



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
MESTRADO EM BIOQUÍMICA

FRANCISCO VASSILIEPE SOUSA ARRUDA

**ATIVIDADE DE LECTINAS DE LEGUMINOSAS SOBRE A GERMINAÇÃO DE
ESPOROS DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS**

FORTALEZA
2009

FRANCISCO VASSILIEPE SOUSA ARRUDA

ATIVIDADE DE LECTINAS DE LEGUMINOSAS SOBRE A GERMINAÇÃO DE
ESPOROS DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica. Área de Concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada

FORTALEZA

2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- A817a Arruda, Francisco Vassiliepe Sousa.
Atividade de lectinas de leguminosas sobre a germinação de esporos de fungos fitopatogênicos. /
Francisco Vassiliepe Sousa Arruda. – 2009.
69 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de
Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2009.
Área de Concentração: Bioquímica vegetal.
Orientação: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada.
1. Lectinas. 2. Fungos. 3. Fitopatógenos. 4. Esporos. 5. Crescimento. I. Título.

CDD 574.192

FRANCISCO VASSILIEPE SOUSA ARRUDA

ATIVIDADE DE LECTINAS DE LEGUMINOSAS SOBRE A GERMINAÇÃO DE
ESPOROS DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica. Área de Concentração: Bioquímica Vegetal.

Aprovada em: 06/02/2009.

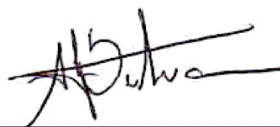
BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof. Dr. André Luís Coelho da Silva
Eurofarma Medicamentos

A Deus, o grande maestro do universo.

Aos meus pais, Benjamim e Lúcia.

Aos meus irmãos, Wendel e Luciana.

À minha noiva, Auxiliadora.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter permitido a conclusão deste projeto não somente acadêmico, mas de vida.

Aos meus pais, por mostrarem que existia uma forma digna de vencer na vida. Obrigado por todos os esforços e por permitir que mesmo longe de vocês avançasse em direção a novos horizontes.

Aos meus irmãos, por sempre estarem do meu lado.

À minha noiva, Auxiliadora, por sempre ter auxiliado durante esse caminho. Por ser sempre companheira, meiga, forte, decidida, doce, batalhadora, enfim, pela sua existência em minha vida.

À Universidade Federal do Ceará, por fornecer condições acadêmicas para a conclusão deste estudo.

Ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, por ter me recebido com tamanha cordialidade.

À FUNCAP, por ter permitido que eu não desempenhasse nenhuma atividade remunerada durante a realização deste curso, através da manutenção de uma bolsa de estudos.

Ao meu orientador, Professor Dr. Benildo Cavada, por acreditar no meu potencial e sempre me fornecer condições de trabalho.

Ao meu orientador de iniciação científica, Professor Dr. Edson Holanda, por ter acreditado e auxiliado diretamente em meu projeto. Por ter tamanha disposição e atenção. Pelo seu alto astral contagiante e sua capacidade de conduzir um grupo de pesquisa.

Ao Dr. André Coelho da Eurofarma Medicamentos, por ter me presenteado com os fungos que foram utilizados neste trabalho.

Ao Professor Rodrigo Maranguape, pela amizade, atenção e aconselhamento. Por ter colaborado substancialmente para a criação do Núcleo de Biotecnologia de Sobral. Pela forma responsável e lúcida com a qual me preparou para o ingresso no mundo utópico da pesquisa científica.

À Professora Margarida Pompeu do Departamento de Patologia da UFC, por ter contribuído de forma direta em minha formação como pesquisador.

Aos colegas do BioMol-Lab, Raquel Benevides, Emanuel Marinho, Márcia Marinho, Tales Rocha, Raniere, Sâmia e Kyria por terem me recebido com tamanha amizade.

Aos colegas navegantes do LIBS, Thays, Fábio, Fabiano, Mayron, Luís, Francisca, Tiago, Mauro, Cinara, Rafaela e Pedro pelas ajudas impagáveis.

À Erica Rabelo, por sempre estar presente nos experimentos que eram realizados, na grande maioria das vezes, em horários insalubres.

Ao Victor Carneiro, pela amizade, conversas e conselhos. Pelos momentos de descontração e pela força quando as coisas não davam certo.

Aos colegas de turma do mestrado, pelas reflexões.

Aos Professores do Departamento, principalmente aos que contribuíram diretamente para construção do processo de ensino-aprendizagem.

“Para os crentes, Deus está no princípio de todas as coisas; para os cientistas, Ele está no final de toda reflexão”. (Max Planck)

RESUMO

Lectinas representam um grupo diversificado de proteínas, tanto em termos de tamanho e estrutura, quanto com relação às atividades biológicas que desempenham sobre diferentes organismos. A maioria das lectinas tem sido isolada de plantas e algumas podem exercer atividades antifúngicas marcantes. Este trabalho apresenta o efeito de cinco lectinas estruturalmente relacionadas, as quais foram purificadas, respectivamente, das sementes de *Canavalia ensiformis* (ConA), *C. boliviana* (Cbol), *C. maritima* (ConM), *C. brasiliensis* (ConBr) e *C. gladiata* (ConG), sobre o crescimento *in vitro* dos fungos fitopatogênicos *Mucor sp.*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum musae* e *C. lindemuthianum*. No sentido de determinar o efeito das lectinas, os esporos fúngicos foram devidamente isolados, tratados com cada uma das lectinas na concentração de 500 µg/mL durante 24 horas e então inoculados para crescimento a 27°C em placas de poliestireno de 96 poços contendo caldo batata dextrose. O crescimento dos fungos foi avaliado em diferentes tempos através da determinação da densidade óptica a 620 nanômetros. O controle negativo foi feito com NaCl 0,15 M. No sentido de verificar se o efeito das lectinas sobre o crescimento fúngico era meramente proteico, os fungos foram crescidos na presença de albumina sérica bovina (BSA). Os resultados mostraram que o crescimento de *Mucor sp.* foi diminuído quando seus esporos foram tratados com ConA. Por outro lado, todas as outras lectinas promoveram o aumento de seu crescimento. Com relação às outras espécies, observou-se que o crescimento fúngico é aumentado quando os esporos são tratados com as lectinas.

Palavras-chave: Lectinas. Fungos. Fitopatógenos. Esporos. Crescimento.

ABSTRACT

Lectins represent a diversified group of proteins, both in terms of size and structure, as well as in relation to biological activities that they play on different organisms. Most of lectins have been isolated from plants and some of them can exert remarkable antifungal activities. This work shows the effect of five structurally related lectins, which were purified from the seeds of *Canavalia ensiformis* (ConA), *C. boliviana* (Cbol), *C. maritima* (ConM), *C. brasiliensis* (ConBr) and *C. gladiata* (ConG), respectively, on the *in vitro* growth of phytopathogenic fungi *Mucor sp.*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum musae* and *C. lindemuthianum*. In order to determine the effect of lectins, fungal spores were properly isolated, treated with each lectin in a concentration of 500 µg/ml for 24 hours and then inoculated to growth at 27°C in 96-well polystyrene plates containing potato dextrose broth. The fungal growth was assessed at different times by measuring the optical density at 620 nanometers. The negative control was performed with 0.15 M NaCl. In order to verify if the effect on fungal growth occurred merely by the presence of protein, the fungi were grown in the presence of bovine serum albumin (BSA). The results showed that the growth of *Mucor sp.* is decreased when spores were treated with ConA. On the other hand, all the other lectins enhanced its growth. With respect to other species, it was observed that fungal growth is increased when the spores were treated with lectins.

Keywords: Lectins. Fungi. Phytopathogens. Spores. Growth.

SUMÁRIO

| | | |
|------------|--|----|
| 1. | INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA | 12 |
| 1.1 | Lectinas | 12 |
| 1.1.1 | <i>Breve Histórico</i> | 12 |
| 1.1.2 | <i>Estrutura das lectinas</i> | 14 |
| 1.1.3 | <i>Lectinas: proteínas com grande amplitude de atividades e papéis biológicos</i> .. | 18 |
| 1.1.4 | <i>Lectinas: ferramentas biotecnológicas com inserção da saúde à agricultura</i> .. | 20 |
| 1.2 | Fungos | 21 |
| 1.2.1 | <i>Principais classes do Reino Fungi</i> | 25 |
| 1.2.1.1 | <i>Zygomycetes</i> | 25 |
| 1.2.1.2 | <i>Ascomycetes</i> | 25 |
| 1.2.1.3 | <i>Basidiomycetes</i> | 26 |
| 1.2.2 | <i>Fungos fitopatogênicos</i> | 26 |
| 1.2.2.1 | <i>Colletotrichum musae</i> | 26 |
| 1.2.2.2 | <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> | 28 |
| 1.2.2.3 | <i>Rhizoctonia solani</i> | 28 |
| 1.2.2.4 | <i>Mucor sp.</i> | 29 |
| 2 | OBJETIVO | 31 |
| 2.1 | Geral | 31 |
| 2.2 | Específicos | 31 |
| 3 | MATERIAIS E MÉTODOS | 32 |
| 3.1 | Obtenção das lectinas | 32 |
| 3.2 | Cultivo dos espécimes | 32 |
| 3.3 | Coleta dos esporos | 33 |
| 3.4 | Determinação do número de esporos coletados | 34 |
| 3.5 | Determinação do efeito das lectinas sobre os esporos | 36 |
| 3.6 | Análise estatística | 38 |
| 4 | RESULTADOS | 39 |
| 4.1 | Efeito das lectinas sobre o crescimento de <i>Mucor sp.</i> | 39 |
| 4.2 | Efeito das lectinas sobre o crescimento de <i>Rhizoctonia solani</i> | 44 |
| 4.3 | Efeito das lectinas sobre o crescimento de <i>Colletotrichum musae</i> | 49 |
| 4.4 | Efeito das lectinas sobre o crescimento de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> | 54 |

| | | |
|----------|--------------------------|-----------|
| 5 | DISCUSSÃO | 59 |
| 6 | CONCLUSÃO | 62 |
| | REFERÊNCIAS | 63 |

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Lectinas

1.1.1 Breve histórico

Foi Potapov (1968) quem introduziu o termo *lectinologia* para referir-se a uma área de estudos inteiramente voltada à pesquisa sobre uma classe especial de proteínas denominadas lectinas. A promoção do primeiro grande fato na história da lectinologia foi realizada por Stillmark, em 1888, durante o percurso de seu doutorado na Universidade de Dorpat (Estônia), na ocasião do estudo pioneiro sobre a aglutinação de eritrócitos por extratos de sementes de *Ricinus communis*, trabalho no qual ele observou que os extratos de sementes quando misturados com sangue aglutinavam os eritrócitos (SHARON; LIS, 2004). A partir de então, surgiu o termo fitohemaglutininas por se pensar, na época, que os compostos aglutinadores eram exclusivamente de origem vegetal.

Karl Landsteiner também realizou estudos sobre lectinas, utilizando aglutininas vegetais como ferramentas para o descobrimento dos grupos sanguíneos A, B e O (LANDSTEINER; RAUBITSCHKEK, 1907).

Inicialmente, Boyd e Shapleigh (1954) utilizaram o termo lectina (do latim, *legere* capaz de escolher, selecionar) para referir-se ao aspecto seletivo da ligação de algumas proteínas de sementes a eritrócitos humanos. Tal seletividade foi demonstrada quando verificaram que extratos de sementes de *Phaseolus vulgaris* aglutinavam eritrócitos de apenas alguns indivíduos.

Após a passagem de mais de cem anos a partir de Stillmark, a pesquisa nesta área focou, principalmente, nas lectinas de vegetais superiores. Muitos trabalhos foram fundamentais para o esclarecimento de inúmeros aspectos ligados à detecção, purificação, caracterização, especificidade, mecanismos de ação e estrutura dessas proteínas. A partir de tais estudos, ocorreram grandes avanços que permitiram definir melhor e de forma contínua as lectinas, o que tem justificado as sucessivas adaptações ocorridas até o presente para tentar definir tais moléculas.

A partir de então, a ideia de especificidade de ligação se tornara clara e foi aliada à noção do caráter ubíquo destas proteínas na natureza, proporcionando o surgimento de uma nova definição para lectinas. Goldstein e colaboradores em 1980 as definiram como proteínas de origem não imune, capazes de reconhecimento específico e ligação reversível a compostos contendo carboidratos e de aglutinarem células e glicoconjugados (GOLDSTEIN *et al.*, 1980). Três anos mais tarde, Kocourek e Horejsi (1983) propuseram uma nova definição. Tais

pesquisadores definiram lectinas como proteínas ou glicoproteínas de natureza não-imune que se ligam a carboidratos, sem apresentar atividade enzimática contra esses açúcares e que não requerem grupos hidroxilas livres para sua ligação.

Peumans e Van Damme (1995) apresentaram uma definição de lectinas ao mesmo tempo abrangente e com alto teor didático, a qual tem sido bastante aceita pelos pesquisadores da área. Tais autores definiram lectinas como sendo proteínas de origem não-imune que possuem pelo menos um sítio de ligação reversível a carboidratos.

Esta definição adquire credibilidade ao observarmos a subdivisão deste vasto grupo de proteínas proposta pelos mesmos autores, que as dividem em quatro classes principais de lectinas:

- Merolectinas

Inclui lectinas que possuem apenas um sítio de ligação a carboidrato e, conseqüentemente, não são capazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados. Como exemplo, podemos citar a heveína isolada de *Hevea brasiliensis* (VANPARIJS *et al.*, 1991).

- Hololectinas

Compreende aquelas que tem dois ou mais sítios de ligação a um mesmo carboidrato, sendo capazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados. Essa classe de lectinas está representada pelas hemaglutininas ou fitohemaglutininas, como a ConBr, isolada das sementes de *Canavalia brasiliensis* (MOREIRA; CAVADA, 1984).

