

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

SANDRO DO NASCIMENTO SILVA

**EXTRATOS E LECTINAS DE *Alpinia zerumbet* (Pers.) Burt & Smith: AVALIAÇÃO
DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS**

Recife
2013

SANDRO DO NASCIMENTO SILVA

**EXTRATOS E LECTINAS DE *Alpinia zerumbet* (Pers.) Burt & Smith: AVALIAÇÃO
DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS**

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em
Bioquímica e Fisiologia, Área de concentração em
Glicoproteínas, da Universidade Federal de
Pernambuco, como requisito parcial para obtenção
do título de Doutor em Bioquímica.

Orientadora: Prof. Dr. Maria Tereza dos Santos
Correia

Recife
2013

Catálogo na Fonte
Biblioteca Elaine Gistina Barroso, CRB-4/1728

Silva, Sandro do Nascimento

Extratos e lectinas de *Alpinia zerumbet* (Pers.) Burt & Smith: avaliação de atividades biológicas / Sandro do Nascimento Silva – Recife: O Autor, 2013.

105 f.: il., fig., tab.

Orientadora: Maria Tereza dos Santos Corrêa

Coorientador: Thiago Henrique Napoleão

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Bioquímica e Fisiologia, 2013.

Índice referências

1. Lectinas 2. Plantas medicinais 3. Agentes antibacterianos I. Corrêa, Maria Tereza dos Santos (orient.) II. Napoleão, Thiago Henrique (coorient.) III. Título

572.6

CDD (22 ed)

UFPE/CCB-2017-441

SANDRO DO NASCIMENTO SILVA

**EXTRATOS E LECTURAS DE *Api nia zerumbet* (Pers.) Burt Smith: AVALIAÇÃO
DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS**

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em
Bioquímica e Fisiologia, Área de concentração em
Glicoproteínas, da Universidade Federal de
Pernambuco, como requisito parcial para obtenção
do título de Doutor em Bioquímica.

Orientadora: Prof. Dr. Maria Tereza dos Santos
Correia

Aprovada 30/09/2013

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Maria Tereza dos Santos Correia (Presidente)
(Universidade Federal de Pernambuco - UFPE)

Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão (Titular interno)
(Universidade Federal de Pernambuco - UFPE)

Prof. Dr. Marcia Vánusa da Silva (Titular Externo)
(Universidade Federal de Pernambuco - UFPE)

Dr. Emmanuel Viana Pontual (Titular Externo)
(Universidade Federal de Pernambuco - UFPE)

Dra. Elba Verônica Mátoso Maciel de Carvalho (Titular Externo)
(Universidade Federal de Pernambuco - UFPE)

Aos meus filhos Anyele, M si a e Sandrinho
E minha linda esposa Rhizi a

AGRADECIMENTOS

A Deus, TODO PODEROSO que de acordo com sua boa vontade me possibilitou realizar mais um sonho.

A minha esposa e meus filhos, pelo amor e carinho cedido em todos os momentos. Vocês são muito especiais e completam o sentido da minha vida, amo muito vocês.

A meus pais, agradeço a Deus por dar mais essa alegria a vocês, é o mínimo que posso retribuir por tantos anos de dedicação que se estende até hoje. Também amo muito vocês.

Aos Doutores Emmanuel Pontual e Francis Soares, que se dedicaram tanto em colaborar com esse trabalho, Deus abençoe vocês.

A Djalmá, Secretário do Programa de Pós-Graduação Em Bioquímica e Fisiologia, por não ter medido esforços e sempre me ajudar no decorrer de todo o curso.

A Carina Cavalcanti, por sempre cooperar com as amostras da planta para desenvolver o trabalho.

A todos os colegas do laboratório de glicoproteínas, espero que Deus possa realizar os sonhos de cada um de vocês, felicidade a todos.

As Professoras Doutoras Marcia Vanusa e Elba Verônica por fazer parte da banca examinadora.

A Professora Doutora Patrícia Guedes, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação Em Bioquímica e Fisiologia, pelo apoio e compreensão a mim confiados.

Ao Professor Doutor Thiago Napoleão, Co-orientador desse trabalho, obrigado pela paciência e ajuda constantes, lhe desejo sucesso.

A Professora Doutora Tereza Maria dos Santos Correia, minha orientadora desde a Iniciação Científica, que me aceitou como aluno desde o início da minha graduação, por toda paciência que eu fiz gastar. Nunca vou poder agradecer por tornar meu sonho possível.

A FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia no Estado de Pernambuco), que financiou esse projeto.

A todos vocês, não tenho palavras que expressem minha gratidão por tudo que vocês fizeram por mim. Sem vocês esse trabalho não seria possível.

“Podemos muito bem fazer planos para o futuro, Mas o resultado final é o SENHOR que produz.”

Provérbios cap. 16vers. 1 (bíblia versão viva)

RESUMO

Lectinas são proteínas de origem não imunológica que se ligam de forma específica e reversível a carboidratos. *Alpinia zerumbet* é uma planta ornamental utilizada na medicina popular de modo muito abrangente para tratamento de enfermidades como inflamações, febre e gripe. Neste trabalho lectinas foram extraídas e purificadas a partir de folhas (AzeLL, do inglês *A zerumbet leaf lectin*) e flores (AzeFL, do inglês *A zerumbet flower lectin*) de *A zerumbet* e avaliadas quanto à atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Shigella sonnei* através da determinação de concentrações mínima inibitória (CM) e mínima bactericida (CMB), bem como a atividade termiticida contra operários e soldados da espécie *Nasutitermes corniger*. Extratos em solução salina e tampões com diferentes valores de pH foram preparados. Os extratos em citrato-fosfato 0,1 M pH 7,0 mostraram maior atividade hemaglutinante específica e foram chamados então de extrato de folha (LE, do inglês *leaf extract*) e extrato de flor (FE, do inglês *flower extract*). As atividades hemaglutinantes de LE e FE foram inibidas por N-acetilglicosamina. Fracionamento salino utilizando sulfato de amônio não resultou em preparações enriquecidas em lectina. Sendo assim LE e FE foram cromatografados em colunas de quitina. Os picos proteicos adsorvidos e eluídos com ácido acético 1,0 M foram dialisados e denominados AzeLL e AzeFL, que apresentaram atividade hemaglutinante específica de 640 e 984,6, respectivamente. FE e AzeFL perderam completamente a atividade hemaglutinante após aquecimento a 70 °C por 30 min, enquanto o LE perdeu a sua atividade apenas após aquecimento a 100 °C e AzeLL após aquecimento a 80 °C. LE inibiu o crescimento de *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. sonnei* (CM de 1235 µg/ mL de proteínas para todas as bactérias) e FE inibiu *P. aeruginosa* e *S. sonnei* (CM de 1135 µg/ mL de proteínas para ambas). AzeLL só foi capaz de inibir o crescimento de *K. pneumoniae* (CM: 970 µg/ mL), enquanto AzeFL inibiu apenas *S. sonnei* (CM: 820 µg/ mL). Os extratos, AzeLL e AzeFL agiram apenas como agentes bacteriostáticos. No ensaio termiticida, a morte de todos os operários mantidos em contato com LE, FE, AzeLL e AzeFL ocorreu em cerca de 3-6 dias, mais cedo que no controle (taxa de mortalidade de 100% após 9 dias). No entanto, não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as curvas de sobrevivência dos operários estabelecidas para o controle e as amostras em todas as concentrações testadas. Por outro lado, LE (0,5 e 1,0 ng/ mL de proteínas), FE, AzeLL e AzeFL (0,0625–1,0 ng/ mL) induziram significativamente ($p < 0,05$) a morte dos soldados de *N. corniger*. Em conclusão, AzeLL e AzeFL foram purificadas a partir de cromatografia em coluna de quitina, apresentaram relativa termestabilidade, foram eficientes em inibir o crescimento das bactérias *K. pneumoniae* e *S. sonnei*, respectivamente, e são agentes termiticidas contra soldados de *N. corniger*.

Palavras-chaves: colônia, lectina, purificação de proteínas, termestabilidade, atividade antibacteriana, atividade termiticida.

ABSTRACT

Lectins are proteins from non-immune origin that bind specifically and reversibly to carbohydrates. *Alpinia zerumbet* is an ornamental plant used in folk medicine in a very comprehensive manner for treatment of infirmities such as inflammation, fever and flu. In this work, lectins were extracted and purified from leaves (*AzeLL*, *A. zerumbet* leaf lectin) and flowers (*AzeFL*, *A. zerumbet* flower lectin) of *A. zerumbet* and evaluated for antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* and *Shigella sonnei* by determining the minimal inhibitory (MIC) and minimal bactericidal (MBC) concentrations as well as for termiticidal activity against *Nasutitermes corniger* workers and soldiers. Extracts in saline solution and buffers at different pH values were prepared. The extracts in 0.1 M citrate-phosphate pH 7.0 showed highest specific hemagglutinating activity and were called LE (*leaf extract*) and FE (*flower extract*). Hemagglutinating activities of LE and FE were inhibited by *N*-acetylglucosamine. Saline fractionation using ammonium sulphate did not result in preparations richer in lectin. Thus LE and FE were chromatographed on chitin columns. The adsorbed protein peaks eluted with 1.0 M acetic acid were dialysed and called *AzeLL* and *AzeFL*, which showed specific hemagglutinating activity of 640 and 984.6 respectively. FE and *AzeFL* completely lost the hemagglutinating activity after heating at 70 °C for 30 min while LE lost its activity only after heating at 100 °C and *AzeLL* after heating at 80 °C. LE inhibited the growth of *E. coli*, *P. aeruginosa* and *S. sonnei* (MIC of 1235 µg/ml of protein for all bacteria) and FE inhibited *P. aeruginosa* and *S. sonnei* (MIC of 1135 µg/ml of protein for both). *AzeLL* was only able to inhibit the growth of *K. pneumoniae* (MIC 970 µg/ml) while *AzeFL* only inhibited *S. sonnei* (MIC 820 µg/ml). The extracts, *AzeLL* and *AzeFL* acted only as bacteriostatic drugs. In the termiticidal assay, the death of all workers maintained in contact with LE, FE, *AzeLL* and *AzeFL* occurred around 3-6 days, earlier than in control (100% of mortality rate after 9 days). However, there were no significant differences ($p > 0.05$) between the survival curves established for control and the samples at all tested concentrations. On the other hand, LE (0.5 and 1.0 mg/ml of protein), FE, *AzeLL* and *AzeFL* (0.0625–1.0 mg/ml) induced significantly ($p < 0.05$) the death of *N. corniger* soldiers. In conclusion, *AzeLL* and *AzeFL* were purified by chitin chromatography, showed relative thermostability, were effective in inhibit growth of the bacteria *K. pneumoniae* and *S. sonnei*, respectively, and are both termiticidal agents against *N. corniger* soldiers.

Keywords: butterfly ginger, lectin, protein purification, thermostability, antibacterial activity, termiticidal activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 <i>Alpinia zerumbet</i>	26
Figura 2 Ninho de cupins.....	31
Figura 3 Casta dos cupins.....	32

Artigo 1 – Purification and partial characterization of lectins from *Alpinia zerumbet* (zingiberaceae) leaves and flowers

Figura 1 Cromatografia em coluna de quitina dos extratos da folha (A) e da flor (B) de <i>A. zerumbet</i>	76
--	----

Figura 2 Atividade hemaglutinante e teste de resistência a temperatura de extratos e lectinas da folha (A) e da flor (B)	77
---	----

Artigo 2 – Evaluation of antibacterial and termiticidal activities of *Alpinia zerumbet* leaf extract and lectin

Figura 1 Teste termiticida com LE (A) e AzeLL (B) em operários de <i>N. termitidae</i>	96
---	----

Figura 2 Teste termiticida com LE (A) e AzeLL (B) em soldados de <i>N. termitidae</i>	97
--	----

Artigo 3 – Evaluation of antibacterial and termiticidal activities of *Alpinia zerumbet* flowers extract and lectin

Figura 1 Teste termiticida com FE (A) e AzeFL (B) em operários de <i>N. termitidae</i>	112
---	-----

Figura 2 Teste termiticida com FE (A) e AzeFL (B) em soldados de <i>N. termitidae</i>	113
--	-----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais classes de compostos com atividade antimicrobiana obtidas de plantas.....	38
Artigo 1 – Purification and partial characterization of lectins from <i>Alpinia zerumbet</i> (zingiberaceae) leaves and flowers.....	39
Tabela 1 Concentração e atividade hemaglutinante dos extratos da flor e da folha de <i>A. zerumbet</i>	74
Tabela 2 Inibição da atividade hemaglutinante dos extratos da folha e da flor de <i>A. zerumbet</i>	75
Artigo 2 – Evaluation of antibacterial and termiticidal activities of <i>Alpinia zerumbet</i> leaf extract and lectin	
Tabela 1 MC do extrato da folha de <i>A. zerumbet</i> e de <i>AzeLL</i>	95
Artigo 3 – Evaluation of antibacterial and termiticidal activities of <i>Alpinia zerumbet</i> flowers extract and lectin	
Tabela 1 MC do extrato da flor de <i>A. zerumbet</i> e de <i>AzeFL</i>	111

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
2.1	LECTINAS	14
2.1.1	Definição e histórica	14
2.1.2	Atividade biológica e aplicação biotecnológica	15
2.1.3	Classificação	18
2.1.4	Purificação de lectinas	19
2.1.5	Caracterização	22
2.2	<i>Alpinia zerumbet</i>	24
2.2.1	Classificação botânica	24
2.2.2	Importância médica e econômica	27
2.3	CUPIÑS	29
2.3.1	Classificação e importância	29
2.3.2	Inseticidas naturais	34
2.4	BACTÉRIAS	36
3	OBJETIVOS	39
3.1	OBJETIVO GERAL	39
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
4	REFERÊNCIAS	41
5	ARTIGO 1: Purification and partial characterization of lectins from <i>Alpinia zerumbet</i> (zingiberaceae) leaves and flowers.	58
6	ARTIGO 2: Evaluation of antibacterial and termiticidal activities of <i>Alpinia zerumbet</i> leaf extract and lectin	76
7	ARTIGO 3: Evaluation of antibacterial and termiticidal activities of <i>Alpinia zerumbet</i> flowers extract and lectin	90
8	CONCLUSÕES	104

1 INTRODUÇÃO

As lectinas são proteínas que se ligam reversivelmente e especificamente a carboidratos (CORREIA et al, 2008). Esta capacidade pode levar a diferentes atividades biológicas, tais como antibacteriana, antifúngica e inseticida (SOUZA et al, 2011; NAPOLEÃO et al, 2012; NAPOLEÃO et al, 2013; GOMES et al, 2013). A ocorrência de lectinas, tem sido relatada em vários organismos e, atualmente, a maioria das lectinas isoladas são de origem vegetal. As lectinas foram obtidas a partir de raízes, rizomas, tubérculos, bulbos, folhas, flores, frutos, sementes, cascas e cerne (NAEEM et al, 2001; OLIVEIRA et al, 2003; OLIVEIRA et al, 2008; SÁ et al, 2008; VALERIE et al, 2009; COSTA et al, 2010; NAPOLEÃO et al, 2011; ALBUQUERQUE et al, 2012).

Estas proteínas podem ser identificadas numa amostra por meio do ensaio de hemaglutinação, seguido pelo ensaio de inibição da atividade de hemaglutinação por carboidratos simples ou complexos. Este último ensaio também define a especificidade da lectina a carboidratos e podem direcionar a escolha da matriz de afinidade ideal para purificação (NUNES et al, 2011; FERNANDEZ - DEL- CARMEM et al, 2013). A caracterização físico-química das lectinas inclui a avaliação da estabilidade para diferentes temperaturas e valores de pH. A caracterização estrutural de lectinas envolve várias técnicas, um delas é a eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), que pode ser realizada na presença ou não de um agente desnaturante (normalmente de dodecilsulfato de sódio, SDS) responsável por desnaturar a proteína, e/ou um agente de redução (normalmente β -mercaptoetanol ou ditiotretol), que quebra suas pontes dissulfeto. A PAGE sob condições nativas revela a homogeneidade e a carga líquida da lectina e PAGE desnaturante sob condições redutoras revela a composição de subunidades e do peso molecular da proteína (REYNOSO- CAMACHO et al, 2003; PAIVA et al, 2010).

Atividade antibacteriana de lectinas de plantas tem sido investigada, principalmente porque está aumentando a necessidade de antibióticos para combater as estirpes bacterianas que apresentam resistência aos compostos usados atualmente (CARVALHO et al, 2010; SAVOIA 2012; TAYLOR, 2013). Tem sido sugerido que a atividade antibacteriana das lectinas contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas ocorre através da interação da lectina com componentes da parede celular bacteriana incluindo peptidoglicanos e lipopolissacarídeos (PAIVA et al., 2010).

Atividade inseticida de lectinas foi descrita contra insetos de várias ordens, como Díptera, Lepidoptera e Coleoptera (OLIVEIRA et al, 2011; NAPOLEÃO et al 2012; NAPOLEÃO et al, 2013). A capacidade que elas possuem de se ligar a carboidratos está implicada na atividade inseticida. Por exemplo, tem sido relatada a ligação das lectinas às estruturas glicosiladas e moléculas presentes no trato digestivo dos insetos (HITCHES et al., 2008; NAPOLEÃO et al, 2011). A atividade inseticida de lectinas a térmitas foi também atribuído a resistência à digestão por enzimas proteolíticas do intestino de térmitas bem como os efeitos bacteriostático e bactericida sobre bactérias simbióticas do intestino (NAPOLEÃO et al, 2011).

Alpinia zerumbet (Pers.) Burt & Smith (Zingiberaceae), popularmente conhecida colônia, é muito cultivada, devido à beleza de suas flores. É uma espécie nativa das regiões tropicais do sul e sudeste da Ásia e é difundido por várias partes do mundo (CRONQUIST, 1981). A *zerumbet* é amplamente utilizada na medicina popular por isso foi estudado propriedades farmacológicas das folhas, flores e rizomas, tais como efeitos depurativos, diurético, anti-histérico, anti-inflamatórios, hipotensor, e anti-helmíntico, entre outros (PINHO DE ARAUJO et al, 2005; ELZAALWELY et al, 2007; CHOMPOO et al, 2011; CAVALCANTI et al, 2012; CUNHA et al, 2013; TAO et al, 2013).

Este trabalho relata a purificação e caracterização de lectinas da folha e da flor de

A. zerumbet, bem como a avaliação da atividade antibacteriana e termiticida do extrato e da lectina (AzeLL) da folha além do extrato e da lectina (AzeFL) da flor.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 LECTINAS

2.1.1 Definição e histórico

A palavra lectina deriva do latim *lectus*, que significa escolhido ou selecionado. Este termo foi introduzido por Boyd e Shapleigh em 1954 e traduz a principal característica dessas moléculas que é a de se ligar a carboidratos de forma específica através de ligações não covalentes e de aglutinar eritrócitos de forma seletiva (PEUMANS & VAN DAMME, 1995).

As lectinas representam um grupo particular de proteínas que estão amplamente distribuídos por todos os tecidos de diversos seres vivos, sendo descritas em maior número em plantas (COELHO E SILVA, 2000; RATANAPPO *et al.*, 2001; NAEEM *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2003; WANG e NG, 2003; NASCIMENTO *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2008a; SÁ *et al.*, 2008; COSTA *et al.*, 2009, SANTOS *et al.*, 2009, VAZ *et al.*, 2009).

O primeiro estudo com lectinas foi desenvolvido por Stillmark em 1888, onde foi verificada a presença de uma proteína nos extratos de sementes de mamona, *Ricinus communis*, que aglutinava eritrócitos de animais. Essa observação resultou em um marco nos estudos das lectinas (SHARON & LIS, 1988). Em 1889, Hellin observou, no extrato tóxico de *Abrus precatorius* (jeriquiti), a presença de uma proteína que ele chamou de abrina, a qual

tinha a propriedade de aglutinar células sanguíneas (SHARON & LIS, 1991). Porém os estudos com lectinas só começaram a se ampliar a partir de 1960 quando se começou a abrir uma vasta área de aplicações para essas proteínas (GABOR *et al.*, 2001).

Em 1980, a definição de lectina foi ampliada para 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 e glicoconjugados de forma reversível (GOLDSTEIN *et al.*, 1980). No entanto, o advento de melhorias

tecnológicas para análise estrutural e molecular levou a uma atualização dessa definição: lectinas são proteínas que possuem no mínimo um domínio não catalítico que se liga reversivelmente a um mono ou oligossacarídeo específico, estendendo esse conceito a proteínas que se comportam de forma completamente diferente com relação às suas propriedades de aglutinação e/ou precipitação de glicoconjugados (PEUMANS & VAN DAMME, 1995; 1998). Uma definição simplificada e muito utilizada pode ser que lectinas são proteínas ou glicoproteínas, encontradas amplamente nos diversos organismos, que se ligam reversivelmente a carboidratos e glicoconjugados (NUNES et al, 2011).

2.1.2 Atividades biológicas e aplicações biotecnológicas

Como objetivo de detectar a presença de lectinas em uma solução pode ser feito o ensaio de atividade hemaglutinante (AH), no qual as lectinas se ligam a carboidratos presentes na superfície dos eritrócitos, formando ligações reversíveis entre células próximas o que resulta na aglutinação dessas células (SANTOS *et al.*, 2005). Os eritrócitos utilizados no ensaio podem ser de origem humana ou de outros animais, bem como podem ser tratados enzimaticamente (BANERJEE *et al.*, 2004; JUNG *et al.*, 2007) ou quimicamente (NAPOLEÃO *et al.*, 2011). Não tratar os eritrócitos também é uma opção para realização do teste (WITSUWANNAKUL *et al.*, 1998; MO *et al.*, 2000). O fato de as lectinas serem ligantes de carboidratos específicos viabiliza outro ensaio muito comum que é o de inibição da hemaglutinação. Nesse teste, a amostra contendo lectina é incubada com solução de carboidrato, o qual atuará como inibidor por se ligar ao sítio de ligação a carboidrato presente na estrutura da lectina, impossibilitando assim a ligação dessa lectina com os eritrócitos. Esse ensaio identifica o monossacarídeo para o qual a lectina é específica (CORREIA & COELHO 1995; WANG & NG, 2006; FERNANDEZ- DEL- CARMEN, 2012).

Além de monossacarídeos inibidores, algumas lectinas podem ser específicas a oligossacarídeos (WALTI *et al.*, 2008) como também a glicoproteínas e/ou polissacarídeos (THAKUR *et al.*, 2007). O ensaio de inibição da AHT também assegura a natureza lectínica da aglutinação, uma vez que outros compostos como taninos e cátions podem causar uma pseudo-aglutinação por dispersarem os eritrócitos na solução. Contudo essa dispersão não é abolida quando a amostra é previamente incubada com carboidratos livres em solução (CORREIA e COELHO 1995; SHARON e LIS, 2001).

As lectinas têm se mostrado importantes ferramentas para a investigação em diversas áreas da ciência, e em especial, processos médicos, químicos e biológicos (NUNES *et al.*, 2011; PATRICIO *et al.*, 2011; ROLIM *et al.*, 2011; MELO *et al.*, 2011). O grande número de lectinas com diferentes especificidades tem levado à sua utilização como reagentes para explorar carboidratos encontrados nas células, sendo este, um dos pontos mais importantes no avanço de numerosas áreas da biologia celular (XIMENES, 2009; SOUZA *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2012).

As lectinas têm sido utilizadas eficientemente em estudos histológicos 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 (BATTERBUY *et al.*, 2002), e na estimulação da proliferação de diferentes tipos celulares, como linfócitos T humanos (BANERJEE *et al.*, 2004; MACIEL *et al.*, 2004) e esplenócitos (NGAI e NG 2004; WANG e NG 2006; LI *et al.*, 2008). Atividade antiinflamatória (SANTI-GADELHA *et al.*, 2006) e atividade hipoglicêmica (KAVALALI *et al.*, 2003) de lectinas já foram descritas e a imobilização de lectinas em suportes inertes permite o uso delas como matrizes de afinidade para purificação

de glicoproteínas dos mais diversos tipos (SILVA *et al.*, 2011; ARAÚJO *et al.*, 2013; NAPOLEÃO *et al.*, 2013b).

