Testes de atividade hemaglutinante e inibição, fazendo uso de monossacarídeos simples ou complexos, glicoproteínas, glicoconjugados e polissacarídeos são frequentes na caracterização de lectinas, desde que a especificidade é um critério para classificar as lectinas de planta em grupos de especificidade. Esta interação das lectinas contribui para a escolha da matriz de afinidade ideal para a purificação das mesmas.

A determinação da dependência de íons ou não é muito importante, pois existe lectinas que necessitam destes para exercer sua atividade biológica (Sharon e Lis, 1990). A lectina *Erythrina speciosa*, por exemplo, é uma metaloproteína que contém Ca^{++} e Mn^{++} , quando tratada com EDTA sua AH é totalmente abolida sendo a mesma restaurada após a adição de Ca^{++} e Mn^{++} (Konozy *et al.*, 2003). A presença de cátions na estrutura da proteína promove uma termoestabilidade e uma relativa resistência à ação enzimática.

A avaliação da AH de lectinas em diferentes temperaturas, para a determinação da estabilidade é outra etapa na caracterização. Algumas lectinas são termossensíveis, outras termoestáveis, isso significa que tais proteínas têm sua atividade otimizada em determinadas temperaturas e ausente em temperaturas desfavoráveis à manutenção da estrutura nativa. Algumas lectinas permanecem ativas até 55 – 65 °C e a partir de então, com a elevação da temperatura, a AH decai até ser abolida, como a lectina de *Luetzelburgia auriculata* (Oliveira *et al.*, 2002), outras continuam ativas até 100 °C, como no caso da lectina de cogumelo *Ganoderma capense* que se manteve ativa após exposição a 100 °C durante 150 min (Ngai e Ng, 2004).

Outra avaliação importante é a estabilidade em diferentes valores de pH, pois estas proteínas devem ser mantidas em solução que apresentem condições ideais à sua manutenção nativa e conseqüente utilização nos experimentos a que podem ser submetidas; pois elas podem sofrer desnaturação em pH desfavorável. O pH tem efeito variado sobre as lectinas, em alguns casos não afeta a atividade (Wititsuwannakul *et al.*, 1998) em outros a lectina perde a atividade em determinada faixa de pH, como o caso da lectina de *E. speciosa* (Konozy *et al.*, 2003) e outras ficam ativas em valores de pH que variam de 4 – 11, como o da lectina de *Ganoderma capense* (Ngai e Ng, 2004).

A AH da lectinas também pode ser avaliada em relação à ação de enzimas proteolíticas, pois estas podem alterar a AH ou não. A lectina de *H. brasiliensis* quando tratada com enzima proteolítica chegou ao mínimo de sua AH (Wititsuwannakul *et al.*, 1998).

A eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) pode ser realizada usando um gel contendo dodecilsulfato de sódio (SDS) ou β -mercaptoetanol, que sob condições redutoras revela o grau de pureza, a composição e a massa molecular de subunidades (Reynoso-Camacho *et al.*, 2003). A PAGE em condições nativas pode ser utilizada para caracterizar a proteína em relação à carga líquida. Proteínas ácidas (Coelho e Silva, 2000) e proteínas básicas (Correia e Coelho, 1995), foram reveladas. Os géis podem ser corados com azul de coomassie ou negro de amido que detectam bandas polipeptídicas, ou com colorações específicas para glicoproteínas, como a coloração de Schiff (Coelho e Silva, 2000). Outro importante método eletroforético é a eletrofocalização ou focalização isoeletrica, que determina o ponto isoeletrico da proteína de interesse.

A técnica de HPLC-RP (cromatografia líquida de alta resolução em fase reversa) constitui um meio útil de obter lectinas mais puras que já tenham sido purificadas, de

estimar massas moleculares, caracterizar e fracionar proteínas e peptídeos muito semelhantes. FPLC tem sido amplamente utilizada como uma etapa final de purificação mais refinada de lectinas, após a utilização de outros métodos cromatográficos (Wong e Ng, 2003) e como um método de caracterização de massa molecular destas proteínas. FPLC e HPLC-RP têm sido utilizadas para estabelecer a homogeneidade das lectinas puras, para separar estruturas de subunidades, assim como determinar se essas moléculas são monoméricas ou não (Wang *et al.*, 2001).

Muitos outros métodos e ensaios, tais como a imunodifusão, a difusão dupla, a eletroforese bidimensional, análise de aminoácidos, seqüenciamento de aminoácidos, estudos de fluorescência, dicroísmo circular e cristalização também são metodologias importantes para a caracterização das lectinas.

1.1. 4. Propriedades Biológicas

As lectinas, por apresentarem propriedades características, principalmente à de se ligar a glicoconjugados, mostram ser importantes ferramentas para a investigação em diversas áreas da ciência, em especial, processos médicos, químicos e biológicos. A distribuição de um grande número de lectinas com diferentes especificidades tem levado à sua utilização como reagentes para explorar carboidratos, sendo este, o ponto mais importante no avanço de numerosas áreas da biologia celular.

Estas proteínas desempenham os mais variados efeitos sobre células, dentre eles, aglutinação, estimulação mitogênica, redistribuição de componentes de superfície celular, modificação da atividade de enzimas, inibição do crescimento bacteriano e fúngico, toxicidade, efeito imunossupressor, entre outros.

Elas podem ser aplicadas e utilizadas como importante ferramenta em diversos processos, como, estudos histoquímicos e celulares (Vega e Pérez, 2006), como moléculas bioadesivas na entrega de drogas (Gabor *et al.*, 2001; Bies *et al.*, 2004), fracionamento de células (Ohba *et al.*, 2002), no estudo de glicoconjugados e oligossacarídeos (Banerjee *et al.*, 2004), na indução de apoptose em tumores de células humanas (Karasaki *et al.*, 2001), inibição da proliferação de fibroblastos oculares e contração de colágeno (Batterbury *et al.*, 2002).

Várias lectinas são tóxicas para células de mamíferos *in vivo* e *in vitro*; inibem o crescimento quando incorporadas na dieta e são tóxicas quando injetadas em animais.

Por outro lado, atividade citotóxica de lectinas tem indicado uso como uma alternativa no tratamento do câncer. A lectina de *Phaseolus acutifolius* foi testada *in vivo* em camundongos e mostrou baixa toxicidade, podendo ser utilizada em estudos carcinogênicos (Reynoso-Camacho *et al.*, 2003), outra lectina a de *Musa basjoo* tem propriedades de estimular macrófagos e inibir a proliferação de células leucêmicas (Wong e Ng, 2006), interação com células Du-145 do câncer de próstata (Gabor *et al.*, 2001).

Muitas lectinas apresentam atividade mitogênica sobre diferentes células como, células de leucemia (L1210 e M1) e de hepatoma (Hep G2) (Ngai e Ng, 2004), linfócitos T humanos (Banerjee *et al.*, 2004; Maciel *et al.*, 2004), sobre esplenócitos (Ngai e Ng, 2004; Wang e Ng, 2006; Li *et al.*, 2008). Também apresentam atividade antitumoral, como no sarcoma 180 (Andrade *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2008), e sobre linhagens de células tumorais humanas (Liu *et al.*, 2008).

Apresentam também ação contra células bacterianas, como, aglutinação de células bacterianas (Gaidamashvili e Van Staden, 2002; Tasumi *et al.*, 2004; Takashaki *et al.*, 2008) e contra fungos (Freire *et al.*, 2002; Trindade *et al.*, 2006), contra protozoários (Moura *et al.*, 2006) e nematodas (Ripoll *et al.*, 2003). A afinidade das lectinas por glicoproteínas de superfície celular tem sido usada para a caracterização epidemiológica da *Neisseria gonorrhoeae* e diferenciação de outras *Neisseria* (Wu *et al.*, 2001). Alguns trabalhos mostraram que determinadas bactérias produzem lectinas específicas para certos carboidratos, e fazem uso das mesmas para se aderir ao tecido hospedeiro como primeira etapa em um processo infeccioso. Ao submeter o organismo infectado com a bactéria a injeções de carboidratos, a colonização é reduzida devido à diminuição de sua adesão ao tecido, sendo o bloqueio aos locais de ataque das bactérias um caso claro de terapia antiadesiva contra doenças microbianas. Esta forma de aplicação das lectinas é alvo de intensas pesquisas pela indústria farmacêutica como método contra infecções (Sharon e Lis, 1993, Rüdiger *et al.*, 2000).

Ainda, as lectinas apresentam outras atividades biológicas, além de seus efeitos sobre células, elas podem atuar como moléculas inseticidas contra várias espécies (Dutta *et al.*, 2005; Leite *et al.*, 2005; Sá *et al.*, 2008a), e seus genes podem ser utilizados na produção de transgênicos de plantas de interesse econômico (Ramesh *et al.*, 2004; McCafferty *et al.*, 2008); atividade antiviral contra vírus herpes tipo 1 e do vírus influenza das folhas de *Pandanus amarillifolius* (Ooi *et al.*, 2004); inibição da

transcriptase reversa do HIV-1 (Wang e Ng, 2006; Li *et al.*, 2008) e atividade hipoglicemiante (Kavalali *et al.*, 2003) e ainda imobilizá-las em suportes inerte e usá-las como matrizes de afinidade para fins bastante variados (Lima *et al.*, 1997; Ohba *et al.*, 2002; Bakalova e Ohba, 2003).

1. 2. Leguminosas

A família das leguminosas é uma das maiores famílias botânicas e de ampla distribuição geográfica. Uma característica típica dessa família é apresentar o fruto do tipo legume, também conhecido como vagem (há exceções). É subdividida em 3 subfamílias muito distintas: Faboideae (ou Papilionoideae), Caesalpinioideae (ou Caesalpiniaceae) e Mimosoideae (ou Mimosaceae). A variação no nome se deve à coexistência atual de mais de um sistema de classificação. Quase todas as espécies da família apresentam simbiose de suas raízes com bactérias do gênero *Rhizobium* e semelhantes, que fixam o nitrogênio da atmosfera, uma característica ecológica de extrema importância. Também são de grande importância econômica pela produção de alimentos como o amendoim, a lentilha, o feijão, o grão de bico, a fava e a soja. Além das propriedades nutricionais e medicinais, elas são bastante utilizadas na produção de madeira nobres ou de valor comercial. As lectinas de legumes representam a maior e mais estudada família de proteínas desta classe, alguns dos 100 membros bem caracterizados, foram quase todos obtidos de sementes de plantas (Konozy *et al.*, 2003). Alguns exemplos bem conhecidos destas lectinas são a concanavalina A (Con A) obtida da *Canavalia ensiformis* (feijão de porco) e Cramoll 1, 2, 3 e 4 obtidas de *Cratylia mollis* (feijão camaratu) (Paiva e Coelho, 1992; Correia e Coelho, 1995). As lectinas de legumes são extremamente úteis como modelo para o entendimento da base molecular de interações proteína-carboidrato porque elas são mais fáceis de serem purificadas e exibem uma grande variedade de especificidade para carboidratos. Uma importante razão pelo interesse nestas lectinas é sua similaridade com as lectinas de outras fontes, como as de animais e microrganismos (Sharon e Lis, 2001).

1.2. 1. *Caesalpinia ferrea* Mart.

Caesalpinia ferrea Mart. ex. Tul. var. *ferrea* é uma árvore que pertence à família Leguminosae-Caesalpinioideae (Caesalpinaceae) e que cresce em todo o Brasil (Bragança, 1996; Lorenzi, 2002), sendo largamente distribuída nas regiões Norte e Nordeste, principalmente em Pernambuco e no Ceará (Alzugaray, 1984). Em Pernambuco acha-se predominantemente nas áreas pobres da Região do São Francisco e nos municípios de Floresta e de Buíque. É conhecida vulgarmente como pau-ferro ou jucá.

Possui flores amarelas pequenas e em cachos; frutos de cor marrom escura, do tipo legume (vagem), com sementes escuras; folhas compostas; altura de 10-15 m, com tronco curto de 40-60 cm de diâmetro, que fornece madeira para construção civil e lenha. A árvore é bastante ornamental (Figura 1), podendo ser empregada na arborização de ruas e avenidas e aproveitada para plantios em áreas degradadas (Pio Corrêa, 1984; Lorenzi, 2002). Além disso, o pau-ferro é considerado uma forrageira importante no Nordeste, tanto pela sua adaptação natural à região, como também por fornecer forragem durante a seca (Nascimento *et al.*, 2002).

Algumas das propriedades terapêuticas de *C. ferrea* têm sido descritas, e incluem tratamento de ferimentos e contusões, alívio de tosse crônica e asma (Braga, 1976; Hashimoto, 1996). Além disso, algumas pesquisas mostram que o jucá possui ação antifúngica (Lima *et al.*, 1994), antiulcerogênica (Bacchi e Sertie, 1994; Bacchi *et al.*, 1995) e antiinflamatória; bem como propriedades analgésicas (Carvalho *et al.*, 1996; Thomas *et al.*, 1988). Os frutos têm sido usados também no tratamento de diabetes (Balbach, 1972) e na prevenção do câncer (Nakamura *et al.*, 2002a). Os constituintes extraídos dos extratos alcoólicos já foram avaliados *in vivo* quanto ao seu efeito antitumoral em processos carcinogênicos de pele, no segundo estágio (Nakamura *et al.*, 2002b).

As raízes do pau-ferro são utilizadas como antipiréticas e antidiarréicas, e a decocção da madeira é anticatarral e cicatrizante (Penna, 1964; Pio Corrêa, 1984; Lewis, 1987). A casca do caule é usada como descongestionante, no tratamento da enterocolite, diarreia (Balbach, 1972), para o tratamento de diabetes e contra reumatismo (Bragança, 1996; Gomes, 2003), mostrando ainda possíveis benefícios no sistema cardiovascular dos usuários (Menezes *et al.*, 2007). Um estudo fitoquímico

preliminar do extrato hidroalcoólico da casca do caule e das folhas demonstrou a presença de flavonóides, saponinas, taninos, cumarinas, esteróides e compostos fenólicos (Gonzalez *et al.*, 2004).

O extrato aquoso de *C. ferrea* mostrou-se, ainda, eficaz no estímulo da mielopoiese frente à listeriose e tumor ascítico de Ehrlich em ratos, promovendo certa proteção contra dose letal de *Listeria monocytogenes* e aumentando a sobrevivência dos animais, respectivamente (Queiroz *et al.*, 2001).

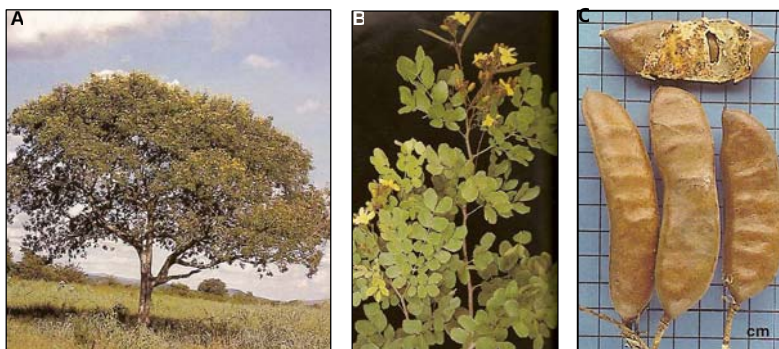


Figura 1 – Árvore (A), flor (B) e fruto (C) de *C. ferrea* Mart. ex Tul. var. *ferrea*.

Fonte: Lorenzi (2002).

A utilização e a comercialização de extratos aquosos e alcoólicos, farinha de diversos tecidos e da vagem de *C. ferrea* para aplicações na medicina popular desperta o interesse desta planta para estudos biotecnológicos.

1. 3. As defesas das plantas

As plantas desenvolveram mecanismos de defesa contra microrganismos, insetos, herbívoros ou em respostas a estresse abiótico. Dessa maneira, elas dominam as paisagens do planeta, apesar dos herbívoros e patógenos conseguirem destruí-las em grande escala (Richlefs, 2003).

Elas utilizam várias formas de defesa dentre as quais temos as adaptações morfológicas (espinhos, acúleos e caules rígidos) e a defesa química que incluem metabólitos primários, como, proteínas de defesa e secundários, em geral moléculas de baixo peso molecular como, alcalóides, terpenóides, saponinas, iridóides, polifenóis e

taninos. Esses compostos agem de diferentes maneiras, apresentando efeitos repelentes, deterrentes (afastador) alimentar, deterrente de ovoposição, inibidor de crescimento e tóxico.

Entre as proteínas que podem estar envolvidas no mecanismo de defesa das plantas, estão as lectinas, as proteínas inativadoras de ribossomo (RIPs), inibidores de protease, inibidores de α -amilase, arcelinas, quitinases canatoxina, ureases e formas modificadas de proteínas de estocagem (Carlini e Grossi-de-Sá, 2002; Macedo *et al.*, 2003; Fithers *et al.*, 2004; Follmer, 2008).

1. 4 Microrganismos

1.4.1 Bactérias

Como as bactérias são organismos unicelulares, o termo crescimento refere-se ao aumento do número de indivíduos presentes na população. O crescimento bacteriano depende das condições químicas, físicas e dos nutrientes adequados. Isto ocorre por divisão binária que é precedida do aumento da massa celular, pela síntese de proteínas, polissacarídeos, lipídeos e ácidos nucleicos que estão presentes na célula. Sua classificação é feita de acordo com a constituição da parede celular em dois grupos Gram-positivos e Gram-negativos. Substâncias químicas interessantes são encontradas na parede das bactérias como o ácido diaminopimílico (DPA), o ácido murâmico e o ácido teicóico. Outros constituintes principais são aminoácidos, açúcares aminados, carboidratos, lipídeos e peptoglicanos (constituídos de N-acetilglicosamina e ácido N-acetilmurâmico). As bactérias Gram-positivas apresentam em sua parede celular, polissacarídeos, ácidos teicóico e peptoglicanos, enquanto as Gram-negativas apresentam na sua parede celular, peptoglicanos, lipídeos, proteínas e lipopolissacarídeos (Trabulsi, 1991).

Dentre as bactérias Gram-positivas podem-se destacar: *Staphylococcus aureus*, de forma esférica, coagulase positivo, geralmente com distribuição em cachos irregulares semelhantes a cachos de uvas. É um patógeno responsável por muitas infecções graves nos seres humanos. Pode provocar endocardite, osteomielite hematogênica aguda, meningite ou infecção pulmonar, entre outras. Desenvolve rapidamente resistência a muitos agentes antimicrobianos e representa problemas

terapêuticos difíceis; *Streptococcus*, também esférica, tipicamente forma par ou cadeias durante o seu crescimento. Apresenta-se amplamente distribuído na natureza. Pode estar presente na flora humana normal, como também estar associado a importantes doenças humanas que pode ser atribuída em parte à infecção por estreptococos e / ou em parte a sensibilidade ao mesmo, por produzir várias substâncias extracelulares e enzimas.

Como bactérias Gram-negativas destacam-se: *Escherichia coli*, apresenta-se na forma de bastonete, além de formar colônias lisas, convexas, circulares e com bordas bem definidas. Faz parte da flora normal e acidentalmente causa doenças. Podendo causar infecção do trato urinário, diarreia, meningite e septicemia; *Klebsiella*, também em forma de bastonete, forma colônias grandes e mucóides, e tendem a coalescer com a incubação prolongada. Encontrada no trato respiratório e nas fezes, é responsável por uma pequena fração de pneumonias bacterianas, provocando extensa consolidação necrozante hemorrágica nos pulmões. Pode causar infecção no trato urinário e bacteremia, além de ser responsável por infecções hospitalares; *Pseudomonas aeruginosa* é um bacilo aeróbico móvel, amplamente distribuído na natureza, sendo comum seu achado em ambientes úmidos de hospitais. Consegue colonizar seres humanos normais, nos quais é um saprófita sendo encontrada em pequenos grupos na flora intestinal normal e na pele de humanos. É capaz de provocar doença em seres humanos cujas defesas estejam alteradas, por produzir a endotoxina A que causa necrose, quando purificada e injetada é letal para animais. Provoca, ainda, várias infecções sendo resistente a muitos antimicrobianos (Jawetz, 1991).

1.4.2 Fungos

Os fungos são seres eucarióticos, protistas, não-fotossintéticos, possuem membrana nuclear que envolve os cromossomos e o nucléolo. No seu citoplasma, encontramos algumas organelas como, o retículo endoplasmático, aparelho de golgi, mitocôndrias e vacúolo. Os componentes principais da parede celular são hexoses e hexoaminas, que formam mananas, ducanas e galactanas. Alguns fungos têm parede rica em quitina (N-acetilglicosamina), outros possuem complexos polissacarídios e proteínas, com predominância de cisteína. Dividem-se em fungos macroscópicos e microscópicos e apresentam-se como filamentosos e leveduriformes.

Os filamentosos possuem uma estrutura filiforme denominada hifa, que em conjunto forma o micélio e sua parede celular é constituída por celulose e quitina. As leveduras são unicelulares não formam micélio, mas são reconhecidas como fungo pela natureza de seus processos de reprodução sexuais e pela existência de forma de transição (Jawetz *et al.*, 1991).

O tempo de geração varia dentre os diferentes gêneros até entre espécies de um mesmo gênero, a dependência do meio de cultura, tempo e temperatura de incubação e disponibilidade de oxigênio. A curva de crescimento de uma espécie de levedura, quando em meio de cultura líquido, pode ser representada por um gráfico com quatro fases (figura 2).

Estes microrganismos são ubíquos, encontrados no solo, em plantas, vegetais, homem e detritos em geral (Trabulsi e Toledo, 1996). Muitos dão origem a doenças em plantas, contudo somente cerca de 100 milhares de espécies conhecidas de leveduras e fungos filamentosos provocam doenças em seres humanos ou animais. Tais como: *Aspergillus niger* apresenta conidióforos simples, cabeça conidial grande, radiada, preta e ocre. É patogênico ao homem, capaz de provocar aspergilose pulmonar, aspergilose disseminada, lesões cutâneas, nasais e do sistema nervoso central, bem como outros processos; *Colletotrichum*, forma assexuada de *Glomerella cingulata*, apresenta micélio de coloração branca, conídios hialinos e arredondados. O *Colletotrichum gloesporioides*, corresponde ao estado conidial de *Glomerella cingulata*. Este gênero é um dos mais importantes e difundidos na natureza, supostamente com mais de 1.000 espécies, normalmente é patógeno de plantas; *Trichoderma viride* apresenta colônias de crescimento lento, inicialmente brancas e mais tarde, amareladas, verdes e acinzentadas. Conidióforo ramificado, com fiálides em forma de frasco. Conídios dispostos em aglomerados, de paredes lisas ou rugosas, dispostos nas extremidades das fialídes. Frequentemente isolado do solo e restos de madeira, apresenta interesse médico, pois são oportunistas, causando patologias humanas, por produzirem micotoxinas (Lacaz, 1998).

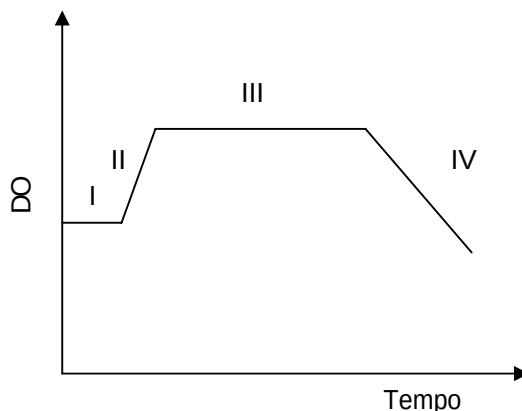


Figura 2- Curva de crescimento de microrganismos: (I) fase Lag também conhecida como fase de adaptação ou latência, é o período em que a população se adapta ao meio em que se encontra, iniciando a produção de metabólitos essenciais para o seu crescimento; (II) fase exponencial ou logarítmica é a fase na qual a multiplicação ocorre com maior velocidade, aumentando exponencialmente a população; (III) fase estacionária, onde o número de células viáveis permanece aproximadamente constante por causa do acúmulo de substâncias tóxicas liberadas pelos próprios microrganismos e redução dos nutrientes no meio e (IV) fase de morte ou declínio (Jawetz *et al.*, 1991).

A levedura *Candida albicans* é ovalada, com brotamento que produz pseudomicélio tanto em cultura como nos tecidos e exudatos. É um habitante normal natural do trato gastrointestinal, das mucosas nas vias respiratórias, trato genital feminino, freqüentes no solo, alimentos e ambiente hospitalar, podendo desta forma, causar infecções em pacientes imunodeprimidos ou debilitados e ser comumente transmitida de um ser humano para outro (Jawetz *et al.*, 1991). Como a *C. albicans* é um patógeno é necessário conhecer detalhadamente este agente casual, sua via metabólica, em busca de peculiaridades que possam ser avaliadas como possíveis alvos, mais seletivos, para uma ação.

Estudo realizado por Ruy *et al.* (2006) demonstrou que a *C. albicans* apresenta na sua mitocôndria três cadeias transportadoras de elétrons ou seja três vias metabólicas: a cadeia respiratória clássica (via dos citocromos, CRC), a cadeia respiratória paralela (PAR) e a ubiquinol oxidase alternativa (AOX), semelhante ao encontrado por Milani *et al.* (2001) para a *Candida parapsilosis*. A presença destas três vias (figura 3) facilita o

crescimento destes patógenos, pois quando são utilizadas terapias antifúngicas, estas drogas podem atuar em uma determinada via e mesmo assim a levedura continua se desenvolvendo, pois tem as outras duas vias para manter seu metabolismo energético. Então com o conhecimento destas vias e dos agentes antifúngicos que as inibem, pode-se elucidar o mecanismo de ação de novos agentes antifúngicos.