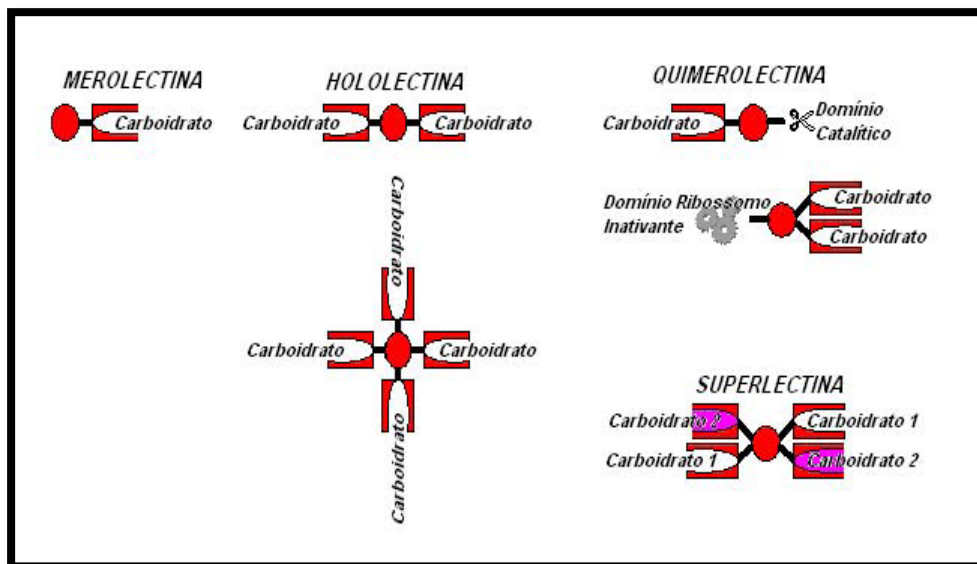
- Quimerolectinas

Engloba as lectinas que possuem um ou mais sítios de ligação a carboidratos, além de apresentarem atividade catalítica (ou outra atividade biológica não-carboidrato ligante) associada a outro domínio molecular, portanto, diferente do sítio de ligação a carboidrato. Como representantes dessa classe, podem ser citadas as RIP's tipo 2 (SHU *et al.*, 2009).

- Superlectinas

Passando da metade da década de 90, mais especificamente no ano de 1998, Peumans e Van Damme introduziram uma nova classe de lectinas vegetais, as superlectinas, visto que possuem dois sítios de ligação a carboidratos, os quais são, estruturalmente, diferentes e reconhecem açúcares não relacionados (PEUMANS; VAN DAMME, 1998). Como exemplo desse grupo temos a lectina de tulipa TxLC-1 que possui subunidades com um sítio específico para manose e outro para N-acetil-galactosamina, atuando de maneira totalmente independente (VAN DAMME *et al.*, 1996). A figura 1 mostra uma ilustração esquemática da classificação das lectinas proposta por Peumans e Van Damme.

Figura 1 – Ilustração esquemática da classificação das lectinas vegetais segundo Peumans e Van Damme.



Fonte: Desenho esquemático proposto pelo Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira

1.1.2 Estrutura das lectinas

Lectinas representam um grupo estruturalmente heterogêneo de proteínas, de origem não-imune, que compartilham da propriedade de se unir a carboidratos com alta especificidade (CAVADA *et al.*, 2001).

Estruturalmente, as lectinas se apresentam como um grupo proteico de grande heterogeneidade, podendo diferir em vários aspectos tais como: composição de aminoácidos, massa molecular aparente, estrutura e número de subunidades, estrutura terciária, e ainda,

pelo fato de conterem ou não íons metálicos ou cátions bivalentes em sua estrutura (CAVADA *et al.*, 2001).

A maioria destas proteínas pode ser agrupada em famílias diferentes que apresentam similaridades quanto às suas propriedades estruturais e de sequência de aminoácidos em suas cadeias polipeptídicas. No Reino Vegetal, podemos citar algumas espécies como as da família Leguminosae, onde podemos encontrar lectinas com alto grau de homologia na sequência de aminoácidos, estrutura secundária e conformação tridimensional, evidenciando assim, uma linha taxonômica bem definida (CAVADA *et al.*, 1993; SHARON; LIS, 1995).

A massa molecular aparente da maioria das lectinas descritas até o momento varia de 3,5 – 4,0 kDa (lectina de *Crotalaria striata*) (KHANG; JEAN-LUC; HOEBEKE, 1990) a 480 kDa (lectina de rizoma de *Aegopodium podagraria*) (PEUMANS *et al.*, 1985). Outra característica encontrada é a presença de carboidratos em sua estrutura, cujo grau de glicosilação varia dentre as espécies (SHARON; LIS, 1989).

As lectinas consistem de subunidades, cujo número varia entre um, no caso da lectina de rizomas de *Urtica dioica* (PEUMANS; DELEY; BROEKAERT, 1984), a dez, no caso de uma das lectinas de *Araucaria angustifolia* (DATTA; FIGUEROA; LAJOLO, 1991). No entanto, tais proteínas podem apresentar diferenças nos padrões de associações de suas subunidades dependendo da característica do meio onde se encontram (pH e temperatura) (GALLEGO DEL SOL *et al.*, 2005).

As lectinas da tribo Viciae (gêneros *Pisum*, *Vicia*, *Lathyrus* e *Lens*) são dímeros. Nestas, cada subunidade é formada por duas cadeias polipeptídicas diferentes, uma cadeia polipeptídica leve (cadeia α) com massa de 5-7 kDa e uma cadeia polipeptídica pesada (cadeia β) com massa de 15-19 kDa, estabilizadas por ligações não covalentes (SHARON; LIS, 1990). Já as lectinas de espécies pertencentes à subtribo Diocleinae são tetrâmeros compostos por uma mistura de subunidades intactas formadas por uma cadeia polipeptídica com 237 resíduos de aminoácidos e de subunidades fragmentadas, nas quais a mesma cadeia polipeptídica está dividida em dois fragmentos, devido ao fato de não ter havido a formação de uma ligação peptídica entre os resíduos 118 e 119 (CHRISPEELS *et al.*, 1986). Apesar de não estarem unidos covalentemente, os fragmentos são mantidos juntos por ligações não covalentes e formam um protômero cuja estrutura tridimensional é a mesma da subunidade formada pela cadeia íntegra, sem descontinuidade da estrutura primária (SHARON; LIS, 1990).

A variedade de formas moleculares nas quais as lectinas podem ser encontradas é de veras impressionante. A existência de isoformas ou isolectinas aponta para tal heterogeneidade molecular. Tais variedade pode ser determinada por mudanças sutis na sequência de aminoácidos. A lectina isolada de sementes de *Datura stramonium* pode facilmente ser considerada como um exemplo de tal fato. Esta proteína é composta por duas subunidades diferentes, uma (A) com 32 kDa e uma (B) com 28 kDa podendo ser associadas entre si, originando três isoformas com as seguintes estruturas: AA, AB e BB (SHIBUYA *et al.*, 1987).

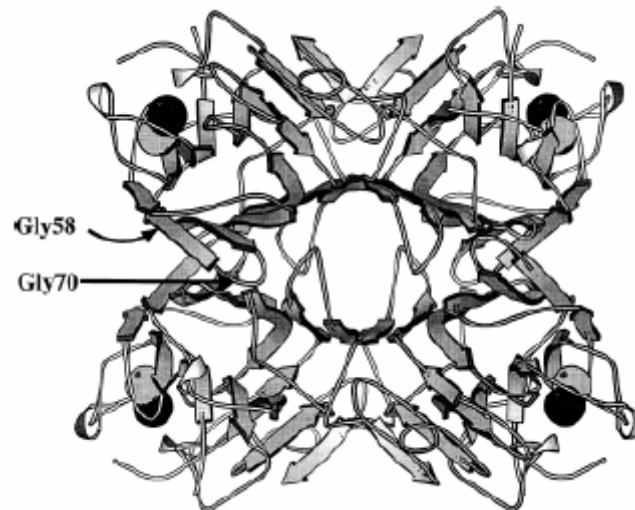
A subtribo Diocleinae (família Leguminosae) compreende treze principais gêneros, sendo que algumas lectinas têm sido isoladas de plantas que pertencem a alguns destes gêneros: *Canavalia*, *Cratylia* e *Dioclea* (CAVADA *et al.*, 2001).

Parte significativa das lectinas, principalmente as pertencentes aos gêneros *Dioclea* e *Canavalia* necessitam de íons metálicos divalentes (geralmente Ca^{++} e Mn^{++}) para exercer a atividade de reconhecimento e ligação a carboidratos (figura 2). Tais íons ligam-se a sítios específicos na estrutura proteica, condição de extrema importância para o estabelecimento da ligação envolvendo o de ligação a carboidratos e para conferir alto grau de estabilidade estrutural à molécula, protegendo-a contra a inativação (CAVADA *et al.*, 1993; CAVADA *et al.*, 1996)

Ultimamente sugeriu-se que substituições de aminoácidos fora do sítio de união de carboidratos podem ser responsáveis pela diferença na afinidade de ligação a açúcares e atividades biológicas das lectinas Diocleinae. A estrutura cristalina de ConBr é representada abaixo (figura 2, p. 17). Na ilustração são demonstrados os resíduos de aminoácidos que variam em relação a lectina ConA. Apenas dois aminoácidos são substituídos e nenhum destes resíduos está próximo do sítio de ligação de carboidratos em ambas lectinas (GRANGEIRO *et al.*, 1997; SANZ-APARICIO *et al.*, 1997).

De acordo com Sharma e Surolia (1997), o sítio de reconhecimento a carboidratos é constituído por diversos *loops* com diferença nos graus de variabilidade. As conformações destes *loops* são determinadas pela presença na estrutura de íons metálicos, como o Ca^{2+} e Mg^{2+} , cuja ausência resulta em uma instabilidade local e na perda da capacidade de ligar-se a carboidratos (LORIS *et al.*, 2004).

Figura 2 – Ilustração da estrutura tridimensional da lectina ConBr em sua forma global tetramérica. A localização das quatro subunidades está evidenciada, bem como as posições dos resíduos de Gly 58 e Gly 70, os quais são substituídos, respectivamente, por Asp e Ala em ConA. Os sítios de ligação aos metais de transição Mn^{2+} e Ca^{2+} estão representados por esferas cinza e pretas, respectivamente.



Fonte: SANZ-APARICIO *et al.*, 1997.

Certas lectinas de leguminosas podem ainda possuir sítios de ligação hidrofóbicos que não interferem com os sítios de ligação a carboidratos (ROBERTS; GOLDSTEIN, 1982; 1984). Ainda permanece de forma indeterminada a função destes sítios de ligação nos organismos originais, no entanto o fato destes sítios estarem presentes em lectinas de leguminosas de diferentes espécies nos leva a crer que demonstram uma importante função biológica (HAMELRYCK *et al.*, 1999). Um desses sítios apresenta alta afinidade ($10^6 M^{-1}$) por adenina e certos derivados dessa base nitrogenada (ROBERTS; GOLDSTEIN, 1983). Este sítio já foi encontrado em lectinas tetraméricas e lectinas diméricas de leguminosas e pode ser encontrado sob duas formas: dentro da subunidade ou os que se estabelecem no centro do tetrâmero.

Na lectina de *Canavalia ensiformis*, o sítio da subunidade liga-se ao hormônio vegetal ácido indolacético do grupo das auxinas (EDELMAN; WANG, 1978), e o outro sítio, existe como uma cavidade única por tetrâmero, que se liga a adenina e também a citocininas, que são hormônios derivados da adenina (SHARON; LIS, 1990).

No ano de 2006, Delatorre e colaboradores determinaram a estrutura cristalográfica da lectina ConM, purificada a partir de sementes de *Canavalia maritima*, complexada naturalmente, via sítio hidrofóbico, com um aminoácido não-protéico: trata-se do ácido α -aminobutírico, ABU (DELATORRE *et al.*, 2006).

1.1.3 Lectinas: proteínas com grande amplitude de atividades e papéis biológicos

Lectinas possuem importantes papéis na fisiologia de diversas espécies, fato este comprovado por sua ampla distribuição. No decorrer das duas últimas décadas, as lectinas que até então haviam sido encontradas principalmente em plantas, mostraram-se amplamente distribuídas na natureza por terem sido isoladas de todas as classes e famílias de seres vivos (algas, vertebrados, invertebrados e micro-organismos) e até mesmo em vírus (PENG *et al.*, 2009). Tais proteínas apresentam uma grande variedade de formas e tamanhos e desempenham papéis biológicos em muitos processos celulares, tais como comunicação celular, defesa de hospedeiros, fertilização, desenvolvimento, infecção parasitária e metástase tumoral (SHARON; LIS, 1989).

Lectinas de bactérias podem desempenhar papel preponderante nas etapas iniciais de infecções, por exemplo, quando ocorre a aderência das bactérias às células epiteliais do trato urinário e gastrintestinal. As lectinas de bactérias também podem agir como sítio molecular de reconhecimento para macrófagos de camundongos na fagocitose de micro-organismos na ausência de opsoninas. O mesmo acontece em macrófagos peritoneais, linfócitos e polimorfonucleares humanos (SHARON; LIS, 1989).

As lectinas também estão envolvidas no processo de adesão de *Corynebacterium diphtheriae* aos seus hospedeiros (COLOMBO *et al.*, 2001). O patógeno *Porphyromonas gingivalis*, um que possui grande importância etiológica em doenças periodontais, liga-se através de suas fímbrias a estruturas periodontais contendo glicoproteínas, evidenciando claramente um efeito “lectin-like” (SOJAR; SHARMA; GENCO, 2004).

Avanços importantes têm sido relatados no campo do combate a malária, no qual a expressão de uma lectina isolada do pepino do mar em mosquitos anofelinos impede o desenvolvimento de protozoários do gênero *Plasmodium*, causadores da malária (YOSHIDA *et al.*, 2007). No protozoário *Entamoeba histolytica* a presença de uma lectina parece desempenhar importante papel na etapa de aderência à célula hospedeira (células epiteliais do cólon), possuindo ainda, um papel na citotoxicidade celular, diferenciado da função de aderência (SAFFER; PETRI, 1991).

Em vírus, a lectina parece estar envolvida no processo de adesão à célula hospedeira. A infecção pelo vírus influenza é iniciada pelo evento de adesão, mediada por uma aglutinina do envelope do vírion que reconhece e se liga a resíduos de ácido siálico da superfície celular (GLICK *et al.*, 1991).

Lectinas também desempenham papel preponderante na patogenia da dengue. Nos eventos iniciais, mais precisamente naqueles relacionados à adesão do patógeno junto às células do sistema imunológico, principalmente macrófagos, a presença de um receptor de manose faz a mediação para a infecção destas células pelo vírus da dengue (MILLER *et al.*, 2008).