Lectina das folhas de *Pandanus amarillifolius* apresentou atividade antiviral contra vírus herpes tipo 1 e vírus influenza (OOI *et al.*, 2004). Outras lectinas têm sido descritas com ação inibitória sobre a transcriptase reversa do HIV-1 (WANG e NG, 2006; LI *et al.*, 2008).

As lectinas também podem funcionar como agentes antimicrobianos contra células bacterianas (GAI DAMASHVILI e VAN STADEN, 2002; TASUM *et al.*, 2004; TAKASHAKI *et al.*, 2008; COSTA *et al.*, 2010; WEI *et al.*, 2012; MASSANI *et al.*, 2013) e contra fungos (FREIRE *et al.*, 2002; TRINDADE *et al.*, 2006). Lectinas também têm apresentado efeito anti-protozoário (MOURA *et al.*, 2006) e nematocida (RIPOLL *et al.*, 2003). A habilidade das lectinas de se ligarem a glicoproteínas de superfícies celulares tem impulsionado estudos da biologia e estrutura de agentes infecciosos, como, por exemplo, na caracterização epidemiológica da *Neisseria gonorrhoeae* e diferenciação de outras espécies de *Neisseria* (WU *et al.*, 2001). Em outros casos, lectinas podem funcionar como alvos em tratamentos de infecções; um exemplo é o caso de determinadas bactérias que produzem lectinas específicas para certos carboidratos e fazem uso das mesmas para se aderirem ao tecido hospedeiro como primeiro passo e num processo infeccioso. O crescimento da colônia dessas bactérias é reduzido quando o tecido é tratado com carboidratos livres em solução devido à diminuição da adesão das células bacterianas ao tecido, ocorrendo um bloqueio do ataque das bactérias (SHARON e LEE, 1993; RÜDIGER *et al.*, 2000).

As lectinas apresentam outras atividades biológicas tais como atividade inseticida contra várias espécies de insetos-praga e vetores de doenças (DUTTA *et al.*, 2005; LEITE *et al.*, 2005; SÁ *et al.*, 2008, 2009; SANTOS *et al.*, 2012; NAPOLEÃO *et al.*, 2013a) e seus genes podem ser utilizados na produção de transgênicos de plantas de interesse econômico

(RAMESH *et al.*, 2004; McCAFFERTY *et al.*, 2008). Relatos prévios têm indicado lectinas como agentes no controle de diversos vetores de doenças, incluindo larvas e ovos de *Aedes aegypti* (COELHO *et al.*, 2009; NAPOLEÃO *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2013).

2.1.3 Classificação

Existem formas muito variadas para classificar as lectinas, as quais dependem muito do enfoque a ser estudado. De uma forma mais ampla, existem os grandes grupos de lectinas vegetais e lectinas animais. As lectinas animais podem ser classificadas em tipo-C que são lectinas cálcio dependentes (WEI *et al.*, 2012) e galectinas, lectinas ligantes específicas de β -galactosídeos (FUKUMORI *et al.*, 2007), as quais são as duas maiores classes, além de mais oito grupos (tipo-S, tipo-I, tipo-P, tipo-L, anexinas, calretulinas/calnexinas, discoidinas, egl ectinas, aglutininas, tipo fibrinogênio e pentraxinas); esses grupos são classificados de acordo com a similaridade de suas estruturas primárias (KILPATRICK *et al.*, 2002). As lectinas de plantas podem ser classificadas com base na especificidade de ligação a açúcares (galactose/N-acetil galactosamina, glicose/manose, N-acetil glucosamina, L-fucose), de acordo com características na estrutura molecular (merlectinas, hol lectinas, quimerlectinas e superlectinas) ou ainda com base na ocorrência, estrutura e especificidade (lectinas de leguminosas, lectinas ligadoras de quitina, proteínas inativadoras de ribossomos, lectinas relacionadas à jacalina, lectinas de monocotiledôneas ligadoras de manose, lectinas de floema de cucurbitáceas e lectinas da família das amarantáceas) (VAN DAMME *et al.*, 1998).

De acordo com a classificação das lectinas quanto à estrutura molecular, temos as seguintes definições:

I Merlectinas: lectinas com apenas um domínio de reconhecimento de carboidratos e que

não possui atividade hemaglutinante. Um dos exemplos mais conhecidos é a heveína, uma lectina isolada do látex da *Hevea brasiliensis* (VAN DAMME *et al.*, 1998).

II Hololectinas: lectinas que possuem pelo menos dois domínios de ligação a carboidratos, os quais são idênticos ou muito semelhantes. A concanavalina A (Con A), a lectina mais conhecida e estudada na literatura, pertence a este grupo (VAN DAMME *et al.*, 1998);

III Quimerlectinas: lectinas que possuem um ou mais domínios de ligação a carboidrato além de um outro domínio com outra atividade biológica qualquer, como por exemplo hormonal ou enzimática, sendo esse sítio independente da ligação a carboidratos. Um exemplo clássico desse grupo de lectinas é a ricina (VAN DAMME *et al.*, 1998);

IV Superlectinas: lectinas que possuem pelo menos dois domínios de ligações a carboidratos, entretanto, ao contrário das hololectinas, podem se ligar a carboidratos com estruturas distintas. Nesse caso alguns consideram as superlectinas um tipo especial de quimerlectinas uma vez que apresentam dois sítios de ligação a carboidratos totalmente independentes entre si em função e estrutura. A TGL, lectina extraída da *Tulipa gesneriana*, é uma superlectina com especificidade a manose e a N-acetil galactosamina (VAN DAMME *et al.*, 1998).

2.1.4 Purificação de lectinas

As técnicas utilizadas para purificação de lectinas são as mesmas utilizadas para purificação de proteínas consistindo, em geral, em métodos convencionais cromatográficos e eletroforéticos, os quais se baseiam em aspectos estruturais e físico-químicos das proteínas, tais como carga elétrica, tamanho e solubilidade.

O primeiro passo na purificação de lectinas de uma planta é a extração, método em que o tecido ou órgão em estudo pode ser macerado ou triturado e, em seguida, homogeneizado e numa solução de extração. A extração pode ser em solução salina, como no

caso do isolamento das sementes de *Talisia esculenta* (FREIRE *et al.*, 2002) e das sementes de *Cratylia mollis* (PAIVA e COELHO 1992; CORREIA e COELHO 1995) ou usando tampões como no 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* (NASCI MENTO *et al.*, 2008). O maior interesse é aumentar a solubilidade das proteínas. A extração é geralmente seguida de uma filtração e centrifugação para retirada de restos sólidos do material de partida e possíveis impurezas na solução.

O extrato bruto é então submetido a etapas de pré-purificação. A primeira etapa é o fracionamento salino, que utiliza sais neutros para diminuir a solubilidade em água das proteínas presentes no extrato. Em concentrações reduzidas, esses sais aumentam a solubilidade das proteínas (“salting in”), mas quando a concentração é aumentada (resultando em aumento da força iônica) ocorre uma redução da solubilidade das proteínas, possibilitando sua precipitação (“salting out”). Normalmente utiliza-se o sulfato de amônio devido sua alta solubilidade em água, permitindo a precipitação proteica, e por não desnaturar as proteínas (HEU *et al.*, 1995). A precipitação pode ser feita utilizando diferentes saturações de sal e pode promover separação parcial (fracionamento) das proteínas, uma vez que proteínas diferentes apresentam solubilidades diferentes em resposta a concentrações de sais (XIMENES, 2009; SILVA, 2009). Para retirada do sal utilizado na precipitação, realizam-se diálises em membranas semipermeáveis, método baseado na separação de moléculas por diferenças de peso molecular; as proteínas ficam retidas, pela limitação causada pela membrana, enquanto que moléculas menores, como carboidratos ou sais, passam para a solução solvente no exterior da membrana (PLUMER, 1978).

Após a extração e purificação parcial, diversos métodos cromatográficos são usados para a purificação das lectinas, dentre 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).

A cromatografia é, basicamente, um método que envolve duas fases, uma móvel e uma estacionária. Nessa técnica, faz-se passar a fase móvel pela estacionária, o que vai possibilitar que alguns componentes da fase móvel fiquem retidos na fase estacionária de uma determinada forma, a depender da cromatografia utilizada. O resultado é a migração seletiva dos componentes presentes na fase móvel. A cromatografia de troca iônica baseia-se na ligação da proteína com grupos de cargas contrárias imobilizados na matriz (trocador de íons). A coluna é lavada com solução tampão e as proteínas com nenhuma ou pouca interação com a matriz 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 isóformas lectínicas, pela utilização de gradiente salino crescente (MISHRA *et al.*, 2004).

A cromatografia de afinidade é a mais utilizada para purificação de lectinas e baseia-se no isolamento por meio da capacidade das proteínas em se ligarem especificamente a outras moléculas. No caso das lectinas, as matrizes de afinidade contêm carboidratos ou glicoconjugados covalentemente imobilizados. A amostra é aplicada à matriz e as moléculas sem afinidade passam sem se ligar, enquanto que as lectinas específicas para a matriz são retidas. A proteína desejada é geralmente 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 para a purificação de lectinas, tais como Sephadex, um polímero de glicose (CORREIA E COELHO, 1995), a quitina, para lectinas com afinidade por *N*-acetilglicosamina (FREIRE *et al.*, 2002), o gel de guar e a Sepharose, para lectinas ligadoras de galactose (COELHO e SILVA, 2000; CANDY *et al.*, 2003), bem como Sepharose ou Agarose contendo carboidratos ou

glicoproteínas imobilizados (GERLACH *et al.*, 2002).

2.1.5 Caracterização

Uma vez definido o protocolo de purificação de uma proteína, essa deverá passar por uma série de testes que vão determinar características particulares, tais como afinidade a carboidratos e glicoconjugados, comportamento em presença de íons e em diferentes valores de pH e temperatura, tamanho da molécula, tipos de estrutura, composição de sua sequência de aminoácidos, entre muitas outras formas de caracterização utilizados atualmente.

Testes de atividade hemaglutinante e inibição desta, 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 classificação de lectinas (SILVA *et al.*, 2012).

A avaliação da AH de lectinas em diferentes temperaturas, para a determinação da estabilidade é outro passo na caracterização. Algumas lectinas são termossensíveis, outras termotáveis. Tais proteínas podem ter sua atividade otimizada e numa determinada faixa de temperatura e ausente em outras temperaturas desfavoráveis à manutenção da sua 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 aquecimento 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 apresente as condições ideais à manutenção de sua estrutura nativa. O pH tem efeito variado sobre as lectinas: em alguns

casos não afeta a atividade (WTTSUWANNAKUL *et al.*, 1998), e outros a lectina perde a atividade em determinada faixa de pH como no caso da lectina de *Erythrina speciosa* (KONOZY *et al.*, 2003) e outras ficam ativas em ampla faixa de pH similarmente à lectina de *Ganoderma capense* ativa em valores de pH que variam de 4 a 11, (NGAI e NG 2004).

A eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) em condições nativas revela o grau de pureza de uma preparação, bem como a carga líquida da proteína. PAGE pode ser realizada usando um gel contendo o agente desnaturante dodecil sulfato de sódio (SDS) e/ou os agentes redutores β -mercaptoetanol ou ditiotreitid (DTT). Na presença desses compostos, a eletroforese pode ser utilizada para revelar a composição e a massa molecular de subunidades de uma proteína (REYNOSO-CAMACHO *et al.*, 2003). Os géis podem ser corados com Azul de Coomassie, coloração com prata, ou Negro de Anido, os quais detectam bandas polipeptídicas, ou com colorações específicas para glicoproteínas, como a coloração com ácido periódico-Reativo de Schiff (GOMES *et al.*, 2013). Outro importante método eletroforético é a eletrofocalização ou focalização isoelétrica, que determina o ponto isoelétrico da proteína de interesse.

Muitos outros métodos e ensaios, tais como dependência da molécula a íons, estabilidade a diferentes valores de pH, HPLC (cromatografia líquida de alta pressão), HPLC-RP (cromatografia líquida de alta pressão e fase reversa), FPLC (cromatografia líquida de rápida resolução) (WONG e NG, 2003), a imunodifusão, a difusão dupla, análise da composição de aminoácidos, sequenciamento de aminoácidos, estudos de fluorescência, diâmetro circular e cristalização também são ferramentas importantes para a caracterização das lectinas.

2.2 *Api nia zerumbet*

2.2.1 Classificação botânica

Essa planta, comumente chamada de colônia, está incluída na família Zingiberaceae, a qual é composta por ervas de pequeno a grande porte, perenes ou não, rizomatosas, entouceiradas e de crescimento simpodial, às vezes acaules, com folhagem emergindo diretamente do solo ou mais frequentemente apresentando pseudocaules eretos, herbáceos, com até 3m de altura. As folhas são alternas, dísticas, lineares e peniparalelinérveas, geralmente na cor verde. As inflorescências são do tipo cimo, frequentemente espiciforme, formada por brácteas decorativas que protegem as flores, as quais são bissexuadas, zigomorfas, diclamídeas e heteroclamídeas, com cálice trímero e gamossépalo, corola trímera, gamopétala, com uma das pétalas em tamanho maior que as demais. A pré-floração é do tipo imbricada, havendo 1 estame e mais 4 estaminódios petalóides, com anteras rimosas. O gineceu é gamocarpelar, tricarpelar, ovário ínfero geralmente com 3 lóculos comumente pluri ovulados, placentação frequentemente axial. O fruto é do tipo baga ou cápsula com sementes ariladas. A família Zingiberaceae apresenta distribuição pantropical com espécies originárias da Ásia Tropical, Índia, Ilhas do Pacífico, Tailândia, Indonésia e Malásia, perfazendo aproximadamente 1300 espécies e em 50 gêneros conhecidos (CRONQUIST 1981; KRESS *et al.* 2002). As espécies mais utilizadas no Brasil para paisagismo são de procedência exótica, apenas o gênero *Renanthis* é nativo da região Amazônica. Contudo, algumas exóticas são consideradas subesportâneas, principalmente em solos brejosos a exemplos das espécies *Hedychium coronarium* e *Hedychium gardnerianum*. Muitas espécies da família têm valor econômico fornecendo alimentos (féculas dos rizomas), perfumes, condimentos de propriedades aromáticas, corantes, fibras e papel (TOMLINSON 1969).

O representante mais comum dessa família é o gengibre (*Zingiber officinale*), muito conhecido na culinária. O rizoma do gengibre, é também utilizado como matéria-prima para fabricação de bebidas, perfumes e produtos de confeitaria como pães, bolos, biscoitos e geléias e, na medicina popular, é muito utilizado como excitante estomacal e carminativo.

Muitas espécies da família têm óleos aromáticos que são usados para perfumaria, tempero e para fins medicinais. Os rizomas de algumas espécies de *Curcuma* são utilizados como fonte de alimento, uma vez que são fontes de amido. Como plantas ornamentais, destacam-se espécies dos gêneros *Zingiber*, *Alpinia*, *Nolana*, *Hedychium* e *Kaempferia* pela beleza da folhagem e da inflorescência (WINTERS, 1995).

Alpinia é o maior gênero da família, com mais de 200 espécies (CRONQUIST, 1981) e ocorre na Malásia e nas ilhas do Oceano Pacífico (DAHLGREN *et al.* 1985). O gênero *Alpinia* é caracterizado morfologicamente pela presença de rizoma simples e pelas brácteas vistosas e inflorescência terminal. Todas as partes da planta são aromáticas, uma propriedade que deriva da grande quantidade de óleos essenciais. Outro traço mais marcante deste gênero é a beleza de sua inflorescência, o que explica seu uso ornamental ampliado através da comercialização de suas mudas e flores. Além disso, essas plantas possuem muitos usos medicinais em várias partes da Ásia e das Américas. Plantas desse gênero fazem parte da dieta humana em várias partes da Ásia, sendo o arroz de *Alpinia zerumbet* um dos alimentos básicos da dieta local em Okinawa no Japão. Os rizomas também são usados para fazer bebidas e temperos.

De acordo com Sirirugsa (1999) a espécie *Alpinia conchigera* é utilizada na Tailândia para o tratamento da bronquite, reumatismo e artrite e, segundo Ibrahim *et al.* (2009), essa planta também possui ação antibacteriana e antifúngica. *Alpinia galanga* é utilizada em vários locais da Ásia contra cólicas, disenteria, cancro do estômago, e para o tratamento de diabetes mellitus, febre, dispepsia e incontinência urinária, apresentando ainda

efeito anti-inflamatório (KHATTAK *et al.*, 2005; NAMS *et al.*, 2009).

A espécie *Alpinia zerumbet* (Pers.) Burt & Smith (Figura 1) é muito cultivada pela beleza de suas flores (JOLY, 1993) e é popularmente conhecida como colônia, paco-seroca, cuité-açu, pacová (ALMEIDA, 1993), gengibre-concha (LORENZI & SOUZA, 1995), cardamomo-do-mato, cardamomo-falso, cana-do-brejo, cana-do-mato e paco-seroso (MACHADO, 1996). É uma planta originária do Japão e China, perene, herbácea, rizomatosa, muito entouceirada, com até 2m de altura. As folhas são coriáceas, decorativas e verdes e a inflorescência terminal, recurvada, formada por flores vistosas de textura cerosa e branco-rosado e amarelo. Multiplica-se facilmente pela divisão dos rizomas. Possui uma variedade chamada de *A. zerumbet variegata* que também tem grande importância paisagística. Ambas são muito utilizadas na medicina popular e encontradas com frequência no Brasil devido a fácil adaptação ao clima tropical, além da grande popularidade (TOMLINSON, 1969).

Figura 1- *Alpinia zerumbet*



Fonte: disponível em < www.jardimdeflores.com.br > acesso em 12 de set. de 2013

2.2.2 Importância médica e econômica

A *zerumbet* é utilizada na medicina popular como hipotensiva, diurética, tônico estomacal e cardíaco, no tratamento de constipações, gripes, febres, problemas estomacais e indigestão, antioxidante, bactericida, proporciona alívio de dores e espasmos. De acordo com Carlini (1972), A *zerumbet* era utilizada por trabalhadores agrícolas de Ribeirão Preto (São Paulo) para tratar reumatismo e doenças cardíacas. Nas regiões nordeste e sudoeste do Brasil, o chá feito de suas folhas é usado frequentemente como um medicamento anti-hipertensivo e diurético (MEDEIROS *et al.*, 2004). Esta espécie está entre as mais citadas para uso medicinal em diferentes regiões do Brasil, e tem sido sugerida para uso no Sistema Único de Saúde do Brasil (SUS) fazendo parte do RENSUS, uma relação nacional de plantas de interesse do SUS com potencial de gerar produtos de interesse ao Ministério da Saúde (HESKI, 2005). Na ilha de Martinica, uma possessão francesa localizada no Mar do Caribe oriental, ela é usada como um tratamento contra a influenza (LONGUEFOSSE & NOSSIN 1996).

Estudos como chá das folhas da colônia realizados por Mendonça *et al.* (1991) e Laranja *et al.* (1992) confirmam o seu efeito hipotensor. Santana *et al.* (1966) mostraram ação antiinflamatória capaz de inibir processos edematosos. A colônia tem sido também estudada em relação às atividades antifúngicas (LIMA *et al.* 1993) e antibacterianas, além da produção de inseticidas a partir dos óleos essenciais da flor (MORI TA 1992). A composição química dos óleos essenciais encontrados na folha e no rizoma da espécie foi estudada por Fujita & Yamashita (1973) e por De Pooter *et al.* (1995); os óleos essenciais da planta têm sido muito estudados recentemente, sendo obtidos óleos a partir de seus frutos (TAO *et al.*, 2013), rizoma (CHOMPOO *et al.*, 2011) e folhas (ELZAAL WELY *et al.*, 2007). São descritos efeitos como anti-hipertensivo (CUNHA *et al.*, 2013); vasorelaxante (PINTO *et al.*, 2009) e analgésico em ratos (DE ARAUJO PINHO *et al.*, 2005), bem como avaliação toxicológica e em leucócitos

humanos (CAVALCANTI *et al.*, 2012).

O óleo essencial de *A. zerumbet* é ativo contra bactérias Gram positivas e Gram negativas, bem como fungos (LOBATO *et al.*, 1989; VICTÓRIO *et al.*, 2009). A atividade antimicrobiana do óleo essencial das flores de *A. zerumbet* foi patenteada por Morita, em 1992. Estudos utilizando extrato etanólico de raízes de *A. zerumbet* comprovaram a inibição do crescimento de estirpes de *Helicobacter pylori* no estômago de pacientes no Hospital de Taiwan (WANG & HUANG, 2005).

A família Zingiberaceae é rica em substâncias com valor terapêutico, tais como os flavonóides, que foram detectados em várias espécies (IWASHINA, 2000). Os flavonóides são considerados marcadores químicos sistêmicos da ordem dos Zingiberales (PUGALLI *et al.*, 1993). Flavonóides, taninos e terpenóides apresentam atividade antioxidante significativa através da captura de espécies reativas de oxigênio associadas ao envelhecimento, doenças cardíacas, disfunção cerebral e doenças neurodegenerativas, reumatismo, e o aparecimento de cânceres, entre outros (OLIVEIRA *et al.*, 2009). Rutina, isoquercitrina, catequina, epicatequina, campferol, o campferol 3-O-glucuronido e campferol 3-O-rutinosídeo foram isolados por Mplantinos *et al.* (1998) a partir de extratos de *A. zerumbet*.

Espécies do gênero *Alpinia* são frequentemente usadas por suas propriedades aromáticas, que estão relacionadas com os compostos voláteis que foram detectados por diferentes técnicas de extração (DE POOTER, 1995; ZOGHBI *et al.*, 1999; JOSEPH *et al.*, 2001; ALI *et al.*, 2002; MALLAVARAPU *et al.*, 2002; FANG *et al.*, 2003; ELZAAWELY *et al.*, 2007a; VICTÓRIO *et al.*, 2010b, 2010c, 2010d). Algumas empresas no Japão investem na extração de óleos essenciais de folhas de *A. zerumbet* e usa para a produção de cosméticos, perfumes e sabonetes (ELZAAWELY *et al.*, 2007; TAWATA *et al.*, 2008). Estes incluem monoterpenos, terpineno, limoneno, 1,8 cineol, canfeno e sabineno. A presença de monoterpenos é predominante entre espécies de *Alpinia*. Taninos são citados como as

substâncias que ocorrem muito comumente em todas as espécies Zingiberaceae (TOMLINSON 1969), no entanto, eles são muito escassos no gênero *Alpinia*.

O gênero *Alpinia* tem sido extensivamente estudado por suas propriedades anticancerígenas. Por exemplo, o óleo essencial da espécie *A. oxyphylla* provou ser eficaz contra linhagens cancerosas (LEE *et al.*, 1998; HOUGHTON & LEE, 2005). Além disso, Hahmet *et al.* (2003) estudaram a ação de substâncias extraídas a partir das sementes de *Alpinia katsumadai*, que foram citotóxicas para linhagens de células de câncer de pulmão humano e linhagens leucêmicas. Os extratos do rizoma de *Alpinia officinarum* foram eficientes e inibiram a melanogênese em estudos com células de melanoma B16 (MATSUDA *et al.*, 2009).

Os principais estudos sobre *Alpinia* dizem respeito a vasodilatação e atividades hipotensoras. Os flavonóides são descritos como metabólitos envolvidos na atividade hipotensora proporcionada por esta espécie (DA COSTA *et al.*, 1998). Da mesma forma, em estudos com camundongos, os componentes do óleo essencial de *A. zerumbet* mostraram um efeito hipotensor atribuído a terpineol-4 (LALHOU *et al.*, 2003). Em outros estudos, do mesmo grupo, verificou-se que a ação anti-hipertensiva do óleo essencial ocorre independentemente do sistema nervoso simpático, o que sugere uma ação relacionada diretamente para o relaxamento de vasos sanguíneos (LALHOU *et al.*, 2002).