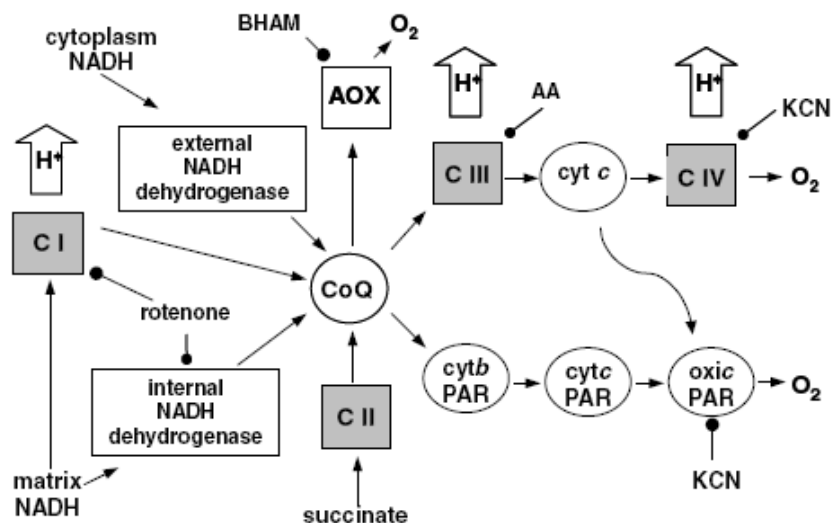


Figura 3- Representação esquemática do transporte de elétrons em *Candida albicans*. Elétrons de NADH são transferidos da bomba de prótons complexo I (CI) ou NADH desidrogenase externa e interna. Elétrons são então alimentados pela coenzima Q (CoQ), que também pode ser reduzido pelos elétrons derivados do succinato canalizado através do complexo II (C II). Elétrons coletados pela CoQ podem ser direcionados para O₂ através da AOX, PAR ou da bomba de prótons CRC, contendo complexo III (C III) citocromo c (cit c) e complexo IV (C IV). Rotenona inibe o complexo I e a NADH desidrogenase interna. BAHM inibe AOX, enquanto AA e KCN inibem os complexos III e IV, respectivamente. KCN também inibe o terminal PAR oxidase (Ruy *et al.*, 2006).

1.5. Atividade antimicrobiana

Uma substância apresenta efeito antimicrobiano quando o microrganismo responsável pela infecção é sensível a ela. Então o microrganismo é considerado sensível a um antimicrobiano quando o seu crescimento é inibido “*in vitro*” por uma concentração três ou mais vezes inferior àquela a que o antimicrobiano atinge no sangue. Se a concentração inibitória é igual ou superior àquela que o antimicrobiano atinge no sangue, o microrganismo é considerado resistente.

Muitas substâncias, inclusive proteínas, e dentre elas as lectinas, estão sendo avaliadas quanto ao seu efeito antimicrobiano. As lectinas podem ser incorporadas em plantas transgênicas conferindo a resistência a estas contra patógenos; podem ainda, servir como princípio ativo de antifúngicos e antibacterianos de uso clínico. As proteínas antimicrobianas, em animais, constituem parte do sistema imune inato.

Peptídeos ou proteínas com ação antifúngica são ubíquos na natureza e são expressos em diferentes estruturas ou órgãos de muitos vegetais e animais (Ng, 2004). Estes peptídeos ou proteínas pequenas com atividade antimicrobiana são usados contra inúmeros patógenos. Estas moléculas estão distribuídas em diferentes classes de proteínas, tais como quitinase (Ye e Ng, 2005), as proteínas tipo-quitinase (Ye e Ng, 2002a), as glucanases, as proteínas tipo-taumatina, as tioninas, proteínas tipo-ciclofilina, as lectinas (Ciopraga *et al.*, 1999; Ye *et al.*, 2001; Freire *et al.*, 2002; Wang e Ng, 2003b; Trindade *et al.*, 2006; Sitholy, *et al.*, 2007), proteínas inativadoras de ribossomo, ribonucleases, desoxiribonucleases, peroxidases e inibidores de proteases (Joshi *et al.*, 1998).

Os agentes antimicrobianos apresentam alguns mecanismos de ação, entre eles, temos: inibição de síntese do peptideoglicano da parede celular bacteriana; lesão da membrana citoplasmática, interferindo na sua função; interferência da síntese e replicação do DNA ou na inibição da RNA polimerase dependente de DNA; e inibição da síntese de metabólitos essenciais (Tortora *et al.*, 2001). A figura 4 ilustra alguns dos mecanismos de ação antimicrobiana.

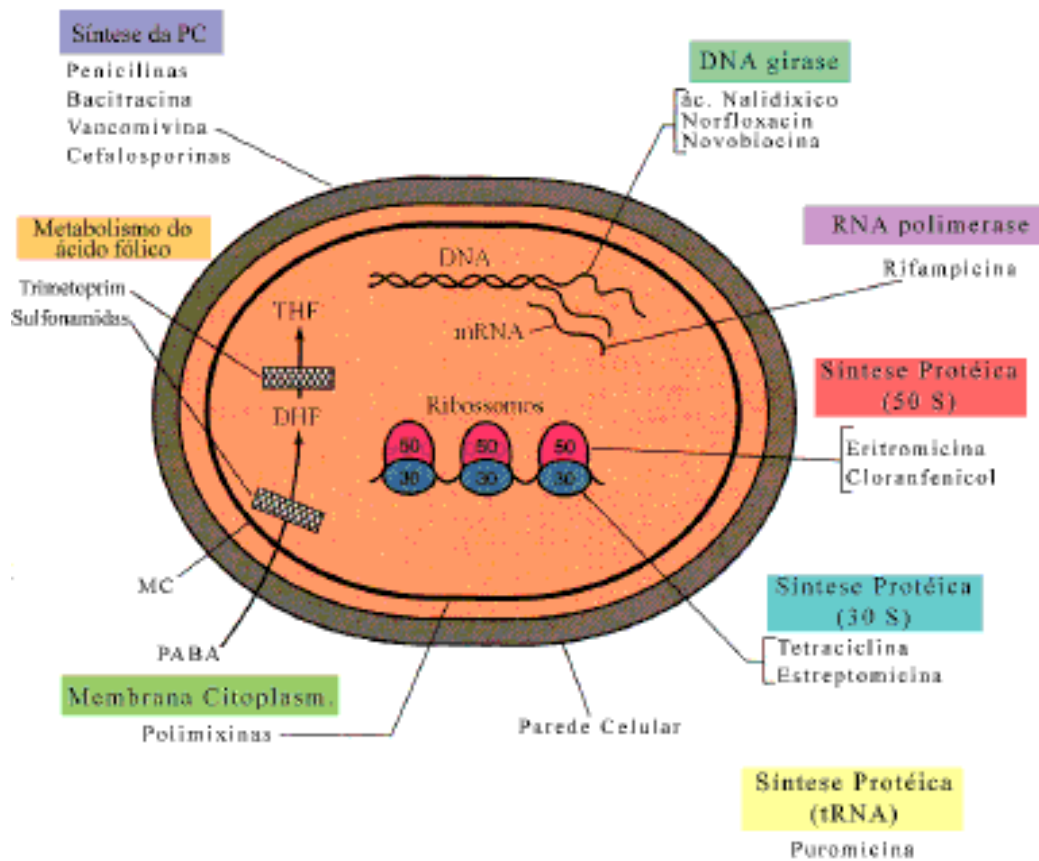


Figura 4 – Esquema das principais estruturas ou etapas metabólicas afetadas por antibióticos (Adaptado de Madigan *et al.*, 2003).

Por causa dos distintos mecanismos de ação, houve um crescente interesse no uso de peptídeos e proteínas antimicrobianas como antibióticos para o controle de patógenos (Wang *et al.*, 2002). Em plantas as proteínas antimicrobianas estão envolvidas com o mecanismo de defesa (Lee *et al.*, 2002).

Muitas proteínas e peptídeos têm demonstrado ação contra fungos. Duas proteínas de *Malva parvifolia* possuem uma potente ação antifúngica e apresentaram uma ação fungicida frente ao fungo *Fusarium graminearum* (Wang e Bumbars, 2000) e peptídeos isolados de sementes de *Phaseolus* e *Adzuki* angularia possuem uma potente atividade antifúngica frente aos fungos *Botrytis cinerea*, *Mycosphaerella*

arachidicola e *Fusarium oxysporium* (Ye e Ng, 2001a). Dois peptídeos antifúngicos foram avaliados por Huang *et al.* (2000) e Duvick *et al.* (1992), um ligador de quitina de folhas de *Gincko biloba*, que exerceu atividade contra *F. graminearum* e *Fusarium moniliforme* dentre outros fungos e outro isolado de milho, com apenas 4 kDa, exibiu ação supressora na germinação de esporos e alongação de hifas de *F. moniliforme*, *F. graminearum* e também contra várias bactérias respectivamente. Outro peptídeo denominado lunatusima com apenas 7 kDa foi isolado de *Phaseolus lunatus* atuou contra *F. oxysporium* e outros fungos ou bactérias apresentando um amplo espectro de ação contra microrganismos (Wong e Ng, 2005b).

Quitinases também estão representadas como agentes antimicrobianos. Duas quitinases foram identificadas, uma em *Delandia umbellata*, denominada delandina com ação contra *F. oxysporium* (Ye e Ng, 2002b) e outra isolada de *Phaseolus Mungo* apresentou ação contra *Fusarium solani* e *F. oxysporium* (Ye e Ng, 2005).

Peptídeos além de apresentarem ação antifúngica, também podem apresentar ação antibacteriana, como: dois peptídeos isolados de *Vigna sesquipedalis* cv. e *P. lunatus* que tem ação antifúngica e apresentaram ação contra as bactérias *E. coli*, *Bacillus megaterium* (Wong e Ng, 2005a), *B. megaterium*, *Bacillus subtilis* (Wong e Ng, 2005b). Outro peptídeo sintético rico em histidina apresentou ação contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas que foram a *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* e *S. aureus*, tal ação está relacionada às condições de acidez (Kacprzyk *et al.*, 2007).

Lectinas também têm sido utilizadas como agente antimicrobiano, devido à oferta de lectinas comerciais e a grande purificação e isolamento destas proteínas em laboratórios de pesquisas. Algumas lectinas como a de *Anguilla japonica* (AJL-1) apresentou atividade aglutinante frente à bactéria patogênica *Streptococcus difficile* (Tasumi *et al.*, 2004). Outra do invertebrado marinho *Holothuria scabra*, mostrou amplo espectro e forte atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Gowda *et al.*, 2008). Uma manose-dependente isolada do soro de peixe (Salmão) do atlântico teve efeito antibacteriano contra a bactéria Gram-negativa patógena, *Aeromonas salmonicida* através de associação com macrófagos (Ottinger *et al.*, 1999), outra lectina de peixe (*Trichogaster trichopterus*) associada a macrófagos, também apresentou ação antibacteriana frente à *Aeromonas hydrophila* (Fock *et al.*, 2001). Lectinas parcialmente purificadas a partir de sete plantas medicinais do sul da África foram avaliadas através do método de aglutinação apresentando efeito antibacteriano

frente às bactérias *S. aureus* e *B. subtilis*, apresentando agregação das células das mesmas (Gaidamashivilli e Staden, 2002). A lectina de sementes de *Aracauria angustifolia* foi ativa contra as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Saint-Gadelha *et al.*, 2006). Duas lectinas Tipo C, purificadas de ovos de galinha e ganso, foram bactericidas para *B. subtilis*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* (Wellman-Labadie *et al.*, 2008).

Atividade antifúngica também foi observada para as lectinas. Uma isolada de sementes de *Castanea mollisma* (castamollin) teve ação frente aos fungos *Botrytis cinerea*, *Mycosphaella machidicola*, *Physalospora piricola* (Wang e Ng, 2003); bem como a lectina de *Talisia esculenta* (TEL) a qual inibiu o crescimento dos fungos *F. oxysporium*, *Colletotrichum lindemuthianum* e *Saccharomyces cerevisiae* através da interação com as estruturas dos fungos (Freire *et al.*, 2002). Duas lectinas isoladas de sementes de *Pisum sativum* (Sitohy *et al.*, 2007) e de *Astragalus mongholicus* (Yan *et al.*, 2005) mostraram ser inibidoras do crescimento de *F. oxysporium*; outra, um dímero com 67 kDa isolada de *Phaseolus vulgaris*, possui ação moderada contra *F. oxysporium* e *Rhizoctonia solani* (Ye *et al.*, 2001). Outro exemplo são duas lectinas ligadoras de quitina, isoladas a partir de sementes de *Artocarpus heterophyllus* e de *Artocarpus altilis*, a jaca e o fruta-pão respectivamente, que inibiram o crescimento de *F. moniliforme* e *S. cerevisiae* (Trindade *et al.*, 2006) e a aglutinina do cotilédone de *Luetzelburgia auriculata* que inibiu o crescimento dos fungos *C. lindemuthianum*, *F. solani* e *A. niger* (Melo *et al.*, 2005).

1. 6. Substâncias naturais com ação inseticida

Inseticida é uma substância que seja letal, repelente, deterrente ou inibidora para os insetos (Addor, 1994). É utilizado para controlar populações de espécies-praga que atacam plantações, construções e vetores que transmitem agentes etiológicos de doenças pouco ou mesmo graves, que podem inclusive levar a morte (Napoleão, 2008).

A partir da segunda guerra mundial substâncias inorgânicas sintéticas foram utilizadas em grande escala para controlar os insetos e em seguida compostos orgânicos, principalmente inseticidas clorados e organofosforados passaram a ser sintetizados, muitas vezes a partir de produtos de algumas plantas, como, os análogos de piretróides. No entanto, o uso desses compostos ganhou diversas restrições, devido aos efeitos

maléficos causados por eles ao meio ambiente e a saúde dos humanos. Dessa forma, a busca por novos compostos de origem natural aumentou, mostrando-se como nova alternativa ecológica. As variedades de compostos produzidos pelas plantas envolvidos no mecanismo de defesa contra herbívoros e patógenos têm sido intensamente exploradas na busca por produtos naturais para o controle de pragas e na manutenção da sanidade das plantas.

Dentre estes compostos naturais, temos as lectinas, que são proteínas capazes de se ligar a carboidratos e/ou glicoconjugados de forma reversível e devido a estas características, vêm sendo aplicadas em várias áreas de pesquisa. As lectinas apresentam atividade antimicrobiana contra fitopatógenos e algumas são entomotóxicas. Muitas lectinas de plantas têm apresentado ação contra insetos de várias ordens, como Coleoptera (besouros), Lepidoptera (mariposas e borboletas), Homoptera (cigarras, pulgões e cochonilhas), Diptera (moscas e mosquitos), Isoptera (cupins) dentre outras (Machucka *et al.*, 2000; Macedo *et al.*, 2002; Leite *et al.*, 2005; Dutta *et al.*, 2005; Coelho *et al.*, 2007; Sá *et al.*, 2008a).

A ação inseticida das lectinas pode ser em diferentes estágios de vida dos insetos como no estágio larval (Fitches *et al.*, 2001; Leite *et al.*, 2005; Coelho *et al.*, 2007; Macedo *et al.*, 2007; Sá *et al.*, 2008b), de ninfa (Bandyopadhyay *et al.*, 2001), adulto (Sauvion *et al.* 2004) e na ovoposição (Sadeghi *et al.*, 2006).

A avaliação dos efeitos das lectinas nos insetos pode ser feita através de bioensaios, onde se coloca a lectina numa dieta artificial oferecida. Sua toxicidade parece depender tanto de uma resistência necessária contra proteínas assimiladoras e degradação proteolítica pelas enzimas digestivas dos insetos quanto de sua ligação as estruturas da membrana peritrófica e/ou estrutura quitinosa na região do intestino médio (Coelho *et al.*, 2007; Macedo *et al.*, 2007).

Ainda não se conhece bem o mecanismo de ação das lectinas contra os insetos, mas é provável que elas estejam envolvidas na ligação as glicoproteínas das células epiteliais do intestino médio (Sauvion *et al.*, 2004), pode também estar relacionado às enzimas proteolíticas e proteínas assimiladora nas quais as lectinas podem interferir com suas funções, inibindo a digestão e absorção e causando a privação nutricional (Leite *et al.*, 2005; Coelho *et al.*, 2007), pode cruzar o epitélio do intestino médio e passar para dentro do sistema circulatório do inseto interferindo com as lectinas endógenas envolvidas na autodefesa, presentes na hemolinfa (Fitches *et al.*, 2001),

podem, ainda ser internalizadas por vesículas endocitóticas de células epiteliais e bloquear a localização nuclear que é seqüência-dependente da importação nuclear de proteínas inibindo a proliferação celular (Yu *et al.*, 1999), estes são alguns possíveis mecanismos de ação das lectinas contra os insetos.

As lectinas N-acetil-D-glicosamina específicas ou com habilidade de se ligar à quitina parecem possuir propriedades inseticidas, como a lectina do cerne de *Myracrodruon urundeuva* que é N-acetilglicosamina específica e ligante a quitina teve um efeito sobre *Nasutitermes corniger* apresentando uma LC₅₀ de 0,238 mg/ml para operários e 0,199 mg/ml para soldados (Sá *et al.*, 2008a). Esta lectina também apresentou efeito sobre as larvas (L4) do mosquito *Aedes aegypti* (Sá *et al.*, 2008b). A lectina isolada de sementes de *Talisia esculenta* (TEL) que é ligante de quitina, mas é inibida por manose e glicose, promoveu cerca de 90 % de mortalidade de larvas de *Callosobruchus maculatus* e *Zabrotes subfasciatus* com LD₅₀ e ED₅₀ (diminuição do peso) de cerca de 1% (p/p) para os dois insetos (Macedo *et al.*, 2002).

Outras lectinas de origem vegetal com diferentes especificidades para açúcares também mostraram habilidade como moléculas inseticidas sugerindo que esta propriedade não é exclusiva para as lectinas que são específicas para N-Acetil-D-glicosamina (GLcNAc). A XLC, uma lectina do cogumelo *Xerocomus chrysenteron* que apresenta afinidade para galactose e lactose e menor para N-acetil-D-glicosamina teve efeito sobre *Drosophila melanogaster* apresentando uma LC₅₀ de 0,4 mg/ml (Trigueiros *et al.*, 2003). A lectina de alga vermelha *Gracilaria ornata* (GOL) inibida por glicoproteínas, causou uma redução significativa na sobrevivência de larvas de *C. maculatus* em torno de 65% (p/p) em relação ao grupo controle, utilizando um bioensaio onde os insetos receberam uma dieta de semente artificial (Leite *et al.*, 2005). Outra lectina específica para galactose, a BmoLL, lectina de folhas de *Bauhinia monandra*, apresentou cerca de 50% de mortalidade de *C. maculatus* e *Z. subfasciatus* quando incorporada na dieta artificial a um nível de 0,3 % e 0,5% (p/p) respectivamente e a 1% não diminuiu significativamente a sobrevivência das larvas de *Anagasta kuchiniella*, mas produziu diminuição de 40 % no peso (Macedo *et al.*, 2007).

1.7 Cupins

Os cupins são insetos eusociais, conhecidos por nós, de hábitos subterrâneos, pertencentes à Ordem Isoptera. Existem cerca de 2500 espécies e vivem em colônias altamente organizadas, onde o princípio básico é a sobrevivência da colônia e não do indivíduo. São conhecidos pelo hábito de se alimentar preferencialmente de celulose, matéria orgânica morta ou em decomposição, mas alimentam-se também de vegetais vivos. Os ninhos podem ser dos tipos mais diversos, de acordo com as espécies; eles podem ser arborícolas (construindo os ninhos em troncos de árvores ou madeira podre, com comunicação com o solo por galerias superficiais), xilófagos (vivem isolados do solo, em troncos de árvores ou madeira tratadas) ou humívoros (constroem seus ninhos no chão). Dentro dos ninhos se organizam em castas, onde cada uma das castas é responsável por uma função específica, para que ocorra a manutenção e sobrevivência do ninho, então existem os indivíduos alados e reprodutores (temporários), indivíduos ápteros sexuais férteis (para substituir o rei e a rainha) ou estéreis, os operários (que constroem o ninho e são responsáveis pela alimentação e pelos filhotes) e os soldados (defensores da colônia) ambos podendo ser macho ou fêmea. Os operários que são responsáveis pela alimentação, a realizam através da troca do alimento pela boca, este é chamado de estomodéico, um líquido claro, utilizado pelos operários para alimentar os soldados e reprodutores.

Dois grupos de cupins que são conhecidos por causarem grandes danos econômicos ao homem são os cupins de madeira seca e os cupins subterrâneos. Os cupins de madeira seca são os que fazem o ninho na própria madeira, ou seja ela serve de abrigo e de alimento ao mesmo tempo e os subterrâneos fazem o ninho no solo, geralmente próximo de umidade ou alimento, pois eles saem para buscar alimento.

No Brasil, existem representantes de quatro famílias de cupins, que são, Kalotermitidae considerados primitivos, não constroem nem possuem operárias, só atacam e alimentam-se de madeira seca; Rhinotermitidae são na maioria subterrâneos, atacam plantas vivas e mortas e alguns são pragas importantes; Serritermitidae até recentemente só continha uma espécie, a *Serritermes serrifer*, que ocorre só no Brasil, novas evidências indicam que *Glossotermes oculatus* espécie da Amazônia também é desta família e Termitidae é bastante diversificada, e compreende cerca de 85% das espécies de cupins conhecidas do Brasil. Alguns são comedores de madeira, de folhas,

de húmus, e também cultivadores de fungo (que não ocorrem no Brasil), e muitos constroem ninhos grandes e complexos.

A família Termitidae é mundialmente a mais rica em espécies somando cerca de 70-75% de todas as espécies de térmitas catalogados, encontrados em madeira, grama ou solo (Inward *et al.* 2007), nesta família destacam-se quatro gêneros, por representarem as principais pragas de mudas no campo, são eles *Conitermes*, *Syntermes*, *Anoplotermes* e *Nasutitermes*. Suas espécies são em geral humívoras, mas no entanto, os *Nasutitermes* podem nidificar em raízes de árvores, sobre troncos, sob o solo e sobre o solo, formando montículos. Os *Nasutitermes* destacam-se também entre os gêneros de interesse econômico para o homem por causarem grandes prejuízos na área urbana e Peridomiciliar.

A espécie *Nasutitermes corniger* é neotropical, formadora de colônias monogênicas ou poligênicas, com uma ou várias rainhas, respectivamente (Adams *et al.*, 2007) e bem adaptada na zona urbana. Os térmitas são capazes de hidrolisar celulose e hemicelulose utilizando três tipos diferentes de celulasas, que podem ser de origem endógena ou simbiótica, as endoglucanases, as exoglucanases e as β -glicosidases (Breznak e Brune, 1994).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Purificar, caracterizar estruturalmente a lectina obtida da vagem sem as sementes de *C. ferrea* (*Caesalpinia ferrea* Pod Lectin, CfePL) e avaliar as atividades antimicrobiana e inseticida.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a presença de atividade hemaglutinante em extratos da vagem sem as sementes de *C. ferrea* para detecção de lectina (s);
- Purificar a proteína com maior atividade hemaglutinante, lectina da vagem sem as sementes de *C. ferrea* (CfePL), utilizando processos cromatográficos convencionais e de alta resolução utilizando os sistemas FPLC e HPLC;
- Caracterizar a CfePL utilizando métodos eletroforéticos;
- Determinar em CfePL a especificidade para carboidratos, para eritrócitos, estimulação da AH em presença de íons, estabilidade térmica e comportamento frente à variação de pH e enzimas proteolíticas;
- Avaliar a atividade antimicrobiana da CfePL;
- Determinar a concentração mínima inibitória (CMI), mínima bactericida (CMB) e mínima fungicida (CMF) da CfePL;
- Avaliar a ação de CfePL na respiração celular e mitocondrial de *Candida albicans*.
- Avaliar potencial atividade repelente/inseticida sobre cupins da espécie *Nasutitermes corniger*;

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- ADDOR, R. W. Insecticides. In: GODFERY, C. R. A. (ed.). **Agrochemicals from natural products**. New York: Marcel Dekker Inc., 1994. p. 1-62.
- ALPUCHE, J.; PEREYRA, A.; AGUNDIS, C.; PASCUAL, C.; SLOMIANNY, M-C; VÁQUEZ, L.; ZETENO, E. Purification and characterization of a lectin from shrimp *Litopenaeus setiferus* (Crustacea decapoda) hemolymph. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1724, p. 86-93, 2005.
- ALZUGARAY, D. **Plantas que curam**. São Paulo: Hemus Press, 1984
- ANDRADE, C.A.S.; CORREIA, M.T.S.; COELHO, L.C.B.B.; NASCIMENTO, S. C.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, p. 435-45, 2004.
- AUDETTE, G. F.; VANDONSELOAR, M.; DELBAERE, L. TL J. The 2.2 Å resolution structure of the O (H) blood-specific lectin I from *Ulex europaeus*. **Journal of Molecular Biology**, v. 304, p. 423 – 433, 2000.
- BABAL, P.; RUSSEL, L. C. Sialic acid-specific lectin-mediated adhesion of *Trichomonas foetus* and *Trichomonas mobilensis*. **The Journal of Parasitology**, v. 85, p.33 – 40, 1999.
- BACCHI, E. M.; SERTIE, J. A. A. Anti-ulcer action of *Styrax camporum* and *Caesalpinia ferrea* in rats. **Planta Médica**, 60, p. 118-120, 1994.
- BACCHI, E. M.; SERTIE, J.A. A. Anti-ulcer action and toxicity of *Styrax camporum* and *caesalpinia ferrea*. **Planta Médica** 60, 118 - 120, 1995.
- BAKALOVA, R.; OHBA, H. Purification of normal lymphocytes from leukemic T-cells by lectin-affinity adsorbents- correlation with lectin-cell binding. **Cancer Letters**, v. 192, 59 -65, 2003.
- BALBACH, A. **As plantas que curam**. São Paulo: Três, 1972, p. 302-303.
- BANDYOPADHAYAY, S.; ROY, A.; DAS, S. Binding of garlic (*Allium sativum*) leaf lectin to the gut receptors of homopteran pests is correlated to its insecticidal activity. **Plant Science**, v. 161, p. 1025-33, 2001.