Com relação às lectinas de algas marinhas é importante observar que o número de trabalhos mostra-se ainda bastante reduzido, porém tem crescido discretamente nos últimos anos. A primeira lectina de alga marinha isolada foi a da alga vermelha *Ptilota plumosa* (ROGERS; BLUNDEN; EVANS, 1977). As algas vermelhas são as que apresentam o maior número de espécies com atividade hemaglutinante seguidas das algas pardas e verdes (SAMPAIO, 1997). De modo geral, as lectinas de algas marinhas costumam apresentar baixos pesos moleculares. Tais valores variam de 4,2 kDa para as isolectinas de *Hypnea japonica* (HORI *et al.*, 1986) e até 64,5 kDa para a lectina de *Ptilota serrata* (ROGERS; FISH; BARWELL, 1990).

As lectinas também possuem ocorrência em invertebrados, as quais estão presentes em praticamente todas as classes examinadas como caranguejos (UMETSU; YAMASHITA; SUZUKI, 1991); larvas de insetos (GRUBHOFFER; MATHA, 1991); carrapatos (SHARON; LIS, 1989); ouriço do mar (YAMADA; AKETA, 1982) e insetos (YU; KANOST, 2000).

Já nos vertebrados, as lectinas podem ser encontradas apresentando duas formas distintas com relação ao processo de adesão a estruturas celulares: solúveis ou ligadas a membranas. Uma grande variedade tem sido encontrada em diferentes tecidos de mamíferos, aves e répteis, algumas semelhantes, outras bastante diferentes em sua estrutura molecular e especificidade por carboidratos. A ampla distribuição das lectinas em vertebrados é também evidenciada pela presença de uma lectina específica por galactose em veneno da cobra que tem ação direta contra micro-organismos gram-positivos e gram-negativos (RADIS-BAPTISTA *et al.*, 2006). Com relação aos peixes, tem sido isolada uma lectina cálcio dependente com funções ainda não determinadas (SUZUKI *et al.*, 2003).

Em fungos, uma lectina com massa molecular de 17 kDa foi isolada do cogumelo *Inocybe umbrinella* (ZHAO; WANG; NG, 2009). Já em *Lentinus edodes*, um cogumelo bastante encontrado nos países asiáticos, um número de lectinas com afinidade por D-galactose e D-lactose tem sido isoladas em diferentes estágios de seu desenvolvimento (VETCHINKINA; POZDNYAKOVA; NIKITINA, 2008).

1.1.4 Lectinas: ferramentas biotecnológicas com inserção da saúde à agricultura

Imberty e Varrot (2008) afirmam que infecções por patógenos são geralmente iniciadas por um reconhecimento específico das superfícies epiteliais, sendo as etapas subsequentes de adesão essenciais para a invasão. Dentro desta estratégia de infecção, os micro-organismos frequentemente utilizam proteínas ligantes a açúcares, como lectinas, para reconhecer e ligar-se aos glicoconjugados. A relação lectina-glicoconjugados é caracterizada por sua alta seletividade e na maioria das vezes por gerar ligações de alta afinidade.

Células em geral possuem sobre suas superfícies, carboidratos na forma de glicoproteínas, glicolípídios e polissacarídeos. O potencial dos açúcares como moléculas de informação já é sedimentado. No entanto, a importância dessas moléculas nos processos bioquímicos era até então descrita como moléculas ricas em energia ou meros elementos prostéticos. Já nas duas últimas décadas, tem havido um número crescente de evidências científicas favorecendo o conceito de que os carboidratos desempenham funções singulares como elementos determinantes de reconhecimento em uma grande variedade de processos biológicos, sejam fisiológicos ou até mesmo patológicos (VARKI, 1993; SHARON; LIS, 1995). E é a partir dessas importantes informações dadas por essas moléculas que as lectinas exercem suas extraordinárias atividades.

Como visto, além da capacidade de aglutinar células, descrita por Stilmark em 1888, várias outras atividades biológicas de lectinas vegetais têm sido demonstradas. Entre estas se destacam: indução da proliferação de linfócitos e da produção de interferon- γ (BARRAL-NETTO *et al.*, 1992); estimulação de macrófagos e liberação de peróxido de hidrogênio (RODRIGUEZ *et al.*, 1992); indução da migração de leucócitos (BENTO *et al.*, 1993); indução da liberação de histamina (GOMES *et al.*, 1994); proteção parcial *in vivo* em animais infectados com *Leishmania amazonensis* e reconhecimento da forma promastigota metacíclica da *Leishmania braziliensis* por *Bauhinia purpurea* (PINTO-DA-SILVA *et al.*, 2002); indução da produção *in vivo* e *in vitro* de óxido nítrico por células peritoneais (ANDRADE *et al.*, 1999); indução de apoptose (BARBOSA *et al.*, 2001); atividade anti-inflamatória e pró-inflamatória de lectinas vegetais (ASSREUY *et al.*, 1997; ALENCAR *et al.*, 1999; SANTI-GADELHA *et al.*, 2006) atividade analgésica (SAYYAH; HADIDI; KAMALINEJAD, 2004), efeitos renais em rim isolado perfundido (TEIXEIRA *et al.*, 2001); utilização de lectinas na entrega de fármacos “*drug delivery*” (JAIN; JANGDEY, 2009).

Tem também sido demonstrado o efeito antiviral de lectinas. Como exemplo disso pode-se citar uma lectina isolada de anelídeo marinho que possui atividade anti-HIV

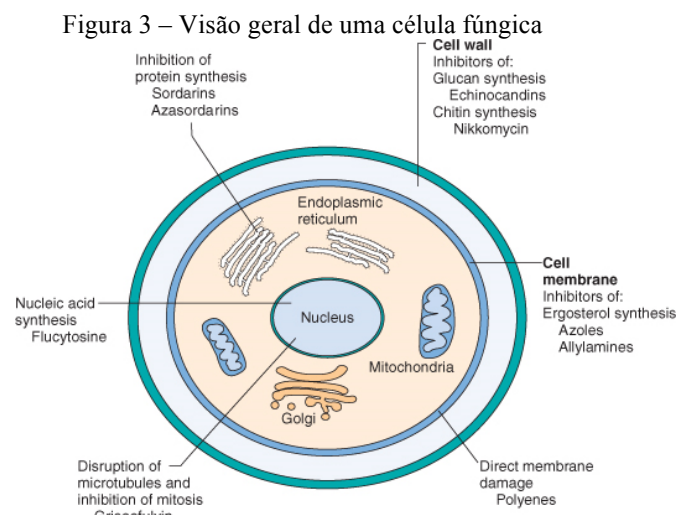
(MOLCHANOVA *et al.*, 2007). Outras lectinas possuem efeito contra o vírus da hepatite C (TULLIS *et al.*, 2009).

Existem poucos relatos na literatura de lectinas com propriedades antifúngicas. Entretanto, Ngai e Ng (2007) isolaram uma lectina das sementes de *Capsium frutescens L. var. Fasciculatum* que possuía atividade inibitória sobre o crescimento dos fungos *Aspergillus flavus* e *Fusarium moniliforme*. Tal proteína exibiu afinidade por glicose/manose.

Recentemente, uma lectina isolada das sementes de *Phaseolus coccineus*, a qual possui afinidade por ácido siálico foi capaz de inibir o crescimento dos fungos *Candida albicans*, *Penicillium italicum*, *Helminthosporium maydis*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Gibberella sanbinetti* e *Rhizoctonia solani* (CHEN *et al.*, 2009).

1.2 Fungos

Os fungos são classificados em seu próprio reino separado, Reino Fungi (Myceteae). Eles são organismos eucarióticos, distinguidos dos outros eucariotos por uma rígida parede celular composta de quitina e glucana e uma membrana celular na qual o colesterol é substituído por ergosterol como componente principal de esterol (Figura 3) (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2008).



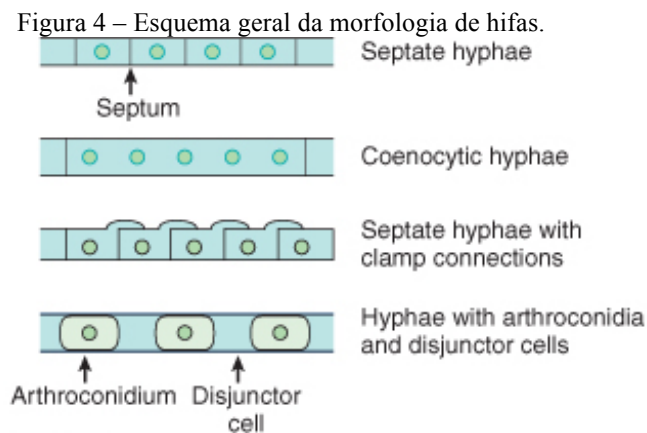
Fonte: (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2008)

Fungos são componentes importantes do ecossistema, sendo essenciais para a reciclagem de minerais e carbono através da decomposição de restos orgânicos. Tem sido estimado que os fungos reciclem anualmente milhões de toneladas de lixo orgânico. A vida

para outros tipos de organismos poderia parar sem a atividade dos fungos. Adicionalmente, cogumelos e outros fungos frescos são fontes de nutrientes para muitos animais, incluindo humanos. Em adição às propriedades benéficas dos fungos, muitas plantas e animais sofrem com doenças causadas por fungos (MOORE-LANDECKER, 1996).

O simples agrupamento baseado na morfologia classifica os fungos em leveduras ou bolores. Uma levedura pode ser definida morfologicamente como uma célula que se reproduz por brotamento ou fissão, na qual uma célula progenitora ou mãe pinça uma parte de si para produzir uma progênie ou célula-filha. As células-filhas podem alongar-se para formar pseudo-hifas semelhantes a salsichas. As leveduras são usualmente unicelulares e produzem colônias arredondadas, pálidas ou mucóides em ágar (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2008).

Os bolores, por outro lado, são organismos multicelulares, consistindo de estruturas tabulares tipo filamento chamadas hifas, as quais se alongam em suas pontas num processo conhecido como extensão apical. As hifas são cenocíticas (ocas e multinucleadas) ou septadas (divididas por septos ou paredes transversais) (Figura 4).



Fonte: (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2008)

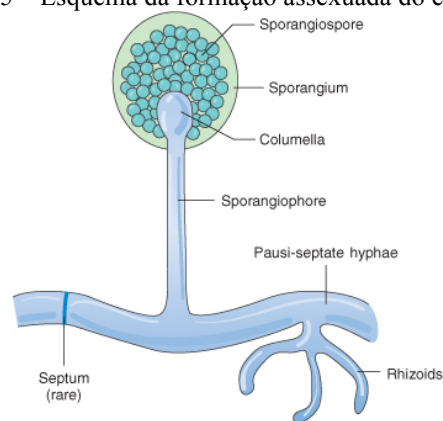
As hifas se juntam para produzir uma estrutura chamada micélio. As colônias formadas por bolores são frequentemente descritas como filamentosas. Quando crescendo em ágar ou outras superfícies sólidas, os bolores produzem hifas, denominadas hifas vegetativas, que crescem sob ou sobre a superfície do meio de cultura, e também hifas que se projetam acima da superfície do meio, popularmente conhecidas como hifas aéreas. As hifas aéreas podem produzir estruturas especializadas conhecidas como conídios (elementos de reprodução assexuada). Os conídios são facilmente carregados pelo ar e servem para disseminar o fungo (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2008).

A maioria dos fungos apresenta respiração aeróbica, embora, alguns sejam facultativamente anaeróbicos (fermentativos) e outros sejam estritamente anaeróbicos. Metabolicamente, os fungos são heterotróficos e bioquimicamente versáteis, produzindo ambos os metabólitos primários e secundários. Em comparação com as bactérias, os fungos são de crescimento lento, com o tempo de duplicação celular de horas, e não de minutos (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2008).

Os esporos assexuados são referidos como sendo anamorfos. Enquanto os esporos sexuados e suas estruturas reprodutivas associadas são chamados de teleomorfos. Os esporos de ambos os estágios do ciclo de vida podem ser morfologicamente distintos. Os esporos teleomórficos (produzidos sexualmente) são classificados de acordo com a estrutura sexual na qual eles se desenvolvem. Muitos fungos complexos produzem estruturas reprodutivas multicelulares – um esporocarpio ou corpo de frutificação (MOORE-LANDECKER, 1996).

Com relação à habilidade de um determinado fungo em produzir esporos sexuados, em situações clínicas, é comum referir-se aos organismos por suas designações assexuadas. Isto ocorre porque o estado anamórfico é isolado dos espécimes clínicos, e a fase sexuada ou teleomórfica ocorre apenas sob condições muito especiais no laboratório. Os esporos assexuados consistem em dois tipos gerais: esporangiosporos e conídios. Os esporangiosporos são esporos sexuados seguidos de uma fusão de dois tipos compatíveis. Os esporos assexuados da ordem Mucorales são contidos dentro de um esporângio (Figura 5).

Figura 5 – Esquema da formação assexuada do esporo.



Fonte: (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2008)

Esporos fúngicos ocorrem em grande quantidade ao ar livre. Segundo Kendrick (1990), existem perto de cem mil fungos que podem ter seus esporos transportados pelo ar. Muitas condições influenciam a concentração de esporos no ar livre. Dentre estas podemos

citar condições geográficas, meteorológicas e fatores relacionados ao homem. Geralmente, existe uma baixa concentração em grandes metrópoles, em comparação à zona rural.

Muitos esporos são difíceis de serem identificados, desta forma são agrupados de acordo com as similaridades morfológicas compartilhadas entre eles. Muitos se mostram alergênicos (isto é, induzem respostas alérgicas em indivíduos susceptíveis) e alérgenos de esporos fúngicos podem ser potentes indutores de asma e rinites alérgicas sazonais (WOOLCOCK; PEAT; TREVILLION, 1995).

A composição, arquitetura e superfície celular nativa vêm recebendo atenção especial no campo da pesquisa em fungos. A parede celular de um basidiomiceto ou ascomiceto típico é constituída principalmente por N-acetilglicosamina, na forma de microfibrilas de quitina, com a presença de glicoproteínas, sendo muitas de natureza manosídica. As microfibrilas de quitina são responsáveis pela arquitetura e integridade estrutural das paredes celulares, enquanto as glicoproteínas nas camadas externas da parede estão relacionadas com um vasto número de fenômenos envolvendo a superfície celular (GOODAY, 1995).

Smith *et al.* (1999; 2001) utilizaram a análise de painéis de lectinas para caracterizar a composição de carboidratos tanto em fungos unicelulares quanto nos filamentosos. Foram encontrados resíduos de manose, N-acetilglicosamina e N-acetilglactosamina em quantidades variáveis na superfície de conídios e de regiões em processo germinativo.