2.3 CUPINS

2.3.1 Classificação e importância

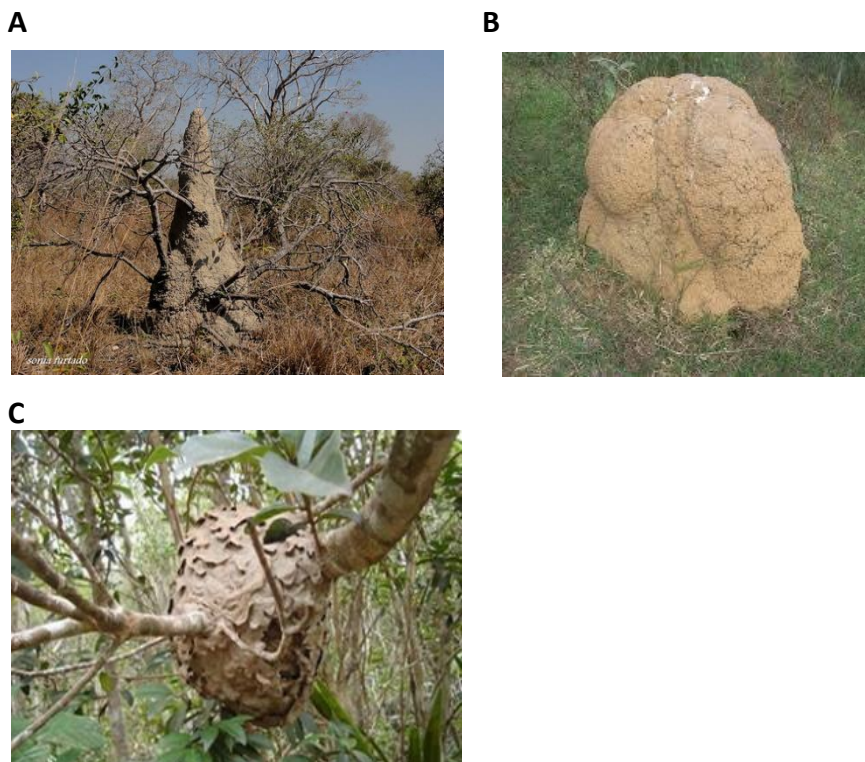
Os cupins são importantes degradadores de madeira e para isso, usam suas enzimas e sua microbiota intestinal (SHELTON & GRACE, 2003). Constituem parte da fauna do solo e somam, com as minhocas, a maior parte da biomassa. Atuam modificando as partículas do solo, alterando sua distribuição e textura, elevando o pH e aumentando os níveis de

nitrogênio e de fósforo, fazendo com que os solos onde estão presentes sejam favoráveis para a agricultura (KOUASSI & LEPAGE, 1988; BASAPPA & RAJAGOPAL, 1990; ASAWALAM & JOHNSON, 2007).

Os cupins são insetos de hábitos subterrâneos e constituem o principal grupo dos insetos eussociais (SÁ *et al.*, 2008) que se agrupam todos na Ordem Isoptera, com mais de 2000 espécies descritas. Estão representados nas Américas por 84 gêneros e 5 famílias com 514 espécies. Registram-se cerca de 200 espécies no Brasil. A grande maioria das espécies de cupins não é considerada praga e são benéficas para o ambiente, principalmente como eficientes decompositores de matéria orgânica (VARMA & SWARAN, 2007). Contudo, algumas espécies são consideradas pragas de madeira, da agricultura e de florestas. As principais espécies causadoras de estragos em madeira estrutural de edificações são dos gêneros *Nasutitermes*, *Coptotermes* e *Grypotermes* e em plantas agrícolas e florestas nativas são do gênero *Coptotermes* (BANDEIRA, 1998). As espécies dos gêneros *Amitermes*, *Cylindrotermes* e *Nasutitermes* são consideradas as principais pragas de plantações de cana-de-açúcar.

No geral, os cupins são conhecidos pelo hábito de se alimentarem preferencialmente de celulose e matéria orgânica morta ou em decomposição, mas alimentam-se também de vegetais vivos. Os ninhos podem ser dos tipos mais diversos (Figura 2), de acordo com as espécies; eles podem ser arborícolas, sendo construídos em troncos de árvores, geralmente apodrecidos com comunicação com o solo, xilófagos, quando são formados longe do solo e em madeira, ou húmívoros no caso de construírem seus ninhos exclusivamente no solo.

Figura 2 Ninhos de cupins arborícolas (A), húmívoros (B) e xilófagos (C).



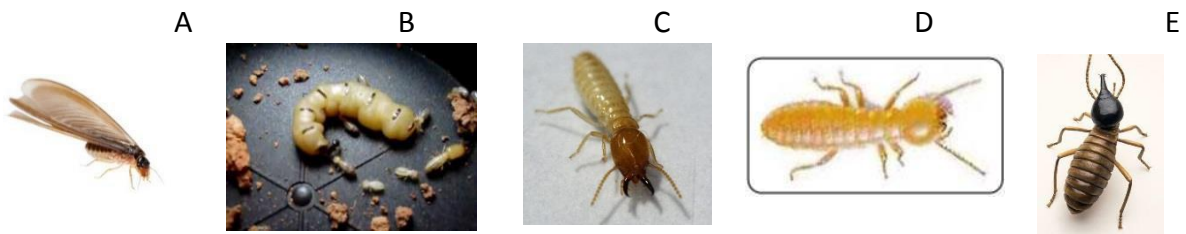
Fontes: A disponível em <www.flickr.com> acesso em 10 de set. de 2013; B disponível em <www.flickr.com> acesso em 10 de set. de 2013; C disponível em <www.natal.m.gov.br> acesso em 10 de set. de 2013

Dentro dos ninhos, os cupins se organizam em castas, onde cada uma é responsável por uma função específica. Para que ocorra a manutenção e sobrevivência do ninho existem os indivíduos alados e reprodutores conhecidos como “aleluias ou siriris” (Figura 3A), que saem em revoadas e épocas quentes para copular. A cópula no entanto não se dá no voo e sim no chão quando eles perdem suas asas. Existem os indivíduos ápteros sexuais que podem se tornar férteis através do desenvolvimento de seus órgãos sexuais em caso de morte do rei ou da rainha (Figura 3B). Os operários (Figura 3C) constroem o ninho e são responsáveis pela alimentação e cuidado dos filhotes (Figura 3D) e dos soldados (Figura 3E), que recebe esse nome por serem os defensores da colônia.

Os operários alimentam as outras castas através da troca do alimento pela boca, sendo chamado de estomodéico e correspondendo a um líquido claro. Essa troca de alimentos

pela boca possibilita o contato através de um feromônio que é fundamental para a organização da colônia. Os indivíduos ainda na fase larval que recebem o alimento podem ter sua função (operário ou soldado) estimulada através de diferentes feromônios, de acordo com a necessidade de indivíduos da colônia. Levando em consideração essa alternância de gerações de reprodutores, reis e rainhas, soldados e operários, teoricamente uma colônia de cupins poderia ser eterna. No entanto por motivos ainda não esclarecidos após um determinado período de tempo ela se extingue.

Figura 3 Castas de cupins. (A) Reprodutor alado. (B) Rainha. (C) Operário. (D) Filhote. (E) Soldado.



Fontes: A Disponível em <www.milheruol.com.br> acesso em 07 de set. de 2013; B extraída do vídeo <<http://www.youtube.com/watch?v=TA5raNjf8E>> acesso em 07 de set. de 2013; C Disponível em <www.ambientalanania.com.br> acesso em 07 de set. de 2013; D Disponível em <www.detetizadora.natsuri.com.br> acesso em 07 de set. de 2013; E Disponível em <www.gasometrocoimvoce.com.br> acesso em 07 de set. de 2013

No Brasil, existem representantes de quatro famílias de cupins, que são: Kalotermitidae, considerados primitivos, não constroem ninhos nem possuem operários, só atacam alimentam-se de madeira seca; Rhinotermitidae, são na maioria subterrâneos, atacam plantas vivas e mortas e alguns são pragas importantes; Serritermitidae, que ocorre só no Brasil; e Termitidae, bastante diversificada, e compreende cerca de 85% das espécies de cupins conhecidas do Brasil (KAMBHAMPATI e EGGLETON, 2000). 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.

Dentro da família Termitidae, 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 além de frequentemente construir ninhos e melhados, forros, e vãos estruturais (EDWARDS e MILL, 1986; SCHEFFRAHN *et al.*, 2002).

Nasutitermes corniger é uma das espécies mais comuns do gênero (SCHEFFRAHN *et al.*, de 2005), sendo uma espécie arbórea endêmica da região neotropical. Seus ninhos são marrom-escuro na superfície e têm pequenas saliências no seu exterior. A rainha vive numa câmara localizada no centro do ninho (geralmente perto do tronco ou ramo ao qual o ninho está ligado). Indivíduos férteis de *N. corniger* têm asas pretas, corpos escuros e olhos que estão localizadas relativamente longe dos olhos.

Segundo Zanetti *et al.* (2002), cupins são de difícil controle, uma vez que são insetos subterrâneos. São comumente vorazes e endógenos na estrutura edificada e em árvores, mostrando pouco ou nenhum sinal de sua presença, pois vivem em ninhos construídos longe do alimento e em locais ocultos e bem protegidos, sendo capazes de transitar amplamente pelo ambiente (MILANO & FONTES, 2002). O trânsito subterrâneo no solo pela população de

cupins se deve principalmente a atividade de forrageamento de alimento que geralmente abrange um território, cujo tamanho varia de acordo com a espécie. A atividade de forrageamento e de tunelamento para várias espécies de cupins de várias regiões do mundo são influenciadas também por fatores ambientais como a temperatura mínima, a umidade do solo, a umidade relativa do ar, a temperatura do solo, a precipitação pluviométrica, dentre outros, sendo que há estratégias de compensação pelos cupins para o forrageamento sob diferentes condições ambientais (GUTIERREZ & WHITFORD, 1989; HAAGSMA & RUST, 1995; UMEH & IVEJARO, 1997; HAN & NDIAYE, 1998; CRIST, 1998; SU & PUCHE, 2003; EVANS, 2003; HOUSEMAN & GOLD, 2003; AHMED & RIAZ, 2004; ARAB *et al.*,

2005; ARAB & COSTA-LEONARDO 2005; GREEN *et al.*, 2005).

2.3.2 Inseticidas naturais

De acordo com Addor (1994) inseticidas são substâncias utilizadas para controlar populações de espécies-praga que atacam plantações, construções e vetores que transmitem agentes etiológicos de doenças graves, que podem inclusive levar a morte (NAPOLÊÃO 2012).

O uso de inseticidas botânicos na agricultura diminui os custos de produção, preserva o ambiente e os alimentos da contaminação química, tornando-se prático à agricultura sustentável e contribuindo para o aprimoramento da qualidade de vida das populações envolvidas (ROEL, 2001). Vários extratos de folhas, ramos, cascas ou sementes vêm sendo testados em várias concentrações. Em estudo com *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae), Boiça Júnior *et al.* (2005) verificaram que os extratos aquosos de *Enterolobium contortisiliquum*, *Nicotiana tabacum* e *Sapindus saponaria*, a 10% de concentração, causaram uma mortalidade larval de 100%. Para *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) os extratos de folhas e de ramos de *Trichillia pallida* prejudicam o desenvolvimento do inseto afetando principalmente a fase larval, aumentando a duração e reduzindo a viabilidade deste período (THOMAZINI *et al.*, 2000). Para o ácaro verde da mandioca, *Mononychellus tanajoa* (Bondar) extratos aquosos de neem (*Azadirachta indica*) e cravo da Índia (*Syzygium aromaticum*) causaram mortalidade larval afetando a duração da fase deutocrisálida e teliocrisálida e reduzindo a viabilidade dos ovos (GONÇALVES *et al.*, 2001).

Os fagorrepelentes, do inglês “antifeedants”, são substâncias naturais que têm a propriedade de interromper o pastejo ou forrageio, podendo o efeito ser temporário ou permanente. Geralmente agem sobre o sistema nervoso central dos insetos e são também

específicos para determinadas espécies. Um exemplo clássico de fagorrepelente é a *Melia azedarach*, que é muito ativa sobre *Schistocerca gregaria* (Orthoptera: Acrididae), o gafanhoto do deserto.

Muitas lectinas de plantas têm apresentado ação contra insetos, já foram identificadas lectinas que agem contra Coleoptera (besouros), Lepidoptera (mariposas e borboletas), Homoptera (cigarras, pulgões e cochonilhas), Diptera (moscas e mosquitos) e 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.*, 2008; COELHO *et al.*, 2009;

NAPOLEÃO *et al.*, 2011, 2012, 2013). Dames na forma isotem ocorrido contra diferentes estágios de vida dos insetos como o estágio larval (FITCHES *et al.*, 2001; LEITE *et al.*, 2005; COELHO *et al.*, 2007; MACEDO *et al.*, 2007; SÁ *et al.*, 2009), de ninfa (BANDYOPADHYAY *et al.*, 2001), adultos (SAUVION *et al.*, 2004; NAPOLEÃO *et al.*, 2013) e ovos (SANTOS *et al.*, 2012).

A forma como as lectinas agem contra os insetos de ainda não foi completamente explicada mas é provável que elas estejam envolvidas na ligação as glicoproteínas das células epiteliais do intestino médio (SAUVION *et al.*, 2004) e interferência na ação de enzimas digestivas, inibindo a digestão e absorção e causando a privação nutricional (PAIVA *et al.*, 2013). Lectinas podem também cruzar o epitélio do intestino médio e passar para dentro do sistema circulatório do inseto (FITCHES *et al.*, 2001) e podem ainda ser internalizadas por vesículas endocitóticas de células epiteliais (YU *et al.*, 1999). As lectinas específicas para N-acetil-D-glicosamina ou com habilidade de se ligar à quitina geralmente possuem propriedades inseticidas, como a lectina do cerne de *Myracrodruon urundeuva* que apresenta efeito contra *Nasutitermes coniger* e *Aedes aegypti* (SÁ *et al.*, 2008; SÁ *et al.*, 2009). Mas a ação inseticida das lectinas não é exclusiva para as que são específicas de N-acetil-D-glicosamina, outras lectinas de origem vegetal com diferentes especificidades para açúcares

também apresentaram resultados positivos (LEITE et al, 2005; MACEDO et al, 2007).

2.4 BACTÉRIAS

Bactérias são organismos microscópicos, unicelulares, procariotes, que podem ser encontradas na forma isolada ou em colônias, podendo ser aeróbias ou anaeróbias facultativas (BOSSOLAN, 2002). O sistema de classificação atual dos seres vivos propõe três domínios, o domínio Archaea, o domínio Bacteria e o domínio Eucarya. Sendo o domínio Bacteria ocupado por todas as bactérias que conhecemos hoje (WOESE; KANDLER; WHEELIS; 1990).

No entanto nem sempre foi assim dentro do sistema de classificação dos seres vivos as bactérias já foram agrupadas no grupo das plantas e dos protozoários, por último foram agrupadas como constituindo o reino monera (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1996), e finalmente separadas para compor a constituição de um domínio. No entanto por serem microorganismos, o maior impedimento do avanço nos estudos das bactérias foram as restrições tecnológicas, só após a fabricação do microscópio os microorganismos puderam ser comprovados (PORTER, 1976), e ainda assim apenas cerca de duzentos anos depois a teoria da abiogênese só pode ser derrubada após Pasteur comprovar através do processo de fermentação o crescimento dos microorganismos. O avanço dos estudos levou a descoberta de que muitas bactérias são patogênicas, os primeiros estudos da microbiologia médica foram feitos no século XIX, porém os primeiros antibióticos só começaram a surgir no início do século XX (THURSTON, 2000; SCHWARTZ, 2004).

Atualmente a biotecnologia permite estudos muito mais eficientes e desenvolvimento de procedimentos e tratamentos mais específicos a cada tipo de bactéria patogênica, da mesma forma as doenças causadas por essas bactérias também são largamente estudadas, muitas delas já são bem conhecidas, a ponto de outrora serem fatais hoje podem ser

tratadas e curadas até de forma muito fácil a depender do grau de infecção, como por exemplo cólera (JEULAND et al., 2009; HOLMNER Å; MACKENZIE A; KRENGEL U 2010) e tuberculose (FRANSBLAU et al., 2012), que já foram protagonistas de grandes epidemias.

Hoje o problema se estende a bactérias imuno-resistentes, chamadas assim por terem adquirido resistência imunológica a maioria dos antibióticos utilizados na medicina atual, essa resistência aos antibióticos gera uma preocupação frequente com o risco de que uma bactéria multi-resistente possa gerar uma contaminação de proporções descontroladas (GUO, YAN, YAN, 2013; HUANG et al, 2011; HUANG et al, 2012). O risco também é muito alto em hospitais uma vez que muitas bactérias se tornam resistentes durante o tratamento médico com pessoas infectadas, podendo se gerar uma contaminação de alguma dessas bactérias a partir de uma infecção hospitalar (FUKUDA; LEE; YMANAKA; 2011; VRIJENS et al, 2010).

Agentes antibacterianos têm sido utilizados para tratar doenças causadas por bactérias, contribuindo significativamente para minimizar a severidade de infecções e reduzir taxas de mortalidade e danos humanos. Contudo, é crescente o número de relatos a cerca da emergência de microrganismos resistentes aos antibióticos comercialmente disponíveis, tais como metilina, penicilina e oxacilina (FORBES et al., 2008; CARVALHO et al., 2010; TAYLOR, 2013). Esse cenário tem estimulado pesquisas visando à descoberta de antibióticos alternativos, dentre eles os de origem vegetal (SAVOIA 2012).

Os antibióticos e os quimioterápicos interferem com diferentes atividades da célula bacteriana, possuindo efeito bactericida ou bacteriostático, sendo ambos efeitos extremamente eficientes. As interações dos antibacterianos com a célula bacteriana podem ocorrer no nível da parede celular, agem bloqueando a etapa final da síntese da parede celular, membrana citoplasmática, desorganizando a membrana, ribossomos, impedindo a

síntese de proteínas, DNA, bloqueando sua transcrição e metabolismo intermediário, bloqueia processos metabólicos da celular bacteriana (COWAN, 1999).

Atividade antibacteriana tem sido descrita para lectinas isoladas de plantas (tabela 1), tais como a lectina de cerne de *Murundeuva*, das sementes de *Eugenia uniflora*, das folhas de *Schinus terebinthifolius* e sementes de *Eugenia malaccensis* (OLIVEIRA *et al.*, 2008; SÁ *et al.*, 2009; BRUSTEIN *et al.*, 2012; GOMES *et al.*, 2013). É sugerido que a ligação das lectinas à carboidratos da parede celular bacteriana resulta em atividade antibacteriana.

Tabela 1 - Principais classes de compostos com atividade antimicrobiana obtidas de plantas

Classe	Subclasse	Exemplos	Mecanismos
Fenólicos	Fenóis simples	Catecol	Impedir a entrada de substrato
		Epicatequina	Desintegração da membrana
	Fenólicos ácidos	Ácido cinâmico	?
	Quinonas	Hypericina	Ligação com adesinas, Inativa enzimas, complexação com parede celular
	Flavonóides	Crisina	Ligação com adesinas
	Flavonas		Complexo com parede celular
		Abissinona	Inativa enzimas e inibe HIV transcriptase reversa
	Taninos	Ellagitânica	Privação de substrato, perturbação de membrana, ligação com adesinas, inativa enzimas, ligação com proteínas, complexos com íons metálicos
	Cumarinas	Wafarina	Interação com DNA eucariótico (atividade antiviral)
Terpenóides, óleos essenciais		Capsaicina	Desintegração da membrana
Alcalóides		Berberina	Interage com parede celular e/ou DNA
		Piperina	
Lectinas e polipeptídeos		Aglutina nanose específica	Forma portes dissulfeto e interage com a replicação viral
Poliacetilenos			?

Fonte: Silva (2010)

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Purificar e caracterizar parcialmente lectinas a partir de folhas e flores de *Alpinia zerumbet* e avaliá-las quanto às atividades antibacteriana e inseticida.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter extratos de folhas e flores de *A. zerumbet* em solução salina e soluções-tampão com diferentes valores de pH
- Determinar a concentração de proteínas nos extratos.
- Determinar o efeito de monossacarídeos e glicoproteínas na AH dos extratos de folhas e flores com maior AH específica
- Fracionar proteínas presentes nos extratos de folhas e flores com maior AH específica utilizando sulfato de amônio e avaliar as frações precipitadas quanto à AH e concentração de proteínas.
- Purificar as lectinas de folha (AzeLL) e flores (AzeFL) de *A. zerumbet* através de cromatografia em coluna de quitina.
- Avaliar AzeLL e AzeFL através de eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE).
- Determinar o efeito do aquecimento a diferentes temperaturas na AH dos extratos de folhas e flores com maior AH específica e de AzeLL e AzeFL.
- Avaliar a atividade antibacteriana de extratos de folha e flor, bem como de AzeLL e AzeFL contra bactérias de importância médica.

- Avaliar a atividade termiticida de extratos de folha e flor, bem como de AzeLL e AzeFL contra *Nasutitermes corniger*.

4 REFERÊNCIAS

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

AHMED, S.; HAZ, M. A. Some studies on population dynamics and chemical control of subterranean termites in sugarcane. **Pakistan Entomologist**, v. 26, n. 2, p. 11-16, 2004.

ALBUQUERQUE, L. P.; SANTANA, G. M. S.; PONTUAL, E. V.; NAPOLEÃO, T. H.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G. Effect of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin on survival and digestive enzymes of *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae). **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 75, p. 158-166, 2012

ALI, S.; SOTHEESWARAN, S.; TUWAWA, M.; SMITH, R. M. A comparison of the composition of essential oils of species *Apiinae* Hedychium - Essential oils of plants Bji, Parte 1. **J Ess Oil Res** 14: 409-411. 2002

ALMEIDA, E. R. Plantas Medicinais Brasileiras - Conhecimentos Populares e Científicos. São Paulo: Hemus. 1993

ARAB, A.; COSTA-LEONARD, A. M.; CASARIN, F. E.; GUARALDO, A. DE C.; CHAVES, R. C. Foraging activity and demographic patterns of two termite species (Isoptera: Rhinotermitidae) living in urban landscapes in southeastern Brazil. **European Journal of Entomology**, v. 102, n. 4, p. 691-697, 2005.

ARAB, A.; COSTA-LEONARD, A. M. Effect of biotic and abiotic factors on the tunneling behavior of *Coptotermes gestrai* and *Heterotermes tenuis* (Isoptera: Rhinotermitidae). **Behavioural Processes**, v. 70, n. 1, p. 32-40, 2005.

ARAÚJO, R. M. S.; VAZ, A. F. M.; AGUIAR, J. S.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G.; MELLO, A. M. M.; SILVA, T. G.; CORREIA, M. T. S. Lectin from *Crataeva tapia* bark exerts antitumor, anti-inflammatory and analgesic activities. **Natural Products and Bioprospecting** 1: 97-100, 2011.

ASAWALAM, D. O.; JOHNSON, S. Physical and chemical characteristics of soils modified by earthworms and termites. **Communications in Soil Science and Plant Analysis** v. 38, n. 34, p. 513-521, 2007.

BANDEIRA, A. G. Danos causados por cupins na Amazônia brasileira. In: FONTES, L. R., BERTI FILHO, E. (Eds). Cupins o desafio do conhecimento, **FEALQ** p. 163-172. 1998

BANDYOPADHAYAY, S.; ROY, A.; DAS, S. Binding of garlic (*Alium sativum*) leaf lectin to the gut receptors of homopteran pests is correlated to its insecticidal activity. **Hant Science**, v. 161, p. 1025-33, 2001.

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

BASAPPA, H.; RAJAGOPAL, D. Physico chemical properties of termite modified soils due to foraging on dung in comparison with surrounding soils. **Sociobiology**, v. 16, n. 3, p. 275-284, 1990.

BATTERBURY, M.; TEBBS, C. A.; RHODES, J. M.; GRIERSON, I. Agaricus bisporus (Edible Mushroom lectin) inhibits ocular fibroblast proliferation and collagen lattice contraction. **Exp. Eye Res.** 74, 361 - 370, 2002.

BLESKI, I. G. C.; Plantas Medicinais e Aromáticas nenhum Sistema Único de Saúde da Região Sul de Goiás -. Minas Gerais, 92p. Monografia - Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras. 2005.

BOIÇA-JÚNIOR, A. L., MEDEIROS, C. A. M., TORRES, A. L., CHAGAS FILHO, N. R. Efeito de extratos aquosos de plantas no desenvolvimento de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) em couve, v. 72, p. 45-50, 2005.