- BANERJEE, S.; CHAKI, S.; BHOWAL, J.; CHATTERJEE, B. P. Mucin binding mitogenic from freshwater Indian gastropod *Belamya bengalensis*: purification and molecular characterization. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 421, 125 - 134, 2004.
- BARRE, A.; PEUMANS, W.J.; ROSSIGNOL, M.; BORDERIES, G.; CULERRIER, R.; VAN DAMME, E. J. M.; ROUGÉ, P. Artocarpin is a polyspecific jacalin-related lectin with a monosaccharide preference for mannose. **Biochimie**, v. 86, p. 685-91, 2004
- BARONDES, S. H. bifunctional properties of lectins: lectins redefined. **Trends in Biochemical Science**, 13: 480 – 482, 1988.
- BATTERBURY, M.; TEBBS, C. A.; RHODES, J. M.; GRIERSON, I. *Agaricus bisporus* (Edible Mushrooms) lectin inhibits ocular fibroblast proliferation and collagen lattice contraction. **Exp. Eye Res.** 74, 361 - 370, 2002.
- BAZIL, V.; ENTLICHER, G. Complexity of lectins from the hard roe of perch (*Perca fluviatilis* L.). **The international Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 31, p. 431-42, 1999.
- BERTRAND, O.; COCHET, S.; CARTRON, J-P. Expanded bed chromatography for one-step purification of mannose binding lectin from tulip bulbs using mannose immobilized on DEAE Streamline. **Journal of Chromatography A**, v. 822, p. 19-28, 1998.
- BEZERRA, R. S.; SANTOS, J.F.; PAIVA, P. M. G.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B.; VIEIRA, V. L. A; CARVALHO JR, L. B. Partial purification and characterization of a thermostable trypsin from pyloric caeca of tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Journal of Food Biochemistry**, v. 25, p. 199 - 210, 2001.
- BIES, C.; LHER, C.M.; WOODLEY, J.F. Lectin-mediated drug targeting: history and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 425 – 435, 2004.
- BOUWMAN, L. H.; ROEP, B. O.; ROOS, A. Mannose-Binding lectin: Clinical implications for infection, transplantation and autoimmunity. **Human Immunology**, v. 67, p. 247-56, 2006
- BOYD, W. C.; SHAPLEIGH, E. Specific precipitating activity of plants agglutinins (lectins). **Science, Washington**, v. 119, p. 419, 1954.
- BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. 2. ed. São Paulo: Três, 1976. p. 45-56.

- BRAGANÇA, L. A. R. **Plantas Medicinais Antidiabéticas**. Niterói: EDUFF Press, 1996. p. 172.
- BREZNANAK, J. A.; BRUNE, A. Role of microorganisms in the digestion of lignocelluloses by termites. **Annual Review of Entomology**, v. 39, p. 453-87, 1994.
- CANDY, L.; VAN DAMME, E. J. M.; PEUMANS, W. J.; MENU-BOUAOUICHE, L.; ERARD, M; ROUGÉ, P. Structural and functional characterization of the GalNac/Gal-specific lectin from the phytopathogenic ascomycete *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 308, p. 396-402, 2003.
- CARLINI, C. R.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon**, v. 40, p. 1515-39, 2002.
- CARVALHO, J. C. T.; TEXEIRA, J. R. M.; SOUZA, P. J. C.; BASTOS, J. K.; DOS SANTOS FILHO, D.; SARTI, S.J. Preliminary studies of analgasic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. **Journal of Ethnopharmacology**, 53, 175 -178, 1996.
- CAVADA, B. S.; SANTOS, C. F.; GRANGEIRO, T. B.; NUNES, E. P.; SALES, P.V. P.; RAMOS, R. L.; DE SOUZA, F. A M.; CRISOSTOMO, C. V.; CALVETE, J. J. Purification and characterization of lectin from seeds of *Vatairea macrocarpa* Duke. **Phytochemistry**, v. 49, n. 3, p.675 - 680, 1998.
- CHEN, C. ROWELEY, A. F.; NEWTON, R. P.; RATCLIFFE, N. A. Identification, purification and properties of a β -1,3-glucan-specific lectin from the serum of the cockroach, *Blaberus discoidalis* wich is implicated in immune defence reactions. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 122, p.309-19, 1999.
- CHU, K. T.; NG, T. B. Smilaxin, a novel protein with immunostimulatory, antiproliferative, and HIV-1-reverse transcriptase inhibitory activities from fresh *Smilax glabra* rhizomes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 340, p. 118-24, 2006.
- CHUNG, J.J.; RATNAPALA, L.A.; COOKE, I.M.; YANAYIHARA, A. A. Partial purification and characterization of a hemolysin (CAH1) from Hawaiian box jellyfish (*Carybdea alata*) venom. **Toxicon** 39, 981-990, 2001.

- CIOPRAGA, J.; GOZIA, O.; TUDOR, R.; BREZUICA, L.; DOYLE, R. J. *Fusarium* sp. growth inhibition by wheat germ agglutinin. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subject**, v. 1428, p.424-32, 1999.
- CITORES, L.; BENITO, F. M.; IGLESIAS, R.; FERRERAS, J. M.; ARGÜESO, P.; JIMÉMEZ, P.; TESTERA, A.; CAMAFEITA, E.; MÉNDEZ, E.; GIRBÉS, T. Characterization of a new non-toxic two-chain ribosome-inactivating protein and a structurally-related lectin from rhizomes of dwarf Elder (*Sambucus ebulus* L.). **Cellular and Molecular Biology**, v. 43, p. 485-99, 1997.
- COELHO, M. B.; MARONGONI, S.; MACEDO, M. L. R. Insecticidal action of *Annona coriacea* lectin against the flour moth *Anagasta kuehniella* and the rice moth *Corcyra cephalonica* (Lepidoptera: Pyralidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 146, p. 406-14, 2007.
- COELHO, L.C.B.B.; DA 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, 295 - 300, 2000.
- CORREIA, M.T.S.; COELHO, L. C. B. B. Purification of glucose/ mannose specific lectin, Isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart (amaratu bean). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 55, p. 261 - 273, 1995.
- DATTA, K.; USHA, R.; DUTTA, S. K.; SINGH, M. A comparative study of the winged bean protease inhibitors and their interaction with proteases. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 39, p. 949 - 959, 2001.
- DUNPHY, J. L.; BARCHAM, G. J.; BISCHOF, R. J.; YOUNG, A. R.; NASH, A.; MEEUSEN, E. N. T. Isolation and characterization of a novel eosinophil-specific galectin released into the lungs in response to allergen challenge. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 14916-24, 2002.
- DUTTA, I.; MAJUNDER, P.; SAHA, P.; RAY, K.; DAS, S. Constitutive and phloem specific expression of *Allium sativum* leaf agglutinin (ASAL) to engineer aphid (*Lipaphis erysimi*) resistance in transgenic Indian mustard (*Brassica juncea*). **Plant Science**, v. 169, p. 996-1007, 2005.
- DUVICK, J. P.; ROOD, T.; RAO, A. G.; MARSHAK, D. R. Purification and characterization of a novel antimicrobial peptide from maize (*Zea mays* L.) kernels. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, p. 18814-20, 1992.

FETON-NAVARRO, B.; ARREGUÍN-L, B.; GARCÁ-HERNÁNDEZ, E.; HEIMER, E. AGUILAR, M. B.; RODRÍGUEZ-A, C.; ARREGUÍN-ESPINOSA, R. Purification and structural characterization of lectins from the cnidarian *Bunodeopsis antillienis*. **Toxicon**, v. 43, p. 525 - 532, 2003.

FITCHES, E.; WOODHOUSE, S. D.; EDWARDS, J. P.; GATEHOUSE, J. A. In vitro and in vivo binding of snowdrop (*Galanthus nivalis* agglutinin; GNA) and jackbean (*Canavalia ensiformis*; Con A) lectins within tomato moth (*Laconobia oleracea*) larvae; mechanisms of insecticidal action. **Journal of Insect Physiology**, v. 47, p. 777-87, 2001

FITCHES, E.; EDWARDS, M. G.; MEE, C.; GRISHIN, E.; GATEHOUSE, A. M. R.; EDWARDS, J. P.; GATEHOUSE, J. A. Fusion proteins containing insect-specific toxins as pest control agents: snowdrop lectin delivers fused insecticidal spider venom toxin to insect haemolymph following oral ingestion. **Journal of Insect Physiology**, v. 50, p. 61-70, 2004

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

FOLLMER, C. Insights into the role and structure of ureases. **Phytochemistry**, v. 69, p. 18-28, 2008.

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

GABOR, F.; KLAUSEGGER, V.; WIRTH, M. Antibacterial and molluscicidal activities of the essential oil of *Crithanthemum viscidifolium*. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 221, p. 35 - 47, 2001.

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

- GARCIA-PINO, A.; BUTS,L.; WYNS,L.; LORIS,R. Interplay between metal binding and *cis/trans* isomerization in legume lectins: structural and thermodynamic study of *P. angolensis* lectin. **Journal of Molecular Biology**, v. 361,p. 153-67, 2006.
- GERLACH, D.; WAGNER, M.; SCHLOTT, B.; ZÄHRINGER, U. Chemical and physicochemical characterization of the sialic acid-specific lectin from *Cepaea hortensis*. **FEM Microbiology Letters**, 10579, 61 - 68, 2002.
- GOLDSTEIN, I. J. *et al.* What should be called a lectin? **Nature**, v. 255, p. 66-69, 1980.
- GOLDSTEIN, I. J.; WINTER, H. C.; AURANDT, J.; CONFER, L.; ADAMSON,J. T.; HAKANSSON.K.; REMMER, H. A new α -galactosyl-binding protein from the mushroom *Lyophyllum decastes*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. V. 467, p. 268-74, 2007.
- GONZALEZ, F. G.; BARROS, S. B. M.; BACCHI, E. M. Atividade antioxidante e perfil fitoquímico de *Caesalpinia ferrea* Mart. In: IX Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia da FCF-USP, 2004, São Paulo. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, v. 40., p. 79, 2004.
- GOWDA, N. M.; GOSWAMI, U.; KHAN, M. I. T-antigen binding lectin with antibacterial activity from marine invertebrate, sea cucumber (*Holothuria scabra*): Possible involvement in differential recognition of bacteria. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 99 (2), p.141-5, 2008.
- HASHIMOTO, G. (ed.). **Illustrated Cyclopedia of Brazilian Medicinal Plants**. Aboc-Sha: Kamakura, p. 646, 1996.
- HEU, M. S.; KIM, H. R.; PYEUN, J. H. Comparison of trypsin and chymotrypsin from the viscera of anchovy, *Engraulis japonica*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 112 (B), n. 3, p. 557 - 567, 1995.
- HUANG, X.; XIE, W-J; GONG, Z-Z. Characteristics and antifungal activity of chitin binding protein from *Ginkgo biloba*. **FEBS Letters**, v. 478, p. 123-6, 2000.
- 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.

- INWARD, D. J.G.; VOGLER, A. P.; EGGLETON, P. A. Comprehensive phylogenetic analysis of termites (Isoptera) illuminates key aspects of their evolutionary biology. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 44, p. 953-67, 2007.
- JAWETZ, E.; MELNICK, J. L.; ALDELBERG, E. A.; BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; ORNSTON L. N. **Microbiologia Médica**, 18^a ed., Ed. Guanabara – Koogan, 1991.
- JIANG, J-F; HAN, Y; XING,L-J; XU, Y-Y; XU, Z-H; CHONG, K. Cloning and expression of a novel cDNA encoding a mannose-specific jacalin-related lectin from *Oryza sativa*. **Toxicon**, v.47, p.133-9, 2006.
- JIMBO, M.; YANOHARA, T.; KOIKE, K.; SAKAI, R.; MURAMOTO, K.; KAMIYA, H. The D-galactose-binding lectin of the octocoral *Sinularia lochmodes*: characterization and possible relationship to the symbiotic dinoflagellates. **Comparative Biochemistry and Physiology**. V. 125 (B), p. 227 - 236, 2000.
- JUNG, E. C.; KIM, K. D.; BAE,C. H.; KIM, D. H.; KIM, H. H. A mushroom lectin from ascomycete *Cordyceps militaris*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1770, p. 833-8, 2007.
- KACPRZYK, L; RYDENGARD, V; MÖRGELIN, M; DAVOUDI, M; PASUPULETI, M; MALMSTEN, M; SCHMIDTCHEN, A. Antimicrobial activity of histidine-rich peptides is dependent on acidic conditions. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes**, v. 1768, p. 2667-80, 2007.
- KANAZAWA, N. Dendritic cell immunoreceptors for pattern-recognition and signaling on antigen-presenting cells. **Journal of Dermatological Science**, v. 45, p. 77-86, 2007
- KANAZAWA, N; TASHIRO, K; MIYACHI, Y. Signaling and immune regulatory role of the dendritic cell immunoreceptor (DCIR) family lectins:DCIR, DCAR, dectin-2 and BDCA-2. **Immunobiology**, v. 209, p.179-90, 2004.
- KARASAKI, Y. TSUKAMOTO; S. MIZUSAKI; K. SUGIURA; T. GOTOH, S. A garlic lectin exerted an antitumor activity and induced apoptosis in human tumor cells. **Food Research international**, v..34, p. 7 - 13, 2001.
- KAUR, M; SINGH, K; RUP, P. J; SAXENA, A. K; KHAN, R. H; ASHRAF, M. T;KAMBOJ, S. S; SINGH, J. A tuber lectin from *Arisaema helleborifolium* Schott with anti-insect activity against melon fruit fly, *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) and anti-cancer effect on human cancer cell lines. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 445, p. 156-65, 2006.

- KAVALALI, G.; TUNCEL, H.; GOKSEL, S.; HATEMI, H. H. Hypoglycemic activity of *Urtica piluliferain* streptozotocin-diabetic rats. **Journal Ethnopharmacology**, v. 84, p.241-245, 2003.
- KAWAGISHI, H.; TAKAGI, J.; TAIRA, T. ; MURATA, T.; USUI, T. Purification and characterization of a lectin from the mushroom *Mycoleptodonoides aitchisonii*. **Phytochemistry**, v. 56, p. 53 - 58, 2001.
- KAWAGISHI, H.; NOMURA, A.; MIZUNO, T. KIMURA, A; CHIBA,S. Isolation and characterization of a lectin from *Grifola frondosa* fruiting bodies. N **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1034, p. 247-52, 1990.
- KENNEDY, J. F.; PAIVA, P. M. G.; CORREIA, M. T. S.; CAVALCANTI, M. S. M.; COELHO, L. C. B. B. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydr.Polym.**, v. 26 : 219 – 30, 1995.
- KONOZY, E. H.; BERNARDES, E. S.; ROSA, C.; FACA, V.; GREENE, L. J.; WARD, R. J. Isolation, purification, and physicochemical characterization of a D-galactose-binding lectin from seeds of *Erythrina speciosa*, **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 410, p. 222-29, 2003
- KUIPERS, S; AERTS, P. C.; DIJK, H. V. Differential microorganism-induced mannose-binding lectin activation. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 36, p. 33-39, 2003.
- KUSUI, K.; YAMAMOTO, K.; KONAMI, Y.; OSAWA, T. cDNA cloning and expression of *Bauhinia purpurea* lectin. **Journal of Biochemistry** **109**, 899-903, 1991.
- LACAZ, C. S.; PORTO, E.; HEINS-VACCARI, E. M.; DE MELO, N. T. **Guia para identificação de fungos, actinomicetos , algas de interesse médico**, Ed. Savier, FAPESP, 1998.
- LEE, D. G.; PARK, Y.; KIM, H. N.; KIM, H. K.; KIM, P. Il.; CHOI, B. H.; HAHM, K-S. Antifungal mechanism of an antimicrobial peptide, HP (2-20), derived from N-terminus of *Helicobacter pylori* ribosomal protein L1 against *Candida albicans*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 291, p. 1006 - 1013, 2002.
- LEITE, Y. F. M. M.;SILVA, L. M. C. M.; AMORIM, R. C. N.; FREIRE, E. A; JORGE,D. M.M.; GRANGEIRO, T. B.; BENEVIDES, N. M. B. Purification of a lectin the marine red alga *Gracilaria ornata* and its effect on the development of a the

- cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1724, p. 137-45, 2005.
- LERIVRAY, H.; CHESNEL, A.; JEGO, P. Identification and localization of lectin in the oviduct of various urodele amphibians. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 81 B, p. 385-91, 1985.
- LEWIS, G. P. **Legumes of Bahia**. Royal Botanic Garden, Kew, Inglaterra, 1987. p. 369.
- LI, Y. R; LIU, Q. R; WANG, H. X; NG, T. B. A novel lectin with potent antitumor, mitogenic and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from the edible mushroom *Pleurotus citrinopileatus*. **Biochimica et Biophysica acta (BBA)- General Subjects**, v. 1780, p. 51-7, 2008.
- LIMA, E. C.; CURY, A. E.; FISCHMAN, O. G.; GIESHRECHT, A. M.; PAULO, O.G. Atividade antifungica de extratos de plantas medicinais sobre *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton* isolados de pacientes com dermatofitoses. **13th Brazilian Symposium in Medicinal Plants. Ceara, Brazil**, 1994.
- LIMA, V. L. M., CORREIA, M. T. S., CECHINEL, Y. M. N., SAMPAIO, C. A., OWEN, J. S. and COELHO, L. C. B. B. Immobilized *Cratylia mollis* lectin as potential matrix to isolate plasma glycoproteins Including lecithin cholesterol acyltransferase. **Carbohydrate Polymers**. v. 31, n. 892, 27 - 32, 1997.
- LIU, C; ZHAO, X; XU, X-C; LI, L-R; LIU, Y-H; ZHONG, S-D; BAO, J-K. Hemagglutinating activity and conformation of a lactose-binding lectin from mushroom *Agrocybe cylindracea*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 42, p.138-44, 2008.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 4. ed., v. 1. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2002, p. 162.
- 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.
- MACHUKA, J. S.; OKEOLA, O.G.; ELS, J. M. V. D.; CHRISPEELS, M. J.; LEUVEN, F. V.; PEUMANS, W. J. Isolation and partial characterization of galactose-specific lectins from African yam beans, *Sphenostyles stenocarpa* Harms. **Phytochemistry**, v. 51, p. 721 -728, 1999.
- MACHUKA, J. S.; OKEOLA, O.G.; CHRISPEELS, M. J.; JACKAI, L. E. N. The African yam bean seed lectin affects the development of the cowpea weevil but does not affect the development of larvae of the legume pod borer. **Phytochemistry**, v. 53, p.667-74, 2000.
- MACIEL, E. V. M; ARAÚJO-FILHO, V. S.; NAKAZAWA, M.; GOMES, Y. M.; COELHO, L. C. B. B.; CORREIA, M. T. S. Mitogenic activity of *Cratilya mollis* lectin on human lymphocytes. *Biologicals*, v.32, p. 57-60, 2004.
- MARTINEZ, M; CORDOBA, F. Isolation of fully active and stable corn coleoptiles lectins. **Preparative biochemistry and Biotechnology**, v. 30, p. 199-208, 2000.
- MCCAFFERTY, H. R. K; MOORE, P. H. ZHU, Y. J. Papaya transformed with the *Galanthus nivalis* GNA gene produces a biologically active lectin with spider mite control activity. **Plant Science**, *In press*, 2008.
- MELO, V. M. M; VASCONCELOS, I. M. GOMES, V. M; DA CUNHA, M; SOARES, A A; OLIVEIRA, J. T. A. A Cotyledonary agglutinin from *Luetzelburgia auriculata* inhibits the fungal growth of *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium solani* and *Aspergillus Niger* and glucose-stimulated acidification of the incubation medium by *saccharomyces cerevisiae* cells. **Plant Science**, v. 169, p. 629-39, 2005.
- MENEZES, I. A. C.; MOREIRA, I. J. A.; CARVALHO, A. A.; ANTONIOLLI, A. R.; SANTOS, M. R. V. Cardiovascular effects of the aqueous extract from *Caesalpinia ferrea*: Involvement of ATP-sensitive potassium channels. **Vascular Pharmacology**, 47, p. 41-47, 2007.
- MILANI, G; JARMUSZKIEWICZ, W; SLUSE-GOFFART, C M; SCHREIBER A, Z; VERCESI, A E; SLUSE, F E. Respiratory chain network in mitochondria of *Candida parapsilosis*: ADP/O appraisal of the multiple electron pathways. **FEBS Letters**, 508, p. 231-35, 2001.

- MISHRA, V; SHARMA, R S; YADAV, S; BABU, C R; SINGH, T P. Purification and characterization of four isoforms of Himalayan mistletoe ribosome-inactivating protein from *Viscum albidum* having unique sugar affinity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 243, p. 288-301, 2004.
- MO, H.; VAN DAMME, E. J. M. ; PEUMANS, W. J. ; GOLDSTEIN, I. J. Purification and characterization of a monnose-specific lectin from shallot (*Allium ascalonicum*) bulbs. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 306, n. 2, p. 431-438, 1993.
- MO, H; WINTER, H C; GOLDSTEIN, I J. Purification and characterization of a Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4Glc/Glc/NAc-specific lectin from the fruiting body of the polypore mushroom *Polyporus squamosus*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 10623-9, 2000.
- MOREIRA, R. A; CASTELO-BRANCO, C. C.; MONTEIRO, A C. O; TVARES, R. O; BELTRAMINI, L M. Isolation and partial characterization of a lectin from *Artocarpus incise* L. Seeds. **Phytochemistry**, v.47, p. 1183-8, 1998.
- MOURA, R. M. et al. CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*: Isolation, characterization and its effects on pathogenic bacteria and *Leishmania* promastigotes. **Comparative Biochemistry and Physiology A**, v. 145, n. 4, p. 517-523, 2006.
- MURAYAMA, K; TAKA, H; KAGA, N; FUJIMURA, T; MINEKI, R; SHINDO, N; MORITA, M; HOSONO, M; NITTA, K. The structure of *Slurusa asotus* (Catfish) Roe lectin (SAL): identification of a Noncovalent Trimer by Mass Spectrometry and Analytical Ultracentrifugation. **Analytical Biochemistry**, v. 247, p. 319-26, 1997.
- NAEEN, A.; KHAN, R. H.; VIKRAM, H. AKIF, M. Purification of *Cajanus cajan* root lectin and its interaction with rhizobial lipopolysaccharide as studied by different spectroscopic techniques. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 396, n 1, p., 99 -105, 2001.
- NAGAI, T; KAWABATA, S; SHISHIKURA, F; SUGITA, H. Purification, characterization, and amino acid sequence of a embryonic lectin in perivitelline fluid of the horseshoe crab. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 37673-8, 1999.
- NAKAMURA E. LS.; KUROSAKI, F.; ARISAWA, M.; MUKAINAKA, T.; TAKAYASU, J.; OKUDA M.; TOKUDA, H. NISHINO, H. PASTORE JR, F. Cancer chemopreventive effects of constituents of *Caesalpinia ferrea* and related compounds. **Cancer Letters**, v.177, p. 119 - 124, 2002a.

NAKAMURA E. L. S.; KUROSAKI, F.; ARISAWA, M.; MUKAINAKA, T.; TAKAYASU, J.; OKUDA M.; TOKUDA, H. NISHINO, H.; PASTORE JR, F. Cancer chemopreventive effects of a brasilian folk medicine, juca, on in vivo two-stage skin carcinogenesis, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, p. 135 - 137, 2002b.

NAPOLEÃO T. H. **Atividade inseticida da lectina do cerne de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. contra *Nasutitermes corniger* Motsch. (ISOPTERA, TERMITIDAE)**. Monografia do curso de Ciências Biológicas. Recife. Universidade Federal de Pernambuco, 2008.

NASCIMENTO, M. P. S. C. B.; OLIVEIRA, M. E.; MIURA, C. L. Q.; REIS, J. C. B.; NASCIMENTO, H. T. S.; LEITE, J. M. B.; LOPES, J. B.; RIBEIRO, V. Q. Potencial forrageiro do pau-ferro. In: **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, 41. Teresina: Embrapa, Outubro, 2002. 16 p.

NASCIMENTO, C. O; COSTA, R. M. P. B; ARAUJO, R. M. S; CHAVES, M. E. C.; COELHO, L. C. B. B; PAIVA, P. M. G; TEIXEIRA, J. A; CORREIA, M. T. S.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G. Optimized extraction of a lectin from *Crataeva tapia* using AOT in isooctane reversed micelles. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 779-82, 2008.