Para colonizar as plantas, os fungos apresentam estratégias para invadir o tecido vegetal, aperfeiçoar o crescimento na planta e propagar-se. Bactérias e vírus, assim como outros fungos oportunistas, frequentemente dependem de aberturas naturais ou feridas para que ocorra a invasão. Em contraste, muitos fungos fitopatogênicos desenvolveram mecanismos evolutivos para atravessarem de forma ativa as barreiras estruturais externas da planta, como cutícula e a parede celular. Para conseguir entrar, os fungos geralmente secretam uma mistura de enzimas hidrolíticas, incluindo cutinases, celulasas, pectinases e proteases. Pelo fato destas enzimas serem requeridas também para a vida saprofítica dos fungos, elas representam ferramentas especificamente desenvolvidas pelo fungo para implementar sua patogênese, e cada enzima hidrolítica individualmente pode não ser absolutamente necessária para a penetração. Porém, isto não impede sua adaptação ou regulação biossintética para as necessidades específicas de um patógeno numa determinada planta (KNOGGE, 1996).

1.2.1 Principais Classes do Reino Fungi

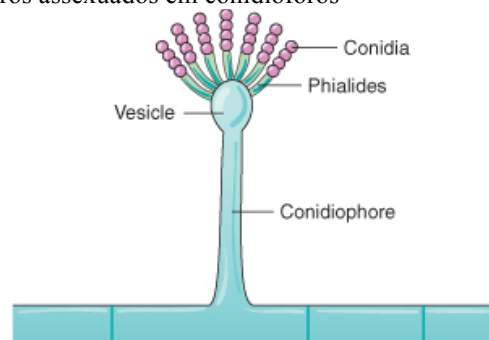
1.2.1.1 Zygomycetes

São bolores com hifas amplas, septadas de forma esparsa e cenocíticas. Zygomycetes produzem esporos sexuados em seguida a uma fusão de dois tipos compatíveis. Os esporos sexuados da ordem Mucorales são contidos dentro de um esporângio. Os esporângios nascem nas pontas de esporangióforos semelhantes a pedúnculos que terminam num bulbo distendido chamado columela (rever Figura 5, p. 23). A presença de estruturas parecidas com raízes, chamadas rizóides, ajuda na identificação do gênero específico dentro de Mucorales. Os esporos assexuados nascem individualmente em esporóforos curtos e são forçosamente ejetados quando maduros (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2008).

1.2.1.2 Ascomycetes

Ascomycetes incluem tanto as leveduras quanto os bolores. As hifas são septadas e os esporos assexuados são produzidos a partir de células conidiogênicas na extremidade de conidióforos (Figura 6). Já o esporo sexuado de Ascomycetes é o ascósporo, caracterizado por sua produção dentro de um saco ou asco.

Figura 6 – Esquema do processo de formação de esporos assexuados em conidióforos



Fonte: (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2008)

1.2.1.3 Basidiomycetes

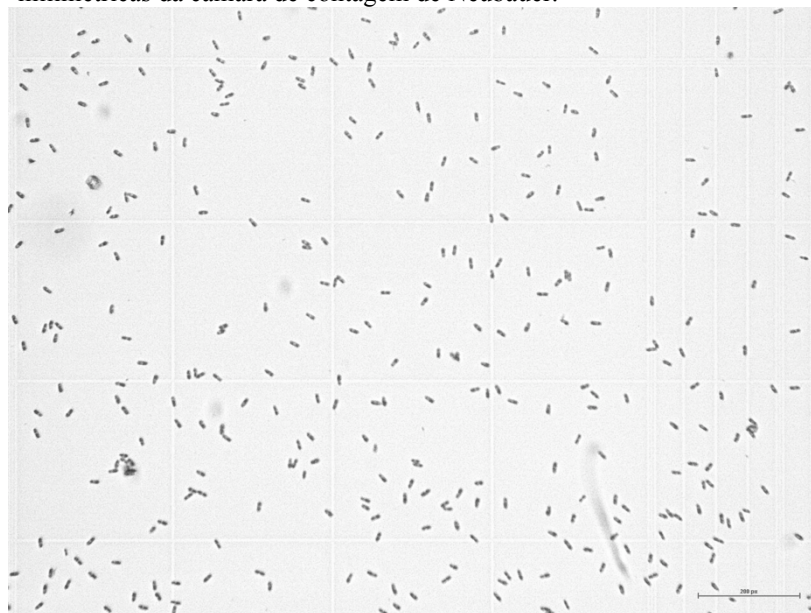
Basidiomycetes são raramente encontrados clinicamente. O único patógeno humano é a *Filobasidiella neoformans*, a forma sexuada de *Cryptococcus neoformans*. O esporo sexuada de Basidiomycetes é o basidiósporo, caracterizado pela a extensão de uma estrutura em forma de clava, o basídio (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2008).

1.2.2 Fungos fitopatogênicos

1.2.2.1 *Colletotrichum musae*

O fungo *Colletotrichum musae* (Berk & Curt.) von Arx. (Teleomorfo: *Glomerella musarum* Petch), cujos esporos são mostrados na figura 7, é um patógeno comum de frutos de banana (*Musa spp.*), causando antracnose, com ampla distribuição geográfica, onde a bananeira é cultivada (THANGAVELU; SUNDARARAJU; SATHIAMOORTHY, 2004). Economicamente, o patógeno é muito importante por causar prejuízos em pós-colheita e, também, perdas ao nível de campo (JEFFRIES *et al.*, 1990), sendo fator limitante da qualidade prejudicando a comercialização do fruto.

Figura 7 – Fotomicrografia óptica de esporos de *Colletotrichum musae* vistos em aumento de 40 vezes. Ao fundo observam-se as ranhuras milimétricas da câmara de contagem de Neubauer.



Fonte: Próprio autor

A antracnose é uma doença que incide principalmente nas brotações jovens, ápices, folhas e ramos jovens. Nas sementeiras, geralmente ocorre à queima do ápice das plântulas, impedindo seu crescimento e provocando seu perfilhamento. Os principais sintomas são: manchas escuras, irregulares, incidindo, principalmente nas bordas, causando deformações nas folhas jovens (Figura 8). As condições favoráveis ao desenvolvimento dessa doença são dentre outros, sombreamento excessivo e umidade excessiva. Em condições favoráveis, os conídios de *C. musae* germinam na superfície em frutos imaturos, dentro de 6 a 8 h, produzindo um tubo germinativo, na extremidade do qual se forma o apressório, considerado um órgão de adesão. Esse órgão capacita o patógeno a sobreviver em condições adversas do ambiente, antes da penetração no tecido do hospedeiro. Quando *C. musae* penetra em frutos imaturos, geralmente permanece quiescente até o início do processo de amadurecimento, ocorrendo à colonização e a expressão dos sintomas (RUNCIO *et al.*, 2008).

Figura 8 – Em (a) observa-se desenvolvimento da antracnose sobre vagens de feijoeiro e (b) mostra folhas com sintomas para esta mesma doença.



(a)



(b)

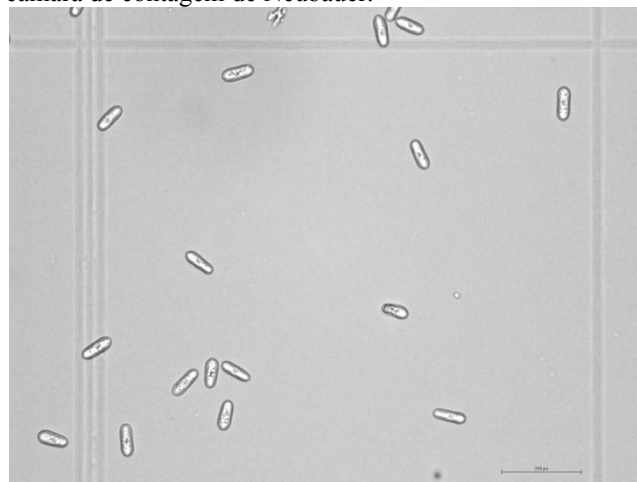
Fonte: Banco de imagens do google. Palavra-chave: antracnose

1.2.2.2 *Colletotrichum lindemuthianum*

Colletotrichum lindemuthianum (Sacc. & Magn.) Scrib. (teleomorfo *Glomerella cingulata* (Stonem) Spauld & Schrank f. sp. *Phaseoli kimati*) agente causal da antracnose do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) apresenta micélio apocítico e ramificado e se reproduz de forma assexuada. Os conídios formam massa de cor salmão ou mel, são hialinos, unicelulares, oblongos e cilíndricos, apresentando as extremidades arredondadas (Figura 9).

A antracnose é uma das principais doenças fúngicas do feijoeiro, que pode ser altamente devastadora, proporcionando perdas de até 100% na produção quando os fatores cultivar suscetível, ambiente favorável ao patógeno e sementes infectadas estiverem simultaneamente presentes durante o período de cultivo (HERBERT *et al.*, 2004).

Figura 9 – Fotomicrografia óptica de esporos de *Colletotrichum lindemuthianum* vistos em aumento de 400 vezes. Ao fundo observam-se as ranhuras milimétricas da câmara de contagem de Neubauer.



Fonte: Próprio autor

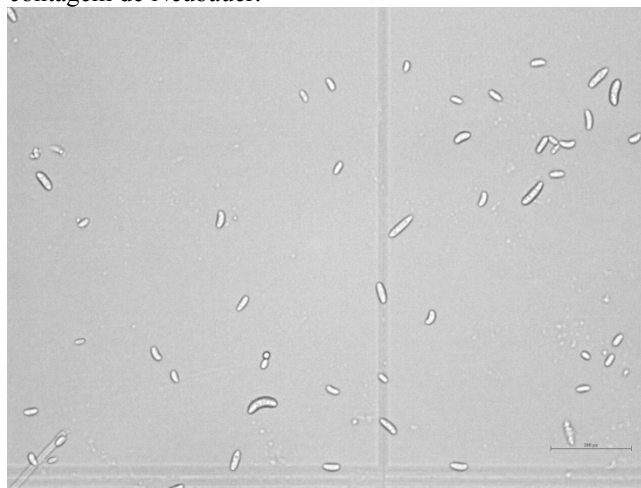
1.2.2.3 *Rhizoctonia solani*

Rhizoctonia solani é um fungo habitante do solo que tem como forma sexuada *Thanatephorus cucumeris* (Frank), pertencente ao Filo Basidiomycota. A anamorfase (ou estágio assexual) de *R. solani* ocorre mundialmente causando doenças em uma ampla variedade de plantas cultivadas. Os esporos de *R. solani* podem ser vistos na figura 10 (p. 29). Ao contrário do que se postulava no passado a respeito da condição de patógeno polífago, a gama de hospedeiros de cada um dos grupos de anastomose de *R. solani* é restrita. Cada grupo

de anastomose está frequentemente associado a determinado hospedeiro ou a um grupo restrito de hospedeiros (SHARON *et al.*, 2008; LEHTONEN *et al.*, 2009).

Os danos causados por *R. solani* a cultivares de arroz são a queima da bainha e colmos, caracterizadas por manchas ovais, elípticas e bordas marrons bem definidas nos tecidos afetados. Em casos mais severos, observam-se manchas semelhantes nas folhas inferiores resultando em seca parcial ou total, e esterilidade de algumas espiguetas, ocasionando inclusive a morte da planta. O período crítico de incidência ocorre entre o perfilhamento e a floração (LI *et al.*, 2009; MERCIER; JIMENEZ, 2009).

Figura 10 – Fotomicrografia óptica de esporos de *Rhizoctonia solani* vistos em aumento de 400 vezes. Ao fundo observam-se as ranhuras milimétricas da câmara de contagem de Neubauer.



Fonte: Próprio autor

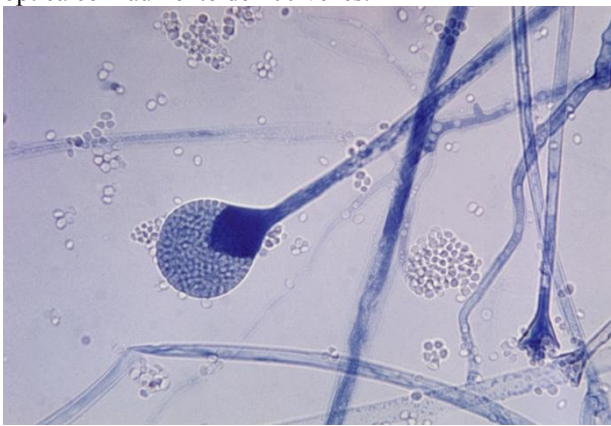
1.2.2.4 Mucor sp.

O gênero *Mucor* (Micheli) compreende cerca de 80 espécies cosmopolitas, sendo considerado o mais representativo e estudado dentre os gêneros de Mucoraceae. Os representantes de *Mucor* reproduzem-se, assexuadamente, por meio de aplanósporos (esporangiosporos – Figura 11, p. 30) formados internamente em esporângios e clamidósporos; sexuadamente, pela fusão de dois gametângios geneticamente compatíveis, pertencentes ou não ao mesmo micélio e dando origem ao zigosporo (ALVES; TRUFEM; MIANEZ, 2002).

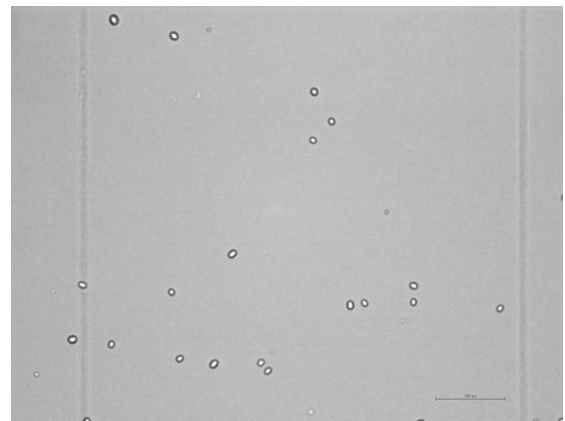
A maioria das espécies de *Mucor* vive como sapróbia no solo, grãos, flores, frutos, restos de vegetais, agárlicos carnosos. Os mucoráceos desempenham papel importante

nos processos iniciais de reciclagem, sendo responsáveis pela colonização primária do substrato utilizando-se dos açúcares de estrutura molecular mais simples (glicose), daí serem conhecidos como "fungos do açúcar". O gênero *Mucor* ganha destaque na biotecnologia sendo responsável pela produção de várias enzimas como: amilase, lipase, pectinase e protease. *Mucor hiemalis*, *M. racemosus* e *M. miehei* são espécies que apresentam atividade enzimática proteásica de importância comercial (ALVES; TRUFEM; MIANEZ, 2002).