BRUSTEIN, V. P.; ARAÚJO, F. V. S.; VAZ, A. F. M.; ARAÚJO, R. V. S.; PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B.; CARNEIRO-LEAO, A. M. A.; TEIXEIRA, J. A.; CARNEIRO-DACUNHA, M. G.; CORREIA, M. T. S. A novel anti-microbial lectin from *Eugenia malaccensis* that stimulates cutaneous healing in mice model. **Inflammopharmacology** (Dordrecht. Print), v. 1, p. 1-8, 2012.

CANDY, L.; VAN DAMME, E. J. M.; PEUMANS, W. J.; MENU-BOUAOUICHE, L.; ERARD, M.; ROUGE, 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.

CARLIN, E. A. Screening farmacológico de Plantas Brasileiras. **Rev Bras Biol** 32: 265-274. 1972.

CAVALCANTI, B. C. et al. Genetic toxicology evaluation of essential oil of *Alpinia zerumbet* and its chemoprotective effects against H₂O₂-induced DNA damage in cultured human leukocytes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 4051-4061. 2012.

CHOMPOO, J.; UPADHYAY, A.; KSHIMOTO, W.; MAKISE, T.; TAWATA, S. Advanced glycation end products inhibitors from *Alpinia zerumbet* rhizomes. **Food Chemistry**, V. 129, p. 709-715, 2011.

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.

COELHO J. S.; SANTOS, N D L; NAPOLEÃO T. H; GOMES, F S; FERREIRA R S ; ZINGALI, R B; COELHO L C B B; LEITE, S. P.; NAVARRO D M A E; PAIVA P. M G Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae. **Chemosphere** (Oxford), v. 77, p. 934-938, 2009.

CORREIA M T S; COELHO L C B B Purification of glucose/ mannose specific lectin, Isoform 1, from seeds of *Galvia mollis* Mart (amaratubean). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 55, p. 261 - 273, 1995.

COSTA R M P B, VAZ A F M, OLIVA M L V., COELHO L C B B, CORREIA M T S Carneiro-da-Cunha M G A new mistletoe *Phthirusa pyrifolia* leaf lectin with antimicrobial properties. **Process Biochemistry** 45, 526–533. 2010.

COWAN M M Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 12, n 4, p. 564-582, 1999.

CRISTO T O The spatial distribution of termites in short grass steppe: a geostatistical approach. **Oecologia**, v. 114, n 3 p. 410-416, 1998.

CRONQUIST. Um sistema integrado de classificação das plantas com flores. Columbia University Press, Nova Iorque. 1981.

CUNHA G H et al. Vasorelaxant and antihypertensive effects of methanolic fraction of the essential oil of *Apiniazarumbet*. Original Research Article
Vascular Pharmacology, v. 58, p. 337-345, 2013.

DAHLGREN R M T; CLIFFORD HT, Y E O P. F. As famílias das monocotiledôneas - Estrutura, **Evolução e taxonomia**. Berlin Springer Verlag 1985.

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.

DE ARAÚJO PINHO E V. S.; COELHO-DE-SOUZA A N; MORAIS S M; FERREIRA SANTOS, C; LEAL-CARDOSO J. H Antinociceptive effects of the essential oil of *Apiniazarumbet* on mice. **Phytotherapy**, v. 12, p. 482-486, 2005.

DE POOTER H; ABOUTABL E; SHABRAWY E L Composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial de folhas, caule e rizoma de *Apiniazarumbet* (JC Wendl.) K Schum crescido no Egito. **Hav Fragr J** 10: 63-67. 1995.

DUTTA I.; MAJ UNDER, P.; SAHA, P.; RAY, K.; DAS, S. Constitutive and phloem specific expression of *Alium sativum* leaf agglutinin (ASAL) to engineer aphid (*Lipaphis erysimi*) resistance in transgenic Indian mustard (*Brassica juncea*). **Hant Science**, v. 169, p. 996-1007, 2005.

EDWARDS, R., MLL, A E. *Termites in Buildings: Their Biology and Control*. Rentokil, London, 1986.

ELZAAWELY, A A; XUAN, T D; TAWATA, S. Óleos essenciais, pironas kava e compostos fenólicos de folhas e rizomas de *Alpinia zerumbet* (Pers.) BL Burtt. RM & Smith e sua atividade antioxidante. **Food Chem** 103: 486-494. 2007.

ELZAAWELY, A A; XUAN, T D; KOYAMA, H; TAWATA, S. Atividade antioxidante e conteúdo de óleo essencial e compostos fenólicos e flores e sementes de *Alpinia zerumbet* (Pers.) BL Burtt.. & R M Smith **Food Chem** 104: 1648-1653. 2007a.

EVANS, T A. The influence of soil heterogeneity on exploratory tunneling by the subterranean termite *Coptotermes frenchi* (Isoptera: Rhinotermitidae). **Bulletin of Entomological Research**, v. 93, n. 5, p. 413-423, 2003.

FANG, J. Y; LEU, Y L; HWANG, T L; CHENG, H C; HUN, C F. Desenvolvimento de sesquiterpenos de *Alpinia oxyphylla* e quantificação dos novos potenciadores da permeação na pele. **Eur J Pharm Sci**. 19: 253-262. 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 with tomato moth (*Laconobia cleracea*) larvae; mechanisms of insecticidal action. **Journal of Insect Physiology**, v. 47, p. 777-87, 2001.

FRANZBLAU, S. G et al. Comprehensive analysis of methods used for the evaluation of compounds against *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculosis**, Volume 92, p. 453-488. 2012.

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. **Hant Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 61-68, 2002.

FUKUDA, H; LEE, J; IMANAKA, Y. Variations in analytical methodology for estimating costs of hospital-acquired infections: a systematic review. **Hospital Infection**, Volume 77, p. 93-105, 2011.

FUKUMORI, T, KANAYAMA, H O, AVRAHAM, R the role of galectin-3 in cancer drug resistance. **Drug resistance updates**. v. 10, p. 101-108, 2007.

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

GAI DAMASHVILI, 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.

GERLACH, D; WAGNER, M; SCHLOTT, B; ZAHNINGER, U Chemical and Physicochemical characterization of the sialic acid-specific lectin from *Cepaea hortensis*. **FEMS Microbiology Letters**, 10579, 61-68, 2002.

GOMES, F S; PROCÓPIO, T E; NAPOLEÃO, T H; COELHO, L C B B; PAIVA, P. M G Anti microbial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf. **Journal of Applied Microbiology (Print)**, v. 114, p. 672-679, 2013.

GONÇALVES, M E de C, OLIVEIRA, J. V de, BARROS, R, LIMA, M P L de. Extratos Aquosos de Plantas e o Comportamento do Ácaro Verde da Mandioca. **Scientia Agricola**, v. 58, n 3, p 475-479, jul./set. 2001

GUO, M; YUAN, Q; YANG, J. Microbial selectivity of UV treatment on antibiotic-resistant heterotrophic bacteria in secondary effluents of a municipal wastewater treatment plant. **Water Research, In Press, Corrected Proof**, Available online 19 August 2013.

HAAGSMA, K A; RUST, M K Colony size estimates, foraging trends, and physiological characteristics of the Western subterranean termite (Isoptera: *Rhinotermitidae*). **Environmental Entomology**, v. 24, n 6, p. 1520-1528, 1995.

HAHM, E R; PARQUE, S; YANG, C H 7,8-Dihydroxyflavonone como inibidor de Jun-Fos-formação do complexo de ADN e o seu efeito citotóxico sobre as células cancerosas humanas cultivadas. **Nat. Prod Res.** 17: 431-436. 2003.

HAN, S H; NDIAYE, A B L'attaque des cultures maraichères par les termites (Isoptera) dans la région de Dakar (Senegal). **Actes des Colloques Insectes Sociaux**. v. 11, p. 1137-43, 1998.

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.

HOLMNER Å; MACKENZIE A; KRENGEL U Molecular basis of cholera blood-group dependence and implications for a world characterized by climate change. **Review Article FEBS Letters**, Volume 584, p. 2548-2555, 2010.

LEE C C; HOUGHTON P. Cytotoxicity of plants from Malaysia and Thailand used traditionally to treat cancer. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 237-243, 2005.

HOUSEMAN R M; GOLD R E Factors that influence tunneling in the eastern subterranean termite, *Reticulitermes flavipes* (Kollar) (Isoptera: Reticulitermitidae). **Journal of Agricultural and Urban Entomology**, v. 20, n. 2, p. 69-81, 2003.

HUANG J. et al. Inactivation and reactivation of antibiotic-resistant bacteria by chlorination in secondary effluents of a municipal wastewater treatment plant. **Water Research**, Volume 45, p. 2775-2781, 2011.

HUANG et al. Monitoring and evaluation of antibiotic-resistant bacteria at a municipal wastewater treatment plant in China. **Environment International**, Volume 42, p. 31-36, 2012.

IBRAHIM H A Z I. Z A N; SYAMSIR D R; ALI, N A M; MOHTAR M; ALI, R M; AWANG K Óleos essenciais de *Alpinia conchigera* Giff. e suas atividades antimicrobianas. **Food Chem** 113: 575-577. 2009.

I WASHINA T. A estrutura e a distribuição dos flavonoides em plantas. **J Vegetal Res.** 113: 287-299. 2000.

JEULAND M et al. Cost-Effectiveness of New Generation Oral Cholera Vaccines: A Multisite Analysis. **Value in Health** Volume 12, p. 899-908, 2009.

JOSEPH R; JOSEPH T; JOSÉ J. Volatile constituintes do óleo essencial de *Alpinia smithiae* (Zingiberaceae). **Rev Biol Trop** 49: 509-512. 2001.

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- 838, 2007.

KAMBHAMPATI, S; EGGLETON P; Taxonomy and phylogeny of termites. in: abe, t., bignell, d e, ligashi, m (Eds.), Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology. **Kluwer Academic Publishers**, Dordrecht, pp. 1-23. 2000.

KHATTAK S; REHMAN S-U; SHAH H U; AHMAD W; AHMAD W Biological effects of indigenous medicinal plants *Curcuma longa* and *Alpinia galangal*. **Fitoterapia**, v. 76, p. 254-257, 2005.

KAVALALI, G; TUNCEL, H; GOKSEL, S; HATEM, H H Hypoglycemic activity of *Urtica pilulifera* in streptozotocin-diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 84, p. 241-

245, 2003.

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.

KOUASSI, P.; LEPAGE, M. Evolution saisonniere de populations de termites d'ecosystemes guineens (Cote d'Ivoire). **Actes des Colloques Insectes Sociaux**, v. 4, p. 333-340, 1988.

LAHLOU, S.; GALINDO, C. A.; LEAL-CARDOSO, J. H.; FONTELES, M. C.; DUARTE, G. P. Efeitos cardiovasculares do óleo essencial de *Apinã Zerumbet* folhas e seu principal constituinte, terpinen-4-ol, em ratos. Papel do sistema nervoso Autonomo. **Hanta Med** 68: 1097-1102, 2002.

LAHLOU, S.; INTERAMENSE, L. F. L.; LEAL-CARDOSO, J. H.; DUARTE, G. P. Efeitos anti-hipertensivos do óleo essencial de *Apinã zerumbet* e seu principal constituinte, terpinen-4-ol, na DOCA-sal ratos conscientes hipertensos. **Fundam Clin Pharmacol** 17: 323-330, 2003.

LARANJA, S. M. R.; BERGAMASCHI, C. M.; SCHOR, N. Avaliação de 3 Plantas com potencial efeito diurético. **Rev Assoc Med Bra** 38: 13-16, 1992.

LEE, E.; PARQUE, K. K.; LEE, J. M.; CHUN, K. S.; KANG, J. Y.; LEE, S. S.; SURH, Y. J. Supressão de ratos pele promoção tumor e indução de apoptose em células HL-60 por *Apinã Oxyphylla* Miqel (Zingiberaceae). **Carcinogenesis** 19: 1377-1381, 1998.

LEITE, Y. F. M. M.; SILVA, L. M. C. M.; AMORI, M. R. C. N.; FREIRE, E. A.; JORGE, D. M. M.; GRANGEIRO, T. B.; BENEVIDES, N. M. B. Purification of a lectin from the marine red alga *Gracilaria ornata* and its effect on the development of the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Biochimica et Biophysica Acta** 1724, 137-145, 2005.

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. 51-57, 2008.

LI MA, E. O.; GOMPERTZ, O. F.; GESBRECHT, A. M.; PAULO, M. Q. In vitro atividade antifúngica de óleos essenciais obtidos de plantas oficiais contra dermatófitos. **Micoses** 36: 333-336, 1993.

LOBATO, M.; RIBEIRO, M. F.; PINHEIRO, J. G.; MAIA, S. Atividade antimicrobiana de Óleos Essenciais da Amazônia. **Acta Amaz** 19: 355-363, 1989.

Longuefosse, J-L; Nossin, E. Medical ethnobotany survey in Martinique. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 53, p. 117-142, 1996.

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

MACEDO ML R; FREIRE MG M; SILVA M B R; COELHO L C B B. Insecticidal action of Bauhinia monandra leaf lectin (BmLL) against Anagasta kuehniella (Lepidoptera: Pyralidae), Zabrotes subfasciatus and Callosobruchus maculatus (Coleoptera: Bruchiidae). **Comparative Biochemistry and Physiology**. A146, 486–498. 2007.

MACHUKA J. S; OKEOLA O G; CHRISPEELS, M J; JACKAI, L. E. N The African yambean 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. ARAUJO-FILHO V. S; NAKAZAWA, M; GOMES, Y. M; COELHO L. C. B. B; CORREIA M. T. S. Mitogenic activity of Gratilys mollis lectin on human lymphocytes. **Biologicals**, v.32, p. 57-60, 2004.

MALLAVARAPU G R; RAO L. M; RAMESH S; DIMRI, B. P; RAO B. R; BHATTACHARYA A. K. Composição dos óleos voláteis de Alpinia galanga rizomas e folhas da Índia. **J Ess Oil Res** 14: 397-399. 2002.

MASSANI, M. B; VIGNOLO G. M; EISENBERG, P; MORANDI P. J. Adsorption of the bacteriocins produced by Lactobacillus curvatus CRL705 on a multilayer-LLDPE film for food-packaging applications. **Food Science and Technology** v. 53, p. 128-138, 2013.

MATSUDA H. S; NAKASHIMAZU O. D. A. Y; NAKAMURA S; YOSHIKAWA M. Inibidores da melanogênese dos rizomas de Alpinia officinarum em células de melanoma B16. **Bioorg Med Chem** 17: 6048-6053. 2009.

MEDEIROS, M. F. T; FONSECA V. S; ANDREATA R. H. P. Plantas medicinais e seus usos pelos fazendeiros da Reserva das Pedras do Rio Mangaratiba, RJ, Brasil. **Acta Bot Bras** 18: 391-399. 2004.

MELO C. M. L; PORTO C. S; MELO-JÚNIOR M. R; MENDES C. M; CAVALCANTI C. C. B; COELHO L. C. B. B; PORTO A. L. E; LEÃO A. M. A. C; CORREIA M. T. S. Healing activity induced by Gramoll 1,4 lectin in healthy and immunocompromised mice. **International Journal of Pharmaceutics**. p. 113-119. 2011.

MILANO S; FONTES, L. R. Cupi me cidade: Implicações ecológicas e controle. São Paulo, 2002. 142 p.

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-C from *Miscanthus sinensis* having unique sugar affinity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 243, p. 288-301, 2004.

MOORE, H. WINTER, H. C. GOLDSTEIN, I. J. Purification and characterization of a Neu-5Ac-alpha2-6Gal-beta1-4Glc/Glc/NAc-specific lectin from the fruiting body of the polypore mushroom *Polyporus squamosus*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 10623-9, 2000.

MORI TA, D. Inseticidas e bactericidas feitas de casca de óleo essencial de flor. Jpn. Oki na wa- Ken Patente dos EUA 5, 110, 594. 1992.

MOURÃO, R. M. et al. GvL, a lectin from the marine sponge *Giona 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.

MPALANTINOS, M. A.; MOURÃO, R. S.; PARENTE, J. P.; KUSTER, R. M. Flavonóides biologicamente ativos e pironas kava do extrato aquoso de *Azadirachta indica*. **Fitoterapia** 12: 442-444. 1998.

NAEEN, A.; KHAN, R. H.; MUKRAM, H. AKTIF, 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.

NAMSA, N. D.; TAGC, H.; MANDAL, B. M.; KALITA, P.; DAS, A. K. Um estudo etnobotânico de plantas anti-inflamatórias tradicionais utilizados pela comunidade Lohit de Arunachal Pradesh, na Índia. **J Ethnopharmacol** 125: 234-245. 2009.

NAPOLÉÃO 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.

NAPOLÉÃO T. H.; GOMES, F. S.; LIMA, T. A.; SANTOS, N. D. L.; SÁ, R. A.; ALBUQUERQUE, A. C.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G. Termiticidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* against *Nasutitermes corniger* and its mechanisms. **International Biodeterioration and Biodegradation**, 65: 52-59. 2011.

NAPOLÉÃO T. H.; PONTUAL, E. V.; LIMA, T. A.; SANTOS, N. D. L.; SÁ, R. A.; COELHO, L. C. B. B.; FERRAZ, NAVARRO, D. M. A.; PAIVA, P. M. G. Effect of *Myracrodruon urundeuva* leaf lectin on survival and digestive enzymes of *Aedes aegypti* larvae. **Parasitology Research** 110: 609-616. 2012.

NAPOLÉÃO T. H.; SANTOS, LILHO, T. G.; PONTUAL, E. V.; FERREIRA, R. S.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G. Affinity Matrices of *Glycyrrhiza mollis* Seed

Lectins for Isolation of Glycoproteins from Complex Protein Mixtures. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. xx, p. 1-12, 2013.

NAPOLÉÃO T H; BELMONTE, B R ; PONTUAL, E V; ALBUQUERQUE, L P; SÁ R A; PAIVA L M; COELHO L C B B; PAIVA P. M G Deleterious effects of Myracrodruon urundeuva leaf extract and lectin on the maize weevil, *Stophilus zeamais* (Coleoptera, Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**, v. 54, p. 26-33, 2013b.

NASCIMENTO C Q 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 *Garaeva tapinga* using AOT in isooctane reversed micelles. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 779-82, 2008.

NGAI, P. H K; NG T B A mushroom (*Gonoderma 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.

NUNES E S; SOUZAM A A; VAZ A F M; SANTANA G M S; GOMES F S; COELHO L C B B; PAIVA P. M G; SILVA R M L; SILVA-LUCCAR A; OLIVAM L V; GUARNERI M C; CORREIA M T S Purification of a lectin with antibacterial activity from *Bothrops leucurus* snake venom v. 159, p. 57-63, 2011.

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 P; NUNES, E P; CAPISTRANO G G G; MONTEIRA 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 P PIREZ, C V OLIVEIRA M G A Purification and partial characterization of a lectin from *Caesalpinia tinctoria* Donb, ex Dc fruits. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 15 (2), p. 119-122, 2003.

OLIVEIRA M D L; ANDRADE, C D S; SANTOS-MAGALHAES, 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 A C, VALENTI M I. B, GOULART, M O F, SILVA C A, BECHARA E J. H, TREVISAN M T S Fontes Vegetais Naturais de antioxidantes. **Quim Nova** 32: 689-702. 2009

OLIVEIRA C F R; LUZ, L A; PAIVA P. M G; COELHO L C B B; MARANGONI, S; MACEDO M L R. Evaluation of seed coagulant *Moringa oleifera* lectin (cMoL) as a

bioinsecticidal tool with potential for the control of insects. **Process Biochemistry** (1991), v. 46, p. 498-504, 2011.

OLIVEIRA, L. S. M.; SUN, S. S. M.; OLIVEIRA, 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.

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

PATRICIO, B. F. C.; MACHADO, M. L. M.; RIBEIRO, C. M. T. S.; CARNEIRO, L. A. A.; ALBERNAZ, M. S.; BARBOZA, T.; SOUZA, S. A. L.; SANTOS, O. L. V. R. Radiolabeling of Galathea 1,4: Evaluation of the Biodistribution. **International Journal of Peptides**, v. 2011, Article ID 945397, 3 pages, 2011.

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEGER, N. R. *Microbiology*, vol. I, 2a edição - São Paulo: Makron Books, 1996.

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

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. D. A. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. D. A. Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e Perspectivas. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.

PLUMER, D. T. An introduction to practical biochemistry. 2 ed. London: McGraw-Hill. Cap. 3, p. 47-98. Separations Methods. 1978.

PONTUAL, E. V.; NAPOLEÃO, T. H.; ASSIS, C. R. D.; BEZERRA, R. S.; XAVIER, H. S.; NAVARRO, D. M. A. F.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G. Effect of Moringa oleifera flower extract on larval trypsin and acetylcholinesterase activities in *Aedes aegypti*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology** 79: 135-152, 2012.

PORTER, J. R. "Antony van Leeuwenhoek: Tercentenary of his discovery of bacteria". **Bacteriological Reviews** 40 (2): 260-269, 1976.

PUGALLI, H. R. L.; KAPLAN, M. A. C.; GOTTILIEB, O. R. Quimiotaxonomia de superordem Zingiberiflorae (sensu. Dahlgren) I. Os flavonóides. **Acta Bot Bras** 7: 135-148, 1993.

RAMESH S; NAGADHARA D; REDDY, V D; RAO K V. Production of transgenic medic rice resistant to yellow stem borer and sap-sucking insects, using super-binary vectors of *Agrobacterium tumefaciens*. **Hant Science**, v. 166, p. 1077-85, 2004.

RATANAPONG S; NGAMUNYAPORN W; CHULAVATNATOL M. Interaction of a mulberry leaf lectin with a phytopathogenic bacterium *P. Syringae* pv *mori*. **Hant Science**, v. 160, p. 739 - 744, 2001.

REYNOSO-CAMACHO, R; DE MEJIA E G; LOARCA-PINA G. Purification and acute toxicity of a lectin extracted from tepary bean (*Phaseolus acutifolius*). **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, p. 21-7, 2003.

RIPOLL, C; FAVERY, B; LECOMTE, P; VANDAMME E; PEUMANS, W; ABAD P; JOUANNE L. Evaluation of the ability of lectin from snowdrop (*Galanthus nivalis*) to protect plants against root-knot nematodes. **Hant Science**, v. 164, p. 517-23, 2003.

ROLIM, A D M M; MACÊDO M F S; SISENANDO H A; NAPOLEÃO T H; FELZENSZWALB I.; ALBUQUERQUE C B B; Medeiros S R B; Paiva P. M G. Genotoxicity Evaluation of *Moringa oleifera* Seed Extract and Lectin. **Journal of Food Science**, Volume 76, p. T53–T58, 2011.

RUDIGER, H; SIEBERT, H C; SOLIS, D; JIMENEZ-BARBERO J.; ROMERO A; VON DER LEITH C W; DIAZ-MARTINEZ; GABUS, 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.

SÁ R A. Constituintes químicos da madeira de lei *Myracrodruon urundeuva* com propriedades antioxidantes e ação contra fungos, bactérias e insetos. Tese (Doutorado em Química Fundamental), Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco. 2008.

SÁ R A; GOMES, F S; NAPOLEÃO T H; SANTOS, N D L; MELLO C M L; GUSMÃO N B; COELHO L C B B; PAIVA P. M G; HEBEL, L W. Antibacterial and antifungal activities of *Myracrodruon urundeuva* heart wood. **Wood Science Technology**, v. 43, p. 85-95, 2009.

SÁ R A; NAPOLEÃO T H; SANTOS, N D L; GOMES, F S; ALBUQUERQUE, A C; XAVIER, H S; COELHO L C B B; HEBEL, L W; PAIVA P. M G. Induction of mortality on *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae) by *Myracrodruon urundeuva* heart wood lectin. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 62, p. 460-464, 2008.

SANDRINI GARCIA P.; BRANDÃO L A C; COELHO A V C; GUIMARÃES R L; PANCOTO J. A T; SEGAT L; DONADEL A; IIMAFILHO J. L; CROVELLA S. Mannose binding lectin gene (MBL2) functional polymorphisms are associated with systemic lupus erythematosus in southern Brazilians. **Human Immunology** 72: 516-521. 2011.

SANTOS, A.F.S., ARGOLLO A.C.C., COELHO L.C.B.B., PAIVA P.M.G. Detection of

water soluble lectin and antioxidant component from *Moringa oleifera* seeds. **Water Research** 39, 975–980, 2005.