NGAI, P H K; NG, T B. A mushroom (*Ganoderma capense*) lectin with spectacular thermostability, potent mitogenic activity on splenocytes, and antiproliferative activity toward tumor cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 314, p. 988-93, 2004.

NG, K K S; DRICKAMER, K. WEIS, I. Structural analysis of monosaccharides recognition by rat liver mannose-binding protein. **Journal Biological Chemistry**, v. 271, p. 663 - 667, 1996.

NG, TB. Antifungal proteins and peptides of leguminous and non-leguminous origins. **Peptides**, v. 25, p. 1215-22, 2004.

NOMURA, K; ASHIDA,H; UEMURA, N; KUSHIBE, S; OZAKI, T; YOSHIDA, M. Purification and characterization of a mannose/glucose-specific lectin from *Castanea crenata*. **Phytochemistry**, v. 49, p. 667-73, 1998.

OHBA, H.; BAKALOVA, R.; MORIWAKI, S.; NAKAMURA, O. Fractionation of normal and leukemic T- cells by lectin affinity column chromatography. **Cancer Letters**, v.184, p. 207 - 214, 2002.

- OLIVEIRA, M. D. L.; ANDRADE, C. D. S; SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; COELHO, L. C. B. B; TEIXEIRA, J. A; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G.; CORREIA, M.T.S. Purification of a lectin from *Eugenia uniflora* L. seeds and its potential antibacterial activity. **Letters in Applied Microbiology**, v. 46, p. 371- 76, 2008.
- OLIVEIRA, J. T.A; MELO, V. M. M.; CAMARA, M. F. L; VASCONCELOS, I. M; BELTRAMINI, L. M.; MACHADO, O L. T; GOMES, V. M.; PEREIRA, S. P.; FERNANDES, C. F.; NUNES, E. P.; CAPISTRANO, G. G. G.; MONTEIRO-MOREIRA, A C. O. Purification and physicochemical characterization of a cotyledonary lectin from *Luetzelburgia auriculata*. **Phytochemistry**, v. 61, p. 301-310, 2002.
- OLIVEIRA, M. L.; BELTRAMINI, L. M; DE SIMONE, S. G; BRUMANO M. H. N; SILVA-LUCCA, R. A; NAKAEMA, M. K.K; PIRES, C. V; OLIVEIRA, M. G. A. Purification and partial characterization of a lectin from *Caesalpinia tinctoria* Domb, ex Dc fruits. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 15 (2), p. 119-122, 2003.
- OLSNES, S.; KOZLOV, J. V. Ricin. **Toxicon**, v. 39, p. 1713-1728, 2001.
- OOI, L. S. M; SUN, S.S. M.; OOI, V. E. C. Purification and characterization of a new antiviral protein from the leaves of *pandanus amaryllifolius* (Pandanaceae). **The International Journal of Biochemistry & cell Biology**, v. 36, p. 1440-46, 2004.
- OTTINGER, C. A.; JOHSON S. C.; EWART K. V.; BROWN L. L.; ROSS N. W. Enhancement of anti- *Aeromonas salmonicida* activity in Atlantic salmon (*Salmo salar*) macrophages by a mannose-binding lectin. **Comparative Biochemistry and Physiology Part (C)**, v. 123, p. 53 - 59, 1999.
- 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, p. 1085-9, 2005.
- 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. 1992.
- PARISI, M.G; MORENO, S.; FERNÁNDEZ, G. Isolation and characterization of dual function protein from *Allium sativum* bulbs which exhibits proteolytic and hemagglutinating activities. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46, p. 403- 13, 2008.

- PELOSI, E; LUBELLI, C.; POLITO, L; BARBIERI, L; BOLOGNESI, A; STIRPE, F. Ribosome-inactivating proteins and other lectins from *Adenia* (Passifloraceae). **Toxicon**, v. 46, p. 658-63, 2005.
- PENNA, J. F. M. *Dicionário brasileiro de plantas medicinais*. 3. ed. Rio de Janeiro: Komos, 1946.
- PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, v. 109. p. 347 - 352, 1995.
- PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Plant lectins versateli proteins with important perspectives in biotechnology. **Biotechnology and Geneteic Engineering Rewiews**, v. 15, p. 199 - 228, 1998.
- PIO CORRÊA, M. *Dicionário das plantas úteis do Brasil*. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, p. 687, 1984.
- PLUMER, D T. Na introduction to pratical biochemistry. 2 ed. London: McGraw-Hill, 1978. Cap. 3, p. 47-98. Separations Methods.
- QUEIROZ, M. L.; JUSTO, G. Z.; VALADARES, M. C.; PEREIRA-DA-SILVA, F. R. Evaluation of *Caesalpinia ferrea* extract on bone marrow hematopoiesis in the murine models of listeriosis and Ehrlich ascites tumor. **Immunopharmacology & Immunotoxicology**, 23(3), p. 367-382, 2001.
- RAMESH,S; NAGADHARA, D; REDDY,V D; RAO, K V. Production of transgenic indica rice resistant to yellow stem borer and sap-sucking insects,using super-binary vectors of *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Science**, v. 166, p. 1077-85, 2004.
- RAMESHWARAM, N. R; NADIMPALLI, S K. Na efficient method for the purification and quantification of a galactose-specifc lectin from vegetative tissues of *dolichos lablab*. **Journal of Chromatography B**, v. 861, p. 209-17, 2008.
- RATANAPO, S.; NGAMJUNYAPORN, W.; CHULAVATNATOL, M. Iteration of a mulberry leaf lectin with a phytopathogenic bacterium, *P. Syringae pv mori*. **Plant Science**, v.160, p.739 - 744, 2001.
- REYNOSO-CAMACHO, R.; DE MEJIA, E. G.; LOARCA-PIÑA, G. Purification and acute toxicity of a lectin extracted from terapy bean (*Phaseolus acutifolius*). **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, p. 21-7, 2003.
- RICKLEFS, R E. A economia da Natureza. 3. Ed. Rio de Janeiro, RJ: Editora Guanabara Koogan S. A., 1996. Parte 5, p. 259-329. Interações das espécies

- RIPOLL, C; FAVERY, B; LECOMTE, P; VAN DAMME, E; PEUMANS, W; ABAD, P; JOUANIN, L. Evaluation of the ability of lectin from snowdrop (*Galanthus nivalis*) to protect plants against root-knot nematodes. **Plant Science**, v. 164, p. 517-23, 2003.
- ROJO, M. A; CITORES, L. JIMENEZ, P; FERRERAS, J. M; ARIAS, F. J; MENDEZ, E.; GIBERS, T. Isolation and characterization of a new D-galactose-binding lectin from *Sambucus racemosa* L. **Protein Peptide Letters**, v. 10, p.287-293, 2003.
- RÜDGER H. Plant lectins-more than just tools for glycoscientists: occurrence, structure, and possible functions of plant lectins. **Acta Anatomica (Basel)**, v. 7, p. 1 - 12, 1998.
- RUDIGER, H.; SIEBERT, H. C.; SOLIS, D.; JIMÉNEZ-BARBERO, J.; ROMERO, A.; VON DER LEITH, C. W.; DIAZ-MARINO, T.; GABIUS, H. J. Medicinal chemistry based on the sugar code: fundamentals of lectinology and experimental strategies with lectins as targets. **Current Medical Chemistry**, v. 7, p. 389 - 416, 2000.
- RUY, F; VERCESI, A E; KOWALTOWSK, A J. Inhibition of specific electron transport pathways leads to oxidative stress and decreased *Candida albicans* proliferation. **Journal Bioenergetics Biomembranes**, v. 38, p.129–135, 2006.
- 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.; BIEBE, L. W. Antibacterial and antifungal activities of *Myracrodruon urundeuva* heartwood. **Wood Science Technology**, 2008, DOI 10.1007/s00226-008-0220-7
- SÁ, R.A; NAPOLEÃO, T. H; SANTOS, N. D. L; GOMES, F. S; ALBUQUERQUE, A, C; XAVIER, H. S; COELHO, L.C.B.B.; BIBIER, L. W.; PAIVA, P. M. G. Induction of mortality on *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae) by *Myracrodruon urundeuva* hearwood lectin. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 62, p.460-4, 2008a.
- SÁ,R. A; SANTOS, D. D. L; DA 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. Larvicidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* on *Aedes aegypti*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, article in press, 2008b.
- SADEGHI, A; VAM DAMME, E J M; PEUMANS, W J; SMAGGHE, G. Deterrent activity of plant lectins on cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (F) ovoposition. **Phytochemistry**, v. 67, p. 2078-84, 2006.

- SAMPIETRO, A R; ISLA, M I; QUIROGA, E N; VATTUONE, A M. An N-acetylglucosamine oligomer binding agglutinin (lectin) from ripe *Cyphomandra betacea* Sendt. Fruits. **Plant Science**, v. 161, p. 659-667, 2001.
- SANTI-GADELHA, T; GADELHA, C. A A; ARAGÃO, K S; OLIVEIRA, C; MOTA, M R L; GOMES, R C; PIRES, A F; TOYAMA, M H; TOYAMA, D O; ALENCAR, N M N; CRIDDLE, D N; ASSREUY, A M. S; CAVADA, B. S. Purification and biological effects of *Araucaria angustifolia* (Aracauriaceae) seed lectin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 350, p. 1050-1055, 2006.
- SAUVION, N; NARDON, C; FEBVAY, G; GATEGOUSE, A M R; RAHBÉ, Y. Binding of the insecticidal lectin Concanavalin A in pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Harris) and induced effects on the structure of midgut epithelial cells. **Journal of Insect Physiology**, v. 50, p. 1137-50, 2004.
- SHARON, N.; LIS, H. Carbohydrates in cell recognition. **Scientific American** v.268, p. 82-89, 1993.
- SHARON, N.; LIS, H. Legume lectins – a large family of homologous proteins. **FASEB Journal** , v. 4, p. 3198 - 3208, 1990.
- SHARON, N.; LIS, H. The structural basis for carbohydrate recognition by lectins. The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates-2. **Taiwan; Kuwer Academic/Plenum Publishers**, 1 - 19, 2001.
- SHARON, N.; LIS, H. How proteins bind carbohydrates: lessons from legume lectins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 50, p. 6586 - 6591, 2002.
- SHARON, N.; LIS, H. A Century of lectin research. Trends in Biochemical Science, v. 12, p. 488- 91, 1988.
- SINGHA, B; ADHYA, M; CHATTERJEE, B P. Multivalent II [β -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)- β -d-glcpNac] and Ta[β -d-Galp-(1 $\rightarrow$ 3)-a-d-GalpNac] specific moracea family plant lectin from the seeds of *Ficus bengalensis* fruits. **Carboydrate Research**, v. 342, p. 1034-43, 2007.
- SOILLEUX, E J; COLEMAN, N. Medicine in focus. Transplacental transmission of HIV: a potential role for HIV binding lectins. **The Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 35, p. 283-87, 2003.
- SOL, F. G. D; CAVADA, B. S; CALVETE, J. J. Crystal structures of *Bauhinia floribunda* seed lectin at acidic and basic pHs. Insights into the structural basis of pH-

- dependent dimer-tetramer transition. **Journal of structural Biology**, v. 158, p. 1-9, 2007.
- SORCI, M; BOI, C; FACCHINI, R; SARTI, G. C. Purification of galacto-specific lectins by affinity membranes. **Desalination**, v. 199, p. 550-552, 2006.
- SORENSEN, G L; HUSBY, S; HOLMSKOV, U. Surfactant protein A and surfactant protein D variation in pulmonary disease **Immunology**, v. 212, p. 381-416, 2007.
- STIRPE, F; BOLOGNESI, A; BORTOLOTTI, M; FARINI, V; LUBELLI, C; PELOSI, E; POLITO, L; DOZZA, B; STROCCHI, P; CHAMBERY, A; PARENTE, A; BARBIERI, L. Characterization of highly toxic type 2 ribosome-inactivating proteins from *Adenia lanceolata* and *Adenia stenodactyla* (Passifloraceae). **Toxicon**, v. 50, p. 94-105, 2007.
- SUN, W-D; FU, L-D; JIA, Y-P; DU, X J; WANG, Q; WANG, Y-H; ZHAO, X-F; YU, X-Q; WANG, J-X. A hepatopancreas-specific C-type lectin from the Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* exhibits antimicrobial activity. **Molecular Immunology**, v. 45, p. 348-61, 2008.
- SUSSELAN, K N; BHAGWATH, A; PANDEY, R; GOPALAKRISHNA, T. Characterization of Con C, a lectin from *Canavalia cathartica* Thouars seeds. **Food Chemistry**, v. 104, p. 528-35, 2007.
- SUZUKI, T.; TAKASHI, T.; FURUKOHRI, T.; KAWAMURA, K.; NAKAUCHI, M. A calcium-dependent galactose-binding lectin from the tunicate *Polyandrocarpa misakiensis*. **J. Biol. Chem.** v. 265, p. 1274-1281, 1990.
- SYED, F B F; JOSHI, B N; SIVARAMAN, H; KHIRE, J M; KHAN, M I. Purification and characterization of a cell-surface lectin (lectin II) from *agrobacterium radiobacter* NCIM 2443. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v. 47, p. 361-7, 1999.
- TAKAHASHI, K G; KURODA, T; MUROGA, K. Purification and antibacterial characterization of a novel isoform of the Manila clam lectin (MCL-4) from the plasma of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 150, p 45- 52, 2008.
- TASUMI, S.; YANG, W-J.; USAMI, T.; TSUTSUI, S.; OHIRA, T.; KAWAZOE, I.; WILDER, M. N.; AIDA, K.; SUZUKI, Y. Characteristics and primary structure of galactin in the skin mucus of the Japanese eel, *Anguilla japonica*. **Developmental Comparative Immunology**, v. 28, p. 325 - 335, 2004.

- THAKUR, A; RANA, M; LAKHANPAL, T N; AHMAD, A; KHAN, M I. Purification and characterization of lectin from fruiting body of *Ganoderma lucidum*: lectin from *Ganoderma lucidum*. **Biochimica et Biophysica acta (BBA)-General Subjects**, v. 1770, p.1404-12, 2007.
- THOMAS, G.; ARAÚJO, C. C.; SOUZA, P. S. Avaliação das atividades antiinflamatória, analgésica e antipirética dos extratos aquosos de *Caesalpinia ferrea*, *Plantago major*, *Polygonum acre* e *Pterodon polygaeflorus*. **10th Brazilian Symposium in Medicinal Plants**. São Paulo, Brasil, 1988.
- TORTORA, G J; FUNKE, B R; CASE, C. L. **Microbiology: na introduction**. 17^a ed. New York: addison Wesley Longman, 2001. 549-575.
- TRABULSI, R. **Microbiologia**. 2^a ed. Ed. Guanabara-Koogan, 1991.
- TRABULSI, L R; TOLEDO, M R F. **Microbiologia**. 2. ed Sao Paulo: Atheneu, 1996.
- TRIGUEIROS,G; LOUGARRE, ALI-AHMED, D.; RAHBÉ,Y.; GUILLOT, J.;CHAVENT, L.;FOURNIER, D.; PAQUEREAU, L. *Xerocomus chysenteron* lectin: identification of a new pesticidal protein. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1621, p. 292-8, 2003.
- TRINDADE, M.; LOPES,J. L. S; SOARES-COSTA, A.; MONTEIRO-MOREIRA, A.C.; MOREIRA, R. A; OLIVA, M. L. V; BELTRAMINI, L. M. Structural characterization of novel chitin-binding lectins from the genus *Artocarpus* and their antifungal activity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1764, p. 146-152, 2006.
- UMETSU, K; YAMASHITA, K; SUZUKI, T. Purification and carboydrate-binding specificities of a blood type B binding lectin from hemolymph of a crab (*Charybdis japonica*). **The Journal of Biochemistry**, v. 109, p. 718-721, 1991.
- VEGA, N; PÉREZ,G. Isolation and characterization of a *Salvia bogotensis* seed lectin specific for the Tn antigen. **Phytochemistry**, v.67, p. 347-355, 2006.
- WALLIS, R. Interactions between mannose-binding lectin and MASPs during complement activation by the lectin pathway. **Immunobiology**, v. 212, p. 289-99.,2007
- WANG, H; NG, T B. A lectin with some unique characteristics from the samta tomato. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 44, p. 181-185, 2006.
- WANG, X.; BUNBERS, G. J. Potent heterologous antifungal proteins from cheeseweed (*Malva parviflora*). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 279, p. 669 - 673, 2000.

- WANG, X.; THOMA, R. S.; CARROLL, J. A.; DUFFIN, K. L. Temporal generation of multiple antifungal proteins in primed seeds. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 292, p. 236 - 242, 2002.
- WANG, H. X.; NG, T. B. Purification of Castamollin, a novel antifungal protein from Chinese chestnuts. **Protein Expression & Purification**, 32, 44 - 51, 2003b.
- 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.
- WANG, H.; NG, T. B. First report of an arabinose-specific fungal lectin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 337, p. 621-25, 2005.
- WANG, H.; NG, T. B. Isolation of a novel n-acetylglucosamine-specific lectin from fresh sclerotia of the edible mushroom *Pleurotus tuber-regium*. **Protein Expression and purification**, v. 29, p. 156-160, 2003a.
- WANG, H.; NG, T. B.; LIU, Q. A novel lectin from the wild mushroom *Polyporus adusta*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 307, p. 535-539, 2003.
- WANG, R.; KONG, C.; KOLATKAR, P.; CHUNG, M C M. A novel dimer of C-type lectin-like heterodimer from the venom of *Calloselasma roddostoma* (Malayan pit viper). **FEBS Letters**, v. 508, p. 447- 453, 2001.
- WELLMAN-LABADIE, O; LAKSHMINARAYANAN, R; HINCKE, MT. Antimicrobial properties of avian eggshell-specific c-type lectin-like proteins. **FEBS Letters**, v.582, p.699-704, 2008.
- WINTER, H C; MOSTAFAPOUR, K; GOLDSTEIN, I J. The mushroom *marasmius oreades* lectin is a blood group type B agglutinin that recognizes Gala1,3gal and Gala1,3Gal β 1,4GlcNAc porcine xenotransplantation epitopes with high affinity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p.14996-15001, 2002.
- WITTISUWANNAKUL, R.; WITITSUWANNAKUL, D.; SAKULBORIRUG, C. A lectin from the bark of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*). **Phytochemistry**, v. 47, n. 2, p. 183-187, 1998.
- WONG, J H; NG, T B. Purification of a trypsin-stable lectin with antiproliferative and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity. **Biochemical and Biophysical research Communications**, v. 301, p. 545-550, 2003.

- WONG, J H; NG, T B. Sesquin a potent defensin-like antimicrobial peptide from ground beans with inhibitory activities toward tumor cells and HIV-1 reverse transcriptase. **Peptides**, v. 26, p. 1120-1126, 2005a.
- WONG, J H; NG, T B. Lunatusin, a trypsin-stable antimicrobial peptide from lima beans (*Phaseolus lunatus* L.). **Peptides**, v. 26, p. 2086-2092, 2005b.
- WONG, J. H; NG, T. B. Isolation and characterization of a glucose/mannose-specific lectin with stimulatory on nitric oxide production by macrophages from the emperor banana. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 38, p. 234-243, 2006.
- WRIGHT, S. New folds of plant lectins. **Current opinion in Structural Biology**, v.7, p.631-6, 1997.
- WU, A. M.; WU, J. H.; TSAI, M. S.; HERP, A. Carbohydrate specificity of an agglutinin isolated from the root of *Trichosanthes kirilii*. **Life Science**, v. 66, p. 2571 – 2581, 2001.
- YAMAGUCHI, M; JIMBO, M; SAKAI, R; MURAMOTO, K; KAMIYA, H. Purification and characterization of *microcystis aeruginosa* (Freshwater cyanobacterium) lectin. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 119, p. 593-597, 1998.
- YAMAGUCHI, M; OGAWA, T; MURAMOTO, K; KAMIO, Y; JIMBO, M; KAMIYA, H. Isolation and characterization of a Mannan-Binding Lectin from the Freshwater Cyanobacterium (Blue-Green Algae) *Microcystis viridis*. **Biochimica and Biophysical Research communications**, v. 265, p.703-708, 1999.
- YAN, Q.; JIANG, Z; YANG, S; DENG, W; HAN, L. A novel homodimeric lectin from *Astragalus mongholicus* with antifungal activity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 442, p. 72-81, 2005.
- YANG, H; LUO, T; LI, S; XU, X. Purification and characterization of a calcium-independent lectin (PjLec) from the haemolymph of shrimp *Penaeus japonicus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 22, p.88-97, 2007.
- YE, X. Y.; NG, T. B. Peptides from pinto bean and red bean with sequence homology to cowpea 10-KDA Protein precursor exhibit antifungal, mitogenic, and HIV-1 reverse transcriptase-inhibitory activities. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 285, p. 424 - 429, 2001a.

YE, X Y; NG, T. B; TSANG, P W K. WANG, J. Isolation of a homodimeric lectin with antifungal and antiviral activities from red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. **Journal of Protein Chemistry**, v. 20, p.367-375, 2001.

YE X Y; NG, TB. A chitinase with antifungal activity from the mung bean. **Protein expression and Purification**, v. 40, p. 230-236, 2005.

YE, XY; NG, TB. A new antifungal protein and a chitinase with prominent macrophage-stimulating activity from seeds of *Phaseolus vulgaris* cv. *pinto*. **Biochemical and biophysical Research communications**, v. 290, p. 813-819, 2002a.

YE, X Y; NG, T B. Deladin, a chitinase-like Protein with Antifungal, HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitory and Mitogenic Activities from the rice Bean *Delandia umbrellata*. **Protein expression and Purification**, v. 24, p. 524-529, 2002b.

YE, X Y; NG, TB. Purification and characterization of glycolactin, a novel glycoprotein from bovine milk. **Life Science**, v. 66, p. 1177-1186, 2000.

YU, L G; FERNIG, D G; WHITE, M R H; SPILLER, DG; APPLETON, P; EVANS, R C; GRIERSON, I; SMITH, J A; DVIES, H; GERASIMENKO, O V; PETERSEN, O H; MILTON, J D; RHODES, J M. Edible mushroom (*Agaricus bisporus*) lectin, which reversibly inhibits epithelial cell proliferation, blocks nuclear localization sequence-dependent nuclear protein import. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 4890-4899, 1999.

4. ARTIGOS

4.1 Artigo 1 - A NEW THERMOSTABLE *Caesalpinia ferrea* POD LECTIN WITH ANTIMICROBIAL ACTIVITY

4.2. Artigo 2 – Growth inhibition of *Candida albicans* by *Caesalpinia ferrea* Pod Lectin

4.3. Artigo 3 – Insecticidal activity of *Caesalpinia ferrea* pod lectin on *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae)

4.1. Artigo 1: a ser submetido ao periódico *Phytochemistry*

**A NEW THERMOSTABLE *Caesalpinia ferrea* POD LECTIN WITH
ANTIMICROBIAL ACTIVITY**

**A NEW THERMOSTABLE *Caesalpinia ferrea* POD LECTIN WITH
ANTIMICROBIAL ACTIVITY**

Ximenes, N. C. A.¹, Vaz, A. F. M.¹, Ferreira, F. R. B.¹, Santana, L. A.², Paiva, P. M. G.¹,
Oliva, M. L. V.², Coelho, L. C. B. B.¹, Carneiro-da-Cunha, M. G.¹ and Correia, M. T. S.^{1*}

Department of Biochemistry¹, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil

Departament of Biochemistry², Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil

*Corresponding author: Maria Tereza dos Santos Correia, Av. Prof. Moraes Rego, 1235 -
Cidade Universitária, Recife - PE - CEP: 50670-901, Recife, PE, Brazil. Tel: +55-81-
2126.8574; Fax: +55-81-21268576; e-mail address: mtscorreia@gmail.com

Abstract

Caesalpinia ferrea Mart. is a legume used in popular medicine in treatment of diabetes and studies demonstrated that its fruits have anti-fungal activity. A new *Caesalpinia ferrea* pod lectin (CfePL) was isolated by chromatography on a chitin column followed by 1 M acetic acid elution. The purified lectin showed, by SDS-PAGE in the presence or absence of 2-mercaptoethanol or by gel filtration using an ÄKTA purified system, a polypeptide band of 8 kDa. CfePL agglutinated human as well as rabbit, chicken, rat erythrocytes; bovine, rabbit and fetal serum glycoproteins inhibited the lectin hemagglutinating activity (HA). CfePL HA was not affected by treatment in the temperature range 30-100°C, even after exposure to 100°C for 12 h. The lectin activity was stimulated by ions (Ca^{2+} and Mg^{2+}) as well as citrate-phosphate (pH 4.5, 5.0, 5.5) and sodium phosphate (pH 7.5) buffers. CfePL displayed antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* sp., *Corynebacterium bovis* and *Bacillus* sp. Antifungal activity was detected against *Colletotrichum gloesporioides*, *Trichoderma viride*, *Aspergillus niger* and *Candida albicans*; the lectin presented a minimum inhibitory concentration (MIC) of 10 µg/ml against *Colletotrichum gloesporioides*, *Escherichia coli* and *Streptococcus* sp. These results point that the thermostable lectin (CfePL) obtained in quantities of milligrams by a simple protocol has a potential use in microbiologic applications.

Keywords: *Caesalpinia ferrea* lectin; pod; antibacterial activity; antifungal activity.