Figura 11 – Fotomicrografias de *Mucor sp.* (a) evidenciando esporangióforo ereto com um esporângio maduro. Notar a quantidade de esporangiosporos liberados. Em (b) são vistos esporangiosporos através de microscopia óptica com aumento de 200 vezes.



(a)



(b)

Fonte: (a) Banco de imagens do google. Palavra-chave: *Mucor sp.* (b) Próprio autor

2 OBJETIVO

2.1 Geral

Avaliar o potencial inibitório e/ou estimulatório *in vitro* de cinco lectinas isoladas das sementes das leguminosas *Canavalia ensiformis* (ConA), *C. boliviana* (Cbol), *C. maritima* (ConM), *C. brasiliensis* (ConBr) e *C. gladiata* (ConG) através do tratamento dos esporos fúngicos e determinação do respectivo efeito sobre o crescimento dos fitopatógenos *Mucor sp.*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum musae* e *C. lindemuthianum*.

2.2 Específicos

- Estudar o efeito estimulatório das lectinas de leguminosas (ConA, CBol, ConM, ConBr e ConG) sobre a germinação de esporos dos fungos fitopatogênicos *Mucor sp.*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum musae* e *C. lindemuthianum*;
- Avaliar se o tratamento dos esporos com as lectinas descritas no item anterior exerce alguma função inibitória sobre o crescimento *in vitro* dos fungos fitopatogênicos outrora citados;
- Avaliar se o efeito exercido sobre o crescimento dos fungos é meramente proteico ou está relacionado com o tratamento com as lectinas citadas;
- Estabelecer comparações entre a atividade exercida pelas lectinas em estudo, relacionando com a similaridade estrutural encontrada entre as mesmas.
- Lançar luz sobre as interação que ocorrem entre as lectinas estudadas e a presença de carboidratos específicos para tais lectinas na superfície dos esporos;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

A realização da presente pesquisa mostrou que as etapas e métodos escolhidos foram de grande relevância para a obtenção dos resultados. Os seguintes protocolos foram realizados: isolamento e purificação das lectinas, cultivo dos espécimes de fungos, coleta dos esporos, determinação do número de esporos coletados, determinação do efeito inibitório das lectinas sobre o processo germinativo de esporos tratados e análise estatística dos dados adquiridos.

3.1 Obtenção das lectinas

As lectinas utilizadas neste estudo estão descritas na tabela 1, as quais foram gentilmente cedidas pelo Professor Doutor Benildo Sousa Cavada, coordenador do Biomol-Lab do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará. Tais proteínas possuem seletividade para os carboidratos apresentados na tabela abaixo:

Tabela 1 – Informações gerais sobre as lectinas estudadas

| Lectina Isolada de | Sigla | Especificidade | Referências |
|-------------------------------|-------|----------------|-------------------------|
| <i>Canavalia ensiformis</i> | ConA | Glicose/Manose | (SUMNER; HOWELL, 1936) |
| <i>Canavalia gladiata</i> | ConG | Glicose/Manose | (KOJIMA et al., 1991) |
| <i>Canavalia boliviana</i> | CBol | Glicose/Manose | Em publicação |
| <i>Canavalia brasiliensis</i> | ConBr | Glicose/Manose | (MOREIRA; CAVADA, 1984) |
| <i>Canavalia maritima</i> | ConM | Glicose/Manose | (PEREZ et al., 1991) |

Fonte: ver coluna de “Referências”

3.2 Cultivo dos espécimes

As amostras dos fungos *Mucor sp.*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum musae* e *C. lindemuthianum* pertencem à micoteca particular do Dr. André Luis Coelho da Silva, sendo gentilmente cedidas pelo mesmo para a realização desta pesquisa.

Os fungos fitopatogênicos *Mucor sp.*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum musae* e *C. lindemuthianum*, foram cultivados em placas de Petri contendo o meio de cultura ágar sabouraud dextrose (HIMEDIA) (Tabela 2, p. 33). Basicamente, distribuiu-se 20 mL do ágar esterilizado em autoclave a temperatura de 121 °C durante 15 minutos, em placas de Petri previamente autoclavadas, secas e individualmente embaladas. Após solidificação total do

meio de cultura nas placas, um bloco esférico de ágar contendo cada espécime de fungo foi inoculado no centro das placas, sendo em seguida colocadas para crescer em estufa mantida a temperatura constante de 27 °C durante um período não superior a 10 dias.

Tabela 2 – Composição* aproximada por litro de Ágar Sabouraud Dexrose

| Nutriente | Peso (g) |
|-----------------------------------|----------|
| Digestão Pancreática da Caseína | 5,0 |
| Digestão Péptica de Tecido Animal | 5,0 |
| Dextrose | 20,0 |
| Ágar | 17,0 |

Fonte: *Datasheet* do fabricante. *Ajustado ou suplementado caso se necessite aumentar a performance.

Todo o processo de manipulação de placas e meios foi realizado em câmara de fluxo laminar previamente esterilizada por luz ultravioleta e acompanhado por controle negativo, que consistia da exposição de uma placa de Petri contendo 20 mL de meio sólido estéril no ambiente da câmara de fluxo laminar durante a realização de todo o processo. Em seguida, tal placa controle era colocada para crescer juntamente com as outras placas.

3.3 Coleta dos Esporos

Os esporos foram coletados a partir de micélios bem desenvolvidos. O procedimento de coleta foi realizado em câmara de fluxo laminar previamente limpa com álcool 70% e irradiada por luz ultravioleta durante um período não inferior a 15 minutos.

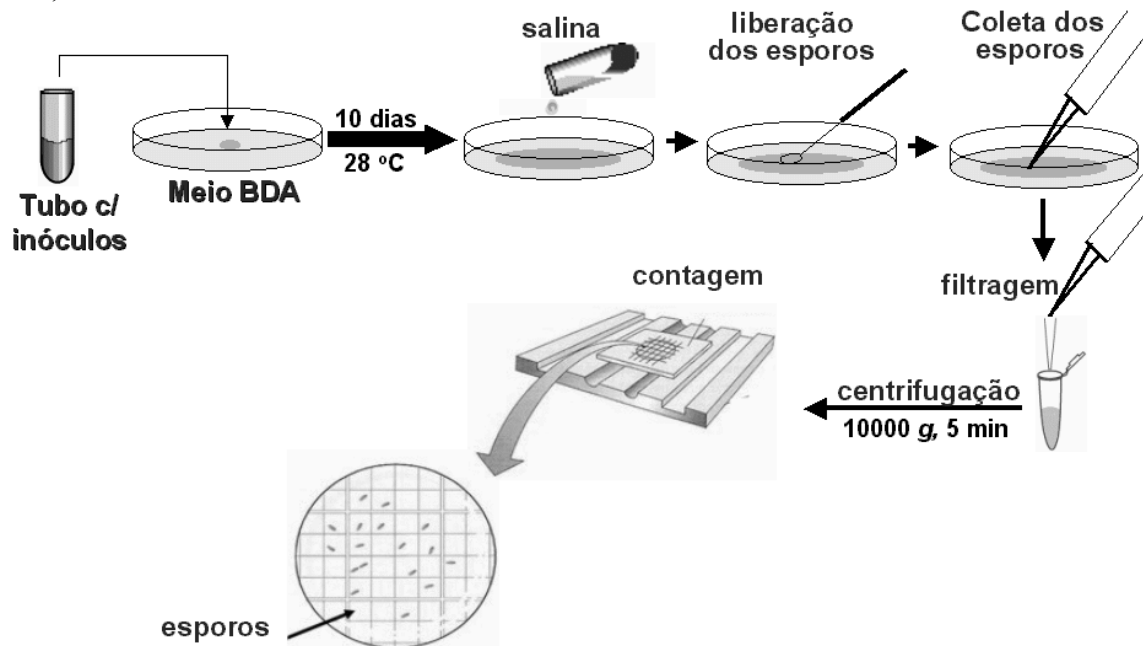
Para a coleta dos esporos do fungo *Mucor sp.* utilizou-se um procedimento padronizado que favorecia um rendimento ideal do número de esporos coletados. Basicamente, com o auxílio de uma alça de platina flambada à chama do bico de Bunsen, realizava-se a raspagem da superfície das colônias, induzindo a liberação dos esporos e coletando os mesmos em tubo estéril de 1,5 mL contendo 1,0 mL de água estéril.

Já para os fungos *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum musae* e *C. lindemuthianum* o procedimento de coleta sofreu algumas modificações no sentido de aumentar o rendimento do número de esporos coletados. Para tais fungos, despejou-se 10 mL de NaCl 0,15 M estéril por toda a extensão das colônias. Em seguida, raspou-se levemente a superfície das colônias com o auxílio de uma alça de platina previamente flambada para que prontamente ocorresse a liberação dos esporos. Realizou-se então a aspiração de pelo menos 8 mL da suspensão dos

esporos, os quais foram posteriormente submetidos à filtração em 3 camadas de gaze estéril, minimizando a presença de hifas no filtrado. Após tal etapa, apenas 1 mL do filtrado foi coletado em tubos de 1,5 mL estéreis e submetidos a centrifugação a $10.000 \times g$ durante 5 minutos em microcentrífuga previamente refrigerada e mantida a temperatura de $4 \text{ }^\circ\text{C}$, com fator de aceleração no máximo e freio no mínimo.

Após todo o processo de centrifugação, o sobrenadante foi descartado e os esporos ressuspensos em 1mL de NaCl 0,15 M e submetidos novamente às mesmas condições de centrifugação anteriormente descritas (Figura 12). Após a realização destas etapas, os esporos foram contados em câmara de Neubauer.

Figura 12 – Esquema ilustrativo das etapas de aquisição dos esporos fúngicos. Existe breve alteração na etapa de liberação de esporos para o fungo *Mucor sp.*, onde o mesmo não necessita de adição de 10 mL de solução de NaCl 0,15 M.



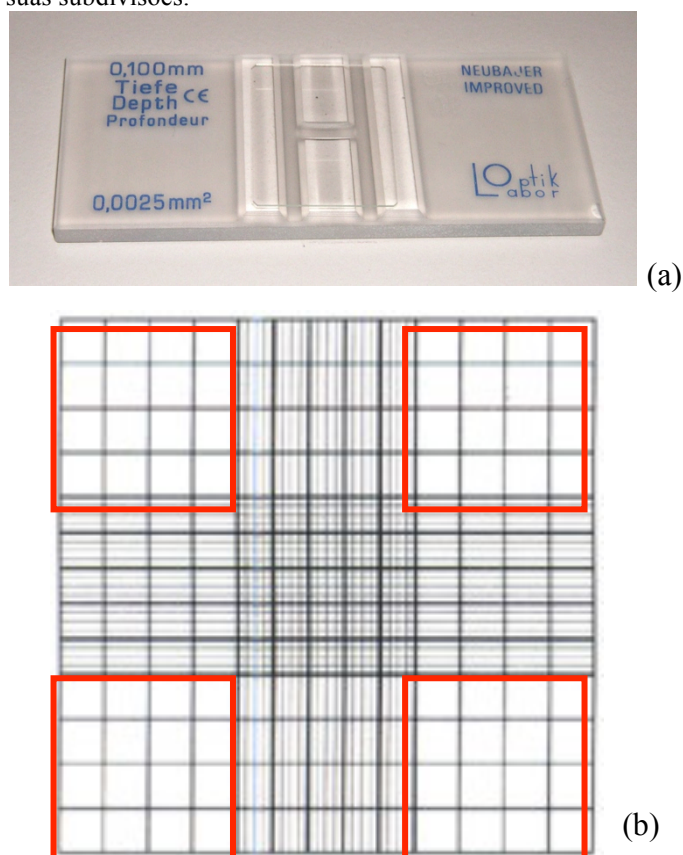
Fonte: Protocolo fornecido pelo Dr. André Luís Coelho da Silva.

3.4 Determinação do número de esporos coletados

A câmara de Neubauer consiste numa lâmina retangular de vidro espesso, contendo dois retículos na porção central, separados longitudinalmente por um sulco profundo sobre a lâmina. Transversalmente, quatro sulcos limitam três plataformas. A central, onde estão os retículos, encontra-se deprimida 0,1 mm em relação às laterais, dando a profundidade da câmara, limitada superiormente por uma lamínula especial adaptada firmemente sobre as plataformas laterais. A lamínula é opticamente plana e sem defeitos.

O retículo na câmara melhorada de Neubauer é um quadrado de 3 mm de lado e 9 mm² de superfície dividido em 9 áreas de 1 mm². Cada milímetro quadrado está dividido em 16 quadros de 1/16 mm², exceto quatro laterais e o da área central, esta dividida em 25 quadros de 1/25 mm², sendo cada um destes divididos em 16 quadrinhos de 1/400 mm², totalizando quatrocentos quadrinhos de 1/400 mm² e 0,1 mm³ na área central. (Figura 13 a e b).

Figura 13 – (a) Ilustração da câmara melhorada de contagem de Neubauer e em (b) detalhe do retículo em suas subdivisões.



Fonte: Próprio autor

Após a correta montagem do aparato, aplicou-se 10 µL da amostra de cada fungo, processada no item anterior, para o retículo da câmara. Em seguida, visualizou-se os esporos através de microscópio óptico modelo Eclipse 3000 (Nikon) em objetivas de 20X ou 40X. A partir daí, os esporos eram contados com o auxílio de um contador hematológico manual, e a contagem determinada pela seguinte fórmula:

$$N^{\circ} \text{ esporos / ml} = n^{\circ} \text{ de esporos (sobre o quadrado maior)} * \text{fator de diluição} * 10^4$$

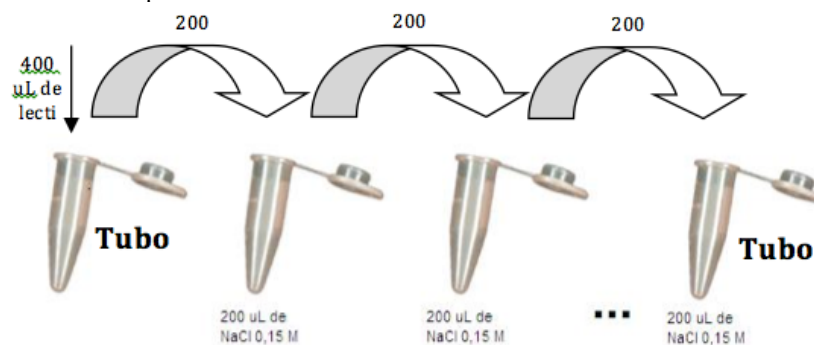
3.5 Determinação do efeito das lectinas sobre os esporos

Após a contagem dos esporos, corrigiu-se a concentração dos mesmos para o valor de 2×10^4 esporos/mL suspendendo-os em solução estéril de NaCl 0,15 M. Em seguida, realizou-se o processo de diluição das lectinas. Para tanto, pesava-se 5 mg de lectina e diluiu-se em 5 mL de NaCl 0,15 M. A solução de lectina era então mantida em estufa a uma temperatura de 37 °C por pelo menos 30 minutos. Em seguida, filtrava-se as proteínas em filtros de seringa de 0,22 μ m. A partir deste passo as proteínas estavam prontas para os ensaios.