SANTOS, A F S; LUZ, L A; ARGOLLO, A C C; TEIXEIRA, J. A; PAIVA, P. M G; COELHO, L. C B B Isolation of a seed coagulant *Moringa oleifera* lectin. **Process Biochemistry** 44, p. 504–8, 2009.

SANTOS, A F S; PAIVA, P. M G; TEIXEIRA, J. A C; BRITO, A G; COELHO, L. C B B; NOGUEIRA, R Coagulant properties of *Moringa oleifera* protein preparations: application to humic acids removal. **Environmental Technology** 33, p. 69–75, 2012.

SANTO, GADELHA, T; GADELHA, C A A; ARAGÃO, K S; OLIVEIRA, C; MOTA, H R L; GOMES, R C; PIRES, A F; TOYAMA, M H; TOYAMA, D Q; ALENCAR, N X N; CRIDDELL, D N; ASSREUY, A M S; CAVADA, B S Purification and biological effects of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) seed lectin **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 350, p. 1050–1055, 2006.

SAUMON, N; NARDON, G; FEBVAY, G; GATEHOUSE, A M R; RAHBE, Y Binding of the insecticidal lectin Concanavalin A in pea aphid *Acyrtosiphon pisum* (Harris) and induced effects on the structure of midgut epithelial cells. **Journal of Insect Physiology** 50, 1137–1150, 2004.

SAVOIA, D, Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics. **Future Microbiology**, 7: 979–990, 2012.

SCHEFFRAHN, R H; CABRERA, B J; KERN, J. R. W J; SUN, Y Nasutitermes costalis (Isoptera: Termitidae) in Florida: first record of a non-endemic establishment by a higher termite. **Florida Entomologist** 85, 273–275, 2002.

SCHEFFRAHN, R H; KRECEK, J.; SZALANSKI, A L; AUSTIN, J. W 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, 2005.

SCHWARTZ, R Paul Ehrlich's magic bullets. **N Engl J Med** 350(11): 1079–1080, 2004.

SHARON, N; LIS, H A century of lectin research. **Trends in Biochemical Science**, v. 12, p. 488–91, 1988.

SHARON, N; LIS, H Carbohydrates in cell recognition. **Scientific America**, V.268, p. 74–81, 1993.

SHELTON, T. G; GRACE, J. K Termite physiology in relation to wood degradation and termite control. **Wood deterioration and preservation: advances in our changing world**, p. 242–252, 2003.

SILVA, S. N Purificação e caracterização de preparações lectínicas da folha da caesalpinia férrea: avaliações biológicas. **Dissertação (mestrado em Bioquímica e Fisiologia)** Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2009.

SILVA N C C Estudo comparativo da ação antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais e sinergismo com drogas anti microbianas. Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Instituto de Biociências (UNESP), 2010.

SILVA M C C; SANTANA L A; MENTELE R; FERREIRA R S; MRANDA A; SILVA L UCCA R A; SAMPALLO M U; CORREIA M T S; OLIVA M L V Purification, primary structure and potential functions of a novel lectin from *Bauhinia forficata* seeds. **Process Biochemistry**, v. 47, p 1049-1059, 2012.

SILVA C D C; CORIOLANO M C; LINO M A S, MELO C M L; BEZERRA R S B; CARVALHO E V M M; SANTOS A J. G; PEREIRA V R A; COELHO L C B B Purification and characterization of a mannose recognition lectin from *Oreochromis niloticus* (Tilapia Fish): Cytokine production in mice splenocytes. **Applied Biochemistry and Biotechnology** 166: p 424-435, 2012.

SIRIRUGSA P. Thai Zingiberaceae: Diversidade de espécies e seus usos. 1999. www.iupac.org/symposia/proceedings/phunket97/sirirugsa, acesso em 2013.

SOL, F G D CAVADA, B S; CALVETE, J. I. Crystal structures of Bauhinia floribunda seed lectin at acidic and basic pH. Insights into the structural basis of pH-dependent dimer-tetramer transition. **Journal of structural Biology**, v. 158, p 1-9, 2007.

SORCI, M BQ, C FACCHIN, R SARTI, G C Purification of galactose-specific lectins by affinity membranes. **Desalination**, v. 199, p 550-552, 2006.

SOUZA J. D; SILVA M B R; ARGOLO A C C; NAPOLEÃO T H; SÁ R A; CORREIA M T S; PAIVA P. M G; SILVA M D C; COELHO L C B B A new *Bauhinia monandra* galactose-specific lectin purified in milligram quantities from secondary roots with antifungal and termiticidal activities. **International Biodeterioration and Biodegradation** 65: 696-702, 2011.

SUN Y; PUCHE, H Tunneling activity of subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae) in sand with moisture gradients. **Journal of Economic Entomology**, v. 96, n. 1, p 88-93, 2003.

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.

TAQ L; HU H Z; XANG SHEN C Endothelium dependent vasodilatation effects of the essential oil from *Fructus Apinae* Zerunbet (EOFAZ) on rat thoracic aortic rings *in vitro* **Original Research Article Phytomedicine**, v. 20, p 387-39, 2013.

TASUM, S; YANG W J.; USAM, T; TSUTSU, S; O-HIRA T; KAWAZOE, I; WILDER, M N; AIDA K; SUZUKI, Y Characteristics and primary structure of galactinin in the skin mucus of the Japanese eel, *Anguilla japonica*. **Developmental Comparative Immunology**, v. 28, p 325 - 335, 2004.

TAYLOR, A R Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, 40: 637-654. 2013.

TAWATA, S; FUKUTA, M; XUAN, T. D; DEBA, F. Total utilização de plantas tropicais *Leucaena leucocephala* e *Apiña zerunbet*. **J Pestic Sci** 33: 40-43. 2008.

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.

THOMAZIN, A P; DEB, W; VENDRAM, M J. D; LOPES, M T DOR. Extratos aquosos de *Trichilia pallida* e a traça-do-tomateiro. **Scientia Agrícola**, v.57, n 1, p. 13-17, 2000.

TOMLINSON, P. B Commelinales - Zingiberales. In: Metcalfe, C R Anatomia das monocotiledôneas. Clarendon Press, Oxford 3: 341-359. 1969.

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.

THURSTON A. Of blood, inflammation and gunshot wounds: the history of the control of sepsis". *Aust NZ J Surg* 70 (12): 855-861. 2000.

UMEH, V. C; IBEJARO, M E. Termite abundance and damage in traditional maize cassava intercrops in southwestern Nigeria. **Insect Science and its Application**, v. 17, n 3/4 p 315-321, 1997.

VALERIE C, TRIPET, C; GOEL, A; NERBERT, L; CAREY, L Dynamical Studies Of A Temperature-Sensitive Mutant Of The Tryptophan Repressor Protein, L75F-TrpR. **Biophysical Journal**, v. 96, p 322a. 2009.

VAN DAMME, E. J. M; PEUMANS, W J.; BARRE, A; ROUGÉ, P. Plant lectins: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Plant Sciences**. V. 17, nº 6 p 575-692. 1998.

VARMA, R V; SWARAN, P. R Diversity of termites in a young eucalypt plantation in the tropical forests of Kerala, India. **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 27, n 2, p 95-101, 2007.

VAZ, A F M; COSTA, R M P. B; MELO, A M M A; OLIVA, M L V; SANTANA, L A; SILVA-LUCCAR, A; COELHO, L C B B; CORREIA, M T S Biocontrol of *Fusarium* species by a novel lectin with low cytotoxicity isolated from *Sebastiania jacobinensis*. **Food Chemistry** 119, 1507–1513. 2010.

VEGA, N PEREZ, G Isolation and characterization of a *Salvia bogozensis* seed lectin specific for the Tn antigen. **Phytochemistry**, v.67, p 347-355, 2006.

VICTÓRIO, C P.; KUSTER, R M; SOARES DE MOURA, R; LAGE, C L S Atividade

vasodilatadora de extratos de campo *Alpinia purpurata* (Veill) K Schum e *A. zerumbet* (Pers.) Burtt Smith et cultivadas in vitro. **Braz J Pharm Sci** 45: 507-514. 2009a.

VICTÓRIO C P.; LEITÃO S G; LAGE, C L S. A composição química dos óleos de folhas de *Alpinia zerumbet* (Pers.) Burtt et Smith e *A. purpurata* (Veill) K Schum do Rio de Janeiro, Brasil. **J Ess Oil Res** 22: 52-54. 2010b.

VICTÓRIO C P.; ARRUDA, R C O; REHL, C A S; LAGE, C L S; Voláteis de folhas e células secretoras de *Alpinia zerumbet* (Pers.) Burtt et . Smith (Zingiberaceae). **Nat Prod Res** 5: 1219-1223. 2010c.

VRIJENS, F. Hospital-acquired, laboratory-confirmed bloodstream infections: linking national surveillance data to clinical and financial hospital data to estimate increased length of stay and healthcare costs. **Journal of Hospital Infection**, Volume 75, p 158-162, 2010.

WÄLTJ, M A; WALSER, P J; THORE, S; GRÜNLER, A; BEDNAR, M; KÜNZLER, M; AEBI, M Structural Basis for Chitotetraose Coordination by CGL3, a Novel Galectin-Related Protein from *Coprinopsis cinerea*. **Journal of Molecular Biology**, v. 379, p 146-159, 2008.

WANG, Y C; HUANG, T L Triage de anti-*Helicobacter pylori* ervas provenientes de plantas medicinais foliáceas de Taiwan. **FEMS Immunol Med Microbiol** 43: 295-300. 2005.

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.

WEI, X; LIU, X; YANG, J.; FANG, J.; QIAO, H; ZHANG, Y; YANG, J. Two G-type lectins from shrimp *Litopenaeus vannamei* that might be involved in immune response against bacteria and virus. **Fish & Shellfish Immunology** 32, 132-140. 2012.

WINTERS, G Jardimagem - Zingiberaceae. Revista Natureza 91: 14-23. 2005

WITTSUWANNAKUL, R; WITTSUWANNAKUL, D; SAKULBORIRUG, C A Zectin from the bark of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*). **Phytochemistry**, v. 47, n. 2 j: 183-187, 1998.

WONG, J H; NG, T B Purification of a trypsin-stable lectin with antiproliferative and Eff-1 reverse transcriptase inhibitory activity. **Biochemical and Biophysical research Communications**, v. 301, p 545-550, 2003.

WOESE, C R; KANDLER, O; WHEELIS, M L Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990; 87: 4576-4579.

WU, A M; WU, J. H; TSAI, M S; HERP, A Carbohydrate specificity of an agglutinin isolated from the root of *Trichosanthes kirilowii*. **Life Science**, v. 66, p 2571 —2581, 2001.

XIMENES, N C A, Caracterização e avaliação de atividades biológicas da lectina da vagem de *Caesalpinia férrea* (CfePL). Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco. 2009.

YAN, Q; YANG, Z; YANG, S; DENG, W; HAN, L. A novel homodimeric lectin from *Astragalus mongholicus* with antifungal activity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 442, p. 72-81, 2005.

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

YU, L. G.; FERNING, D. G.; WHITE, M. R. H.; SPILLER, D. G.; APPLETON, P.; EVANS, R. G.; GRIERSON, I.; SMITH, I. A.; DINES, 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.

ZANETTI, R.; CARVALHO, G. A.; SOUZA-SILVA, A.; SANTOS, A.; GODOY, M. S. Manejo Integrado de Cupins. **Lavras: UFLA – MG**, p. 29, 2002.

ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S. Constituintes voláteis das folhas e flores de *Alpinia speciosa* K. Schum e *A. purpurata* Schum (Vell.). **Rev Bras Frut** 14: 411-414, 1999.

5. ARTIGO 1

Purification and partial characterization of lectins from *Alpinia zerumbet* (Zingiberaceae) leaves and flowers

Sandro do Nascimento Silva, Emmanuel Viana Pontual, Patrícia Maria Guedes Paiva, Thiago

Henrique Napoleão, Maria Tereza dos Santos Correia*

*Departamento de Bioquímica-CCB, Universidade Federal de Pernambuco,
Cidade Universitária, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil.*

*Corresponding author. Tel: +558121268540; fax: +558121268576. E-mail:

ntscorreia@gmail.com

Abstract

Alpinia zerumbet (butterfly ginger) is a plant with ornamental importance and also well known in folk medicine showing several pharmacological properties. This work reports the purification and partial characterization of lectins, carbohydrate-binding proteins, from leaves (AzeLL) and flowers (AzeFL) of *A. zerumbet*. Extracts from leaves and flowers prepared in saline solution (0.15 M NaCl) or distinct buffer and pH values (0.1 M citrate-phosphate pH 5.0, 6.0, 6.5 or 7.0 and 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 and 9.0) were evaluated for hemagglutinating activity and protein concentrations. The extracts in citrate-phosphate pH 7.0 showed highest specific hemagglutinating activity and were called leaf extract (LE) and flower extract (FE). Hemagglutinating activities of LE and FE were inhibited by *N*-acetylglucosamine and treatment of extracts with ammonium sulphate did not result in preparations richer in lectin. Thus the lectins were purified from leaf and flower extracts in 0.1 M citrate-phosphate pH 7.0 using chromatography on chitin columns. AzeLL and AzeFL were recovered in adsorbed protein peaks eluted with 1.0 M acetic acid and showed specific hemagglutinating activities of 640 and 984.6, respectively. The flower extract (FE) and AzeFL completely lost their hemagglutinating activity after 30 min at 70 °C while the leaf extract (LE) lost its activity only at 100 °C and AzeLL after heating at 80 °C. The isolation of AzeLL and AzeFL stimulates the evaluation of their biological activities and biotechnological potential.

Keywords: lectin purification, flower, leaf, thermostability, butterfly ginger.

1 Introduction

Alpinia zerumbet (Pers.) Burt & Smith is a plant from Zingiberaceae family that is broadly cultivated for ornamental purposes. It is also used in folk medicine and its leaves, flowers, and rhizomes have several pharmacological properties such as depurative and diuretic effects, anti-hysterical, antiinflammatory, antioxidant, hypotensive, and antihelminthics, among others (Laranja, et al, 1992; Almeida, 1993; Bezerra et al, 2000; Elzaawely et al, 2007).

Lectins are carbohydrate-binding proteins that have been isolated from several parts of plants including roots, rhizomes, leaves, flowers, fruits, seeds, bark and heart wood (Correia and Coelho, 1995; Coelho and Silva, 2000; Naeem et al, 2001; Oliveira et al, 2003; Wang and Ng, 2003, Oliveira et al, 2008, Sá et al, 2008; Costa et al, 2010). These proteins can be identified in a sample through the hemagglutinating assay followed by assay of hemagglutinating activity inhibition by simple or complex carbohydrates. This last assay also defines the carbohydrate specificity of lectin and may direct the choice of the ideal affinity matrix for purification (Nunes et al, 2011; Fernandez-del-Carne et al, 2013).

Lectins have shown several biological activities that stimulate the evaluation of their biotechnological potential. Lectins have been studied as antibacterial, antifungal, antitumor and insecticidal agents (Coelho et al., 2007; Sá et al, 2009, Napoleão et al, 2011; Araújo et al, 2011) as well as components of microarrays and electrochemical sensors that can be used as analytical and diagnosis tools, for example (Gemeiner et al, 2009; Oliveira et al, 2011). For all these biotechnological purpose it is imperative the characterization of structure and physico-chemical properties of the lectin since it needs to be stable in an environment many times totally distinct from the plant cell or tissue from which was extracted. Physico-

chemical characterization of lectins includes evaluation of stability toward different temperatures and pH values. Structural characterization of lectins involves several techniques. One of them is the polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), which can be performed in the presence or not of a denaturing agent (usually sodium dodecyl sulfate, SDS) and/or a reducing agent (usually β -mercaptoethanol or dithiothreitol) that will unfold the protein and break disulfide bridges, respectively. The PAGE under native conditions reveals the homogeneity and net charge of lectin and PAGE under denaturing and reducing conditions reveals the subunit composition and molecular weight of protein (Reynoso-Camacho et al., 2003; Paiva et al., 2010).

This paper describes the extraction, purification and partial characterization of lectins from the leaf (AzeLL) and flower (AzeFL) of *A. zerumbet*.

2 Materials and methods

2.1 Plant collection

Leaves and flowers of *A. zerumbet* were collected in gardens of the Recife city, Pernambuco. Washed with tap water, dried and separately powdered using a blender.

2.2 Protein extraction

Leaf powder was homogenized with 0.15 M NaCl, 0.1 M citrate phosphate pH 5.0, 6.0, 6.5 or 7.0 or 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 in a proportion of 5% (w/v) during 16 hours at 28 °C under constant stirring. Then the homogenates obtained were filtered in gauze and submitted to centrifugation for 15 min at 8,000 x g and 28 °C. The supernatants (extracts) were evaluated for hemagglutinating activity and protein concentration. The same procedure and buffers were used to extract proteins from flower powder and then obtaining the extracts from flowers. The extracts obtained with 0.01 M citrate-phosphate pH 7.0 were

used in the next steps for lectin purification and were referred as leaf extract (LE) and flower extract (FE) in the next sections of this paper.

2.3 Protein concentration

Protein concentration was estimated according to Lowry et al. (1951) using a standard curve of bovine serum albumin (BSA) with values between 31.25 and 500 µg/mL. In chromatography assays protein elution was monitored by reading the absorbance at 280 nm.

2.4 Hemagglutinating activity

Rabbit blood samples were collected and mixed with Alsever anticoagulant solution (2.05 g dextrose, 1.2 g sodium citrate, 0.42 g sodium chloride, and 0.055 g citric acid per 100 mL of distilled water) in a 1:1.6 (blood/anticoagulant) (Bukantz et al., 1963). Next the erythrocytes were fixed with glutaraldehyde (Bing et al., 1967) and after washing a 2.5% (v/v) cell suspension in 0.15 M NaCl was obtained.

Hemagglutinating assay was performed according to Correia and Coelho (1995) using microtiter plates (Techno Plastic Products, Trasadingen, Switzerland). The sample (50 µL) was added to a well containing 0.15 M NaCl (50 µL) and then double-dilutions were performed to fill two rows of the microplate. Next, 50 µL of rabbit erythrocyte suspension were added to each well. One hemagglutinating unit (titer^{-1}) was defined as the reciprocal of the highest dilution of the sample that was able to promote full agglutination. Specific hemagglutinating activity (unit/ng) was defined as the ratio between hemagglutinating activity and protein concentration (ng/mL).

Hemagglutinating activity was also evaluated after previous incubation (15 min) of leaf extract with different concentrations of monosaccharides (fructose, galactose, N-acetylglucosamine) or glycoproteins (fetuin, thyroglobulin, ovalbumin) before addition of

erythrocyte suspension.

2.5 Protein precipitation with ammonium sulphate

LE and FE were submitted to treatment with ammonium sulfate at different saturations (0-20 % 20-40 % 40-60 % 60-80 % 0-40 % 0-60 % or 0-80 %) according to Green and Hughes (1955). The precipitated fractions obtained were dialyzed against distilled water (4 h) followed by 0.1 M citrate-phosphate pH 7.0 (4 h) and evaluated for protein concentration and hemagglutinating activity.

2.6 Chromatography on chitin columns

For purification of AzeLL, LE (4.4 ng of protein) was chromatographed on chitin (Sigma-Aldrich, USA) column equilibrated with 0.1 M citrate-phosphate pH 7.0. After extensive washing with equilibration buffer the adsorbed proteins were eluted with 1.0 M acetic acid. The pool of eluted fractions was dialyzed against distilled water (4 h) followed by

0.15 M NaCl (4 h) and called AzeLL. For purification of AzeFL, the same procedure described above was used starting from FE (4.1 ng of protein).

2.7 Polyacrylamide gel electrophoresis

Electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulphate (SDS-PAGE) was performed on 12 % (w/v) gel according to Laemmli (1970). AzeLL and AzeFL polypeptides and molecular mass markers (phosphorylase b, 97,000 Da, albumin, 66,000 Da, ovalbumin, 45,000 Da, carbonic anhydrase, 30,000 Da, soybean trypsin inhibitor, 20,100 Da, α -lactalbumin, 14,400 from GE Healthcare Life Sciences, Sweden) were stained with Coomassie Brilliant Blue in 10 % acetic acid (0.02 % v/v).

2.8 Heat-stability of he magglutinating activity

LE, FE, AzeLL and AzeFL were submitted to heating for 30 min at 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 or 100 °C. After each heating period the he magglutinating activity was determined as described in section 2.4.

3 Results and discussion

The he magglutinating activity and protein concentrations of extracts obtained from leaves and flowers are shown in Table 1. For both leaves and flowers the extracts with highest specific he magglutinating activity were obtained with 0.1 M citrate-phosphate pH 7.0 and thus called LE and FE and chosen as starting materials for lectin purification.

Once lectins are proteins their structures and stability are influenced by pH. The pH of the extraction step is very important because the activity of lectins needs ideal conditions for maintenance of native structure. The pH has varied effect on distinct lectins; in some cases it does not affect the activity (Wittsuwannakul et al., 1998) but in others the lectin loses its activity in a particular pH range, such as the cases of the lectin of *E. speciosa* (Konozy et al., 2003) and the lectin of *Ganoderma capense* (Ngai and Ng, 2004).

He magglutinating activity of LE and FE was evaluated in presence of carbohydrates and glycoproteins (Table 2). The activity of both extracts was more inhibited by *N*-acetylglucosamine. The glycoproteins fetuin, thyroglobulin and albumin also inhibited he magglutinating activity. The inhibition by carbohydrates and/or glycoconjugates assures the lectin nature of agglutination as well as can be used as an indicative to establish what will be the matrix used in chromatography step.

In attempt to obtain more concentrated lectin preparations, the extracts were submitted to salt fractionation. However, the Specific he magglutinating activity obtained for

all fractions, which ranged from 80 unit/ ng to 4876.2 unit/ ng for precipitated fractions from leaves and from 156.1 unit/ ng to 266.7 unit/ ng for flower fractions, were lower than those obtained for the extracts. For this reason, the extracts were used in chromatography step. Since the hemagglutinating activities of LE and FE were more inhibited by *N*-acetylglucosamine we used columns of chitin, which is a homopolysaccharide composed by this monosaccharide.

Chromatography of LE on chitin column (Figure 1A) resulted in a single adsorbed protein peak eluted with 1.0 M acetic acid. This peak showed specific hemagglutinating activity of 640 and was called AzeLL. The lectins showed a band of high molecular weight which did not migrate in the gel (Figure 1A inset). The presence of staining in the top of the gel is an indication that AzeLL did not migrate. This may be occurred because the acrylamide concentration in the gel for medium sized mesh networks of polyacrylamide occluding lectin migration or because the presence of high molecular mass aggregates in AzeLL.

When FE was chromatographed, it was also obtained a single adsorbed protein peak eluted with 1.0 M acetic acid (Figure 1B). This peak, which was called AzeFL, showed specific hemagglutinating activity of 984.6. No band was also observed for AzeFL on SDS-PAGE (Figure 1B inset), probably because the same reasons suggested for AzeLL.

LE, FE, AzeLL and AzeFL were evaluated for stability of hemagglutinating activity to heating. Hemagglutinating activity of LE and AzeLL were abolished only after heating at 90

°C and 70 °C, respectively. This result can be due to the presence of other lectins in the extract, which is also suggested by the highest specific hemagglutinating activity of extract. On the other hand, both FE and AzeFL lose their hemagglutinating activity at 70 °C (figure 2).

Plant lectins can be therm-sensitive or therm-stable; in addition they also

possess an optimal temperature which is more favorable for its native structure. Similarly to AzeLL and AzeFL, some plant lectins remain active until 55-65°C such as the lectin *Luetzelburgia auriculata* (Oliveira et al., 2002) while others remain active up to 100°C such as *Moringa oleifera* seed lectins (Coelho et al., 2009; Santos et al., 2009), *Schinus terebinthifolius* leaf lectin (Gomes et al., 2013), and *Sebastiania jacobinenses* bark lectin (Vaz et al., 2010).

In conclusion, leaf and flowers of *A. zerumbet* contain lectins that can be purified by chitin chromatography. This work stimulated the evaluation of biological activities and biotechnological applications of lectins.

Acknowledgments

This work was financially supported by the *Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco* (FACEPE), the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES) and the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq). S. N. Silva would like to thank FACEPE for graduate scholarship. E. V. Portual would like to thank FACEPE and CAPES for post-doctoral scholarship. P. M. G. Paiva and M. T. S. Correia would like to thank CNPq for research grants and fellowships.