1. Introduction

Lectins are proteins or glycoproteins of ubiquitous distribution in nature, which have at least one carbohydrate or derivative binding site without catalytic function or immunological characteristics (Sharon and Lis, 2001), could have one additional hydrophobic site (Barondes, 1988) and reversibly bind to mono or oligosaccharides of eukaryotic glycoconjugates (Peumans and Van Damme, 1995). They could be purified from different species (Banerjee et al., 2004; Ngai and Ng, 2004; Fenton-Navarro et al., 2003; Freire et al., 2002). In plants, they are mainly obtained from legume seeds (Wang and Ng, 2003; Santos et al. 2009), but could be, also, obtained from different vegetative tissues such as leaves (Coelho and Silva, 2000), bulbs (Mo et al., 1993), barks (Wititsuwammakul et al., 1998; Sá et al., 2008a), roots (Naeem et al., 2001), heartwoods (Sá et al., 2008b) and pods (Oliveira et al., 2003). By virtue of their sugar-binding property, they are useful for detection of cell surface carbohydrates (Weis et al., 1996), differentiation of normal from transformed tissues (Beltrão et al., 2003), glycoconjugate purification (Lima et al., 1997; Paiva et al., 2003), as well as biological and medical investigations (Banerjee et al., 2004; Mizuno et al., 2004; Sharon and Lis, 2001).

Several proteins (Nagashima et al., 2003; Wang and Ng, 2003) including lectins (Tasumi et al., 2004; Gaidamashvili and Standen, 2002) showed antimicrobial activity. Some lectins have action against pathogenic species of fungi such as *Talisia sculenta* (Freire et al., 2002), *Ganoderma capense* lectin (Ngai and Ng, 2004) and *Castanea mollissima* lectin (Wang et al., 2003). In particular, chitin-binding lectins seemed to have a role in defending plants against fungi and insects (Freire et al., 2002; Macedo et al., 2002; Sá et al., 2008b). *In vitro* studies with *Urtica dioica* lectins demonstrated inhibition growth of some fungi (Broekaert et al., 1989). Antibacterial activity have, also, been found in many lectins obtained from medicinal plants, animal or from fish (Oliveira et al., 2008; Welman-Labadie et al., 2008; Gaidamashvili and

Staden, 2002; Fock et al., 2001). A avian C-type lectin-like protein were bactericidal against *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* (Welman-Labadie et al., 2008); a lectin from salmon (*Salmo solar*), an Atlantic fish, inhibited the growth of *Aeromonas salmonicida* (Ottinger et al., 1999).

Caesalpinia ferrea Mart. is a legume broadly distributed at North and Northeast Region of Brazil and is locally known as Jucá or Pau-ferro (iron-wood). Anti-fungal, anti-ulcer and anti-inflammatory properties have been attributed to *C. ferrea* fruit (Thomas et al., 1988; Lima et al., 1994; Bacchi et al., 1995); also aqueous extracts have anti-inflammatory and analgesic activities (Carvalho et al., 1996). Fruits have been used for popular treatment of diabetes (Balbach, 1972).

This paper describes the extraction, purification and characterization of *C. ferrea* pod lectin (CfePL) as well as the evaluation of its antimicrobial activity.

2. Material and Methods

2.1.Plant material

C. ferrea pods were harvested from plants at Ibimirim City, State of Pernambuco, Northeast Brazil.

2.2.Haemagglutination and inhibition assays

Fresh erythrocytes from human (A, B, O and AB types) and rabbit were obtained as described by Bukantz et al. (1946) and glutaraldehyde treated according to Bing et al. (1997). Haemagglutinating activity (HA) was evaluated as described by Correia and Coelho (1995) defined as the lowest sample dilution showing haemagglutination; specific HA (SHA)

corresponded to HA divide by protein concentration (mg/ml). Rabbit erythrocytes were chosen for subsequent assays. Quantitative protein determination was performed according to Lowry et al. (1951) and Warburg and Christian (1960). Carbohydrate binding specificity was determined by HA inhibition using sugars (100 mM) (threulose, fucose, N-acetyl-D-glucosamine, mannose, glucose, fructose, galactose, ramnose and saccharose) and glycoproteins (0.5 mg/ml) (fetuin, ovalbumin, casein and fetal bovine serum, human and rabbit serum) as described by Coelho and Silva (2000).

2.3.Lectin purification

C. ferrea pod, without seeds, were washed with distilled water, dried at room temperature, powdered in a multiprocessor and a 10 % (w/v) extract in 0.15 M NaCl was obtained by gentle shaking for 16 h, at 4 °C. The extract was passed through gauze, centrifuged 10.000 x g for 15 min and the supernatant was mixed with activated charcoal, filtered and submitted to 0 to 80 % (w/v) ammonium sulphate fractionation (F 0-80 %, F80) by addition of solid salt. After 4 h at room temperature, the resuspended precipitate was dialyzed against distilled water followed by 0.15 M NaCl (16 h, 4 °C) (F80). A sample of F80 (8.7 mg / 500 µl) was incubated (30 min) with chitin (Sigma) pre-equilibrated with 0.15 M NaCl containing 0.04 mM MgCl₂ (NaCl/Mg) and applied to a chromatographic column (5.0 x 1.5 cm). Proteins of each fraction were measured by absorbance at 280 nm. Unbound proteins were washed with NaCl/Mg and adsorbed proteins were eluted with 1.0 M NaCl containing 0.04 mM MgCl₂ followed by 1.0 M acetic acid. Fractions with high activity, eluted with acetic acid were bulked, dialyzed with 0.15 M NaCl (CfePL) and stored at -20 °C. The adsorbed fraction (CfePL), after concentration by ultrafiltration in PBS buffer, was applied to a Superdex 75 HR 10/30 column coupled to an AKTA purifier system (Amersham Pharmacia Biotech). The column was pre-equilibrated and eluted with 150 mM NaCl, at a flow rate of 0.5 ml/min,

monitored by absorbance at 215 nm, collected in 1ml fractions. Following the lectin was chromatographed on a C 4 column connected to RP-HPLC system (model LC-10 AD from Shimadzu, Japan) equilibrated in 0.1 % acid trifluoroacetic solution (TFA) in water (solvent A); elution was made with 90 % acetonitrile gradient (5-95 %) in 0.1 % TFA (solvent B). The lectin was submitted to reverse-phase chromatography on the C-18 column performed on a HPLC system (Shimadzu) monitored at 215 nm, as described below for chain separations.

2.4.Effect of temperature, pH and ions on CfePL HA

CfePL samples were submitted to a defined temperature (30 °C – 100 °C) and after incubation (30 min) HA was determined using 0.15 M NaCl as diluent. Different pH solutions (citrate phosphate buffer, pH 2.0 – 4.5; sodium phosphate buffer, pH 5.0 – 8.0; Tris-HCl buffer, pH 8.5 – 10 and NaOH, pH 10 – 12) and CaCl₂ or MgCl₂ solutions (0.01 – 0.04 M) were used to dilute CfePL samples in HA assay; after incubation (45 min) rabbit erythrocytes were added.

2.5.Effect of proteolytic enzymes on CfePL HA

The assay was made according to Rios et al. (1996). CfePL (7.7 µg) was incubated (37 °C, 2 h) with bovine trypsin (5.0 µg) or chymotrypsin (5.0 µg) in 0.1 M Tris-HCl, pH 8.2 (50 µl) and the enzyme reaction was stopped by addition (13 µl) of phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) in 0.1 M Tris-HCl, pH 8.2 buffer at 3:1 proportion 9 (v/v). The effect of enzymes on CfePL was evaluated by measurement of HA.

2.6. *Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)*

PAGE for basic and acidic native proteins by Reisfeld et al. (1962) and Davis (1964), respectively. Samples denaturated were reduced or not, and analyzed by SDS-PAGE according to Laemmli (1970). The range standard marker proteins were rabbit muscle myosin (205 kDa), *E. coli* β -galactosidase (116 kDa), rabbit muscle phosphorylase b (97.4 kDa), rabbit muscle fructose-6-phosphate kinase (84 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), bovine liver glutamic dehydrogenase (55 kDa), egg albumin (45 kDa), rabbit muscle gliceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (36 kDa), bovine erythrocyte carbonic anhydrase (29 kDa), bovine pancreas trypsinogen (24 kDa), soybeam trypsin inhibitor (20 kDa), bovine milk a-lactalbumin (14.2 kDa) and bovine lung aprotinin (6.5 kDa), purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Proteins were detected with Coomassie Brilliant blue R-250.

2.7. *Carbohydrate content*

The amount of neutral sugars in purified lectin (7.7 μ g) was estimated by phenol-sulfuric acid method (Dubois et al., 1951) using mannose as standard.

2.8. *Microorganisms and Inocula preparation*

Twelve microorganisms were used for antimicrobial activity evaluations, five Gram positive, three Gram-negative bacteria and four fungi (Table 1). Bacteria were inoculated in Nutrient Broth and fungi in Sabouraud Dextrose Broth. Bacteria (24 h at 37 °C) and fungi (48 h at 28 °C) growth were maintained in an orbital shaker. Bacteria were harvested during the

exponential growth phase and their concentration was determined by OD measurements at 600 nm. All microorganisms were adjusted to 10^5 colony forming units (CFU)/ ml.

2.10. Antibacterial and antifungal assays

Antimicrobial activity of CfePL was investigated by the disc diffusion method (Bauer et al., 1966). The antimicrobial screening was performed using Nutrient Agar (NA) for bacteria and Sabouraud Dextrose Agar (SDA) for fungi. Warmed medium (100 ml, 43 °C) and 0.5 mL of inoculum (10^5 CFU/ml) were added; solutions were distributed in sterile Petri plates (90 X 15 mm) in portions of 10 mL and allowed to solidify. Following, 15 µl of CfePL solution (100 µg/ml) were impregnated on sterile paper discs with 6 mm diameter and placed on agar. Discs containing 15 µl of sterile saline solution (0.9% w/v) were used as negative control and discs of chlorophenicol and cyclohexamide, both with 5 mg/ml, were used as positive control for bacteria and for fungi, respectively. Plates were incubated at 37 °C for 24 h (bacteria) and 28 °C for 48 h (fungi). A transparent ring around the paper disc revealed antimicrobial activity. Zones of growth inhibition around discs were measured in mm. Result of four independent experiments were expressed as average $\pm$ standard deviation ($X \pm sd$), and submitted to variance analysis and Tukey test.

2.11. Minimum inhibitory concentration (MIC)

Minimum inhibitory concentration (MIC) of CfePL was tested by a serial dilution method. CfePL (0.2 ml) of stock solution (100 µg/ml) was incorporated into assay tube containing 1.9 ml of Nutrient Broth for bacteria and Sabouraud Dextrose Broth for fungi and

0.1 ml of standardized suspension of test organism being serially double diluted to achieve 20, 10, 5 and 2.5 µg/ml. Control tube contained only microorganisms and medium. The culture tubes were incubated at 37 °C for 24 h (bacteria) and 28 °C for 48 h (fungi). The lowest concentrations, which did not show any growth of tested organism after macroscopic evaluation were determined as MIC (Courvalin et al., 1988).

2.12. Minimum bactericidal concentration (MBC) and minimum fungicidal concentration (MFC)

All tubes used in MIC evaluation that did not show any growth of bacteria or fungi after incubation period subcultured on to the surface of freshly prepared Nutrient Agar (for bacteria) and Sabouraud Dextrose Agar (for fungi) plates were incubated at 37 °C for 24 h (bacteria) and 28 °C for 48 h (fungi). The minimum bactericidal concentration (MBC) and minimum fungicidal concentration (MFC) corresponded to the minimum concentration of the lectin that reduced the number of CFU to 0-1 % of the initial concentration (Courvalin et al., 1988).

3. Results and discussion

Several lectins have been purified from leguminous tissues and used in different biological applications. Search of new lectins is interesting to amplify the knowledge of this class protein specially when the plant extracts have pharmacological activities and also are used in popular medicine, as it occurs with *C. ferrea* tissues (Lewis, 1987; Pio Corrêa, 1984; Penna, 1964), which increase the interest in the isolation and purification of this plant lectin. *C. ferrea* pods showed a potential lectin with HA. Analgesic and antiinflammatory (Carvalho et al., 1996) or anti-gastric ulcer (Bacchi et al., 1995) activities were evaluated with aqueous

extracts from *C. ferrea* fruits; alcoholic extracts were used in antifungi and antitumor assays (Lima *et al.*, 1994; Nakamura *et al.*, 2002). Nozaki *et al.* (2007), also working with *C. ferrea*, showed that paufferol, a compound obtained from the stem, possesses a cell proliferation inhibitory activity through the induction of apoptosis in human leukemia HL60 cells. Aqueous extract from stem bark of *C. ferrea* (AECF) induces hypotension associated to tachycardia; however, in dose of 40 mg/kg, AECF induces transient bradyarrhythmias (Menezes *et al.*, 2007).

The observation that N-acetyl-D-glucosamine inhibited the activity containing in fraction precipitated with (NH₄H₂SO₄, F80), offered the possibility of using chitin as affinity matrix for lectin purification. The chromatographic step of F80 on chitin column was resolved in three main peaks (Figure 1). Two adsorbed protein peaks were observed but only the third peak showed HA (CfePL). The described protocol allowed to obtain 48 mg of pure CfePL from 10 g of *C. ferrea* pod flour, a high yield, in relation to other lectin purification steps, such as those to obtain *Talisia esculenta* lectin (5 mg from 10 g of seeds) by chitin chromatography or soybean agglutinin (44 mg of pure lectin from 50 g of soybean flour) (Freire *et al.*, 2002; Franco-Fraguas *et al.*, 2002;). Acetic acid is a cheap eluent and has been used to obtain lectins from affinity chromatography as can be observed for *Goderma lucidum* lectin purification on BSM-Toyopearl column (Kawagishi *et al.*, 1997). CfePL specific binding to chitin was demonstrated by using N-acetyl-D-glucosamine (carbohydrate which makes up the matrix) as the eluent of bound protein. Table 2 summarizes CfePL purification. Native electrophoresis showed only one small and highly basic protein (Figure 1B); under denatured and reduced conditions CfePL showed a polypeptide band with molecular mass of approximately 8 kDa (Figure 1C). Some lectins binding to chitin present low molecular weight such as *Artocarpus integrifolia* (14 kDa), *Artocarpus incisa* (14 kDa), the *Caesalpinia tinctoria* (12.5 kDa),

Myracrodruon urundeuva heartwood (14.4) and *Myracrodruon urundeuva* bark (14.0 kDa) (Trindade et al., 2006; Oliveira et al., 2003; Sá et. al., 2008) and most of the purified lectin in chitin show activity against fungi, bacteria and insects.

Glycoprotein staining on SDS-PAGE not revealed glycosylated polypeptide band. However, carbohydrate analysis by the phenol-sulphuric acid method showed that CfePL presents 6.8 % carbohydrate content; an antibacterial protein of rockfish *Sebastes schlegeli* contained 3.4 % of reducing sugar and 2.8 % of amino sugar on weight basis (Nagashima et al., 2003).

When CfePL was chromatographed in gel filtration Superdex 75 one protein peak was obtained, with 8 kDa (Figure 2 A) and the chromatographed in C4 resolved in two peaks (figure 2 B), both peaks revealed by C18 chromatography a identical strong hydrophobic character and homogeneous profile characteristic of a highly purified protein (Figure 2 C, D). One explanation for this result is the observation that in protein the presence of isoforms is a frequent phenomenon. Lectin multiple forms, resulting in characteristically distinct electrophoretic mobilities or could be formed prior or during isolation, as a result of side chain modifications (Kennedy et al., 1995).

CfePL agglutinated rabbit and human (A, B, AB and O) erythrocytes (Figure 3 A). The lectin was sensible to alkaline pH (Figure 2 B) and was stimulated by Mg^{++} or Ca^{++} (Figure 3 C); glycoproteins present in fetal bovine and rabbit sera totally inhibited CfePL HA, however fetuin, ovalbumin and casein affected only partially its HA at tested concentrations (figure 3 D); the carbohydrates N-acetyl-glucosamine, mannose, glucose and fucose also partially inhibited CfePL HA (256^{-1} to 32^{-1}). CfePL showed high thermostability and remained active even after 12 hours at 100 °C. CfePL agglutinated preferentially AB and O human blood types. A lectin from *Talisia esculenta*, purified by chitin chromatography, showed similar preference

to AB type blood. *T. esculenta* lectin was stimulated by Ca^{2+} (Freire et al., 2002) and *Sphenostyles stenocarpa* lectin showed higher agglutination to type O blood (Machuka et al., 1999). The thermal stability of CfePL and the reasonable stability with respect to pH variations; only at pH above 6.0 a reduction of HA was observed, suggested that the lectin is markedly stable. Legume seed lectins have been very stable; isolectin 1 from *Cratylia mollis* lectin (Cramoll 1) remained active after exposition at 80 °C for 30 min or after storage for at least 10 years (Correia and Coelho, 1995). Ngai and Ng (2004) showed that *Ganoderma capense* lectin was unaltered after incubation at 100 °C for 60 min and only lost activity after 150 min of heating treatment. Incubation CfePL with either trypsin or chymotrypsin did not eliminated its HA. Some lectins from different sources show to be proteolytic enzymes, as the lectin from *Artocarpus integrifolia seeds* (Rios et al., 1996) and the ACL-I, a lectin from marine sponge *Axinella corrugate* (Dresch et al., 2008).

Table 3 shows the results of microorganism's growth in the presence of CfePL. All bacteria and fungi tested were inhibited by the lectin; better results were obtained on *C. gloesporioides* (17.25 ± 1.5 mm halo) and on *E. coli* (16.75 ± 0.5 halo). Although halos obtained with *C. gloesporioides* and *E. coli* has been highest show an effective inhibitory activity, no significative difference was observed on *E. coli*, *Klebsiella* sp. and *Streptococcus* sp bacteria or on *C. gloesporioides* and *T. viride* fungi. CfePL showed fungistatic and bacteriostatic action by minimum bactericidal concentration (MBC) or minimum fungicidal concentration (MFC) assays, respectively, for *C. gloesporioides*, *E. coli*, *Streptococcus* sp, with minimum inhibitory concentration (MIC) of 10.0 µg/ml. Sun et al. (2008) defined that MIC for *Fenneropenaeus chinensis* C-type lectin as 0.6 µM, 1.2 µM and 4.8 µM for *B. subtilis*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *E.coli* and *Colletotrichum lagenarium*, respectively. Gaidamadhvili and Staden (2002) defined MAC for *Combretum* agglutinin as 20.0 µg/ml and 5.0 µg/ml for *B.*

subtilis and *S. aureus* agglutination, respectively. The presence of chitin, cellulose, N-acetyl-D-glucosamine, mannan, N-muramic acid and other carbohydrates at fungi and bacteria membranes might explain the broad inhibitory effects of CfePL on growth of used microorganisms; CfePL was not specific to any tested monosacharide but was partially inhibited by them. Although the number of lectins described with antibacterial activity yet is relatively small (Sun et al., 2008; Wellman-Labadie et al., 2008; Tasumi et al., 2004; Freire et al., 2002; Gaidamashvili and Staden, 2002; Ottinger et al., Fock et al., 2001), in our laboratory we showed that the *Eugenia uniflora* lectin has a potent antibacterial activity (Oliveira et al., 2008). The ability of plant agglutinins to bind human bacteria and inhibit their motility and/or growth has not been related to their physiological activities. Nevertheless, the fact that agglutinins were mostly isolated from storage parts of plants, also, suggests their possible contribution to plant defense mechanisms (Gaidamashvili and Staden, 2002).

Characterized antifungal lectins like hevein from *Hevea brasiliensis* (4.7 kDa), *Urtica dioica* lectin (8.5 kDa) and *Gastrodia elata* lectin (10 kDa) are small proteins (Parijs et al., 1991; Parijs et al., 1992; Xu et al., 1998). Chrispeels and Raikhel (1991) suggested that these small chitin-binding proteins cross-linked chitin preventing cell expansion at the tip of the growing hyphae of fungi. This binding could slow down the hyphae growth as the first line of an integrated defense mechanism.

In this paper, a thermostable *C. ferrea* pod lectin that recognized chitin binding was purified in milligram quantities by one reproducible affinity chromatographic step using a cheap eluent solution (acetic acid) with high protein yield; the lectin was a powerful antimicrobial agent of low cost, with broad spectrum of action, and in the future might used in therapeutic applications.

Acknowledgements

This paper was financially supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). The authors are deeply grateful to Maria Barbosa Reis and João Antônio Virgínio (for technical assistance).

Reference

- Bacchi, E. M., Setie, J.A., 1995. Anti-ulcer action and toxicity of *Styrax camporum* and *Caesalpinia ferrea*. *Planta Medica* 60, 118 – 120.
- Balch, A., 1972. *As Plantas que curam*. Três Press, São Paulo, p. 302 –303.
- Banerjee, S., Chaki, S., Bhowal, J., Chatterjee, B. P., 2004. Mucin binding mitogenic from freshwater Indian gastropod *Belamya bengalensis*: purification and molecular characterization. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 421, 125 – 134.
- Barondes, S. H., 1988. Bifunctional properties of lectins: lectins redefined. *Trends in Biochemical Science*, 13: 480 – 482.
- Beltrão, E. I. C., Medeiros, P. L. Rodrigues, O. G., Figueiredo-Silva, J., Valença, M. M., Coelho, L. C. B. B., Carvalho Jr, L. B., 2003. *Parkia pendula* lectin as histochemistry marker for meningothelial tumour. *European Journal of Histochemistry*, 47, 2, 139 – 142.
- Bing, D H.; Weyand, J. M. Stanislawski, A. B., 1967. Hemagglutination with aldehyde - fixed erythrocytes for assay of antigens and antibodies. *Proc. soc. Cyp. Biol. Med.*, 124, 1166 –1170.
- Bukantz, C. S. C., Rein, L. C. C. R., Kent, J. F., 1946. Studies in complement fixation Preservation of shepp's blood in dextrose mixtures (modified Alsever's solution) for use in the complement fixation reaction. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, Saint Louis. 31, 349 – 399.

- Broekaert, W. F., Parijs, J.V., Leyns, F., Joos, H., Peumans, W. J., 1992. A chitin-binding lectin from stinging nettle rhizomes with antifungal properties, *Science*, 245, 1100 – 1102.
- Carvalho, J. C. T., Texeira, J. R. M., Souza, P. J. C., Bastos, J. K., Dos Santos Filho, D., Sarti, S.J., 1996. Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 53, 175 –178.
- Coelho, L.C.B.B., Silva, M. B. R., 2000. Simple method to purify milligram quantities of the galactose – specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. *Phytochemical Analysis*, 11, 295 – 300.
- Correia, M.T.S., Coelho, L. C. B. B., 1995. Purification of glucose/ mannose specific lectin, Isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart (camaratu bean). *Applied Biochemistry and Biotechnonology*, 55, 261 - 273.
- Courvalin, P., Goldstein, F., Philippon, A., Sirot, J., 1988. L’antibiogramme COFECUB, Paris, 1 ed., 189 -198.
- Davis, B. J., 1964. Disc eletrophoresis II: Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121, 404-427.
- Franco-Fraguas, L., Plá, A., Ferreira, F., Massaldi, H., Suárez, N., Batista-Vieira, F., 2002. Preparative purification of soybean agglutinin by affinity chromatography and its immobilization for polysaccharide isolation. *Journal of Chromatography A*, 1, 000-000.
- Feton-Navarro, B., Arreguín-L, B., Garcá-Hernández, E., Heimer, E. Aguilar, M. B., Rodríguez-A, C., Arreguín-Espinosa, R., 2003. Purification and structural characterization of lectins from the cnidarian *Bunodeopsis antillienis*. *Toxicon*, 43, 525 - 532.
- Fock, W. L., Chen, C. L., Lam, T. J., Sin, Y. M., 2001. Roles of an endogenpous serum lectin in the immune protection of blue gourami, *Trichogaster trichopterus* (Pallus) against *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shelfish Immunology*, 11, 101 - 113.

- Freire, M. G., Gomes, V. M., Corsini, R. E., Machado, O. L. T., De Simoni, S. G., Novello, J. C., Marangoni, S., Macedo, M. L. R., 2002. Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40, 61 - 68.
- Gaidamashvili, M., Standen J. V., 2002. Interactin of lectin-like proteins of South African medicinal plants with *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*. *Journal of Ethnopharmacology*, 80, 131 - 135.
- Heukeshoven, J., dernick, R., 1985. simplified methods for silver stain of protein in polyacrylamide gel and mechanism of silver stain. *Electrophoresis*, 6, 103 – 112.
- Hong, M., Cassely, A., Mechref, Y., Novotny, M. V., 2001. Sugar-lectin interactions investigated through affinity capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B*, 752, 207-216.
- Kawagishi, H., Nomura A., Mizumo T., Kimura A., Chiba S., 1990. Isolation and Characterization of a lectin from *Grifola frondosa* fruiting bodies. *Biochemica et Biophysica Acta*, 1034, 247 –252.
- Kawagishi, H., Mitsunaga, SI., Yamawaki,M., Ido, M., Shimai, A., Kinoshita, T., Murata, T., Usui, T., Kimura, A., Chiba, S., 1997. A lectin from mycelia of fungus *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry*, 44, 7-10
- 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: a review. *Carbohydr.Polym.*, 26 : 219 – 30.
- Laemmli, U. K., 1970 Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-5.
- Lima, E. C., Cury, A. E., Fischman, O. G., Gieshrecht, A. M., Paulo, O.G., 1994. Atividade antifungica de extratos de plantas medicinais sobre *Trichophton*, *Microsporum* e

Epidermophyton isolados de pacientes com dermatofitoses. 13th Brazilian Symposium in Medicinal Plants. Ceara, Brazil.