Antes da realização dos ensaios, todos os materiais plásticos e reagentes com exceção das lectinas, BSA e fungos foram submetidos à luz ultravioleta da câmara de fluxo laminar por 15 minutos.

A partir daí, iniciou-se o procedimento experimental no qual as lectinas foram colocadas em contato prévio com os esporos fúngicos em tubos estéreis de microcentrifugação com capacidade para 1,5 mL. Basicamente, os tubos de 1,5 mL foram numerados e distribuídos em suportes apropriados com o auxílio de uma pinça estéril. Em seguida distribuiu-se 400 μ L das lectinas (1 mg/mL) nos tubos, de modo que cada lectina fosse testada com cada fungo. Procedia-se então com uma diluição seriada das lectinas, onde se retirava 200 μ L da solução de lectina (1 mg/mL) e diluía-se em 200 μ L de NaCl 0,15 M estéril até a sétima diluição seriada (tubo 8), a qual possuía concentração lectínica final de 7,8125 μ g/mL (Figura 14). Os dados mostrados na seção de Resultados são referentes à concentração que mostrou-se mais efetiva.

Figura 14 – Ilustração do desenho experimental utilizado para a diluição seriada das proteínas estudadas.



Fonte: Próprio autor.

Em seguida, adicionou-se para todos os tubos 200 μL de esporos suspensos em NaCl 0,15 M e em concentração de 2×10^4 esporos/mL. Como dito anteriormente, no sentido de verificar se o efeito não era meramente pela presença de proteína, um padrão comparativo de natureza proteica foi inserido aos ensaios. A proteína escolhida foi a BSA, em concentração inicial de 1 mg/mL. Já o controle negativo era feito com a inoculação de 200 μL de esporos fúngicos na concentração de 2×10^4 esporos/mL em 200 μL de NaCl 0,15 M. O procedimento ilustrado na figura 14 é também válido para a diluição da BSA.

Passados pelo menos 12 horas de contato entre lectina (ou BSA) e fungo, preparou-se a etapa de inoculação dos esporos, onde eram oferecidas condições para que germinassem. Inicialmente, preparou-se meio de cultura Batata-Dextrose-Caldo como se segue: Pesou-se 200 g de batata inglesa (*Solanum tuberosum*) adquirida em supermercado local. Em seguida, partiu-se em pequenos cubos mesmo com casca e colocou-se para cozinhar em 1 L de água. Ao primeiro sinal de fervura, marcou-se 30 minutos. Passado o tempo de fervura, o caldo foi filtrado em papel-filtro (J. Prolab) com especificações técnicas indicadas na tabela 3.

Tabela 3 – Características do papel de filtro utilizado na preparação do BDC

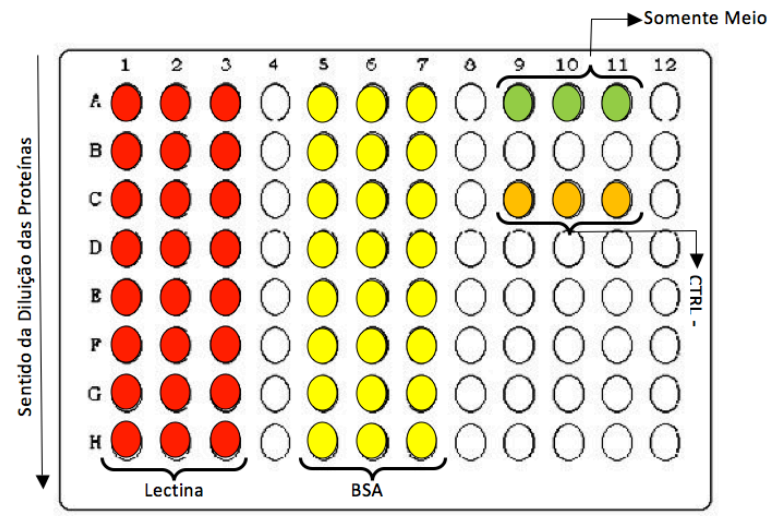
| Propriedade | Unidade | Método | Valores |
|---------------------------------------|------------------|---------------|----------------|
| Gramatura | g/m^2 | - | 80 |
| Espessura | μm | - | 205 |
| Cinza | % | - | 0,5 |
| Maioria dos Poros | μm | - | 14 |
| Permeabilidade ao ar @ 20 mmCa | l/s m^2 | DIN 53.887 | 14 |

Fonte: Datasheet do fabricante

Após a filtração do caldo, adicionou-se dextrose ($\alpha\text{-D-(+)-Glicose}$) na proporção de 3 g para 150 mL. O meio de cultura foi então submetido ao processo de esterilização em autoclave vertical (Phoenix).

A etapa subsequente consistia na inoculação das amostras em meio de cultura. Para isso utilizava-se uma placa estéril de microtitulação contendo 96 poços (Karteeel) com tampa estéril e embalada individualmente. Em seguida, com o auxílio de pipetador multicanal (Eppendorf) preenchia-se a placa com 100 μL de meio de cultura por poço e em seguida inoculava-se os 100 μL dos esporos que estavam em contato prévio com a lectina, como ilustrado na figura 15 (p. 38).

Figura 15 – Esquema ilustrando de disposição das amostras na microplaca.



Fonte: Próprio autor.

Após o processo de inoculação, a microplaca foi mantida em estufa com temperatura constante de 27 °C. O crescimento dos fungos foi então avaliado através de monitoramento espectrofotométrico realizando-se leituras em intervalos de 12 horas durante as primeiras 72 horas. O método utilizado foi o de determinação da densidade óptica com filtro de banda em 620 nm, realizada no leitor de placa Biotrak II Reader (GE Healthcare).

3.6 Análise estatística

O resultado das atividades das lectinas vegetais sobre o crescimento dos fungos foi demonstrado através de gráficos construídos no Pacote Estatístico GraphPad Prism® versão 3.00 para Microsoft Windows®, sendo a diferença entre as médias das replicatas calculadas pelo Pacote Estatístico Statsoft Statistica® versão 6.0 para Microsoft Windows 95/98/ME/XP. A metodologia empregada no teste foi One-way ANOVA seguida pelo teste *post hoc* Bonferroni. Os dados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Efeito das lectinas sobre o crescimento de *Mucor sp.*

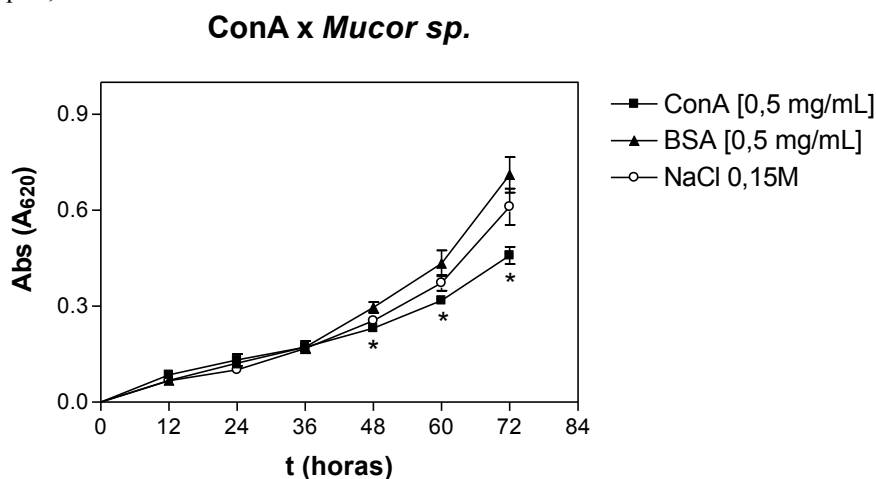
Após a análise dos resultados, observou-se que o zigomiceto *Mucor sp.* teve seu perfil de crescimento diminuído quando seus esporos foram tratados durante 24 horas com ConA na concentração de 0,5 mg/mL (Figura 16). As médias das absorvâncias, nos tempos 48, 60 e 72 horas, de ConA, BSA e NaCl 0,15 M estão descritas na tabela 4.

Tabela 4 – Comparação das médias de absorvância de *Mucor sp.* nos tempos 48, 60 e 72 horas, após o tratamento prévio de seus esporos com ConA 0,5 mg/mL. Comparar com a absorvância dos referidos controles. Os valores médios estão acompanhados pelo desvio-padrão.

| Tempo (h)/Tratamento | ConA | BSA | NaCl |
|----------------------|---------------|---------------|---------------|
| 48 | 0,231 ± 0,009 | 0,296 ± 0,016 | 0,255 ± 0,012 |
| 60 | 0,318 ± 0,013 | 0,434 ± 0,040 | 0,373 ± 0,024 |
| 72 | 0,459 ± 0,026 | 0,711 ± 0,055 | 0,611 ± 0,056 |

Fonte: Dados na pesquisa

Figura 16 – Perfil de crescimento de *Mucor sp.* quando seus esporos foram tratados com ConA a 0,5 mg/mL por 24 horas, antes de serem inoculados em meio BDC. (*): estatisticamente significativo em relação à BSA 0,5 mg/mL, $p < 0,01$.



Fonte: Dados da pesquisa

Por outro lado, as lectinas ConG, CBol, ConBr e ConM estimularam o crescimento de *Mucor sp.* O efeito de ConG sobre seu o crescimento está relacionado com a estimulação do desenvolvimento fúngico (Tabela 5 e Figura 17, p. 40).

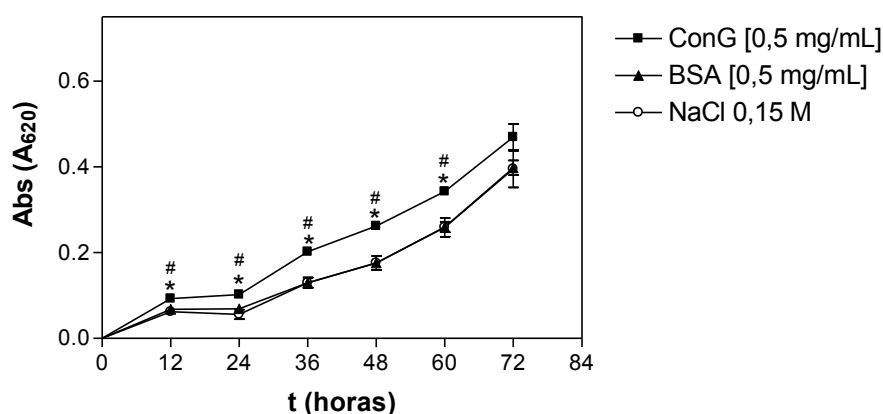
Tabela 5 – Comparação das médias de absorbância de *Mucor sp.* nos tempos 12, 24, 36, 48, 60 e 72 horas, após o tratamento prévio de seus esporos com ConG 0,5 mg/mL. Comparar com a absorbância dos referidos controles. Os valores médios estão acompanhados pelo desvio-padrão.

| Tempo (h)/Tratamento | ConG | BSA | NaCl |
|----------------------|---------------|---------------|---------------|
| 12 | 0,093 ± 0,009 | 0,068 ± 0,001 | 0,062 ± 0,004 |
| 24 | 0,102 ± 0,007 | 0,069 ± 0,002 | 0,056 ± 0,011 |
| 36 | 0,202 ± 0,002 | 0,130 ± 0,011 | 0,130 ± 0,012 |
| 48 | 0,262 ± 0,004 | 0,176 ± 0,005 | 0,176 ± 0,016 |
| 60 | 0,343 ± 0,010 | 0,260 ± 0,012 | 0,259 ± 0,022 |
| 72 | 0,470 ± 0,030 | 0,398 ± 0,017 | 0,395 ± 0,043 |

Fonte: Dados na pesquisa

Figura 17 – Perfil de crescimento de *Mucor sp.* quando seus esporos foram tratados com ConG a 0,5 mg/mL por 24 horas, antes se serem inoculados em meio BDC. (#): estatisticamente significativo em relação ao NaCl 0,15 M e (*) com relação à BSA 0,5 mg/mL. $p < 0,01$.

ConG x *Mucor sp.*



Fonte: Dados da pesquisa

O tratamento com CBol foi indicativo de uma cinética de estimulação. Entretanto, tal estimulação foi vista apenas após 24, 36 e 48 horas. Nestes tempos de avaliação, observa-se que existe claramente uma diferença significativa entre o grupo tratado com a lectina e os demais grupos. Entretanto, a avaliação estatística mostrou que CBol é diferente de BSA e NaCl 0,15 M apenas no tempo de 24 horas. O mesmo não foi visto para os demais tempos, muito possivelmente por conta do desvio-padrão levemente elevado do grupo tratado com BSA. Desta forma, nos tempos 36 e 48 horas, a lectina foi diferente apenas de NaCl 0,15 M (Tabela 6 e Figura 18, p. 41).