References

- Almeida, E. R.** 1993. *Plantas Medicinais Brasileiras - Conhecimentos Populares e Científicos*. São Paulo: Hemus.
- Araújo, R. M. S.; Vaz, A. F. M.; Aguiar, J. S.; Coelho, L. C. B. B.; Paiva, P. M. G.; Melo, A. M. M.; Silva, T. G.; Correia, M. T. S.** 2011. Lectin from *Grataeva tapia* bark exerts antitumor, anti-inflammatory and analgesic activities. *Natural Products and Bioprospecting* 1: 97-100.
- Bezerra, R. S.; Santos, J. E.; Paiva, P. M. G.; Correia, M. T. S.; Coelho, L. C. B. B.; Veira, V. L. A.; Carvalho, 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.

Bing, D H, Weyand, J. M Stanislawski, A B, 1967. **Hemmagglutination with aldehyde – fixed erythrocytes for assay of antigens and antibodies**. Proc. Soc. Cyp. Boil. 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.

Coelho, L C B B; Da Silva, M B R 2000. Simple method to purify milligram quantities of the galactose – specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. *Hydrochemical Analysis*, v. 11, 295 – 300.

Coelho, L C B B; Leite, S P.; Navarro, D M A F.; Paiva, P. M G 2009. Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae. *Chemosphere* (Oxford), v. 77, p 934-938.

Coelho, J S; Santos, N D L; Napoleão, T H; Gomes, F S; Ferreira, R S ; Zingali, R B;

Correia, M T S; Coelho, L C B B 1995. Purification of glucose/ mannose specific lectin, Isoform 1, from seeds of *Galvilia mollis* Mart (camaratubean). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 55, p 261 – 273.

Costa R M P B, Vaz A F M, Oiva M L V, Coelho L C B B, Correia M T S Carneiro-da-Cunha M G 2010. A new mistletoe *Phthirusa pyrifolia* leaf lectin with antimicrobial properties. *Process Biochemistry* 45, 526–533.

Elzaawely, A A; Xuan, T D; Tawata, S 2007. Os óleos essenciais, pironas kava e compostos fenólicos de folhas e rizomas de *Alpinia zerumbet* (Pers.) BL Burtt. RM & Smith e sua atividade antioxidante. *Food Chem* 103: 486-494.

Gomes, F S; Procópio, T F.; Napoleão, T H; Coelho, L C B B; Paiva, P. M G 2013. Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf. *Journal of Applied Microbiology* (Print), v. 114, p 672-679.

Konozy, E H; Bernardes, E S.; Rosa, C; Faca, V; Greene, L J.; Ward, R J. 2003. 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,

Laranja, S M R; Bergamaschi, C M; Schor, N 1992. Avaliação de 3 Plantas com potencial Efeito diurético *Rev Assoc Med Bra* 38: 13-16.

Naeen, A; Khan, R H; Vikram H Akf, M Purification of *Cajanus cajan* root lectin and its interaction with rhizobial lipopolysaccharides as studied by different spectroscopic techniques. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 396, n 1, p, 99 -105, 2001

Napoleão, T H, Gomes, F S, Lima, T A, Santos, N D L, Sá, R A, Albuquerque, A C, Coelho, L C B B, and Paiva, P. M G, 2011. Termiticidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* against *Nasutitermes corniger* and its mechanisms. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 65: 52-59.

Ngai, P. H K; Ng, T. B. A, 2004. Mushroom (*Gonoderma capense*) lectin with spectacular thermostability, potent mitogenic activity on splenocytes, and antiproliferative activity toward tumor cells. *Biochemical and Biophysical research communications*, 314: 988-93.

Nunes, E S; Souza, M A A; Vaz, A F M; Santana, G M Sá; Gomes, F. S; Coelho, L C B B; Paiva, P. M G; Silva, R M L; Silva-Lucca, R A; Oiva, M L V.; Guarnieri, M C; Correia, M T. S; Purification of a lectin with antibacterial activity from *Botrops leucurus* snake venom. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 159, 57–63. 2011.

Oliveira, J. T A; Melo, V M M; Camara, M F. L; Vasconcelos, I. M; Beltrami, L. M;

Machado, O L T.; Gomes, V. M; Pereira, S P.; Fernandes, C P.; Nunes, E. P.; Capistrano, G G G; Monteiro-Moreira, A C Q 2002. Purification and physicochemical characterization of a cotyledonary lectin from *Luetzelburgia auriculata*. *Phytochemistry*, 61: 301-310.

Oliveira, M L; Beltrami, L. M De Simone, S. G Brumano M H N Silva-Lucca, R A Nakama, M K K Pires, C V; Oliveira, M G A 2003. Purification and partial characterization of a lectin from *Caesalpinia tinctoria* Domb, ex Dc fruits. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 15 (2): 119-122.

Oliveira, M D L; Andrade, C D S; Santos- Magalhaes, N S; Coelho, L C B B Teixeira,

J. A Carneiro- Da- Cunha, M G; Correia, M T S, 2008. Purification of a lectin from *Eugenia uniflora* L seeds and its potential antibacterial activity. *Letters in Applied Microbiology*, 46: 371- 76.

Oliveira, C E R; Luz, L. A; Paiva, P. M G; Coelho, L C B B; Marangoni, S; Macedo,

M L R 2011. Evaluation of seed coagulant *Moringa oleifera* lectin (cMoL) as a bioinsecticidal tool with potential for the control of insects. *Process Biochemistry* (1991), v. 46, p 498-504.

Paiva, P. M G, Santana, G M S, Souza, I. E A C, Albuquerque, L P., Agra-Neto, A C, Albuquerque, A C, Luz, L. A, Napoleão, T. H, Coelho, L C B B, 2011. Effect of lectins from *Opuntia ficus indica* cladodes and *Moringa oleifera* seeds on survival of *Nasutitermes corniger*. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 65: 982- 989.

Reynoso-Camacho, R; De Mejia, E G, Loarca-Pina, G 2003. Purification and acute toxicity of a lectin extracted from tepary bean (*Phaseolus acutifolius*). *Food and Chemical Toxicology*, 41: 21-7.

Sá, R A; Gomes, F S; Napoleão, T H; Santos, N D L; Melo, C M L; Gusmano, N B; Coelho, L C B B; Paiva, P. M G; Hebe, L W 2009. Antibacterial and antifungal activities of *Myracrodruon urundeuva* heart wood. *Wood Science Technology*, 43: 85-95.

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 et al. (2009) **Antibacterial and antifungal activities of *Myracrodruon urundeuva* heart wood** Wood Sci Technol 43, 85–95.

Santos, A F S; Luz, L A; Aragão, 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 Biochem 44: 504–8.

Vaz, A F M, Costa, R M P B, Melo, A M M A, Oiva, M L V, Santana L. A, Silva-Lucca R. A, Coelho, L C B B, Correia, M T S 2010. Biocontrol of *Fusarium* species by a novel lectin with low ecotoxicity isolated from *Sebastiania jacobinensis*. Food Chemistry 119, 1507–1513.

Wang, H X; Ng, T. B. 2006. 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.

Wittsuwannakul, R; Wittsuwannakul, D; Sakulborirug, C. A 1998. Zectm from the bark of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*). Phytochemistry, v. 47, n. 2 j: 183–187.

Figure captions

Fig 1. Chromatography of leaf (A) and flower (B) extracts in 0.1 M citrate-phosphate pH 7.0 on chitin columns. Washing steps used 0.1 M citrate-phosphate pH 7.0 (A – 66 ml, B – 54 ml) on chitin columns. The adsorbed peaks eluted with 1.0 M acetic acid (A – 24 ml, B – 18 ml) showed hemagglutinating activity and were called AzeLL (*Alpinia zerumbet* leaf lectin) and AzeFL (*Azerumbet* flower lectin). The inserts show SDS-PAGE of AzeLL (A) and AzeFL (B). The arrows indicated polypeptide bands detected in AzeLL and AzeFL after staining with Coomassie Brilliant Blue.

Fig 2 Hemagglutinating activity of leaf and flower extracts as well as purified AzeLL and AzeFL determined after previous heating of samples for 30 min at different temperatures.

Table 1. Protein concentration and hemagglutinating activity in extracts obtained from

Alpinia zerumbet leaves and flowers.

Extract		I	Protein		SHA
A		(ng/ mL)		**	
Leaves					
pH 5.0	Citrate-phosphate	1	0.640		1600.
	024			0	
pH 6.0	Citrate-phosphate	2	0.711		2880.
	048			5	
pH 6.5	Citrate-phosphate	8	0.723		11, 33
	192			0.1	
pH 7.0*	Citrate-phosphate	1	0.888		18, 45
	6384			0.5	
	Tris- HCl pH 8.0	2	0.516		3969.
	048			0	
	0.15 M NaCl	1	0.427		2398.
	024			1	
Flowers					
pH 5.0	Citrate-phosphate	2	4.98		411.3
	048				
pH 6.0	Citrate-phosphate	8	5.23		1566.
	192			3	
pH 6.5	Citrate-phosphate	1	5.21		3144.
	6384			7	
pH 7.0*	Citrate-phosphate	2	6.56		4995.
	2768			1	
	Tris- HCl pH 8.0	8	3.23		2536.
	192			2	
	0.15 M NaCl	1	5.07		202.0
	024				

*Results with better yield for lectin extraction

**SHA= HA/ Protein (ng/ mL)

Table 2 Effect of monosaccharide and glycoproteins on hemagglutinating activities of leaf (LE) and flower (FE) extracts from *A. zerunbet* obtained in 0.1 M citrate-phosphate pH 7.0.

Inhibitor	HA of LE	HA of FE
Fructose		
0.2 mg/ mL	NI	NI
Galactose		
0.2 mg/ mL	NI	NI
N-acetyl glucosamine		
0.2 mg/ mL	2048	0
0.1 mg/ mL	4096	0
0.05 mg/ mL	4096	0
Fetuin		
0.5 mg/ mL	1024	512
0.25 mg/ mL	2048	1024
0.125 mg/ mL	4096	1024
Thyroglobulin		
0.5 mg/ mL	512	128
0.25 mg/ mL	1024	256
0.125 mg/ mL	1024	512
Ovalbumin		
0.5 mg/ mL	512	512
0.25 mg/ mL	512	512
0.125 mg/ mL	512	1024

HA of LE and FE in absence of inhibitors: 16,384 and 32,768, respectively.

Figure 1

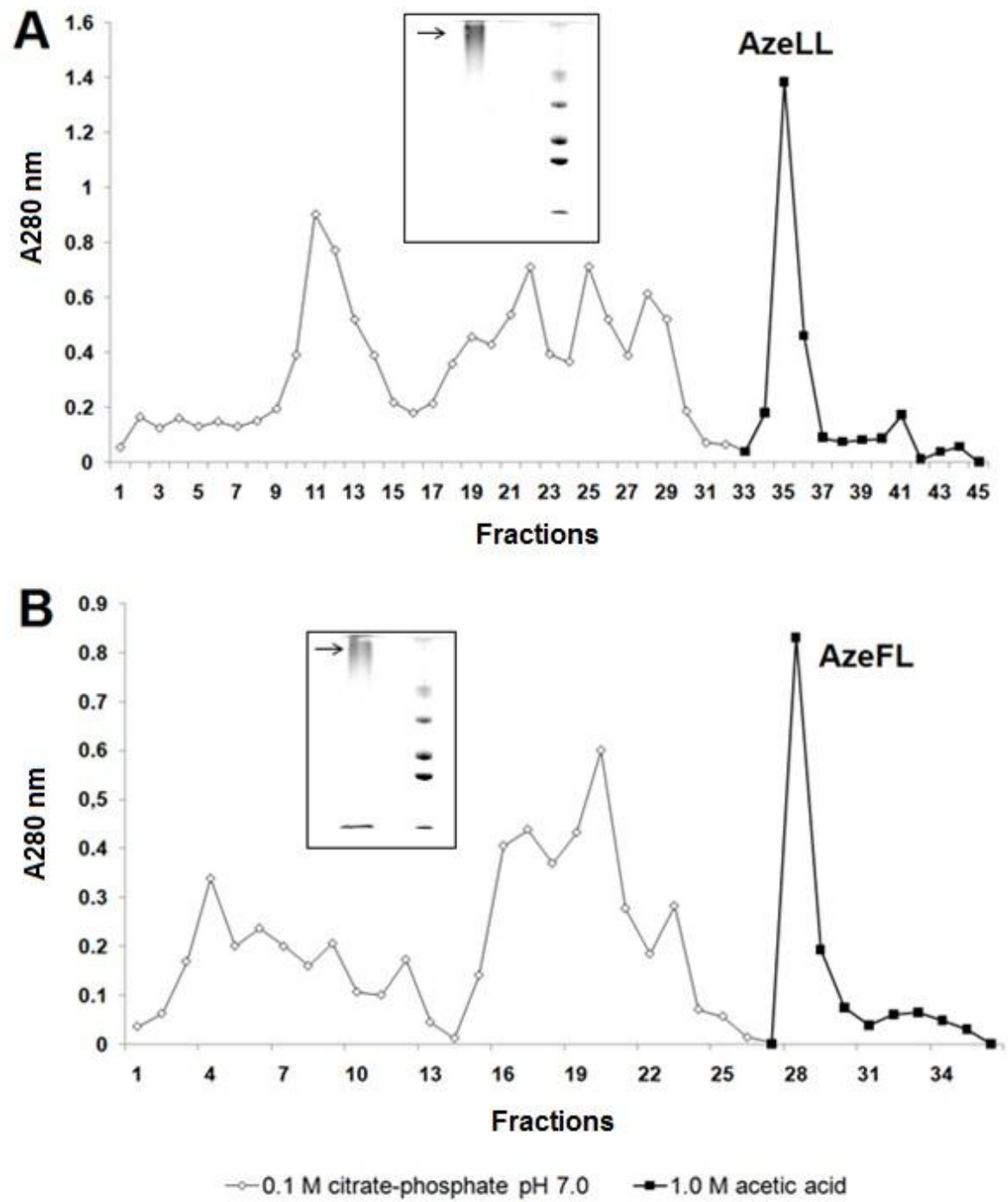
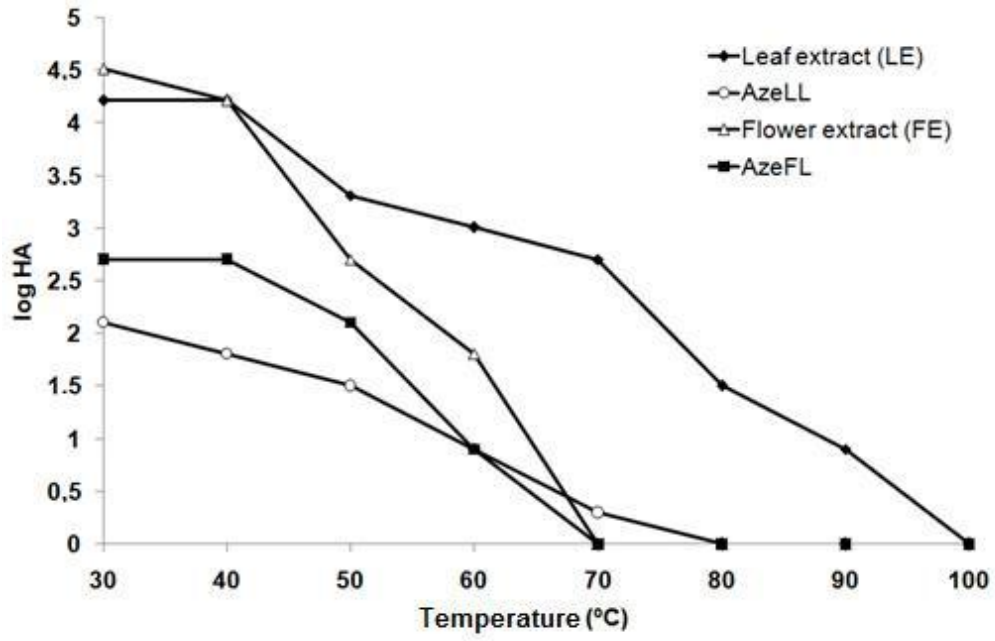


Figure 2



6. ARTIGO 2

Evaluation of antibacterial and termiticidal activities of *Api nia zerumbet* leaf extract and lectin

Sandro do Nascimento Silva, Francis Soares Gomes, Emmanuel Viana Pontual,
Patrícia Maria Guedes Paiva, Thiago Henrique Napoleão, Maria Tereza dos Santos Correia*

*Departamento de Bioquímica-CCB, Universidade Federal de Pernambuco,
Cidade Universitária, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil.*

*Corresponding author. Tel: +558121268540; fax: +558121268576. E-mail:
ntscorreia@gmail.com

Abstract

The broad biotechnological potential of lectins becomes increasingly the interest in the study of these proteins. Plant lectins are natural compounds and usually lower toxic for non-target organisms than synthetic chemicals. This study evaluates the antibacterial and termiticidal activities of *Azerumbet* leaf extract and lectin (AzeLL). Antibacterial activity was evaluated against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia* and *Shigella sonnei* by determining minimal inhibitory (MIC) and bactericidal (MBC) concentrations. Termiticidal activity was evaluated against *Nasutitermes corniger* workers and soldiers. Leaf extract inhibited the growth of *E. coli*, *P. aeruginosa* and *S. sonnei* (MIC of 1235 µg/mL of protein for all bacteria). AzeLL was only able to inhibit the growth of *K. pneumonia* (MIC 970 µg/mL). Thus extract and AzeLL acted only as bacteriostatic agents. Intermiticidal assay, leaf extract and AzeLL did not induce significantly ($p < 0.05$) the death of *N. corniger* workers in comparison with control. However, the leaf extract (0.5 and 1.0 mg/mL) and AzeLL (at all concentrations) showed termiticidal activity on soldiers. Both extract and lectin did not show feeding-rejection effect on *N. corniger*. In conclusion, *Azerumbet* leaf extract and lectin were efficient in inhibit growth of bacteria and showed termiticidal activity against *N. corniger* soldiers.

Keywords: lectin; leaf; antibacterial activity; termiticidal activity; *Nasutitermes corniger*.

1 Introduction

The occurrence of lectins, carbohydrate-binding proteins, has been reported in several organisms and currently the most of isolated lectins are from plant origin. Lectins have been obtained from roots, rhizomes, tubers, bulbs, leaves, flowers, fruits, seeds, pods, barks and heart wood (Náeemet al., 2001; Oliveira et al., 2003; Oliveira et al., 2008; Sá et al., 2008; Santos et al., 2009; Valérie et al., 2009; Costa et al., 2010; Napoleão et al., 2011; Albuquerque et al., 2012).

Anti microbial agents have been used to treat diseases caused by bacteria and fungi in order to contribute for minimizing significantly the severity of infections as well as reduce mortality rates in humans and animals. However, it has been increasingly reported the emergence of microorganisms resistant to the commercial antibiotics routinely used, such as methicillin, penicillin, and oxacillin (Forbes et al., 2008; Carvalho et al., 2010; Taylor, 2013). This scenario has encouraged researches on discovering alternative antibiotics and a promising trend in this direction is the evaluation of medicinal plants as source of compounds that inhibit the growth and affect survival and/or virulence of microorganism (Savoi a, 2012). Antibacterial and antifungal activities against microorganisms that cause human diseases were described for plant lectins isolated from seeds, heart wood, leaves and cladodes, for example (Oliveira et al., 2008; Sá et al., 2009; Santana et al., 2009; Charungchitrak et al., 2011; Gomes et al., 2013).

Lectins are also able to exert insecticidal activity by inducing mortality, affecting physiology and causing feeding-deterrent effects on insect pests or disease vectors (Sá et al., 2008; Napoleão et al., 2012; Napoleão et al., 2013; Paiva et al., 2013). Termites are important wood-feeding, soil-recycling and decomposers insects thanks to lignocellulolytic and other enzymes present in their gut that are produced by the termites or symbiotic prokaryotes and

eukaryotes (Boucias et al., 2013). However a minority of termite species (around 6.6%) act as pests attacking mainly wooden structures (Verma et al., 2009). The termite *Nasutitermes corniger* is found in tropical regions including Brazilian semi-arid causing damage to wood using in building. Lectins from *Myracrodruon urundeuva* heart wood, bark, and leaves, *Opuntia ficus indica* cladodes as well as *Microgramma vacciniifolia* rhizome were insecticidal agents against *N. corniger* (Sá et al., 2008; Napoleão et al., 2011; Paiva et al., 2011; Albuquerque et al., 2012).

Alpinia zerumbet (Pers.) Burt & Smith (Zingiberaceae), popularly known as “butterfly ginger” in English and “colônia” in Portuguese, is much cultivated due to the beauty of its flowers. It is a species native from tropical areas of South and Southeast Asia and is widespread for various parts of the world (Cronquist, 1981). *A. zerumbet* is widely used in folk medicine and thus it has been studied pharmacological properties of leaves, flowers, and rhizomes such as depurative effects, diuretic, anti-hysterical, anti-inflammatory, hypotensive, and anthelmintic, among others (de Araujo Pinho et al., 2005; Elzaalwely et al., 2007; Chompoo et al., 2011; Cavalcanti et al., 2012; Cunha et al., 2013; Tao et al., 2013).

This work reports the evaluation of antibacterial and termiticidal activities of the leaf extract and lectin (AzeLL) isolated from *A. zerumbet* leaves. This lectin is a chitin-binding protein whose hemagglutinating activity is inhibited by *N*-acetylglucosamine and thermostable until 70 °C (data to be submitted for publication).

2 Materials and Methods

2.1 Plant material

Leaves of *A. zerumbet* were collected in gardens of the Recife city, Pernambuco. The leaves were washed with tap water, dried for 2 days and powdered using a blender.

2.2 Bacteria cultures

Antibacterial assay was performed with Gram positive (*Staphylococcus aureus* WDCM00032) and Gram negative (*Escherichia coli* WDCM00013, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 29665, *Pseudomonas aeruginosa* WDCM00025 and *Shigella sonnei*. bacteria kindly provided by the Department of Antibiotics from the *Universidade Federal de Pernambuco*, Brazil. Stationary cultures were maintained on Nutrient Agar and stored at 4 °C. To determine the antibacterial activity, bacteria were grown in Nutrient Broth and incubated with shaking at 37 °C overnight.

2.3 Termites

N. corniger workers and soldiers were obtained in a fragment of Atlantic Forestry located at Dois Irmãos, Recife, Pernambuco, Brazil. Intact nests were removed with a machete from trunks of trees. The collection of termites is authorized (number 36301-1) by the *Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade* from Brazilian Ministry of the Environment.

2.4 Leaf extract and purification of AzeLL

Leaf powder was homogenized with 0.1 M citrate phosphate pH 7.0 in a proportion of 5% (w/v) during 16 hours at 28 °C under constant stirring. After filtration in gauze and centrifugation (15 min at 8,000 xg and 28 °C) the extract was obtained and evaluated for protein concentration (Lowry et al., 1951) and hemagglutinating activity.

For purification of AzeLL, LE (4.44 ng of protein) was chromatographed on chitin (Sigma-Aldrich, USA) column equilibrated with 0.1 M citrate-phosphate pH 7.0. After extensive washing with equilibration buffer the adsorbed proteins were eluted with 1.0 M

acetic acid. The pool of eluted fractions (AzeLL) was dialyzed against distilled water (4 h) followed by 0.1 M citrate phosphate pH 7.0 (4 h).

2.5 Hemagglutinating activity

Hemagglutinating assay was performed according to Correia and Coelho (1995) using microtiter plates (Techno Plastic Products, Trasadingen, Switzerland). Briefly, the leaf extract or AzeLL (50 μ L) was added to a well containing 0.15 M NaCl (50 μ L) and then double-dilutions were performed to fill two rows of the microplate. Next, 50 μ L of a 2.5% (v/v) suspension of rabbit erythrocytes treated with glutaraldehyde (Hing et al., 1967) were added to each well. One hemagglutinating unit (titer^{-1}) was defined as the reciprocal of the highest dilution of the sample that was able to promote full agglutination. Specific hemagglutinating activity (unit/ng) was defined as the ratio between hemagglutinating units and protein concentration (ng/mL).