Lima, V. L. M., Correia, M. T. S., Cechinel, Y. M. N., Sampaio, C. A., Owen, J. S. And Coelho, L. C. B. B., 1997. Immobilized *Cratylia mollis* lectin as potential matrix to isolate plasma glycoproteins Including lecithin cholesterol acyltransferase. Carbohydrate Polymers. 31, 892, 27 - 32.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. And Randall, R. J., 1951 Protein measurement with the folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry. 193, 265.

Macedo, M., L. R., Freire, M. G. M., Novello, J. C., Maragoni, S., 2002. *Talisia esculenta* lectin and larval development of *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes*. Biochimical et Biophysycal Acta, 1571, 2, 83 – 88.

Machuka, J. S., Okeola, O.G., Els, J. M. V. D., Chrispeels, M. J., Leuven, F. V., Peumans, W. J., 1999. Isolation and partial characterization of galactose-specific lectins from African yam beans, *Sphenostyles stenocarpa* Harms. Phytochemistry, 51, 721 -728.

Menezes, I. A.C., Moreira, I. J. A., Carvalho, A. A., Antonioli, A. R., Santos , M. R. V., 2007. Cardiovascular effects of the aqueous extract from *Caesalpinia ferrea*: Involvement of ATP-sensitive potassium channels. Vascular Pharmacology 47, 41–47.

Mizumo, M., Noguchi, M., Imai, M., Motoyoshi, T., Inazu T., 2004, Interaction assay oligosaccharide with lectins using glycosylasparigine. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 14, 485 – 490.

Mo, H., Van Damme, E. J. M., Peumans, W. J., Goldstein, I. J.,1993. Purification and characterization of a monnose-specific lectin from shallot (*Allium ascalonicum*) bulbs. Archives of Biochemistry and Biophysics, 306, 2, 431-438.

- Nagai, P. H. K., Ng, T.B., 2004. A mushroom (*Gonoderma canpense*) lectin with spectacular thermostability, potent mitogenic activity on splenocytes, and antiproliferative activity toward tumor cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 314, 988 – 993.
- Naeen, A., Khan, R. H., Vikram, H. Akif, M., 2001. Purification of *Cajanus cajan* root lectin and its interaction with rhizobial lipopolysaccharide as studied by different spectroscopic techniques. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 396, 1, 99 -105.
- Nagashima, Y., Kikuchi, N., Shimakura, K., Shiomi, K., 2003. Purification and characterization of an antibacterial protein in the skin secretion of rockfish *Sebastes schlegeli*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 136, 63 –71.
- Nozaki, H., Hayashi, K., Kido, M., Kakumoto, K., Ikeda, S., Matsuura, N., Tani, H., Takaoka, D., Iinuma, M., Akao, Y., 2007. Pauferrol A, a novel chalcone trimer with a cyclobutane ring from *Caesalpinia ferrea* Mart exhibiting DNA topoisomerase II inhibition and apoptosis-inducing activity. *Tetrahedron Letters* 48, 8290-8292.
- Oliveira, M. D. L.; Andrade, C. D. S; Santos-magalhães, N. S.; Coelho, L. C. B. B; Teixeira, J. A; Carneiro-da-cunha, M. G.; Correia, M.T.S. Purification of a lectin from *Eugenia uniflora* L. seeds and its potential antibacterial activity. *Letters in Applied Microbiology*, 46, 371- 76, 2008.
- Oliveira, M. L., Beltramini, L. M., Simone, S. G., Brumano, M. H. N., Silva-Lucca, R. A., Nakaema, M. K. K., Pires, C. V., Oliveira, M. G. A., 2003. Purification and partial characterization of a lectin from *Caesalpinia trinatoria* Domb, ex. Dc fruits. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 119-122.
- Ottinger, C. A., Johson S. C., Ewart K. V., Brown L. L., Ross N. W., 1999. Enhancement of anti- *Aeromonas salmonicida* activity in Atlantic salmon (*Salmo salar*) macrophages by a mannose-binding lectin. *Comparative Biochemistry and Physiology Part (C)*, 123, 53 - 59.

- Paiva, P. M. G, Souza, A. F., Oliva, M. L., Kennedy, J. F., Cavalcanti, M. S. M., Coelho, L. B. B., Sampaio, C. A. M, 2003. Isolation of a trypsin inhibitor from *Echinodorus paniculatus* seeds by affinity chromatography on immobilized *Cratylia mollis* isolectins. *Bioresource Technology*, 88, 75-79.
- Parijs, J. V., Broekaert, W. F., Goldstein, I. J., Peumans, W. J., 1991. Hevein: An anti-fungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex, *Planta*, 183, 258 – 262.
- Parijs, J. V., Broekaert, W. F, Peumans, W. J., Geuns, J. M., Laere A. J. V., 1992. Effect of the lectin UDA (*Urtica dioica agglutinin*) on germination and cell wall formation of *Phycomyces blakesleeana* Burgeff, *Archives of Microbiology*, 158, 19 – 25.
- Peumans, W. J., Van Damme, E. J. M., 1995. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiology*, 109. 347 - 352.
- Reisfeld, R. A. et al., 1962. Disk eletrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. *Nature*, 195, 281-283.
- Rios, F. J. B., Cavada, B. S., Medeiros, D. A., Moreira, R. A., Vasconcelos, L. M., Oliveira, J. T. A. (1996). Digestibility of plant lectins from Canavalia, Cratylia, Dioclea and Artocarpus genera. *Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*. 11, 227-284.
- 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., 2008a. Larvicidal activity of lectins from Myracrodruon urundeuva on *Aedes aegypti*. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, doi:10.1016/j.cbpc.2008.08.004.
- Sá, R.A., Napoleão, T.H., Santos, N.D.L., Gomes, F.S., Albuquerque, A.C., Coelho, L.C.B.B., Bieber, L.W., Paiva, P.M.G., 2008b. Induction of mortality on Nasutitermes corniger by Myracrodruon urundeuva heartwood lectin. *International Biodeterioration & Biodegradation* 62, 460–464.

Santos, A. F. S. ; Luz, L. A. ; Argolo, A. C. C. ; Teixeira, J. A. ; Paiva, P. M. G. ; Coelho, L. C. B. B., 2009. Isolation of a seed coagulant *Moringa oleifera* lectin. Process Biochemistry, doi: 1016/j.procbio.2009.01.002..

Sharon, N., Lis, H., 2001. The structural basis for carbohydrate recognition by lectins. The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates-2. Taiwan; Kuwer Academic Plenum Publishers, 1 - 19.

Sun, Y-D., Fu, L-D., Jia, Y-P., Du, X-J., Wang, Q., Wang, Y-H., Zhao, X-F., Yu, X-Q., Wang, J-X., 2008. A hepatopancreas-specific C-type lectin from the Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* exhibits antimicrobial activity. Molecular Immunology, 45, 348–361.

Tasumi, S., Yang, W-J., Usami, T., Tsutsui, S., Ohira, T., Kawazoe, I., Wilder, M. N., Aida, K., Suzuki, Y., 2004. Characteristics and primary structure of galactin in the skin mucus of the Japanese eel, *Anguilla japonica*. Developmental Comparative Immunology, 28, 325 - 335.

Thomas, G., Araujo, C. C., Souza, P. S., 1988. Avaliação das atividades antiinflamatória, analgésica e antipirética dos extratos aquosos de *Caesalpinia ferrea*, *Plantago major*, *Polygumum acre* e *Pterodon polygaefloras*. 10th Brazilian Symposlum in Medicinal Plants. São Paulo, Brazil.

Wang, H. X., Ng, T. B., 2003. Purification of Castamollin, a novel antifungal protein from Chinese chestnuts. Protein Expression & Purification, 32, 44 - 51.

Warburg, O.; Christian, W., 1942. Isolierung und kristallisation des gärungsferments enolase Biochem. 2., (310), 384-421.

Weis, W. I., Drickamer, K., 1996. Structural basis of lectin – carbohydrate recognition. Animal Reviews in Biochemistry, 65, 441-473.

Wellman-Labadie, O., Lakshminarayanan, R., Hincke, M. T., 2008. Antimicrobial properties of avian eggshell-specific C-type lectin-like proteins. *FEBS Letters*, 582, 699–704.

Wititsuwannakul, R., Wititsuwannakul, D. and Skulborirug, C., 1998. Lectin from the bark of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Phytochemistry*, 2 (47), 183-187.

Wong, J. H. and Ng, T. B., 2005. Isolation and characterization of a glucose/mannose/rhamnose-specific lectin from the knife bean *Canavalia gladiata*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 439, 91-98.

Xu, Q., Liu, Y., Wang, X., Gu, H., Chen, Z., 1998. Purification and characterization of a novel anti-fungal protein from *Gastrodia elata*, *Plant Physiology and Biochemistry*, 36, 889 – 905.

Figure 1 – Elution pattern of F80 on chitin column and PAGE.

A sample (8.7 mg of protein) was applied at flow rate of 20 ml/h on chitin (5 ml) and 2 ml fractions were collected. (A) Arrows indicated elution with 0.15 M NaCl (1), followed by 1 M NaCl (2) and 1 M acetic acid (CfePL) (3) and (B) Polyacrylamide gel electrophoresis for basic and native proteins 20% samples of CfePL (1) and cytochrome c (2) contained 250 and 20 µg, respectively; protein was stained with Amido black according Reisfeld et al. (1962) as well as (C) SDS-PAGE 12 % under denatured and reduced conditions, CfePL (3) under denatured and reduced or absence (4) conditions contained 250 µg of protein. Protein was stained with Coomassie Brilliant blue R-250.

Figure 2 - **(A)** Gel filtration of the chitin column on Superdex-75 equilibrated and eluted with NaCl 150 mM at 0.5 ml/min collected on 1-ml fractions, mAbs 215 nm. **(B)** Reverse phase chromatography in C-4 column by HPLC system (Shimadzu), mAbs. The column was equilibrated with solvent A (0.1% TFA in H₂O) and eluted using solvent B linear gradient 5-95% (90% acetonitrile: 10% H₂O: 0.1% TFA). **(C e D)** Reverse phase chromatography in C-18 column HPLC system (Shimadzu). The column was equilibrated with solvent A (0.1% TFA in H₂O) and used a non-linear gradient elution (5-100%) with solvent B (90% acetonitrile: 10% H₂O: 0.1% TFA).

Figure 3 – Hemagglutinating activity of CfePL in presence of different erythrocytes (A), pH values (B), ions (C) and glycoproteins (D), rabbit serum (1) bovine fetal serum (2), ovalbumin (3), fetuin (4), casein (5), colostrum (6) and human serum (7). Log HA of CfePL in 0.15 M NaCl with rabbit erythrocytes was 2.7.

Figure 1

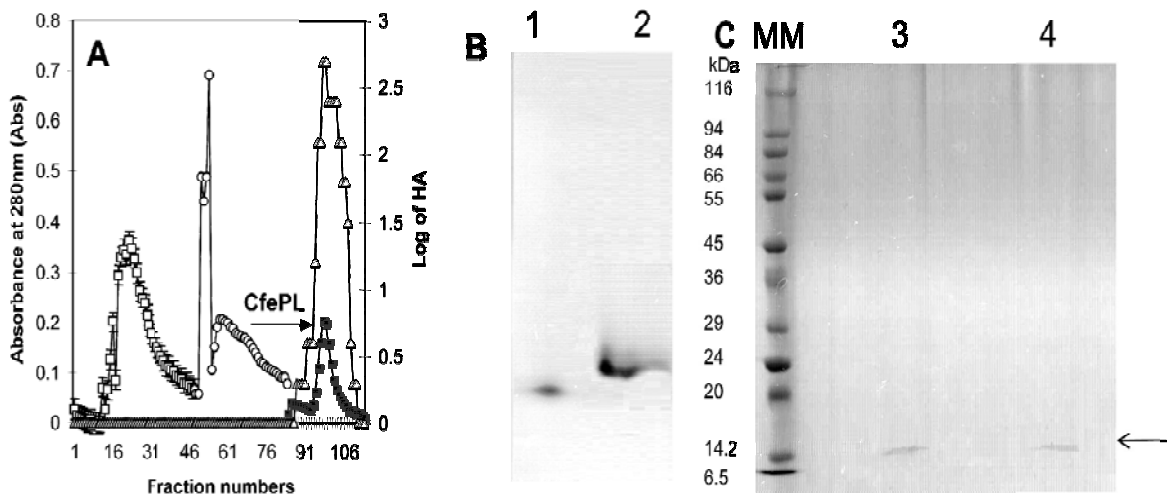


Figure 2

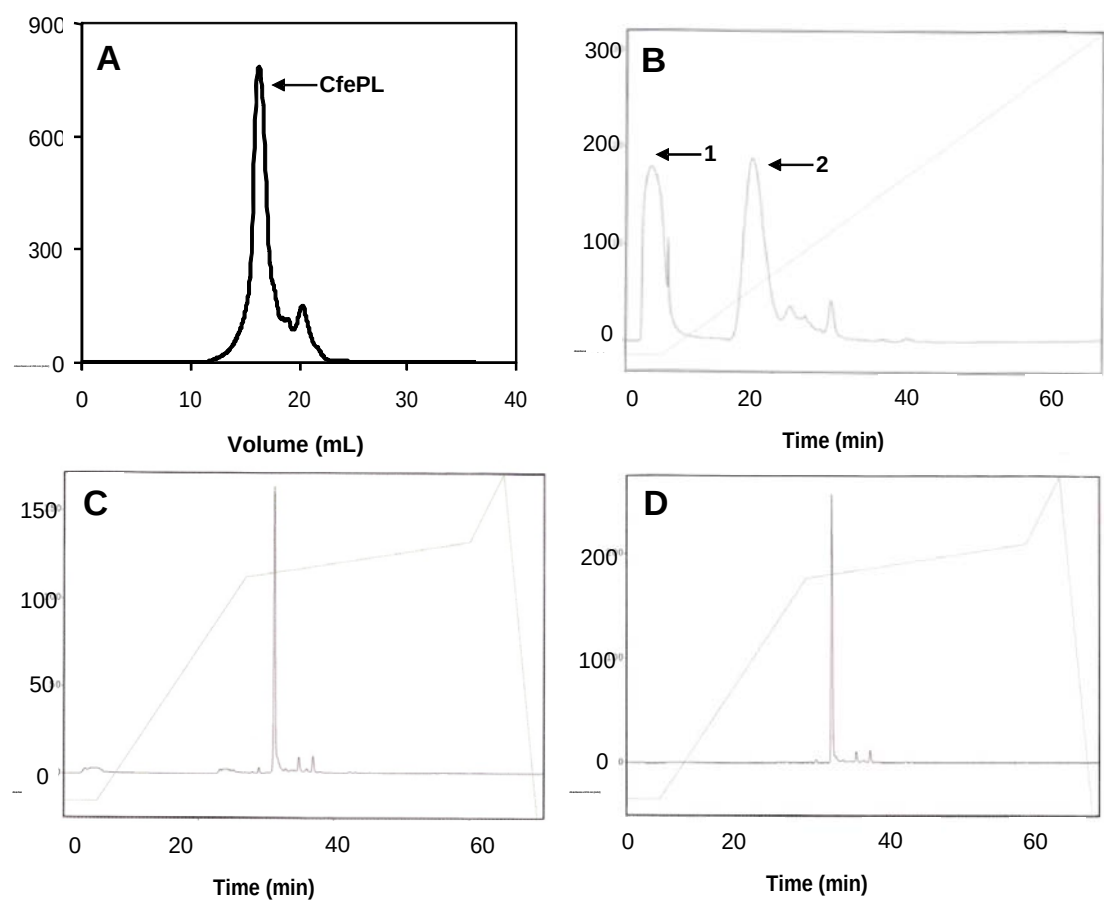


Figure 3

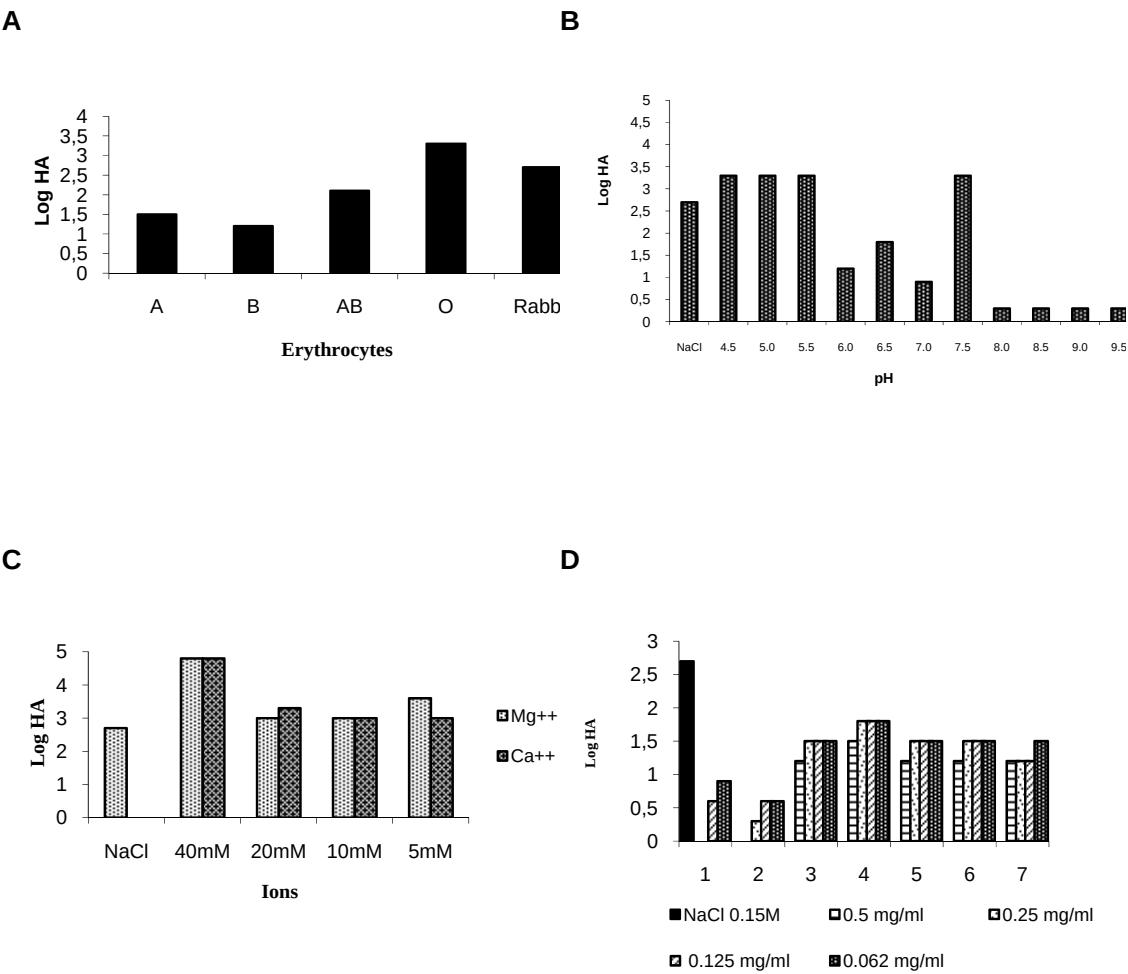


Table 1
Microorganisms

Bacteria	Local provided
<i>Bacillus subtilis</i> (+)	DAUFPE-16
<i>Bacillus</i> sp.(+)	LBUFRPE-05
<i>Corynebacterium bovis</i> (+)	LBUFRPE-03
<i>Escherichia coli</i> (-)	LBUFRPE-04
<i>Klebsiella</i> sp.(-)	LBUFRPE-01
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (-)	LBUFRPE-02
<i>Staphylococcus aureus</i> (+)	DAUFPE-01
<i>Streptococcus</i> sp . (+)	UFPEDA-295
Fungi	
<i>Aspergillus niger</i>	URM-5238
<i>Candida albicans</i>	URM-4388
<i>Coletotrichum gloesporioides</i>	URM-4911
<i>Trichoderma viride</i>	URM-3344

Stock cultures were maintained on Nutrient Agar medium (bacteria) and on Sabouraud Dextrose Agar medium (fungi), at 4 °C. All microorganisms were obtained from clinical material and provided by Departamento de Antibióticos (DA), Culture Collections (URM), Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Brasil and Laboratório de bacterioses (LB), Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Brasil. *In vitro*, antibacterial activity was determined by using Nutrient Agar and Nutrient Broth (10 g peptone, 5 g yeast extract per liter of distilled water) and antifungal activity was determined by using Sabouraud Dextrose Agar and Sabouraud Dextrose Broth (10 g glucose, 10 g peptone per liter of distilled water). (+) Gram-positive and (-) Gram-negative.

Table 2

Summary of CfePL purification

Sample	Volume (ml)	Protein (mg/ml)	HA ^a	SHA	Purification
EP	57	43.2	2048	47	1
F80	20	17.4	2048	117	2.5
CfePL	12	0.1	512	5120	22*

^aThe lectin hemagglutinating activity (HA) was measured with glutaraldehyde treated rabbit erythrocytes. Specific HA = SHA.

* In relation to F80 (500 µl) applied in chitin column.

EP = extract of pod in NaCl 0.15 M

F80 = ammonium sulphate fraction (0-80%)

CfePL= *Caesalpinia ferrea* pod lectin

Table 3

Antimicrobial activity of CfePL

Microorganism	Inhibition halo (mm) ^a
<i>Bacteria</i>	
<i>Bacillus subtilis</i> (+)	11.00 ± 3.5 ^b
<i>Bacillus</i> sp. (+)	11.25 ± 1.7 ^b
<i>Corynebacterium bovis</i> (+)	10.25 ± 0.5 ^b
<i>Escherichia coli</i> (-)	16.75 ± 0.5 ^a
<i>Klebsiella</i> sp.(-)	13.00 ± 0.8 ^a
<i>Staphylococcus aureus</i> (+)	10.25 ± 1.5 ^b
<i>Streptococcus</i> sp.(+)	13.75 ± 3.3 ^a
<i>Fungi</i>	
<i>Aspergillus niger</i>	12.87 ± 0.9 ^b
<i>Candida albicans</i>	08.62 ± 0.3 ^b
<i>Coletotrichum gloesporioides</i>	17.25 ± 1.5 ^a
<i>Trichoderma viride</i>	15.50 ± 1.3 ^a

^a Mean of four assays.

Similar letters (*a* or *b*) mean $p > 0.05$; different letters (*a* and *b*) mean $p \leq 0.05$.

(+) Gram-positive and (-) Gram- negative

4.2. Artigo 2: a ser submetido ao periódico *Journal of Applied Microbiology*

Growth inhibition of *Candida albicans* by *Caesalpinia ferrea* Pod Lectin

Growth inhibition of *Candida albicans* by *Caesalpinia ferrea* Pod Lectin

Neila C. A. Ximenes¹, Fernando Ruy², Maria G. Carneiro-da-Cunha¹, Luana C. B. B. Coelho¹,
Aníbal E. Vercesi², Maria T. S. Correia²

¹ Departamento de Bioquímica – Laboratório de Glicoproteínas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), 50670-901, Brazil, Recife, PE.

² Departamento de Patologia Clínica – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade de Campinas (FCM/UNICAMP), Campinas, SP, Brasil

* Correspondence

Profa. Dra. Maria Tereza Santos Correia.

Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, 50670-901,
Recife, PE, Brazil

Tel: +55-81-2126.8547; Fax: +55-81-21268576

e-mail: mtscorreia@gmail.com

Abstract

Aims: The aim of this work was to investigate the effect of *C. ferrea* pod Lectin (CfePL) on *Candida albicans* cell growth and respiration.

Methods and Results: An ammonium sulphate fractionation (F80), obtained by a *Caesalpinia ferrea* Mart. ex. Tul. Var. *ferrea* pod extract in 0.15 M NaCl was chromatographed on chitin column and adsorbed proteins (CfePL) were eluted with 1 M acetic acid (pH 4.0) dialyzed against 0.15 M NaCl (4 h, 4°C). CfePL (1.5 µg ml⁻¹) antifungal activity by diffusion disk assay, as well as, the effect of CfePL (10, 25 and 40 µg ml⁻¹) on inhibition growth curve and cell and mitochondrial respiration was performed. By diffusion assay it was observed *C. albicans* inhibition growth with 8,5 mm halo. Partial inhibition of the yeast growth curve in presence of CfePL at 10 and 25 µg ml⁻¹ was observed, while at 40 µg ml⁻¹ CfePL inhibited totally the *C. albicans* growth. CfePL (25 and 40 µg/mL, after 2 h) induced 30% and 45% of cell and 45 % and 90% of mitochondrial respiration inhibitions, respectively.

Conclusions: The new purified lectin (CfePL) inhibited *C. albicans* growth and reduced the *C. albicans* cell and mitochondrial respiration.

Significance and Impact of the study: This study is the first report that showed the effect of a lectin on *C. albicans* growth and respiration indicates the high potential use of the lectin for *C. albicans* clinical and therapeutic applications.

Keywords: *Caesalpinia ferrea* lectin; antifungal lectin; *Candida albicans*; fungus.