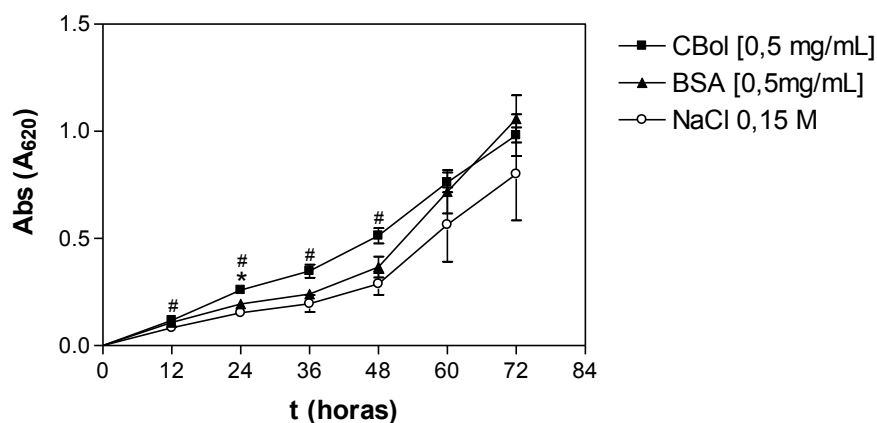
Tabela 6 – Comparação das médias de absorvância de *Mucor sp.* nos tempos 12, 24, 36 e 48 horas, após o tratamento prévio de seus esporos com CBol 0,5 mg/mL. Comparar com a absorvância dos referidos controles. Os valores médios estão acompanhados pelo desvio-padrão.

| Tempo (h)/Tratamento | CBol | BSA | NaCl |
|----------------------|---------------|---------------|---------------|
| 12 | 0,118 ± 0,004 | 0,108 ± 0,009 | 0,083 ± 0,007 |
| 24 | 0,259 ± 0,019 | 0,195 ± 0,008 | 0,153 ± 0,014 |
| 36 | 0,348 ± 0,030 | 0,241 ± 0,014 | 0,196 ± 0,039 |
| 48 | 0,513 ± 0,035 | 0,367 ± 0,048 | 0,288 ± 0,050 |

Fonte: Dados na pesquisa

Figura 18 – Perfil de crescimento de *Mucor sp.* quando seus esporos foram tratados com CBol a 0,5 mg/mL por 24 horas, antes se serem inoculados em meio BDC. (#): estatisticamente significativo em relação ao NaCl 0,15 M e (*) com relação à BSA 0,5 mg/mL. $p < 0,01$.

CBol x *Mucor sp.*



Fonte: Dados da pesquisa

Ao contrário de ConA, que inibiu o crescimento de *Mucor sp.*, ConBr estimulou significativamente o seu crescimento. Tal estímulo começou a ser notado a partir da leitura de 24 horas e foi visto até o tempo de 60 horas. Mesmo após 72 horas, nota-se claramente uma diferença no crescimento do grupo tratado com ConBr em comparação aos outros grupos. Entretanto, neste tempo não houve diferença estatisticamente mensurável muito possivelmente devido ao elevado desvio padrão de ambos os controles (Tabela 7 e Figura 19, p. 42).

Tabela 7 – Comparação das médias de absorvância de *Mucor sp.* nos tempos 24, 36, 48, 60 e 72 horas, após o tratamento prévio de seus esporos com ConBr 0,5 mg/mL. Comparar com a absorvância dos referidos controles. Os valores médios estão acompanhados pelo desvio-padrão.

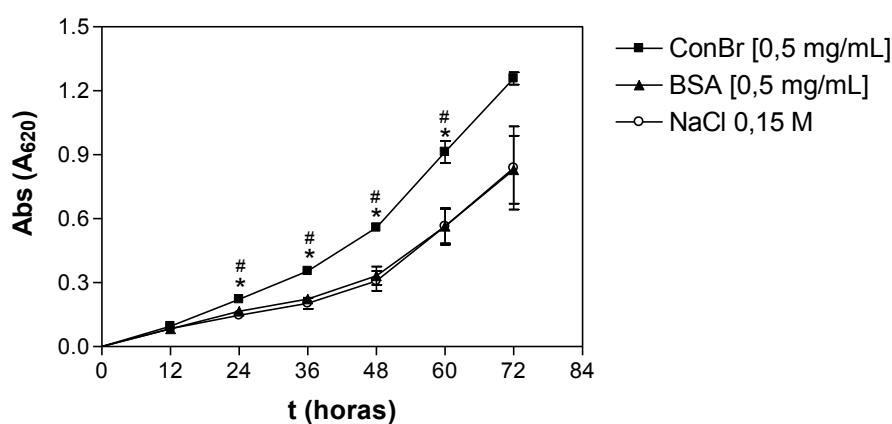
| Tempo (h)/Tratamento | ConBr | BSA | NaCl |
|----------------------|---------------|---------------|---------------|
| 24 | 0,222 ± 0,017 | 0,166 ± 0,005 | 0,147 ± 0,007 |

| | | | |
|----|---------------|---------------|---------------|
| 36 | 0,355 ± 0,016 | 0,223 ± 0,007 | 0,203 ± 0,026 |
| 48 | 0,558 ± 0,012 | 0,332 ± 0,043 | 0,308 ± 0,046 |
| 60 | 0,913 ± 0,051 | 0,564 ± 0,086 | 0,565 ± 0,081 |
| 72 | 1,258 ± 0,029 | 0,830 ± 0,159 | 0,838 ± 0,195 |

Fonte: Dados na pesquisa

Figura 19 – Perfil de crescimento de *Mucor sp.* quando seus esporos foram tratados com ConBr a 0,5 mg/mL por 24 horas, antes se serem inoculados em meio BDC. (#): estatisticamente significativo em relação ao NaCl 0,15 M e (*) com relação à BSA 0,5 mg/mL. $p < 0,01$.

ConBr x *Mucor sp.*



Fonte: Dados da pesquisa

Ao contrário das outras lectinas, o efeito de ConM sobre o crescimento de *Mucor sp.* pareceu ser meramente proteico, haja visto que as poucas diferenças estatísticas encontradas foram, principalmente, com relação ao grupo tratado apenas com NaCl 0,15 M (Tabela 8 e Figura 20, p. 43).

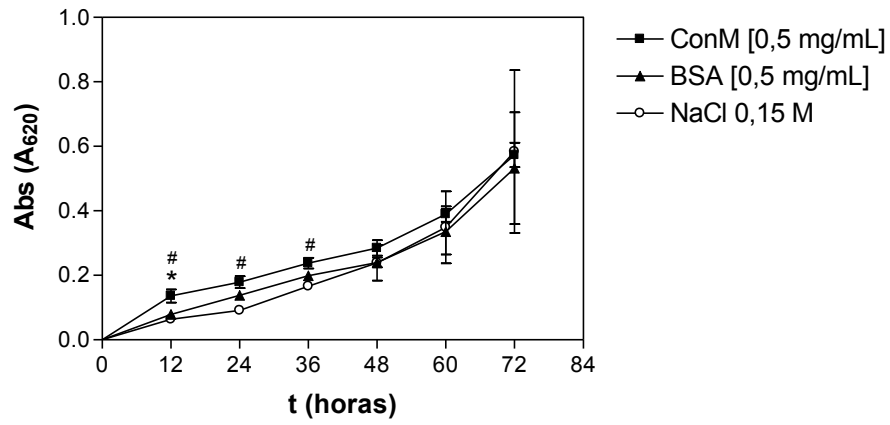
Tabela 8 – Comparação das médias de absorbância de *Mucor sp.* nos tempos 24, 36 e 48 horas, após o tratamento prévio de seus esporos com ConM 0,5 mg/mL. Comparar com a absorbância dos referidos controles. Os valores médios estão acompanhados pelo desvio-padrão.

| Tempo (h)/Tratamento | ConM | BSA | NaCl |
|----------------------|---------------|---------------|---------------|
| 24 | 0,222 ± 0,017 | 0,166 ± 0,005 | 0,147 ± 0,007 |
| 36 | 0,355 ± 0,016 | 0,223 ± 0,007 | 0,203 ± 0,026 |
| 48 | 0,558 ± 0,012 | 0,332 ± 0,043 | 0,308 ± 0,046 |

Fonte: Dados na pesquisa

Figura 20 – Perfil de crescimento de *Mucor sp.* quando seus esporos foram tratados com ConM a 0,5 mg/mL por 24 horas, antes de serem inoculados em meio BDC. (#): estatisticamente significativo em relação ao NaCl 0,15 M e (*) com relação à BSA 0,5 mg/mL. $p < 0,01$.

ConM x *Mucor sp.*



Fonte: Dados da pesquisa

4.2 Efeito das lectinas sobre o crescimento de *Rhizoctonia solani*

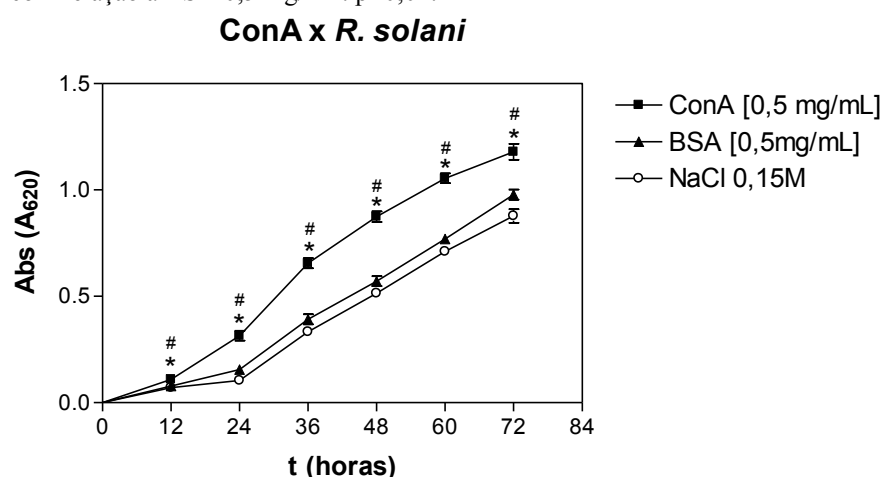
O crescimento do basidiomiceto *Rhizoctonia solani* foi intensamente aumentado quando seus esporos foram tratados durante 24 horas com ConA. A grande diferença exibida na taxa de crescimento entre o grupo tratado pela lectina e aquele por BSA, permite concluir que o efeito não é meramente proteico, e sim lectínico. ConA estimulou o crescimento de *R. solani* a partir de 12 horas e tal efeito manteve-se até a última leitura (Tabela 9 e Figura 21).

Tabela 9 – Comparação das médias de absorbância de *R. solani* nos tempos 12, 24, 36, 48, 60 e 72 horas, após o tratamento prévio de seus esporos com ConA 0,5 mg/mL. Comparar com a absorbância dos referidos controles. Os valores médios estão acompanhados pelo desvio-padrão.

| Tempo (h)/Tratamento | ConA | BSA | NaCl |
|----------------------|---------------|---------------|---------------|
| 12 | 0,110 ± 0,005 | 0,078 ± 0,002 | 0,070 ± 0,006 |
| 24 | 0,315 ± 0,023 | 0,156 ± 0,012 | 0,105 ± 0,006 |
| 36 | 0,656 ± 0,024 | 0,392 ± 0,023 | 0,333 ± 0,003 |
| 48 | 0,874 ± 0,025 | 0,571 ± 0,023 | 0,514 ± 0,016 |
| 60 | 1,055 ± 0,023 | 0,770 ± 0,021 | 0,711 ± 0,020 |
| 72 | 1,179 ± 0,037 | 0,978 ± 0,024 | 0,878 ± 0,032 |

Fonte: Dados na pesquisa

Figura 21 – Perfil de crescimento de *R. solani* quando seus esporos foram tratados com ConA a 0,5 mg/mL por 24 horas, antes se serem inoculados em meio BDC. (#): estatisticamente significativo em relação ao NaCl 0,15 M e (*) com relação à BSA 0,5 mg/mL. $p < 0,01$.



Fonte: Dados da pesquisa

Efeito semelhante ao de ConA foi visto no grupo tratado por ConG. Observa-se que os perfis de crescimento são, de fato, muito semelhantes. Entretanto, diferentemente de

ConA, a lectina ConG foi mostrada ser efetiva até o tempo de 60 horas (Tabela 10 e Figura 22).

Outro fato importante é que a diferença de crescimento entre o grupo teste e os controles parece ser maior quando ConA foi utilizada.

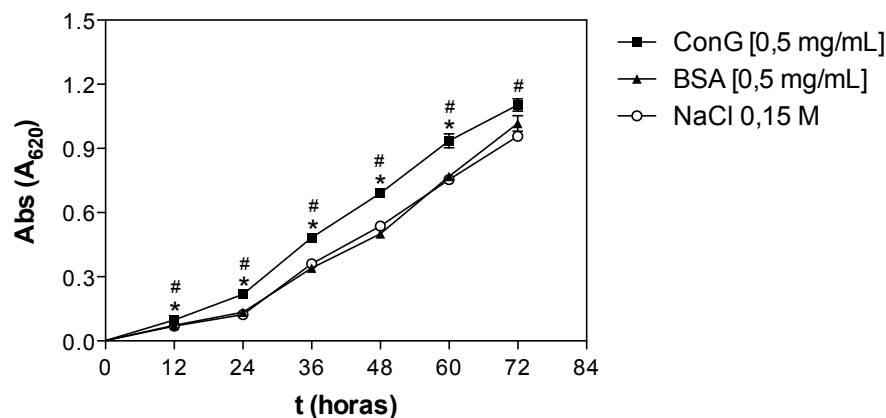
Tabela 10 – Comparação das médias de absorbância de *R. solani* nos tempos 12, 24, 36, 48 e 60 horas, após o tratamento prévio de seus esporos com ConG 0,5 mg/mL. Comparar com a absorbância dos referidos controles. Os valores médios estão acompanhados pelo desvio-padrão.

| Tempo (h)/Tratamento | ConG | BSA | NaCl |
|----------------------|---------------|---------------|---------------|
| 12 | 0,098 ± 0,008 | 0,073 ± 0,003 | 0,069 ± 0,003 |
| 24 | 0,218 ± 0,013 | 0,134 ± 0,012 | 0,123 ± 0,010 |
| 36 | 0,483 ± 0,007 | 0,340 ± 0,020 | 0,360 ± 0,012 |
| 48 | 0,691 ± 0,007 | 0,500 ± 0,012 | 0,537 ± 0,007 |
| 60 | 0,936 ± 0,033 | 0,770 ± 0,019 | 0,755 ± 0,011 |

Fonte: Dados na pesquisa

Figura 22 – Perfil de crescimento de *R. solani* quando seus esporos foram tratados com ConG a 0,5 mg/mL por 24 horas, antes de serem inoculados em meio BDC. (#): estatisticamente significativo em relação ao NaCl 0,15 M e (*) com relação à BSA 0,5 mg/mL. $p < 0,01$.