2.6 Antibacterial assay

Overnight grown bacterial cultures were adjusted turbidimetrically to 1.5×10^8 colony forming units (CFU) mL^{-1} in a wavelength of 600 nm. Aliquots (100 μ L) of leaf extract (1.9 mg/mL protein) or AzeLL (0.23 ng/mL) were submitted in a microtiter plate to a serial double dilution in Nutrient Broth (100 μ L) until a final ratio of 1:2048. All wells were then inoculated with 20 μ L of bacterial culture and incubated at 37 °C for 24 h. Assays were performed in triplicate for each concentration. Negative control wells contained 0.15 M NaCl diluted in Nutrient Broth and the microorganism. After incubation, the optical density was measured at 490 nm (OD₄₉₀) using a spectrophotometer for microplates (Biotek Instruments Inc., VT, USA). Minimal inhibitory concentration (MIC) was determined as the lowest

protein concentration at which there was $\geq 50\%$ reduction in OD₄₉₀ in comparison with control (Amsterdam 1996).

To determine the minimal bactericidal concentration (MBC), aliquots (10 μ L) from the wells where it was detected growth inhibition in MIC assay were transferred to petri plates containing Nutrient Agar and incubated at 37 °C for 24 h. The lowest sample concentration that reduced bacterial growth in agar in 99.9% in comparison with control corresponded to the MBC. The assay was performed in triplicate. Cloranfenicol was used as positive control in both MIC and MBC assays.

2.7. *Termiticidal assay*

Termiticidal activity was evaluated using the method described by Kang et al. (1990) with some modifications (Napoleão et al., 2011). Previously, leaf extract and AzeLL solutions at different concentrations (0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, and 1.0 ng/mL of protein) were obtained by diluting a stock solution of extract or lectin in 0.15 M NaCl. Each experimental unit consisted of a petri dish (90 x 15 mm) with the bottom plate covered with filter paper. A filter paper disk with 4 cm diameter was soaked with 200 μ L of the sample or 0.15 M NaCl (negative control). Next, 20 termites (16 workers and 4 soldiers) were transferred to each plate and the assay was incubated at 28 °C in darkness. Evaluation of insect survival was done daily until the death of all insects. The bioassay was carried out in quintuplicate and survival rates obtained were expressed as mean $\pm$ SD.

2.8. *Feeding-rejection assay*

In an attempt to determine if LE and AzeLL induced a feeding-rejection effect, the mass loss of filter paper disks treated or untreated with the extract or lectin was evaluated according to Albuquerque et al (2012). For this, a termiticidal assay containing filter papers

treated with LE or AzeLL at 1.0 mg/ml, or 0.15 M NaCl (negative control) was performed as described in Section 2.7. The mass of filter papers was determined at the beginning of the experiment and after 9 days. Bioassays were carried out in quintuplicate.

2.9 Statistical analysis

Data were expressed as the mean of replicates $\pm$ standard deviation, calculated using GraphPad Prism version 4.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA). For analysis of significant differences between treatment groups from termiticidal assay it was applied Student's *t*-test (significance at $p < 0.05$) performed using Origin 6.0 software (Microcal, USA).

3 Results and discussion

The broad biotechnological potential of lectins becomes increasingly the interest in the study and isolation of these proteins. Lectins from plants have attracted more attention because plant-derivatives are biodegradable and usually lower toxic for non-target organisms than synthetic chemicals, although toxicity evaluations cannot be ruled out for any compound that is candidate for use as drug for treatment of metabolic diseases as well as for control of infections and pests. The antibacterial and insecticidal activities previously reported for other plant lectins stimulated the evaluation of biotechnological potential of AzeLL for controlling human pathogenic bacteria and insect pest.

Azerumbet leaf extract showed specific hemagglutinating activity of 18,618 and AzeLL (specific hemagglutinating activity of 640) was purified by chromatography of extract on chitin column following procedure previously reported (data to be submitted). In antibacterial assay, the extract and lectin did not show any activity against *S. aureus*. The leaf

extract inhibited the growth of *E. coli*, *P. aeruginosa* and *S. sonnei* and MC values are summarized in Table 1. In contrast, the extract was inactive on *K. pneumoniae* while AzeLL was able to inhibit the growth of this bacterium (Table 1). These results show that the leaf extract contains other antibacterial agents in addition to AzeLL which were present in concentrations sufficient to exert inhibitory effect on *E. coli*, *P. aeruginosa* and *S. sonnei*; on the other hand, AzeLL is an active principle against *K. pneumoniae* whose antibacterial effect was not evident in the extract probably because its concentration was lower than that enough to inhibit growth of this microorganism.

Based on the results from MC assay, the bactericidal property was evaluated for leaf extract against *E. coli*, *P. aeruginosa* and *S. sonnei* and AzeLL against *K. pneumoniae*. All these bacteria were able to grow when aliquots were removed from wells of MC assay and smeared on plates containing Nutrient Agar. In this sense, the extract and AzeLL acted only as bacteriostatic agents.

The treatment of an infection may require a bactericidal agent, a bacteriostatic agent or a combination of both depending on the type of infection. There are cases where bactericidal compounds are preferable and others where bacteriostatic agents are as efficient as bactericidal drugs. In addition, some bactericidal drugs may induce the release of toxic components by bacteria, leading to toxic shock syndromes, being then preferable the use of bacteriostatic agents (Pankey and Sabath, 2004). In this sense, the evaluation of biotechnological potential of AzeLL as an antibiotic cannot be discarded because it was only bacteriostatic.

In termiticidal assay, the death of all worker termites that were maintained in plates containing leaf extract and AzeLL occurred in approximately 3-6 days, which was earlier than in control (Figure 1). However, there were no significant differences ($p > 0.05$) between the survival curves established for control and test samples at all tested

concentrations. On the other hand, leaf extract (0.5 and 1.0 mg/ mL of protein) and AzeLL (at all concentrations) significantly ($p < 0.05$) induced the death of *N. corniger* soldiers (Figure 2).

The termiticidal activity of lectins are probably related with the carbohydrate-binding specificity of the protein but this feature seems not to be crucial and the unique that determines the insecticidal effect. The most of lectins evaluated until now for termiticidal effect were chitin-binding proteins but showed distinct effect on termites. For example, a chitin-binding lectin from *Moringa oleifera* showed termiticidal activity only at high concentrations (1.0 and 1.5 mg/ mL) while chitin-binding lectins from *M. vacciniifolia* rhizome, *O. ficus indica* cladodes, and *M. urundeuva* heart wood were active on workers with LC50 values ranging from 0.116 to 0.248 mg/ mL (Sá et al., 2008; Paiva et al., 2011; Albuquerque et al., 2012). It has also been suggested other mechanisms that can be involved in termiticidal activity. For example, *M. urundeuva* bark, heart wood and leaf lectins were able

to kill symbiont bacteria from gut of *N. corniger* workers and soldiers (Napolitano et al., 2011) and it was suggested that *M. vacciniifolia* rhizome lectin is able to deregulate the normal homeostasis in the gut of termites because it interfered on trypsin-like, acid phosphatase, endoglucanase, and β -glucosidase activities (Albuquerque et al., 2012). In this sense, AzeLL although able to bind chitin may not be able to exert other deleterious effects on worker termites and then cause mortality induction. On the other hand, the sensitivity of the soldiers to AzeLL can be related to the specificity of this lectin to N-acetylglucosamine, a major component of the peritrophic matrix from insects.

After 9 days, the feeding-rejection assay revealed that the mass loss of filter paper disks treated with the extract and AzeLL (1.0 mg/ mL) were 3.6 ± 1.5 mg and 1.7 ± 0.8 mg, respectively. These values were not significant different ($p > 0.05$) from that obtained for the control disks (4.7 ± 2.5 mg), indicating that the extract and AzeLL did not exercise a feeding-rejection effect. This finding ensures that the absence of activity of the extract and lectin on

workers was not due to a lack of intake of these preparations.

In conclusion, *A zerumbet* leaf extract and AzeLL exerted antibacterial activity by inhibiting the growth of the human pathogenic bacteria *E. coli*, *P. aeruginosa* and *S. sonnei* (leaf extract) and *K. pneumoniae* (AzeLL) and showed termiticidal activity against *N. corniger* soldiers.

Acknowledgments

This work was financially supported by the *Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco* (FACEPE), the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES) and the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq). S. N. Silva would like to thank FACEPE for graduate scholarship. E. V. Pontual would like to thank FACEPE and CAPES for post-doctoral scholarship. P. M. G. Paiva and M. T. S. Correia would like to thank CNPq for research grants and fellowships.

References

- Albuquerque, L. P.,** Santana, G. M. S., Pontual, E. V., Napoleão, T. H., Coelho, L. C. B. B., Paiva, P. M. G., 2012. Effect of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin on survival and digestive enzymes of *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae). *International Biodeterioration and Biodegradation* 75: 158-166.
- Bing, D. H.,** Weyand, J. M. Stanislawski, A. B., 1967. **Hemmagglutination with aldehyde – fixed erythrocytes for assay of antigens and antibodies.** *Proc. Soc. Cyp. Biol. Med.*, 124, 1166-1170.
- Boucias, D. G.,** Cai, Y., Sun, Y., Lietze, V. U., Sen, R., Raychoudhury, R., Scharf, M. E., 2013. The hindgut lumen prokaryotic microbiota of the termite *Reticulitermes flavipes* and its responses to dietary lignocellulose composition. *Molecular Evolution*, 22: 1836-1853.
- Carvalho, K. S.,** Miziuka, E. M., Gontijo Filho, P. P., 2010. Methicillin/Oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a hospital and public health threat in Brazil. *The Brazilian Journal*

of Infectious Diseases, 14: 71-76.

Cavalcanti, B C et al. 2012. Genetic toxicology evaluation of essential oil of *Alpinia zerumbet* and its chemoprotective effects against H₂O₂-induced DNA damage in cultured human leukocytes. *Food and Chemical Toxicology*, v. 50, p. 4051-4061.

CHOMPOO J; UPADHYAY, A; KISHIMOTO, W; MAKISE, T; TAWATA, S. 2011. Advanced glycation end products inhibitors from *Alpinia zerumbet* rhizomes. *Food Chemistry*, V 129, p. 709-715.

Correia, M T S; Coelho, L C B B. 1995. Purification of glucose/ mannose specific lectin, Isoform 1, from seeds of *Galvia mollis* Mart (canaratu bean). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 55, p. 261 – 273.

CUNHA, G H et al. 2013. Vasorelaxant and antihypertensive effects of methanolic fraction of the essential oil of *Alpinia zerumbet*. *Vascular Pharmacology*, v. 58, p. 337-345.

Costa R M P B, Vaz A F M, Oiva M L V, Coelho L C B B, Correia M T S, Carneiro-Da-Cunha M G. 2010. A new mistletoe *Phthirusa pyrifolia* leaf lectin with antimicrobial properties. *Process Biochemistry* 45, 526–533.

Cronquist. 1981. Um sistema integrado de classificação das plantas com flores. Columbia University Press, Nova Iorque.

De Araújo Pinho, F V S; Coelho-De-Souza, AN; Mbrais, S M; Ferreira Santos, C; Leal-Cardoso, J. H. 2005. Antinociceptive effects of the essential oil of *Alpinia zerumbet* on mice. *Phytomedicine*, v. 12, p. 482-486.

Elzaawely, A A; Xuan, T. D; Tawata, S. 2007. Os óleos essenciais, pironas kava e compostos fênicos de folhas e rizomas de *Alpinia zerumbet* (Pers.) BL Burtt. RM & Smith e sua atividade antioxidante. *Food Chem* 103: 486-494.

Gomes, F S; Procópio, T. F; Napoleão, T. H; Coelho, L C B B; Paiva, P. M G. 2013. Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf. *Journal of Applied Microbiology (Print)*, v. 114, p. 672-679.

Forbes, B A, Bonbicino, K, Plata, K, Cuirdo, A, Weber, D, Bender, C L, Rosato, A E, 2008. Unusual form of oxacillin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 61: 387-395.

Lowry, O H, Rosebrough, N J., Farr, A L, Randall, R J. **Journal Biological Chemistry**, v. 193, 265-75, 1951.

Naeen, A; Khan, R H; Vikram, H Akf, 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*, v. 396, n 1, p. 99 -105.

Napoleão, T H, Gomes, F S, Lima, T A, Santos, N D L, Sá, R A, Albuquerque, A C, Coelho, L C B B, and Paiva, P. M G, 2011. Termiticidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* against *Nasutitermes corniger* and its mechanisms. *International*

Biodeterioration and Biodegradation, 65: 52-59.

Napoleão T. H; Pontual E. V.; Lima T. A.; Santos N. D. L.; Sá R. A.; Coelho L. C. B. B.; Ferraz Navarro D. M. A.; Paiva P. M. G. 2012. Effect of Myracrodruon urundeuva leaf lectin on survival and digestive enzymes of Aedes aegypti larvae. Parasitology Research 110: 609-616.

Napoleão, T. H; Santos Filho, T. G.; Pontual, E. V.; Ferreira, R. S.; Coelho, L. C. B. B.; Paiva, P. M. G. 2013. Affinity Matrices of Gratia mollis Seed Lectins for Isolation of Glycoproteins from Complex Protein Mixtures. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. xx, p. 1-12.

Oliveira, M. L; Beltrami n1, L. M. De Simone, S. G. Brumano M. H. N.; Silva-Lucca, R. A. Nakama, M. K. K. Pires, C. V.; Oliveira, M. G. A. 2003. 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.

Oliveira, M. D. L; Andrade, C. D. S.; Santos- Magalhaes, N. S.; Coelho. L. C. B. B. Teixeira, J. A. Carneiro- Da- Cunha, M. G.; Correia, M. T. S. 2008. Purification of a lectin from Eugenia uniflora L. seeds and its potential antibacterial activity. Letters in Applied Microbiology, v. 46, p. 371- 76.

Paiva, P. M. G, Santana, G. M. S., Souza, I. F. A. C., Albuquerque, L. P., Agra- Neto, A. C., Albuquerque, A. C., Luz, L. A., Napoleão, T. H., Coelho, L. C. B. B., 2011. Effect of lectins from Opuntia ficus indica cladodes and Moringa oleifera seeds on survival of Nasutitermes corniger. International Biodeterioration and Biodegradation, 65: 982-989.

Pankey, G. A, Sabath, L. D., 2004. Clinical Relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram Positive bacterial infections. Clinical Infectious Diseases, 38: 864-870.

SÁ R. A; GOMES, F. S.; NAPOLEÃO T. H.; SANTOS, N. D. L.; MELLO C. M. L.; GUSMÃO N. B.; COELHO L. C. B. B.; PAIVA P. M. G.; HEBE, L. W. Antibacterial and antifungal activities of Myracrodruon urundeuva heart wood. Wood Science Technology, 2008, DOI 10.1007/s00226-008-0220-7

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.; Hebe, L. W. 2009. Antibacterial and antifungal activities of Myracrodruon urundeuva heart wood. Wood Science Technology, v. 43, p. 85-95.

Santos, A. E. 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 Biochem 44, p. 504-8.

Savoiã, D, 2012 Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics. Future Microbiology, 7: 979-990.

Tao, L; Hu, H. Z.; Xiang Shen, C. 2013. Endothelium-dependent vasodilation effects of the essential oil from Fructus Apiniae Zerumbet (EOFAZ) on rat thoracic aortic rings in vitro. Original Research Article Phytomedicine, v. 20, p. 387-39.

Taylor, A R, 2013. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. Primary Care: Clinics in Office Practice, 40: 637-654.

Valerie C, Tripet, C; Goel, A; Nerbert, L; Carey, L. 2009. Dynamical Studies Of A Temperature-Sensitive Mutant Of The Tryptophan Repressor Protein, L75F-TrpR. Biophysical Journal, v. 96, p. 322a.

Figure captions

Fig 1. Effect of *A zerumbet* leaf extract (A) and AzeLL (B) on survival of *Nasutitermes corniger* workers. 0.15 M NaCl was used as negative control. Each point represents the mean $\pm$ SD of five experiments.

Fig 2 Effect of *A zerumbet* leaf extract (A) and AzeLL (B) on survival of *Nasutitermes corniger* soldiers. 0.15 M NaCl was used as negative control. Each point represents the mean $\pm$ SD of five experiments.

Bacteria	Leaf extract		AzeLL		A Gramphenicol	
	M C		M C		M C	
<i>Staphylococcus aureus</i>	ND	1235	ND	ND	NE	15.62
<i>Escherichia coli</i>		1235		970		7.8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		ND	1235	ND		500
<i>Klebsiella pneumoniae</i>						3.9
<i>Shigella sonnei</i>						7.8

Table 1. Minimal inhibitory concentrations (MIC) of *A. zerumbet* leaf extract and lectin (AzeLL) as well as positive control cloramphenicol.

MIC values expressed as µg/ mL of protein (leaf extract and AzeLL) or cloramphenicol. ND: not detected

Figure 1

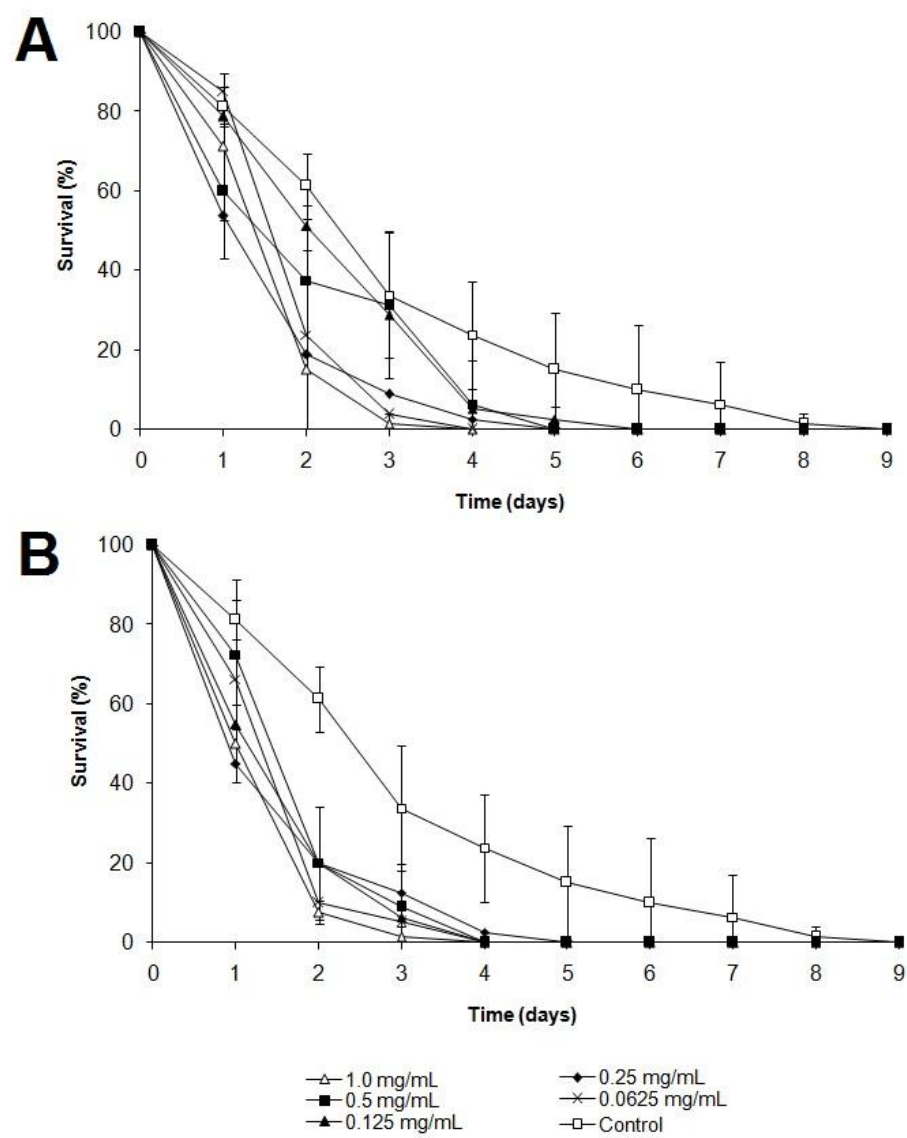
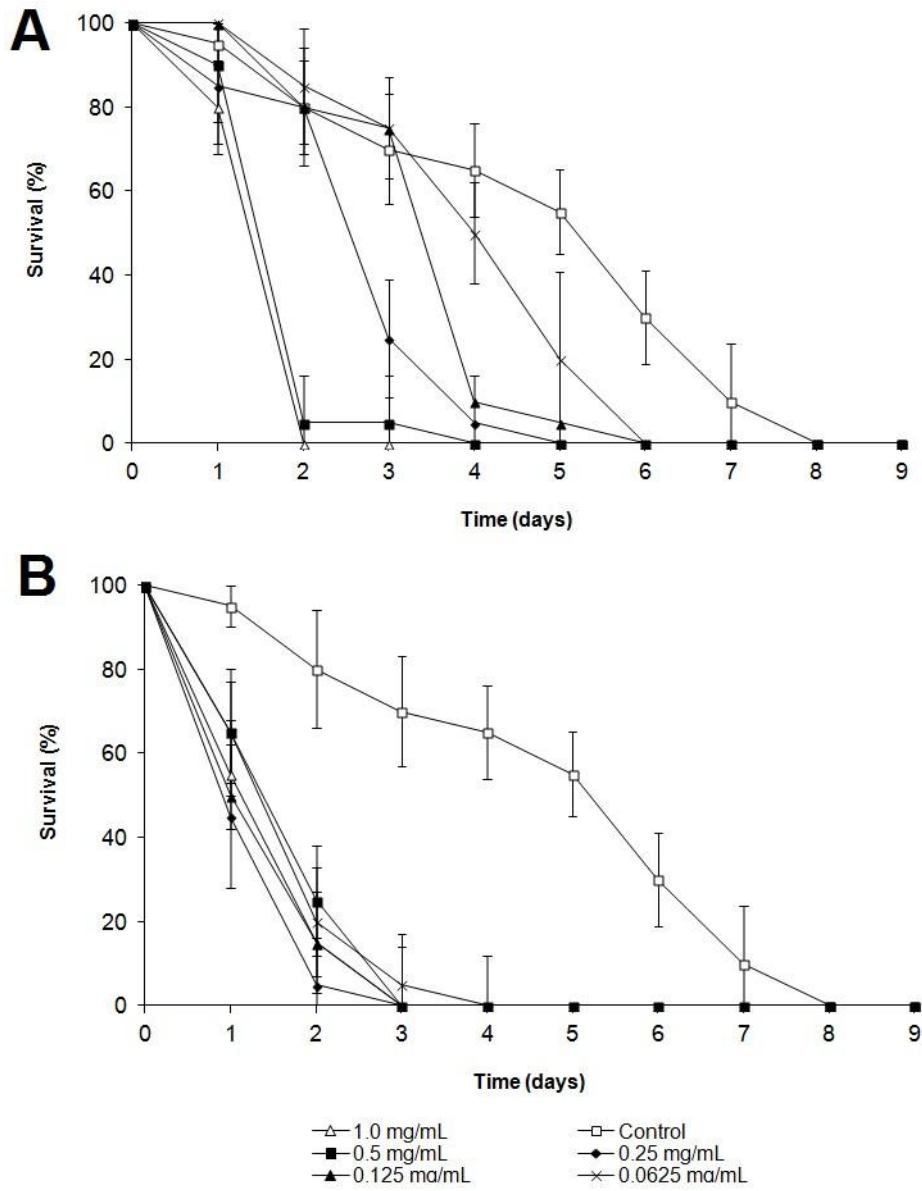


Figure 2



7. ARTIGO 3

Anti bacterial and termitticidal activities of extract and lectin from *Alpinia zerumbet* flowers

Sandro do Nascimento Silva, Emmanuel Viana Pontual, Francis Soares Gomes, Patrícia Maria Guedes Paiva, Thiago Henrique Napoleão, Maria Tereza dos Santos Correia^{*}

Departamento de Bioquímica-CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil.