Introduction

Candidiasis are common infections of the skin, oral, cavity, esophagus, gastrointestinal tract, vulvovaginal and vascular system, and have become a major cause of mortality in immunocompromised patients, including those with AIDS (Sanglard & Odds, 2002; Georgopapadakou & Tkacz, 1995; Rex et al, 1993). The *Candida* genus is the main cause of fungal infections in humans (Segal, 2005). Within years 2001 – 2003 a total of 2803, *Candida* sp. strains were isolated from various tissues of patients in clinics hospital from the University of Campinas, UNICAMP, Brazil. Among other species, 57% of the strains were identified *C. albicans* (Annual Register of Mycoses, 2003). Currently chemotherapy against these fungi suffers a number of deficiencies such as low specificity, toxicity, and drug resistance. Mechanisms of action most of systemic antifungal agents is related the reaction with ergosterol (polyemic) or inhibit its synthesis (imidazoles and triazoles) (Diamond, 1991); however, there is an alarming increase in resistance to fungal agents (Sanglard & Odds, 2002, Rex et al, 1995). Therefore, it is very important to search for biological target that could be exploited for the rational development of improved therapies.

Antifungal proteins and peptides as their names imply, serve a protective fungal invasion. They are produced by a multitude of organism including leguminous flowering plant, non-leguminous flowering plants, fungi, bacteria, insects and mammal (Ng, 2004). Drugs, as statins, simvastatin and atorvastatin that are very used to lower blood cholesterol levels were tested in inhibiting the growth of *Candida* species and *Aspergillus niger* (Macreadie et al., 2006).

Lectins are sugar-specific binding proteins or glycoproteins with multiple combining sites capable of agglutinating cells (Yang et al., 2007). They are present in wide variety of organisms (Goldstein et al., 1986); a heterogeneous group of proteins or glycoproteins of non-immune origin with the ability to bind (non-covalently) to specific saccharide structures (Goldstein et al., 1980). Peptides and proteins have been evaluated as antibiotics for control of pathogens (Wang and Bunkers, 2000). Lectins have been considered as participants in plant defense mechanisms (Gaidamashvili and van Staden, 2002; Freire et al., 2002).

Caesalpinia ferrea Mart. ex Tul. var. *ferrea* (Leguminosae) it's a tree that grows throughout Brazil, especially in North and Northeast regions (Bragança, 1996; Lorenzi, 2002). *C. ferrea* preparations are used popularly for treatment of a number of diseases such diabetes, diarrhea, rheumatism, inflammation, pain, for cancer prevention and others (Balbach, 1972; Bragança, 1996; Hashimoto, 1996; Nakamura et al., 2002a; Gomes, 2003). Some of its therapeutic properties have been studied, including its antitumor effect (Nakamura et al., 2002a, 2002b).

Lectin activity was detected by hemagglutinating activity in *C. ferrea* pod. In the present study we demonstrated the effect of *C. ferrea* lectin on *C. albicans* growth.

Materials and Methods

Lectin purification

C. ferrea pods were harvested from plants at Ibimirim City, State of Pernambuco, Northeast Brazil, washed with distilled water, pods, without seeds dried at room temperature and powdered in a multiprocessor. A 10% (w/v) extract in 0.15 M NaCl was obtained by gentle shaking for 16 h, at 4°C. The extract was passed through gauze, centrifuged 10.000 x g for 15

min, and the supernatant mixed with activated charcoal, filtered and submitted to 0 to 80% (w/v) ammonium sulphate fractionation (F 0-80%, F80) by addition of solid salt. After 4 h at room temperature, the resuspended precipitate was dialyzed against distilled water followed by 0.15 M NaCl (F80). A sample (500 µl) of F80 (8.7 mg) was incubated (30 min) with chitin pre-equilibrated with 0.15 M NaCl containing 0.04 mM MgCl₂ (NaCl/Mg) and applied to a chromatographic column (5.0 x 1.5 cm). Proteins of each fraction were measured by absorbance at 280 nm. Unbound proteins were washed with NaCl/Mg and adsorbed proteins were eluted with 1.0 M NaCl containing 0.04 mM MgCl₂ followed by 1.0 M acetic acid. Fractions with HA, eluted with acetic acid were bulked, dialyzed with 0.15 M NaCl (4 h, 4°C) (CfePL) and stored at -20 °C.

Cell cultures and isolation of mitochondria

C. albicans ATCC90028 was obtained from the American type Culture Collection. The cells were cultured at 37 °C under vigorous aeration in YEPG medium. Mitochondria were isolated and purified as described by Milani et al. (2001), using lyticase to digest the cell wall then homogenizing the suspension and separating mitochondria through differential centrifugation. Cell and Mitochondrial protein concentration was determined by Biuret method (Gornall et al., 1949).

Antifungal assay by disc diffusion method

CfePL antifungal activity was investigated by the disc diffusion method (Bauer et al., 1966), performed in Sabouraud Dextrose Agar (SDA). Warmed medium (100 ml, 43 °C) and 0.5 ml of inoculum (10⁵ CFU ml⁻¹) were added; the solution was distributed in sterile Petri plates (90 X 15 mm) in portions of 10 ml and allowed to solidify. Following, 15 µl of CfePL

solution ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) were impregnated on sterile paper discs with 6 mm diameter and placed on agar. Discs containing 15 μl of sterile saline solution (0.9% w/v) and cyclohexamide (5 mg ml^{-1}) were used as negative and positive controls, respectively. Plates were incubated at 28°C for 48 h. Antifungal activity is revealed by a transparent ring around the paper disc. Zones of growth inhibition around discs were measured in mm. All determinations were made in quadruplicate. The results were subjected to a one-way analysis of variance and the significance between means determined by Tuckey's ($p > 0.05$).

***Candida albicans* growth measurements**

C. albicans cells were grown in YEPG medium at 37°C with 200 rpm shaking, in absence or presence of different concentrations of CfePL (10, 25 and $40 \mu\text{g ml}^{-1}$). Culture aliquots were collected each hour and the optical density of suspension was measured at 530 nm using a Hitachi U- 3000 spectrophotometer.

O₂ consumption measurements

Oxygen consumption was measured polarographically using a Clark-type electrode (Hansatech instruments, Norfolk, England). Cells or Mitochondria were incubated in medium (28°C) containing 125 mM sucrose, 65mM KCl, 10 mM HEPES, pH 7.2, 2.5 mM KH_2PO_4 , 1mM MgCl_2 , 1% bovine serum albumin, 5mM K-malate, 5mM K-piruvate and 5mM K-a-ketoglutarate. Added 10, 25 and $40 \mu\text{g ml}^{-1}$ CfePL concentrations.

Data analysis

Quantitative data were expressed as mean and standard error. Comparisons between control and treaties were made with T-test for non-paired Student. Statistical significance was

set at $p < 0.05$. The data processing and statistical analysis were performed using Graph Pad Prism®, version 4.02.

Results

In order to evaluate the effect of CfePL on *C. albicans* growth the diffusion disk assay and inhibition growth curve were performed. CfePL (1.5 ug) showed a halo of 08.62 ± 0.3 mm by the disk assay. The lectin at 10 ug ml^{-1} not inhibited cell growth, however at 25 and 40 ug ml^{-1} a partial and a complete inhibition growth, respectively, were observed, compared with the control (Fig. 1).

We measured the oxygen consumption of the mitochondrial respiration in the presence of CfePL at different concentrations. Figure 2 A, show, that the mitochondrial respiration, maintained by substrates generators of NADH was the $28 \text{ nmols O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$; decreased after CfePL addition to 14,7 and $2.7 \text{ nmols O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$ with an inhibition of 45% and 90% at 25 and 40 ug ml^{-1} concentrations respectively (Fig. 2 B). At 10 ug ml^{-1} of the lectin seemed to be a stimulation of the mitochondrial respiration.

Oxygen consumption of intact cells of *C. albicans* at 1, 2 and 3 h of incubations showed that at 10 ug ml^{-1} there was no change of the oxygen consumption in any incubation periods, however at 25 and 40 ug ml^{-1} there was a decrease, taking the best result at 2 h of incubation (Fig. 3 A) with an inhibition of 30 and 45% respectively, compared with the control (Fig. 3 B). The inhibition of respiratory activity of mitochondria isolated from mammalian (rat) by CfePL was also evaluated with no change in the states III and IV of the mitochondria.

Discussions

This study is the first to report that shows the decrease in the growth curve of *C. albicans* as well as the inhibition of the *C. albicans* cellular and mitochondrial respiration by a lectin.

Plant lectins showed antifungal action on fungi growth (Freire et al., 2002; Trindade et al., 2006; Wong et al., 2008). Some of these lectins binding chitin and are small proteins (Parijs et al., 1991; Parijs et al., 1992; Xu et al., 1998). Chrispeels and Raikhel (1991) suggested that these small chitin-binding proteins cross-linked chitin preventing cell expansion at the tip of the growing hyphae of fungi. CfePL is a binding-chitin lectin with 8 kDa similar to those described in the literature (data not shows).

Ruy et al. (2006) showed the importance of the classical respiratory chain (CRC) for the survival of the *C. albicans* cells when observed that the inhibitors such as rotenone (2 μ M) did not inhibit cell growth and that both (2 μ M) Antimicina A (AA) and (1 mM) KCN significantly inhibited cell growth. Milani et al. (2001) observed that these drugs partially and totally inhibit the consumption of oxygen in *Candida parapsilosis*. The observation that CfePL did not exercise any effect on respiratory activity of mitochondria isolated from mammalian (rat) is very important. The saliva antifungal peptide, histatina-5, showed toxic action not only on *C. albicans* mitochondria (Helmerhost et al, 2001). Also, Petruzelli et al. (2003) observed that histatin-5 presented a toxicity to mammals mitochondria involving the inhibition of respiratory activity and dissipation of transmembrane potential ($\Delta\Psi$), sharing similarities with to toxic mechanisms operating in *C. albicans*. Another peptide, of human lactoferrin induced

candidacidal activity due to release of intracellular calcium and its absorption by mitochondria (Lupetti et al., 2004).

The decreased of the mitochondrial respiration maintained by substrates generators of NADH after CfePL (25 $\mu\text{g ml}^{-1}$) addition was similar to AA action which is a blocker of complex III and the CRC, but has no effect on parallel respiratory chain (PAR), as observed by Ruy et al. (2006). CfePL (40 $\mu\text{g ml}^{-1}$) seemed inhibited both CRC and PAR better than the KCN inhibition, a terminal cytochrome oxidase inhibitor of both CRC and PAR as seen by Ruy et al (2006). Guerin and Camoungrand (1994) and Milani et al. (2001) noted that to *Candida parapsilosis* the oxygen can be reduced by three ways: CRC, PAR and alternative oxidase (AOX).

In conclusion our results showed that CfePL, a chitin-binding lectin, inhibiting the growth and cellular and mitochondrial respiration of *C. albicans*, with any changes to the mammals mitochondrial respiration suggest that the lectin may be acting in PAR CRC ways and can be used as an antifungal agent, principally in the *C. albicans* proliferation.

Acknowledgements

The authors express their gratitude to the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). They are also deeply grateful to Maria Barbosa Reis, João Antônio Virgínio, Elisangela J.Gomes and Edilene S.S. dos Santos (for technical assistance).

References

Annual register of Mycoses “Micoteca” (2003). Departamento de Patologia Clínica, hospital da Universidade de Campinas, SP, Brazil.

Balbach, A. As plantas que curam. São Paulo: Três, 1972, p. 302-303.

Bragança, L. A. R. Plantas Medicinais Antidiabéticas. Niterói: EDUFF Press, 1996. p. 172.

Diamond, R. D. 1991. The growing problem of mycoses inpatients infected with the human immunodeficiency vírus. Rev. Infect. Dis. 13: 480-486.

Freire, M. G.; Gomes, V. M.; Corsini, R. E.; Machado, O. L. T.; De Simoni, S. G.; Novello, J. C.; Marangoni, S.; Macedo, M. L. R., 2002. 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.

Gaidamashvili, M.; Standen, J. V., 2002. Interactin of lectin-like proteins of South African medicinal plants with *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*. Journal of Ethnopharmacology, v. 80, p. 131 – 135.

Georgopapadakou, N. H. and Tkacz, J. S. 1995. The fungal cell wall as a drug target. Trends Microbiol. 3: 98-104.

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

Gomes, M., 2003. As plantas da saúde – guia de tratamentos naturais. 3. ed. Paulinas, São Paulo, p. 232.

Gornall A. G., Bardawill C. J., David M. J., 1949. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. Biological Chemistry, 177: 751-757.

Hashimoto, G. (ed.). Illustrated Cyclopedia of Brazilian Medicinal Plants. Aboc-Sha: Kamakura, p. 646, 1996.

Guérin, M. G, Camougrand N. M, 1994. Partitioning of electron flux between the respiratory chains of the yeast *Candida parapsilosis*: parallel working of the two chains. *Biochim Biophys Acta* 1184:111-117

Helmerhorst, E. J., Troxler, R. F., Oppenheim, F. G. 2001. The human salivary peptide histatin 5 exerts its antifungal activity through the formation of reactive oxygen species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 14637-14642.

Lorenzi, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 4. ed., v. 1. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2002, p. 162.

Lupetti A., Brouwer, C. P. J. M., Dogterom-Ballering, H. E. C., Senesi, S., Campa M., van Dissel J. T., Nibberring, P. H, 2004. Release of calcium from intracellular stores and subsequent uptake by mitochondria are essential for candidacidal activity of an N-terminal peptide of human lactoferrin. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 54, 603-608.

Macreadie, I. G., Johnson, G., Schlosser, T., Macreadie P. I., 2006. Growth inhibition of *Candida* species and *Aspergillus formigatus* by statins

Nakamura E. L.S.; Kurosaki, F.; Arisawa, M.; Mukainaka, T.; Takayasu, J.; Okuda M.; Tokuda, H. Nishino, H. Pastore JR, F., 2002a. Cancer chemopreventive effects of constituents of *Caesalpinia ferrea* and related compounds. *Cancer Letters*, v.177, p. 119 – 124.

Nakamura E. L S.; Kurosaki, F.; Arisawa, M.; Mukainaka, T.; Takayasu, J.; Okuda M.; Tokuda, H. Nishino, H.; Pastore JR, F., 2002b. Cancer chemopreventive effects of a Brazilian folk medicine, juca, on in vivo two-stage skin carcinogenesis, *Journal of Ethnopharmacology*, v. 81, p. 135 – 137.

Ng, TB, 2004. Antifungal proteins and peptides of leguminous and non-leguminous origins. Peptides, v. 25, p. 1215-22.

Petruzzelli, R., Clementi, M. E., Marini, S., Coletta, M., Di Stasio, E., Giardina, B., Misiti, F., 2003. Respiratory inhibition of isolated mammalian mitochondria by salivary antifungal peptide histatin-5. Biochemical and Biophysical Research Communications 311, 1034-1040.

Rex J H, Pfaller M A, Rinaldi G.,PolaK A & Galgiani J N, 1993. Antifungal susceptibility testing.Clinical Microbiology, 6: 367-381.

Rex, J. H., Rinaldi, G. and Pfaller, M. A. 1995. Resistance of *Candida* species to fluconazole. Antimicrob.Agents Chemother. 39: 1-8.

Ruy, F; Vercesi, A E; Kowaltowsk, A J., 2006. Inhibition of specific electron transport pathways leads to oxidative stress and decreased *Candida albicans* proliferation. Journal Bioenergetics Biomembranes, v. 38, p.129–135.

Sanglard, D. and Odds, F. C., 2002. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. Lancet infect. Dis. 2: 73-85

Milani, G, Jarmuskiewicz W, Sluse-Goffart C M, Schreiber A Z, Vercesi a E, Sluse F E 2001. Respiratory chain network in mitochondria of *Candida parapsilosis*: ADP/O appraisal of the multiple electron pathways. FEBS Letter 508: 231-235.

Segal E., 2005. Candida, still number one—what do we know and where are we going fromthere? Mycoses 48: 3-11.

Wang, X.; Bunkers, G. J. Potent heterologous antifungal proteins from cheeseweed (*Malva parviflora*), 2000. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 279, p. 669 - 673.

Yang, H; Luo, T; Li, S; Xu, X. Purification and characterization of a calcium-independent lectin (PjLec) from the haemolymph of shrimp *Penaeus japonicas*, 2007. Fish & Shellfish Immunology, v. 22, p.88-97.

Figure Legends

Figure 1 - *C. albicans* growth curve. *C. albicans* were cultured in complete liquid medium in the absence (Control, $\square$) or presence of $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ CfePL ($\diamond$), $25 \mu\text{g ml}^{-1}$ CfePL ($\blacktriangle$) or $40 \mu\text{g ml}^{-1}$ CfePL ($\blacktriangledown$), as shown. Cell growth was monitored by optical density (O.D) measurements. The results are representative of at least three independent and similar experimental repetitions.

Figure 2 - Effect of CfePL on oxygen consumption of *C. albicans* mitochondrial respiration (A) and inhibition percentual (B). Isolated *C. albicans* mitochondria ($0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$) were added to 10 mm K-hepes, pH 7.2, containing 125 mm sucrose, 65mM KCl, 1mM MgCl_2 , 2.5 mM K_2HPO_4 , 1% BSA, 5mM K-malate, 5mM K-pyruvate and 5mM k-a-ketoglutarate. Untreated *C. albicans* mitochondria (control).

Figure 3 - Effect of CfePL on oxygen consumption of *C. albicans* cell respiration at $25 \mu\text{g ml}^{-1}$ and $40 \mu\text{g ml}^{-1}$ of CfePL (A) and inhibition percentual at $25 \mu\text{g ml}^{-1}$ and $40 \mu\text{g ml}^{-1}$ at $25 \mu\text{g ml}^{-1}$ of CfePL (B). CfePL were added to intact cells suspended in complete medium, and O_2 consumption was determined after 2 h. The results are averages $\pm$ SEM O_2 consumption relative to untreated cells (control) of at least four independent experimental repetitions.

Figure 1

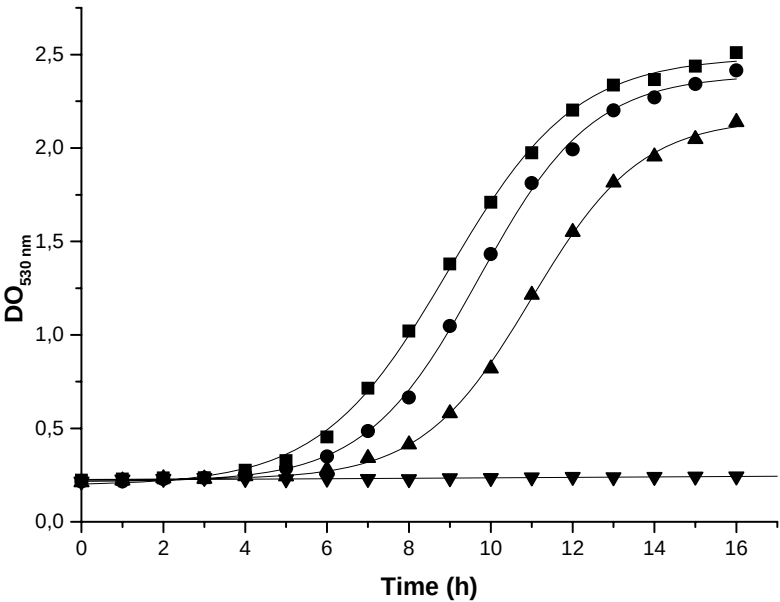
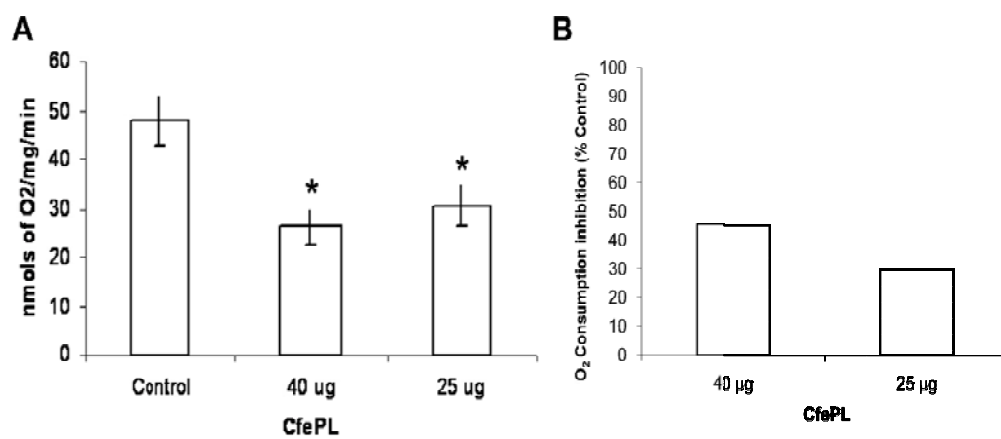


Figure 2

Figure 3

4. 3. Artigo 3: a ser submetido ao periódico *International Biodeterioration & Biodegradation*

Insecticidal activity of *Caesalpinia ferrea* pod lectin on *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae)

Insecticidal activity of *Caesalpinia ferrea* pod lectin on *Nasutitermes corniger*
☆
(Isoptera: Termitidae)

Neila C. A. Ximenes^a, Thiago H. Napoleão^a, Roberto A. Sá^a, Auristela C. Albuquerque^b,
Haroulido S. Xavier^c, Patrícia M. G. Paiva^a, Maria G. Carneiro-da-Cunha^a, Luana C. B. B.
Coelho^a, Maria T. S. Correia^{a*}

^aLaboratório de Glicoproteínas, Departamento de Bioquímica-CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50.670-420, Recife, Pernambuco, Brasil.

^bDepartamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Dois Irmãos, 52171-030, Recife, Pernambuco, Brasil.

^cLaboratório de Farmacognosia, Departamento de Ciências Farmacêuticas-CCS, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50740-521, Recife, Pernambuco, Brasil.

☆ Scientific relevance: *Caesalpinia ferrea* pod lectin (CfePL) is a protein obtained in milligram quantities by a simple protocol, resistant to proteolysis by trypsin and chymotrypsin, which showed insecticidal effect on *Nasutitermes corniger*. This activity potentiates its use as a tool that can be applied in the termite control

.

* Corresponding author. Tel.: +55 8121268540; fax: +55 8121268576. E-mail address: mtscorreia@gmail.com.

Abstract

Caesalpinia ferrea is a very hardwood with long durability widely used in construction and shipbuilding, whose fruits, utilized in popular medicine, are being noted by its hardness and smell pleasant and peculiar. *C. ferrea* pod lectin (CfePL) was isolated through chitin chromatography and characterized as a pure lectin through AKTA purifier and HPLC systems and analysed for the presence of non-protein contaminants and evaluated by insecticidal and repellent assays on *Nasutitermes corniger*. Lectin activity was inhibited by N-acetylglucosamine monosaccharide and glycoproteins from rabbit and bovine serum. CfePL was free of secondary plant metabolites that can promote insect mortality. CfePL in all concentrations induced mortality of termites. CfePL was submitted to trypsin or chymotrypsin treatment and remained active after incubation with these serine proteases. CfePL LC₅₀ values, after 4 days, were 0.176 mg ml⁻¹ and 0.764 for workers and soldiers, respectively. Repellence assay indicated that the lectin did not induce a rejection effect. CfePL, a lectin obtained in quantities of milligrams for a simple and reproducible protocol from *C. ferrea* pods, material abundance, of easily accessible and low cost, presents termiticidal activity of economic interest to wooden industry or agriculture.

Keywords: *Caesalpinia ferrea*, pod lectin, legume lectin, *Nasutitermes corniger*, termite.

Introduction

The termite are social insects and predominantly tropical and constitute the order Isoptera, so hot and humid climates such as Brazil are favorable for its growth (Duarte et al., 2008). They are the most severe destructive agents of wood (Paes e Vital 2000), however, the underground, are responsible for larger amounts of losses of wood in the world (Hunt e Garrat, 1967, Richardson, 1993). The degradation of wood caused by termites is economically one of the biggest problems of using same (Deka et al., 2002; Cheng et al., 2007).

Termites play a key role in tropical ecosystem, as they actively participate in decomposition and cycling of nutrients in natural systems (Costa-Leonardo, 2002; Duarte et al., 2008). The family Termitidae is the most important and abundant species in the world, with about 75% of all termites (Constantino, 2002; Berti Filho, 1993; inward et al., 2007) and the subfamily Nasutitermitinae is the most diversified group in Isoptera (Kambhampati and Eggleton, 2000). The genus *Nasutitermes* are able to invade the urban and destroy objects made of wood (Duarte et al., 2008) and feeds mainly on wood and builds arboreal carton nests at several meters height, which are connected to the ground by galleries (i.e. artificial tunnels) along the tree trunk (Krauss et al., 2005). *Nasutitermes corniger* is the most dominant species of this genus and more distributed (Scheffrahn et al., 2005).

The plants develop mechanisms of defense against microorganisms, insects, and herbivores or in responses to abiotic stress. They use various forms of defense among which, the morphological changes and chemical defense that include primary metabolites (e.g.

proteinase, thionins, lectins) and secondary metabolites (e.g. alkaloids, tannins and rotenoids) (Chrispeels and Raikhel, 1991, Peumans and Van Damme, 1995).