*Corresponding author. Tel: +558121268540; fax: +558121268576. E-mail:

ntscorreia@gmail.com

Abstract

Alpinia zerumbet is an ornamental plant used in folk medicine for treatment of infirmities such as inflammation, fever and flu. This work describes the evaluation of *A. zerumbet* flower extract and isolated lectin (AzeFL) as antibacterial agents against human pathogenic bacteria and termiticidal agents against *N. corniger*, a termite responsible for biodegradation of buildings, paintings, books, and monuments. AzeFL was isolated by chromatography on a chitin column. Flower extract inhibited the growth of *Pseudomonas aeruginosa* and *Shigella sonnei* (MC of 1143 µg/mL for both) and AzeFL was a selective antibacterial agent, inhibiting only the growth of *S. sonnei* (MC of 820 µg/mL). Flower extract and AzeFL did not affect the survival of *N. corniger* workers but promoted significant mortality of soldiers. Both extract and lectin did not show feeding-rejection effect on *N. corniger*. In conclusion, *A. zerumbet* flower extract and AzeFL were bacteriostatic agents against the human pathogenic bacteria *P. aeruginosa* and *S. sonnei* (leaf extract) and *S. sonnei* (AzeFL), and were able to promote mortality of *N. corniger* soldiers.

Key words: lectin; flower; antibacterial activity; termiticidal activity; *Nasutitermes corniger*.

1 Introduction

Lectins are proteins that bind carbohydrates reversibly and specifically (Correia et al., 2008). This carbohydrate-binding ability leads to different biological activities such as antibacterial, antifungal and insecticide (Souza et al., 2011; Napoleão et al 2012; Napoleão et al., 2013; Gomes et al 2013).

Antibacterial activity of lectins from plants has been investigated mainly because it is increasing the need for antibiotics to combat bacterial strains that show resistance to the compounds currently used (Carvalho et al., 2010; Savoia, 2012; Taylor, 2013). It has been suggested that the antibacterial activity of lectins against Gram positive and Gram negative bacteria occurs through the interaction of lectin with components of the bacterial cell wall including teichoic and teicuronic acids, peptidoglycans and lipopolysaccharides (Pai va et al., 2010).

Insecticidal activity of lectins has been described against insects from several orders such as Diptera, Lepidoptera and Coleoptera (Oliveira et al., 2011; Napoleão et al 2012; Napoleão et al., 2013). The carbohydrate-binding ability of lectins is implicated in the insecticidal activity. For example it has been reported the binding of lectins to glycosylated structures and molecules present at digestive tract of insect (Fitches et al., 2008; Napoleão et al., 2011). The insecticidal activity of lectins on termites has been also attributed to resistance to digestion by proteolytic enzymes from termite gut as well as bacteriostatic and bactericide effects on gut symbiotic bacteria (Napoleão et al., 2011).

This work evaluated the antibacterial and insecticidal effects of flower extract and lectin from *A. zerumbet*, a plant popularly known as “butterfly ginger” in English and “colônia” in Portuguese, and which is used in folk medicine for treatment of inflammations, fever and flu. The antibacterial activity was evaluated against several species from medical

interest and termiticidal activity was determined against *Nasutitermes corniger*, a pest common in urban areas of northeastern Brazil.

2 Materials and Methods

2.1 Plant material

Flowers of *Azerumbet* were collected in gardens of the Recife city, Pernambuco, and washed with tap water. After drying for 2 days at room temperature, the flowers were powdered using a blender.

2.2 Bacteria cultures

Antibacterial assay was performed with Gram-positive (*Staphylococcus aureus* WDCM00032) and Gram-negative (*Escherichia coli* WDCM00013, *Kebsiella pneumoniae* ATCC 29665, *Pseudomonas aeruginosa* WDCM00025 and *Shigella sonnei*. bacteria kindly provided by the Department of Antibiotics from the *Universidade Federal de Pernambuco*, Brazil. Stationary cultures were maintained on Nutrient Agar and stored at 4 °C. To determine the antibacterial activity, bacteria were grown in Nutrient Broth and incubated with shaking at 37 °C overnight.

2.3 Termites

Nests of termites from *N. corniger* were collected from trunks of trees at a fragment of Atlantic Forestry located at Dois Irmãos, Recife, Pernambuco, Brazil. The collection of termites is authorized (number 36301-1) by the *Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade* from Brazilian Ministry of the Environment.

2.4 Protein extraction and lectin purification

Powdered flowers were homogenized with 0.1 M citrate phosphate pH 7.0 in a proportion of 5% (w/v) during 16 h at 28 °C under constant stirring. After filtration in gauze and centrifugation (15 min at 8,000 $\times g$ and 28 °C) the extract was obtained and evaluated for protein concentration (Lowry et al., 1951) and hemagglutinating activity.

For purification of AzeFL, FE (4.0 mg of protein) was chromatographed on chitin (Sigma-Aldrich, USA) column equilibrated with 0.1 M citrate-phosphate pH 7.0. After extensive washing with equilibration buffer the adsorbed proteins were eluted with 1.0 M acetic acid. The pool of eluted fractions (AzeFL) was dialyzed against distilled water (4 h) followed by 0.1 M citrate phosphate pH 7.0 (4 h).

2.5 Hemagglutinating activity

Hemagglutinating assay was performed according to Correia and Coelho (1995) using microtiter plates (Techno Plastic Products, Trasadingen, Switzerland). Briefly, the flower extract or AzeFL (50 μ L) was added to a well containing 0.15 M NaCl (50 μ L) and then double-dilutions were performed to fill two rows of the microplate. Next, 50 μ L of a 2.5% (v/v) suspension of rabbit erythrocytes treated with glutaraldehyde (Bing et al., 1967) were added to each well. One hemagglutinating unit (titer^{-1}) was defined as the reciprocal of the highest dilution of the sample that was able to promote full agglutination. Specific hemagglutinating activity (unit/mg) was defined as the ratio between hemagglutinating units and protein concentration (mg/mL).

2.6 Antibacterial assay

Overnight grown bacterial cultures were adjusted turbidimetrically to 1.5×10^8 colony forming units (CFU) mL^{-1} in a wavelength of 600 nm. Aliquots (100 μL) of flower extract (1.14 mg/mL protein) or AzeFL (0.8 mg/mL) were submitted in a microtiter plate to a serial double dilution in Nutrient Broth (100 μL) until a final ratio of 1:2048. All wells were then inoculated with 20 μL of bacterial culture and incubated at 37 °C for 24 h. Assays were performed in triplicate for each concentration. Negative control wells contained 0.15 M NaCl diluted in Nutrient Broth and the microorganism. After incubation, the optical density was measured at 490 nm (OD₄₉₀) using a spectrophotometer for microplates (Biotek Instruments Inc., VT, USA). Minimal inhibitory concentration (MIC) was determined as the lowest protein concentration at which there was $\geq 50\%$ reduction in OD₄₉₀ in comparison with control (Amsterdam 1996).

To determine the minimal bactericidal concentration (MBC), aliquots (10 μL) from the wells where it was detected growth inhibition in MIC assay were transferred to petri plates containing Nutrient Agar and incubated at 37 °C for 24 h. The lowest sample concentration that reduced bacterial growth in agar in 99.9% in comparison with control corresponded to the MBC. The assay was performed in triplicate. Cloranfenicol was used as positive control in both MIC and MBC assays.

2.7. *Termiticidal assay*

Termiticidal activity was evaluated using the method described by Kang et al. (1990) with some modifications (Napoleão et al., 2011). Previously, flower extract and AzeFL solutions at different concentrations (0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, and 1.0 mg/mL of protein) were obtained by diluting a stock solution of extract or lectin in 0.15 M NaCl. Each experimental unit consisted of a petri dish (90 x 15 mm) with the bottom plate covered with filter paper. A filter paper disk with 4 cm diameter was soaked with 200 μL of the sample or

0.15 M NaCl (negative control). Next, 20 termites (16 workers and 4 soldiers) were transferred to each plate and the assay was incubated at 28 ° C in darkness. Evaluation of insect survival was done daily until the death of all insects. The bioassay was carried out in quintuplicate and survival rates obtained were expressed as mean $\pm$ SD

2.8 Feeding-rejection assay

The Feeding-rejection assay was performed according to Albuquerque et al (2012) with slight modifications. A termiticidal assay containing filter papers soaked with FE or AzeFL at 1.0 mg/ml was performed as described in Section 2.7; 0.15 M NaCl was used as negative control. The mass of filter papers was determined at the beginning of the experiment and after 9 days aiming to evaluate if the extract and the lectin exert a feeding-rejection effect. Bioassays were carried out in quintuplicate.

2.9 Statistical analysis

Data were expressed as the mean of replicates $\pm$ standard deviation, calculated using GraphPad Prism version 4.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA). For analysis of significant differences between treatment groups from termiticidal assay it was applied Student's *t*-test (significance at $p < 0.05$) performed using Origin 6.0 software (Microcal, USA).

3 Results and discussion

It has been well reported that lectins are toxic to pathogenic microorganisms and insects (Sá et al., 2009; Napoleão et al., 2011; Oliveira et al., 2013; Santos et al., 2013;

Gomes et al., 2013). In this sense, we investigated the extract from *A. zerumbet* flowers and the lectin AzeFL for antibacterial activity against pathogenic bacteria and termiticidal activity against *N. corniger* workers and soldiers.

The chromatography of flower extract (specific hemagglutinating activity of 5005.5) on chitin column resulted in recovering of AzeLL (specific hemagglutinating activity of 990.9). The assessment of antibacterial activity revealed that flower extract was able to inhibit the growth of *P. aeruginosa* and *S. sonnei* and MC values are summarized in Table 1. AzeFL was a selective antibacterial agent, inhibiting only the growth of *S. sonnei*. The reduction of MC value of AzeFL regarding the extract suggests that AzeFL is an active principle present in flower extract. Also, the activity of flower extract on *P. aeruginosa* can suggest the presence of other antibacterial compounds in flower extract. Both extract and lectin were not able to kill *P. aeruginosa* and *S. sonnei* strains, since that these bacteria were able to grow when aliquots were removed from wells of MC assay and smeared on plates containing

Nutrient Agar. Flower extract and AzeFL did not interfere in *S. aureus* growth. Based in these findings it can be concluded that flower extract and AzeFL were selective bacteriostatic agents but not exerted bactericidal effect at the conditions employed in this work. Lectins can affect the bacterial survival or growth by interact with teichoic or teicuronic acids, peptidoglycans or lipopolysaccharides in the bacterial cell wall (Paiva et al., 2010).

The results of termiticidal assay indicates that flower extract and AzeFL did not affect significantly ($p > 0.05$) the survival of *N. corniger* workers (Figure 1). On the other hand, flower extract and AzeFL at all tested concentrations promoted significant ($p < 0.05$) mortality of *N. corniger* soldiers (Figure 2). Other chitin-binding lectins have been described as termiticidal agents. The *Moringa oleifera* seed lectin at 1.0 and 1.5 mg/mL affected the survival of *N. corniger* (Paiva et al., 2011). Also, the chitin-binding lectins from *M*

vaccinifolia rhizome, *O ficus indica* cladodes, and *M urundeuva* heart wood were efficient termiticidal agents (Sá et al., 2008; Paiva et al., 2011; Albuquerque et al., 2012). It has been suggested that the termiticidal activity of lectins can involve different mechanisms such as the disrupting of peritrophic matrix, the inhibition of digestive enzymes including trypsin-like, acid phosphatase, endoglucanase, and β -glucosidase and death of symbiont bacteria from termite gut (Napoleão et al., 2011; Albuquerque et al., 2012).

The results of the feeding-rejection assay showed that, after 9 days, the mass loss of filter paper disks treated with flower extract and AzeFL at 1.0 mg/mL (2.75 ± 1.3 mg and 6.8

± 3.8 mg, respectively) were not significantly different ($p > 0.05$) from that of the control disks (7.4 ± 4.8 mg). These results indicate that flower extract and AzeFL did not exercise a feeding-rejection effect and ensures that the absence of activity of both preparations on workers was not due to a lack of intake by termites.

In conclusion, *A zerumbet* flower extract and AzeFL were bacteriostatic agents against the human pathogenic bacteria *P. aeruginosa* and *S. sonnei* (leaf extract) and *S. sonnei* (AzeFL), and were able to promote mortality of *N. corniger* soldiers.

Acknowledgments

This work was financially supported by the *Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco* (FACEPE), the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES) and the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq). S. N. Silva would like to thank FACEPE for graduate scholarship. E. V. Pontual would like to thank FACEPE and CAPES for post-doctoral scholarship. P. M. G. Paiva and M. T. S. Correia would like to thank CNPq for research grants and fellowships.

References

- Albuquerque, L P.**, Santana, G M S., Pontual, E V., Napoleão, T H., Coelho, L C B B., Paiva, P. M G., 2012. Effect of *Macrogramma vacciniifolia* rhizome lectin on survival and digestive enzymes of *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae). *International Biodeterioration and Biodegradation* 75: 158-166.
- Carvalho, K S.**, Miziuka, E M., Gontijo Filho, P. P., 2010. Methicillin/ Oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a hospital and public health threat in Brazil. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 14: 71-76.
- Correia, M T S.**; Coelho, L C B B 1995. Purification of glucose/ mannose specific lectin Isoform 1, from seeds of *Galvia mollis* Mart (camaratu bean). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 55, p 261 – 273.
- Gomes, F S.**; Procópio, T. F.; Napoleão, T. H.; Coelho, L C B B.; Paiva, P. M G 2013. Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf. *Journal of Applied Microbiology (Print)*, v. 114, p 672-679.
- Lowry, O H.**, Rosebrough, N J., Farr, A L., Randall, R J. **Journal Biological Chemistry**, v. 193, 265-75, 1951.
- Napoleão, T H.**, Gomes, F S., Lima, T A., Santos, N D L., Sá, R A., Albuquerque, A C., Coelho, L C B B., and Paiva, P. M G., 2011. Termiticidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* against *Nasutitermes corniger* and its mechanisms. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 65: 52-59.
- Napoleão T H.**; Pontual E V.; Lima T. A.; Santos N D L.; Sá R A.; Coelho L C B B.; Ferraz Navarro D M A.; Paiva P. M G 2012. Effect of *Myracrodruon urundeuva* leaf lectin on survival and digestive enzymes of *Aedes aegypti* larvae. *Parasitology Research* 110: 609-616.
- Napoleão, T H.**; Santos Filho, T G.; Pontual, E V.; Ferreira, R S.; Coelho, L C B B.; Paiva, P. M G 2013. Affinity Matrices of *Galvia mollis* Seed Lectins for Isolation of Glycoproteins from Complex Protein Mixtures. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. xx, p 1-12.
- Oliveira, C E R.**; Luz, L. A.; Paiva, P. M G.; Coelho, L C B B.; Mrangoni, S.; Macedo, M L. R 2011. Evaluation of seed coagulant *Moringa oleifera* lectin (cMoL) as a bioinsecticidal tool with potential for the control of insects. *Process Biochemistry* (1991), v. 46, p 498-504.
- Paiva, P. M G.**, Santana, G M S., Souza, I. F A C., Albuquerque, L P., Agra-Neto, A C., Albuquerque, A C., Luz, L. A., Napoleão, T H., Coelho, L C B B., 2011. Effect of lectins from *Opuntia ficus indica* cladodes and *Moringa oleifera* seeds on survival of *Nasutitermes corniger*. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 65: 982-989.

Pankey, G A, Sabath, L D, 2004. Clinical Relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram Positive bacterial infections. *Clinical Infectious Diseases*, 38: 864-870.

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; Hebe, L. W. Antibacterial and antifungal activities of *Myracrodruon urundeuva* heart wood. *Wood Science Technology*, 2008, DOI 10.1007/s00226-008-0220-7

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; Hebe, L. W. 2009. Antibacterial and antifungal activities of *Myracrodruon urundeuva* heart wood. *Wood Science Technology*, v. 43, p. 85-95.
Savioia, D, 2012. Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics. *Future Microbiology*, 7: 979-990.

Taylor, A R, 2013. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Primary Care: Clinics in Office Practice*, 40: 637-654.

Figure captions

Fig. 1. Effect of *Azerumbet* flower extract (A) and AzeFL (B) on survival of *Nasutitermes corniger* workers. 0.15 M NaCl was used as negative control. Each point represents the mean $\pm$ SD of five experiments.

Fig. 2. Effect of *Azerumbet* flower extract (A) and AzeFL (B) on survival of *Nasutitermes corniger* soldiers. 0.15 M NaCl was used as negative control. Each point represents the mean $\pm$ SD of five experiments.

Table 1. Minimal inhibitory concentration (MIC) of *Azerumbet* flower extract and lectin (AzeFL) as well as positive control cloramphenicol.

Bacteria	Flower extract	AzeFL	Cloramphenicol
	CM	CM	CM
<i>Staphylococcus aureus</i>	ND	ND	15.62
<i>Escherichia coli</i>	ND	ND	7.8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1143	ND	500
<i>Klebsiella pneumonia</i>	ND	ND	3.9
<i>Shigella sonnei</i>	1143	820	7.8

MIC values expressed as $\mu\text{g}/\text{mL}$ of protein (flower extract and AzeFL) or cloramphenicol.
 ND: not detected

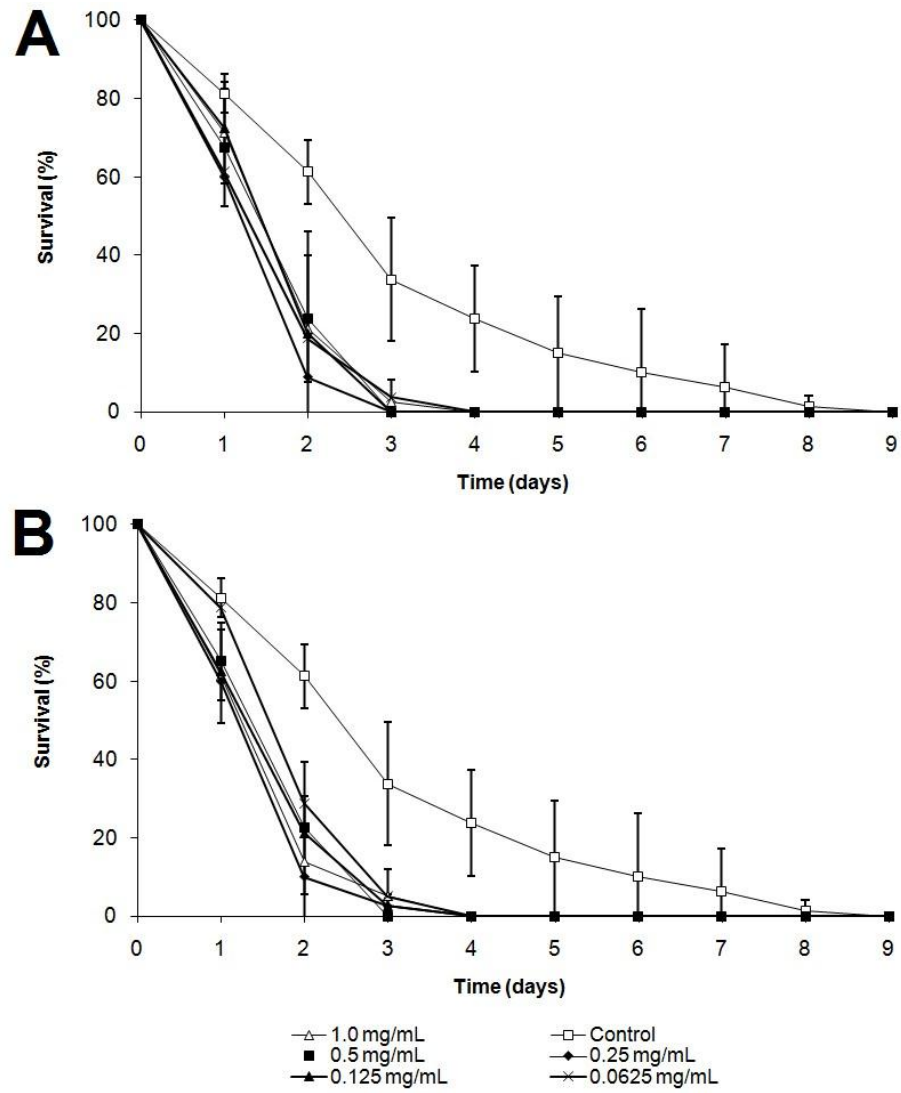
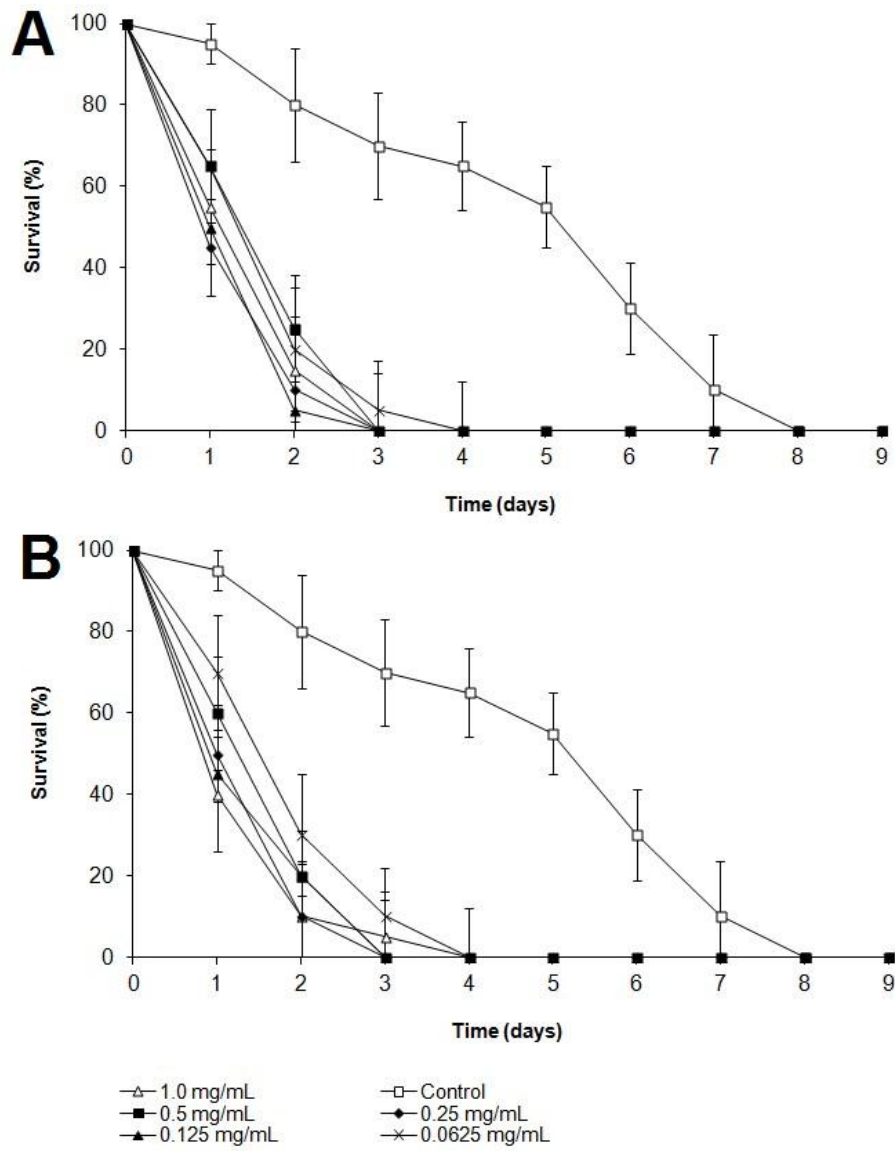
Figure 1

Figure 2

8 CONCLUSÕES

- Duas lectinas foram purificadas de tecidos da *A. zerumbet*: AzeLL, a partir das folhas, e AzeFL, a partir das flores, através de protocolos simples consistindo em extração de proteínas em solução-tampão e cromatografia em coluna de quitina.
- AzeLL e AzeFL são proteínas com afinidade para *N*-acetil glicosamina e glicoproteínas.
- AzeLL e AzeFL bem como seus extratos apresentaram sensibilidade relativa a elevadas temperaturas, onde as preparações da flor perdem a atividade a 70 °C enquanto que as preparações da folha perdem apenas após 30 min a 90 e 100 °C.
- Extratos de folhas e flores inibiram o crescimento de bactérias de importância médica.
- AzeLL e AzeFL atuaram como agentes bacteriostáticos contra *K. pneumoniae* e *S. sonnei*, respectivamente.
- Os extratos, AzeLL e AzeFL não apresentaram ação inseticida contra operários, mas foram capazes de promover a morte de soldados de *N. corniger*.