Lectins are proteins or glycoproteins of ubiquitous distribution in nature, which have at least one carbohydrate or derivative binding site without catalytic function or immunological characteristics (Sharon and Lis, 2001). Due to this feature the lectins shown to be important tools for research in various campuses of science, particularly chemical processes, medical and biological. Several lectins have revealed effects in different life stages of insects that indicate insecticidal activity against Coleoptera (Macedo et al., 2002; Sadeghi et al., 2006), Homoptera (Dutta et al., 2005), Diptera (Kaur et al., 2006), Coleoptera and Lepidoptera (Macedo et al., 2007), Isoptera (Sá et al., 2008a, Silva et al., 2008) and other order insect representatives.

Caesalpinia ferrea Mart. is a legume broadly distributed at North and Northeast region of Brazil and is locally known as Jucá or Pau-ferro (iron-wood). Its wood is very hard and very heavy, with long natural durability, keeping it perfect for long years, even in water (Santos, 1987). The tree is widely used in streets and squares a forestation and landscaping and their fruits are popularly used in medicinal, apiculture and fodder applications (Rizzini and Mors, 1995).

Lectin activity was detected in *C. ferrea* pod (CfePL), a new legume lectin that has been purified in your laboratory; it's a thermostable lectin, with a potent antimicrobial activity.

In this work we propose CfePL a pure lectin with insecticidal activity against *N. corniger*.

2. Material and methods

2. 1. *Lectin purification*

C. ferrea pods were harvested from plants at Ibimirim City, State of Pernambuco, Northeast Brazil. *C. ferrea* pod lectin (CfePL) was obtained through a sequential purification protocol. Pods were washed with distilled water, pods, without seeds dried at room temperature, powdered in a multiprocessor and a 10 % (w/v) extract in 0.15 M NaCl was obtained by gentle shaking for 16 h, at 4 °C. The extract was passed through gauze, centrifuged 10.000 x g for 15 min, filtered and submitted to 0 to 80 % (w/v) ammonium sulphate fractionation (F 0-80 %, F80) by addition of solid salt. After 4 h at room temperature, the resuspended precipitate was dialyzed against distilled water followed by 0.15 M NaCl (F80). A sample of F80 (8.7 mg / 500 µl) was incubated (30 min) with chitin pre-equilibrated with 0.15 M NaCl containing 0.04 mM MgCl₂ (NaCl/Mg) and applied to a chromatographic column (5.0 x 1.5 cm). Proteins of each fraction were measured by absorbance at 280 nm. Unbound proteins were washed with NaCl/Mg and adsorbed proteins were eluted with 1.0 M NaCl containing 0.04 mM MgCl₂ followed by 1.0 M acetic acid. Fractions with high activity, eluted with acetic acid were bulked, dialyzed with 0.15 M NaCl (CfePL) and stored at -20 °C. CfePL obtained in the purification process had their hemagglutinating activity (HA) evaluated with 2.5 % (v/v) glutaraldehyde-treated erythrocyte suspension in 0.15 M NaCl (Bing et al., 1967) according to Correia and Coelho (1995). HA (titer) was defined as the lowest dilution of the

sample that showed hemagglutination. HA inhibition assays were performed with 200 mM N-acetylglucosamine and 0.5 mg ml⁻¹ solution of glycoproteins from rabbit and bovine serum.

2.2. *Effect of proteolytics enzymes on CfePL HA*

The assay was made according to Rios et al. (1996). CfePL (7.7 µg) was incubated (37°C, 2 h) with bovine trypsin (5.0 µg) or chymotrypsin (5.0µg) in 0.1 M Tris-HCl, pH 8.2 (50µl) and the enzyme reaction was stopped by addition (13 µl) of phenylmethylsulphonylfluoride (PMSF) in 0.1 M Tris-HCl, buffer pH 8.2 at 3:1 proportion 9 (v/v). The effect of enzymes on CfePL was evaluated by measurement of HA.

2.3. *Phytochemical analysis*

The isolated lectin (15 ml containing 15 mg 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. *Insecticidal assay*

Termites species *N. corniger* was identified 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).

Insecticidal activity was evaluated by a bioassay based on the method described by Kang et al. (1990). Each experimental unit consisted of a Petri plate (90 x 15 mm) with the deep plate covered by filter paper. A filter paper disk of 4 cm diameter soaked with 200 µl of lectin (0.1, 0.2, 0.5, 0.8 or 1 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 OriginTM 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 by Probit Analysis method (Statplus, 2006) with a reliability interval of 95%.

2. 5. *Repellence assay*

The potential repellent property from CfePL was evaluated using an assay based on Su et al. (1982). Petri plates (100 x 15 mm) were filled up with 2% agar solution until there was no space between the superior surface of agar and plate covers. After solidification, wells are

made in 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 μ l of lectin (0.2, 0.5, 0.8 and 1 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.

3. Results

A quantity 10 g from *C. ferrea* pod allowed to obtain 48 mg of pure CfePL through a simple established protocol. CfePL is a thermostable lectin and the reasonable stability with respect to pH variations. Proteolytic treatment of CfePL with either trypsin or chymotrypsin did not eliminate HA.

Isolated lectin sample was submitted to TLC to evaluate the presence of non- protein contaminant. The chromatograms revealed a total absence of metabolites secondary as flavonoids, condensed proanthocyanidins, leucoanthocyanidins, alkalis, polyphenols, coumarins, cinnamic derivatives, hydrolysable tannins, saponins, steroids, iridoids and terpenes.

CfePL free of secondary metabolite was evaluated on *N. corniger*. Contact with the lectin in all concentrations induced mortality of termites. The treatments with the lectin concentration (0.5, 0.8 and 1 mg ml⁻¹) induced death of all insects after 7 days while 0.1 and 0.2 mg ml⁻¹ concentrations promoted 100% mortality after 13 days for workers (Fig. 1). The 0.8 and 1 mg ml⁻¹ concentrations promoted a survival rate of 50% on the 2 day while 0.1, 0.2 and

0.5 mg ml⁻¹ concentrations did so on the 3 day. In negative control 100% mortality was observed after 19 days and survival rate was lower than 50% around 8 days.

Results with all lectin treatment for workers showed statistically significant difference in relation to control. LC₅₀ of 0.176 mg ml⁻¹ was determined after 4 days. CfePL treatment at 1mg ml⁻¹ induced death of all soldiers after 8 days. Mortality 100% was promoted by treatment with CfePL at 0.8 and 0.5 mg ml⁻¹ after 9 days; 0.2 and 0.1 mg ml⁻¹ after 11days (Fig. 2). Survival rate 50 % was observed around 4, 4, 4, 7, 7 days for treatments with 1, 0.8, 0.5, 0.2 and 0.1 mg ml⁻¹, respectively. LC₅₀ value for soldiers was 0.764 mg ml⁻¹, also after 4 days. In negative control 100% mortality was observed after 18 days and survival rate of 50% after 12 days. Statistical analysis using Student's t-test ($p < 0.05$) showed that result were significantly different.

Construction of tunnels toward lectin and control was observed by the repellency assay. The termite tunnels opened up but not closed in both directions toward the lectin as the control. Indicating that the lectin had no repellent effect.

Discussion

Different *C. ferrea* tissues have been used in several biological activities as anti-fungal, anti-ulcer, analgesic (Lima et al., 1994; Bacchi et al., 1995; Carvalho et al., 1996; Thomas et al., 1988); their fruits have been used for popular treatment of diabetes (Balbach, 1972).

The simple and efficient protocol used to isolated CfePL in this work yielded milligram quantities of lectin (48 mg from 10 g of pod flour) and high HA stimulating evaluation of lectin as a bioactive component of pod.

CfePL showed to be free of secondary metabolites, compounds that can be responsible for insecticidal activity in preparations obtained from plants. The absence of secondary metabolites in CfePL, indicated that in the termiticidal activity detected had no interference of these compounds suggesting termiticidal action of lectin.

CfePL was toxic on termites in all tested concentrations since the time of life for insects in contact with lectin was reduced regarding negative control. Sá et al. (2008a) reported that lectin from *M.urundeuva* heartwood (MuHL) showed LC_{50} of 0.248 mg ml⁻¹ and 0.199 mg ml⁻¹ on *N. corniger* workers and soldiers, after 4 days, respectively and Silva et al. (2008) reported that lectin from *Cladonia verticillaris* lichen (ClaveLL) showed LC_{50} of 0.196 mg ml⁻¹ and 0.5 mg ml⁻¹ on *N. corniger* workers and soldiers, after 12 and 10 days, respectively. LC_{50} for CfePL was calculated after 4 days.

LC_{50} values showed that CfePL was less effective on soldiers than MuHL but a little more efficient on workers. Similarly MuHL and ClaveLL, termiticidal effect of CfePL yielded different LC_{50} values for soldiers and workers cast but, on the other hand, CfePL was more effective on workers similar to ClaveLL but with a 10 times lower concentration (Silva et al., 2008); MuHL was more toxic for soldiers (Sá et al., 2008a). CfePL, as well as MuHL, ClaveLL and other lectins with insecticidal properties, showed affinity to N-acetyl-D-glucosamine and also was adsorbed on chitin matrix. In insects, the peritrophic matrix constitutes a membrane found in the midgut containing chitin, which separates the contents of the gut lumen from the digestive epithelial cells (Silva et al., 2008). Lectins able to bind N-acetylglucosamine or chitin showed insecticidal effect on *Aedes aegypti* (Sá et al., 2008b), *Collosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfaciatus* (Macedo et al., 2002), *Drosophila melanogaster* (Trigueiros et al., 2003) and *Anagasta kuehniella* (Coelho et al., 2007).

CfePL was active after incubation with bovine trypsin similar of MuHL (Sá et al., 2008a). The detection of HA after contact with proteases similar to those forms found in the digestive system of insects is an interesting CfePL feature as refereed to insecticidal *Annona coriacea* and *Bauhinia monandra* lectins which were resistant to digestion by trypsin (Coelho et al., 2007, Macedo et al., 2007). Sá et al (2008 a) suggested that the termiticidal tract effect of MuHL may be due to lectin action on digestive tract of termites and showed that this lectin is resistant to proteolytic degradation by trypsin.

Bioassays are used to analyze the effect of plant lectins, with the inclusion of lectins in artificial diets and offered to insects has been suggested that the toxic action of the lectin is related to the connection glycoproteins present in the gut of insects (Macedo et al., 2007).

Is still unknown and the mechanism of action of lectins against insects, but it is likely that they are involved in linking the glycoproteins of the midgut epithelium cells (Sauvion et al., 2004) may be related to proteolytic enzymes and proteins in the assimilated lectins which can interfere with their functions, inhibiting digestion and absorption and causing the deprivation nutricional (Leite et al., 2005; Coelho et al., 2007) among other proposed mechanisms. CfePL may be promoting the mortality of termites through one of these mechanisms already proposed for them lectins.

Termites are insects that have the ability to build tunnels and galleries and on stress condition at the presence of possible toxic substances they can react closing these spaces to avoid physical contact (Su et al., 1982). The investigation of repellent activity revealed that CfePL did not have repellent property on termites, suggesting that insecticidal activity was due to direct action of lectin. Similarly to CfePL, MuHL and ClaveLL did not show repellent properties (Sá et al., 2008a; Silva et al., 2008).

C. ferrea pod lectin (CfePL) is a novel lectin obtained by a simple purification protocol, in milligram quantities which potential action against *N. corniger*.

Acknowledgements

The authors express their gratitude to the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). They are also deeply grateful to Maria Barbosa Reis and João Antônio Virgínio (for technical assistance).

References

- Bacchi, E. M.; Setie, J.A. A., 1995 Anti-ulcer action and toxicity of *Styrax camporum* and *caesalpinia ferrea*. *Planta Médica* 60, 118 – 120.
- Balbach, A. As plantas que curam. 1972. São Paulo: Três, p. 302-303.
- Bandyopadhyay, S., Roy, A., Das, S., 2001. Binding of garlic (*Allium sativum*) leaf lectin to the gut receptors of homopteran pests is correlated to its insecticidal activity. *Plant Science* 161, 1025–1033.
- Berti-Filho, E. (Coord.), 1993. Manual de pragas em florestas – Cupins ou Térmitas. São Paulo: IPEF/SIF, 3.
- 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.

- Carvalho, J. C. T.; Texeira, J. R. M.; Souza, P. J. C.; Bastos, J. K.; Dos Santos Filho, D.; Sarti, S.J. Preliminary studies of analgasic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 53, 175 -178, 1996.
- 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.
- 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.
- Correia, M.T.S., Coelho, L.C.B.B., 1995. Purification of a glucose/mannose specific lectin, Isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart (amarante bean). *Applied Biochemistry and Biotechnology* 55, 261–273.
- Costa-Leonardo, A. M., 2002. *Cupins-praga: morfologia, biologia e controle*. Rio Claro; SP: Edifurb.
- Constantino, R., 2002. Na Illustrated Key to Neotropical termite genera (Insecta: Isoptera) based primarily on soldiers. *Zootaxa*, 67, 2002, 01-40.
- Chrispeels, M.J., Raikhel, N.V., 1991. Lectins, lectin genes and their role in plant defense. *Plant Cell* 3, 1–9.
- 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.
- Duarte, F. G., Santos, G. A., Rosado, F. R., Delariva, R. L., Sampaio, A. C. F., 2008. Cupins (Insecta: Isoptera) na arborização urbana da zona 1 de Maringá-PR. *Revista em Agronegócios e Meio Ambiente*, 1, 1, 87-99.

- Dutta, I.; Majunder,P.; Saha, P.; Ray, K.; Das, S., 2005. Constitutive and phloem specific expression of *Allium sativum* leaf agglutinin (ASAL) to engineer aphid (*Lipaphis erysimi*) resistance in transgenic Indian mustard (*Brassica juncea*). Plant Science, v. 169, p. 996-1007.
- Fitches, E., Woodhouse, S.D., Edwards, J.P., Gatehouse, J.A., 2001. In vitro and in vivo binding of snowdrop (*Galanthus nivalis* agglutinin; GNA) and jackbean (*Canavalia ensiformis*; Con A) lectins within tomato moth (*Lacanobia oleracea*) larvae; mechanisms of insecticidal action. Journal of Insect Physiology 47, 777–787.
- Hant, G. M., Garratt, G. A., 1967. Wood preservation. 3 ed. New York, Mc Graw-Hill, 433.
- Harborne, J.B., 1998. Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis. Chapman & Hall, London.
- Inward, D.J.G., Vogler, A.P., Eggleton, P., 2007. A comprehensive phylogenetic analysis of termites (Isoptera) illuminates key aspects of their evolutionary biology. Molecular Phylogenetics and Evolution 44, 953–967.
- Kambhampati, S., Eggleton, P., 2000. Taxonomy and phylogeny of termites. In: Abe, T., Bignell, D.E., Higashi, M. (Eds.), Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 1–23.
- 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 antiinsect activity against melon fruit fly, *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) and anti-cancer effect on human cancer cell. Archives of Biochemistry and Biophysics 445, 156–165.
- Krauss,M., Wilcke, W Christopher Martius,C., Adelmair G. Bandeira, A. G., Garcia,M. V. B., Amelung, W., 2005. Atmospheric versus biological sources of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in a tropical rain forest environment. Environmental Pollution, 135, 143-154.

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.

Lima, E. C.; Cury, A. E.; Fischman, O. G.; Gieshrecht, A. M.; Paulo, O.G. Atividade antifúngica de extratos de plantas medicinais sobre *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton* isolados de pacientes com dermatofitoses. 13th Brazilian Symposium in Medicinal Plants. Ceara, Brazil, 1994.

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., 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.

Markhan, K.R., 1982. *Techniques of Flavonoid Identification*. Academic Press, London.

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

Paes, J. B.; Vital, B. R., 2000. Resistência natural da Madeira de cinco espécies de eucalipto a cupins subterrâneos em testes de laboratório. *Revista Arvore*, Viçosa, 24, 1, 1-6.

Peumans, W.J., Van Damme, E.J.M., 1995. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiology* 109, 347–352.

Richardson, B. A., 1993. *Wood preservation*. 2 ed. London: E & FN SPON, 226.

Rios, F. J. B., Cavada, B. S., Medeiros, D. A., Moreira, R. A., Vasconcelos, L. M., Oliveira, J. T. A. 1996. Digestibility of plant lectins from Canavalia, Cratylia, Dioclea and Artocarpus genera. *Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*. V. 11, p.227-284.

Rizzini, C.T.; Mors, W.B. 1995. *Botânica Econômica Brasileira*, 2a Edição. Âmbito Cultural Edições Ltda. Rio de Janeiro.

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.

Sá, R.A., Napoleão, T.H., Santos, N.D.L., Gomes, F.S., Albuquerque, A.C., Coelho, L.C.B.B., Bieber, L.W., Paiva, P.M.G., 2008a. Induction of mortality on *Nasutitermes corniger* by *Myracrodruon urundeuva* heartwood lectin. *International Biodeterioration & Biodegradation* 62, 460–464.

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., 2008b. Larvicidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* on *Aedes aegypti*. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, doi:10.1016/j.cbpc.2008.08.004.

Santos, E., 1987. *Nossas Madeiras*. Belo Horizonte, Itatiaia, v. 7. p. 218.

Sauvion, N., Nardonb, G., Febvay, G., Gategouse, 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.

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.

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.

Sharon, N., Lis, H., 2001. The structural basis for carbohydrate recognition by lectins. *The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates-2*. Taiwan; Kuwer Academic Plenum Publishers, 1 - 19.

Silva, M. D. C., Sá, R. A., Napoleão, T. H, Gomes, F. S., Santos, N. D. L., Albuquerque, A., C.. Xavier, H. S., Paiva, P. M. G., Correia, M. T. S., Coelho, L. C. B. B, 2008. Purified *Cladonia verticillaris* lichen lectin: Insecticidal activity on *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae). *International Biodeterioration & Biodegradation*, doi: 10.1016/j.ibiod.2008.11.002

Stiasny, E., 1912. The Qualitative Detection and Differentiation of Vegetable Tannins. Collegium, Haltingen.

Su, N., Tamashiro, M., Yates, J.R., Haverty, M.I., 1982. Effects of behavior in the evaluation of insecticides for prevention of or remedial control of the Formosan subterranean termite. *Journal of Economic Entomology* 75, 188–193.

Thomas, G.; Araújo, C. C.; Souza, P. S. Avaliação das atividades antiinflamatória, analgésica e antipirética dos extratos aquosos de *Caesalpinia ferrea*, *Plantago major*, *Polygonum acre* e *Pterodon polygaeflorus*. 10th Brazilian Symposium in Medicinal Plants. São Paulo, Brasil, 1988.

Trigueros, V., Lougarre, A., Ali-Ahmed, D., Rahbe´, Y., Guillot, J., Chavant, L., Fournier, D., Paquereau, L., 2003. Xerocomus chrysenteron lectin: identification of a new pesticidal protein. *Biochimica et Biophysica Acta* 1621, 292–298.

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.

Yu, L.G., Fernig, D.G., White, M.R.H., Spiller, D.G., Appleton, P., Evans, R.C., Grierson, I., Smith, J.A., Davies, H., Gerasimenko, O.V., Petersen, O.H., Milton, J.D., Rhodes, J.M., 1999. Edible mushroom (*Agaricus bisporus*) lectin, which reversibly inhibits epithelial cell proliferation, blocks nuclear localization sequence--dependent nuclear protein import. *Journal of Biological Chemistry* 274, 4890–4899.

Figure captions

Fig 1. Survival rate % of *Nasutitermes corniger* workers in presence of CfePL. Treatment was at 1 (Δ), 0.8 (∇), 0.5 ($\blacklozenge$), 0.2 ($\circ$) and 0.1 (-) mg ml; 0.15 M was used as negative control ($\square$). Each point represents the mean of five repetitions.

Fig 2. Effect of CfePL on *Nasutitermes corniger* soldiers. Treatment was lectin at concentrations of 0.1 (∇), 0.2 (-), 0.5 ($\circ$), 0.8 ($\blacklozenge$), and 1 mg ml (Δ); 0.15 M NaCL was used as negative control ($\square$). Each point represents the mean of five experiments.

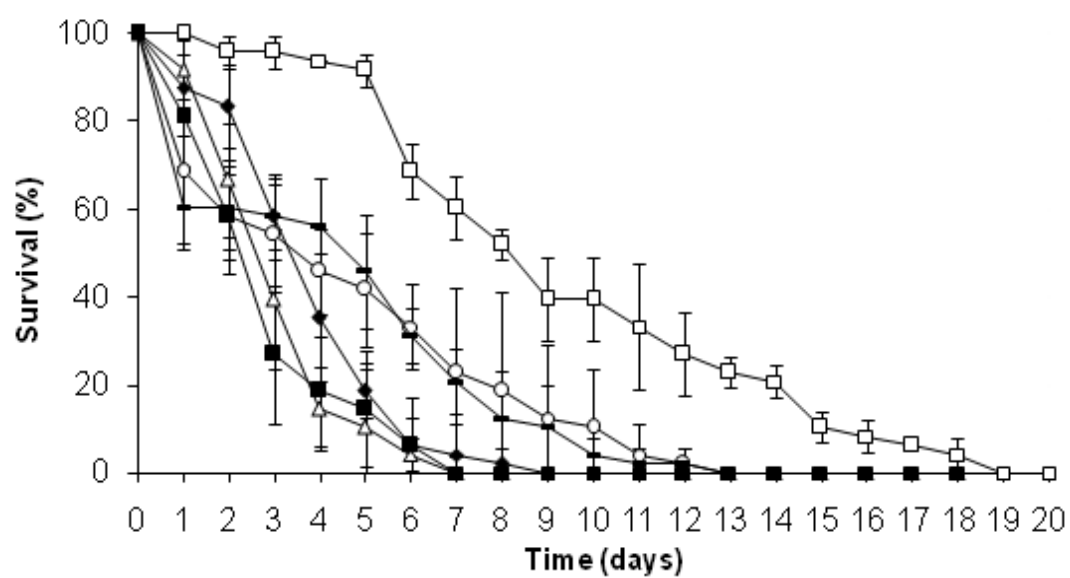
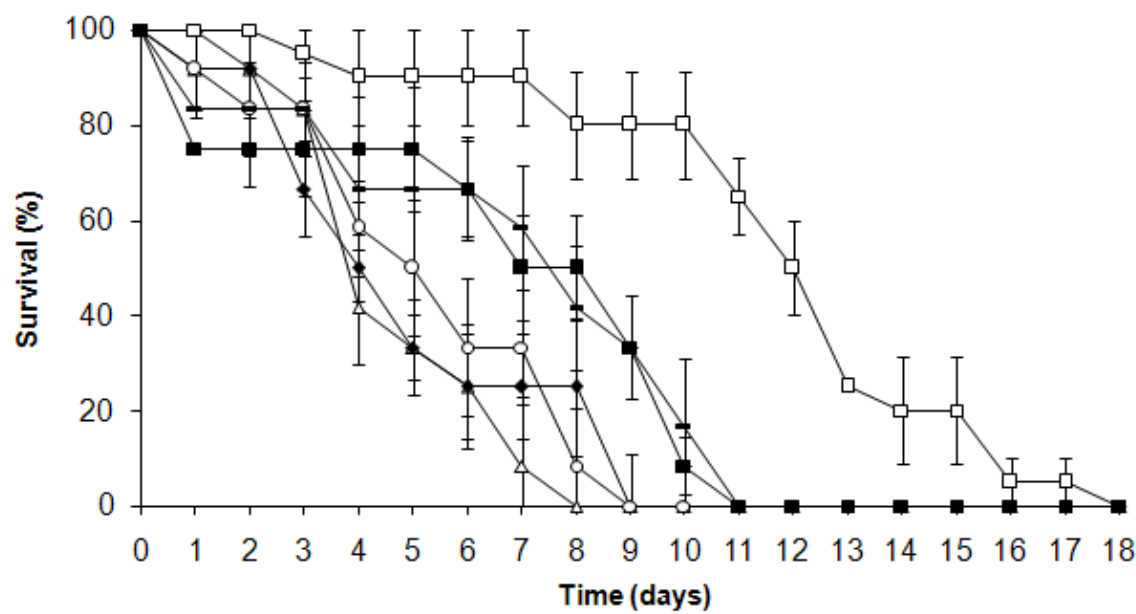
Figure 1

Figure 2



5. CONCLUSÕES

- Uma lectina foi purificada da vagem de *Caesalpinia ferrea* (CfePL) através de um protocolo simples. Cromatografias em quitina isolaram 48mg de CfePL presente na fração protéica (F80), obtida do extrato bruto de apenas 10 g da vagem;
- CfePL não é específica para eritrócitos humanos, é termoestável , é estimulada pela presença de íons (Ca^{2+} e Mg^{2+}), é resistente a enzimas proteolíticas e é sensível a variações nos extremos de pH;
- CfePL, uma proteína básica, possui baixa massa molecular (8 kDa), forte caráter hidrofóbico e perfil homogêneo por eletroforese e cromatografias em FPLC e HPLC;
- CfePL é uma amostra lectínica livre de metabólitos secundários, com afinidade por N-acetil-D-glicosamina e, especialmente, glicoproteínas;
- CfePL apresentou atividade antibacteriana e antifúngica de amplo espectro, podendo ser considerada um potente agente antimicrobiano;
- CfePL em baixas concentrações atuou como inibidor do crescimento celular, da respiração celular e mitocondrial de *Candida albicans*;
- CfePL apresentou ação inseticida contra *Nasutitermes corniger*, uma espécie de cupins que ataca madeiras;
- CfePL não possui ação repelente sobre *Nasutitermes corniger* indicando que a atividade inseticida ocorreu devido à ingestão do papel contendo a lectina.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.