ConG x *R. solani*



Fonte: Dados da pesquisa

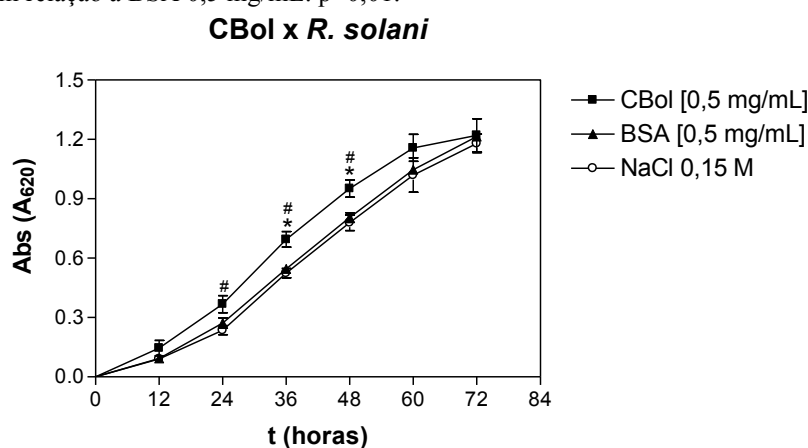
Na curva de crescimento do grupo tratado com CBol observa-se “visualmente” que a lectina estimulou o crescimento de *R. solani* na maioria dos pontos testados. Entretanto, os testes estatísticos mostraram que a diferença entre CBol e controles foi vista apenas após 36 e 48 horas de crescimento (Tabela 11 e Figura 23, p. 46).

Tabela 11 – Comparação das médias de absorvância de *R. solani* nos tempos 24, 36, e 48 horas, após o tratamento prévio de seus esporos com CBol 0,5 mg/mL. Comparar com a absorvância dos referidos controles. Os valores médios estão acompanhados pelo desvio-padrão.

| Tempo (h)/Tratamento | CBol | BSA | NaCl |
|----------------------|---------------|---------------|---------------|
| 24 | 0,368 ± 0,043 | 0,272 ± 0,027 | 0,236 ± 0,023 |
| 36 | 0,695 ± 0,040 | 0,546 ± 0,020 | 0,524 ± 0,024 |
| 48 | 0,952 ± 0,044 | 0,805 ± 0,025 | 0,779 ± 0,040 |

Fonte: Dados na pesquisa

Figura 23 – Perfil de crescimento de *R. solani* quando seus esporos foram tratados com CBol a 0,5 mg/mL por 24 horas, antes se serem inoculados em meio BDC. (#): estatisticamente significativo em relação ao NaCl 0,15 M e (*) com relação à BSA 0,5 mg/mL. $p < 0,01$.



Fonte: Dados da pesquisa

O perfil de crescimento de *R. solani* tratado com ConBr é semelhante aquele visto para ConG. Assim como ConG, ConBr mostrou ser diferente dos controles desde o primeiro tempo avaliado (12 horas) e até o tempo antepenúltimo tempo (48 horas) (Tabela 12 e Figura 24, p. 47).

Vale ressaltar que as diferenças entre ConBr e ConA são mínimas, em termos de estrutura e sequência de aminoácidos. Entretanto, vários trabalhos apresentam potenciais de atividades diferentes entre tais lectinas. Na maioria das vezes, tal diferença pode inclusive residir na intensidade do efeito de cada uma delas.

Tabela 12 – Comparação das médias de absorvância de *R. solani* nos tempos 12, 24, 36, e 48 horas, após o tratamento prévio de seus esporos com ConBr 0,5 mg/mL. Comparar com a absorvância dos referidos controles. Os valores médios estão acompanhados pelo desvio-padrão.

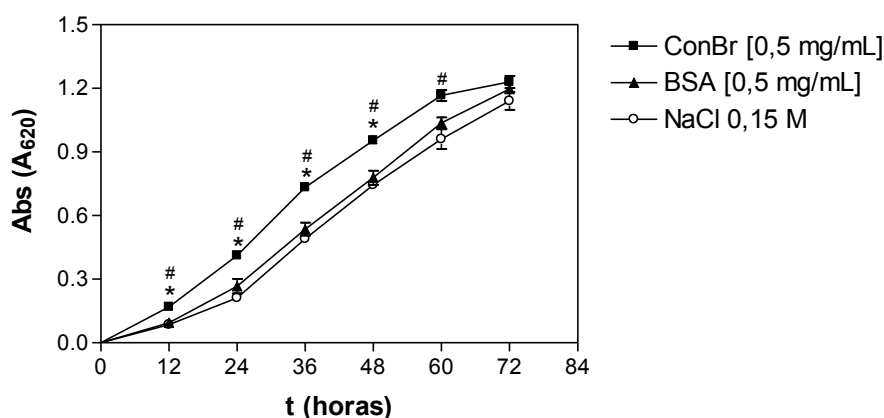
| Tempo (h)/Tratamento | ConBr | BSA | NaCl |
|----------------------|---------------|---------------|---------------|
| 12 | 0,169 ± 0,016 | 0,094 ± 0,014 | 0,086 ± 0,009 |

| | | | |
|----|---------------|---------------|---------------|
| 24 | 0,412 ± 0,013 | 0,267 ± 0,034 | 0,212 ± 0,006 |
| 36 | 0,733 ± 0,007 | 0,536 ± 0,031 | 0,491 ± 0,002 |
| 48 | 0,955 ± 0,004 | 0,779 ± 0,033 | 0,744 ± 0,009 |

Fonte: Dados na pesquisa

Figura 24 – Perfil de crescimento de *R. solani* quando seus esporos foram tratados com ConBr a 0,5 mg/mL por 24 horas, antes de serem inoculados em meio BDC. (#): estatisticamente significante em relação ao NaCl 0,15 M e (*) com relação à BSA 0,5 mg/mL. $p < 0,01$.

ConBr x *R. solani*



Fonte: Dados da pesquisa

Assim como ConBr, ConM estimulou o crescimento de *R. solani* na maioria dos tempos testados (Tabela 13 e Figura 25, p. 48). O único tempo na qual ela não foi diferente de ambos os controles foi 72 horas, possivelmente por conta do desvio-padrão do grupo tratado com BSA.

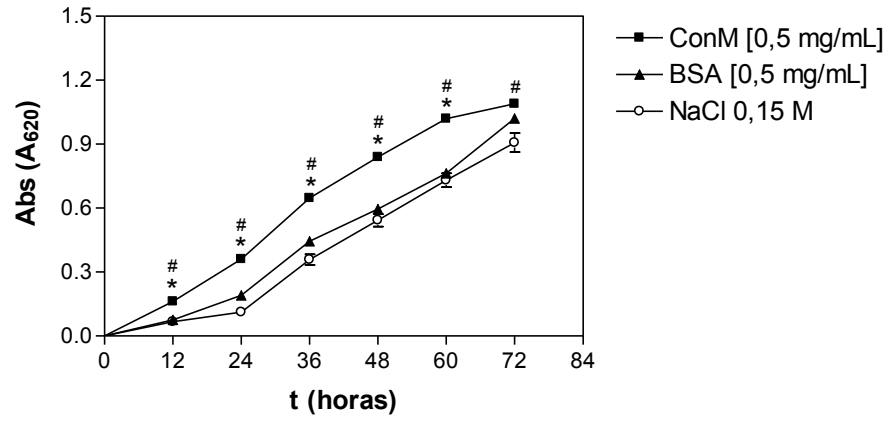
Tabela 13 – Comparação das médias de absorvância de *R. solani* nos tempos 12, 24, 36, 48 e 60 horas, após o tratamento prévio de seus esporos com ConM 0,5 mg/mL. Comparar com a absorvância dos referidos controles. Os valores médios estão acompanhados pelo desvio-padrão.

| Tempo (h)/Tratamento | ConM | BSA | NaCl |
|----------------------|---------------|---------------|---------------|
| 12 | 0,162 ± 0,003 | 0,076 ± 0,001 | 0,067 ± 0,003 |
| 24 | 0,360 ± 0,006 | 0,191 ± 0,010 | 0,112 ± 0,007 |
| 36 | 0,647 ± 0,008 | 0,444 ± 0,021 | 0,358 ± 0,025 |
| 48 | 0,839 ± 0,014 | 0,596 ± 0,019 | 0,543 ± 0,029 |
| 60 | 1,020 ± 0,018 | 0,763 ± 0,007 | 0,731 ± 0,032 |

Fonte: Dados na pesquisa

Figura 25 – Perfil de crescimento de *R. solani* quando seus esporos foram tratados com ConM a 0,5 mg/mL por 24 horas, antes de serem inoculados em meio BDC. (#): estatisticamente significativo em relação ao NaCl 0,15 M e (*) com relação à BSA 0,5 mg/mL. $p < 0,01$.

ConM x *R. solani*



Fonte: Dados da pesquisa

4.3 Efeito das lectinas sobre o crescimento de *Colletotrichum musae*

O tratamento dos esporos do ascomiceto *C. musae* com ConA, induziu um aumento de seu crescimento, principalmente nos tempos de 24, 36 e 48 horas, ocasiões nas quais o grupo tratado com a lectina foi estatisticamente diferente de ambos os controles (BSA e NaCl 0,15 M). A cinética de seu crescimento é demonstrada a seguir (Tabela 14 e Figura 26).

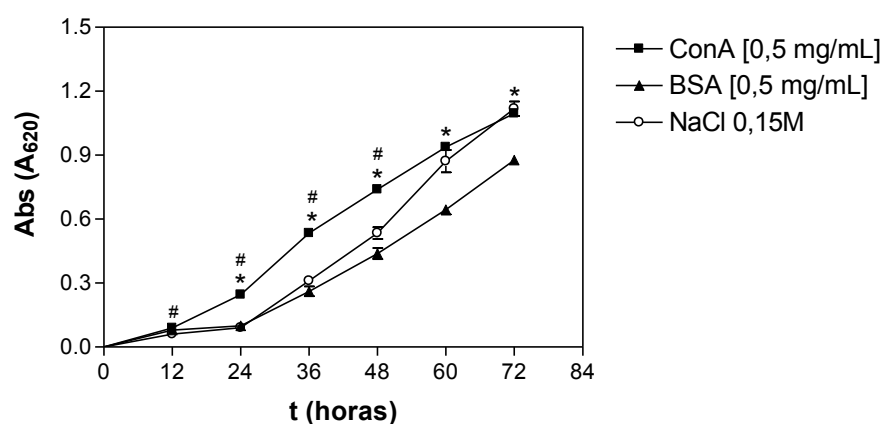
Tabela 14 – Comparação das médias de absorvância de *C. musae* nos tempos 24, 36 e 48 horas, após o tratamento prévio de seus esporos com ConA 0,5 mg/mL. Comparar com a absorvância dos referidos controles. Os valores médios estão acompanhados pelo desvio-padrão.

| Tempo (h)/Tratamento | ConA | BSA | NaCl |
|----------------------|---------------|---------------|---------------|
| 24 | 0,245 ± 0,014 | 0,099 ± 0,005 | 0,091 ± 0,001 |
| 36 | 0,534 ± 0,017 | 0,261 ± 0,023 | 0,310 ± 0,019 |
| 48 | 0,739 ± 0,016 | 0,438 ± 0,026 | 0,534 ± 0,028 |

Fonte: Dados na pesquisa

Figura 26 – Perfil de crescimento de *C. musae* quando seus esporos foram tratados com ConA a 0,5 mg/mL por 24 horas, antes se serem inoculados em meio BDC. (#): estatisticamente significante em relação ao NaCl 0,15 M e (*) com relação à BSA 0,5 mg/mL. $p < 0,01$.

ConA x *C. musae*



Fonte: Dados da pesquisa

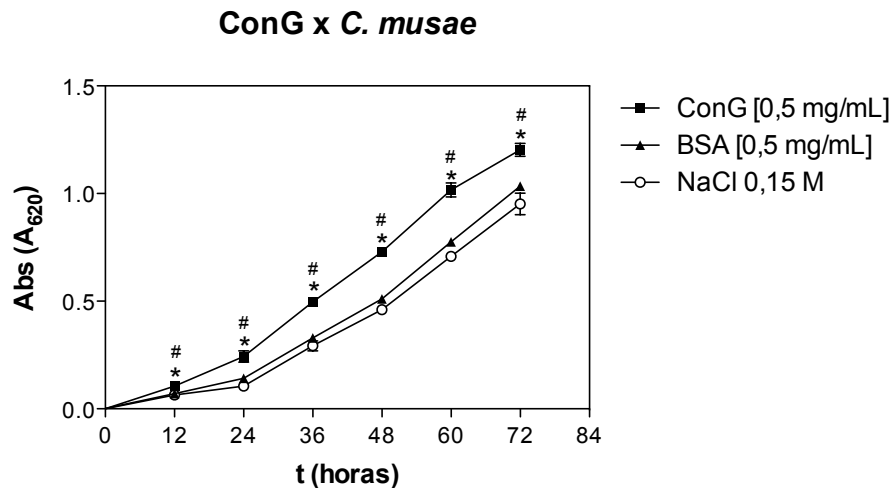
Já ConG exerceu uma forte estimulação sobre *C. musae*. O grupo tratado com a lectina foi estatisticamente diferente de ambos os grupos controles em todos os momentos em que o crescimento foi avaliado (Tabela 15 e Figura 27, p. 50).

Tabela 15 – Comparação das médias de absorvância de *C. musae* nos tempos 12, 24, 36, 48, 60 e 72 horas, após o tratamento prévio de seus esporos com ConG 0,5 mg/mL. Comparar com a absorvância dos referidos controles. Os valores médios estão acompanhados pelo desvio-padrão.

| Tempo (h)/Tratamento | ConG | BSA | NaCl |
|----------------------|---------------|---------------|---------------|
| 12 | 0,106 ± 0,013 | 0,070 ± 0,001 | 0,064 ± 0,004 |
| 24 | 0,243 ± 0,026 | 0,142 ± 0,003 | 0,106 ± 0,016 |
| 36 | 0,497 ± 0,012 | 0,329 ± 0,006 | 0,293 ± 0,023 |
| 48 | 0,729 ± 0,016 | 0,511 ± 0,012 | 0,460 ± 0,015 |
| 60 | 1,017 ± 0,032 | 0,776 ± 0,013 | 0,708 ± 0,022 |
| 72 | 1,203 ± 0,030 | 1,035 ± 0,021 | 0,952 ± 0,050 |

Fonte: Dados na pesquisa

Figura 27 – Perfil de crescimento de *C. musae* quando seus esporos foram tratados com ConG a 0,5 mg/mL por 24 horas, antes se serem inoculados em meio BDC. (#): estatisticamente significativo em relação ao NaCl 0,15 M e (*) com relação à BSA 0,5 mg/mL. $p < 0,01$.



Fonte: Dados da pesquisa

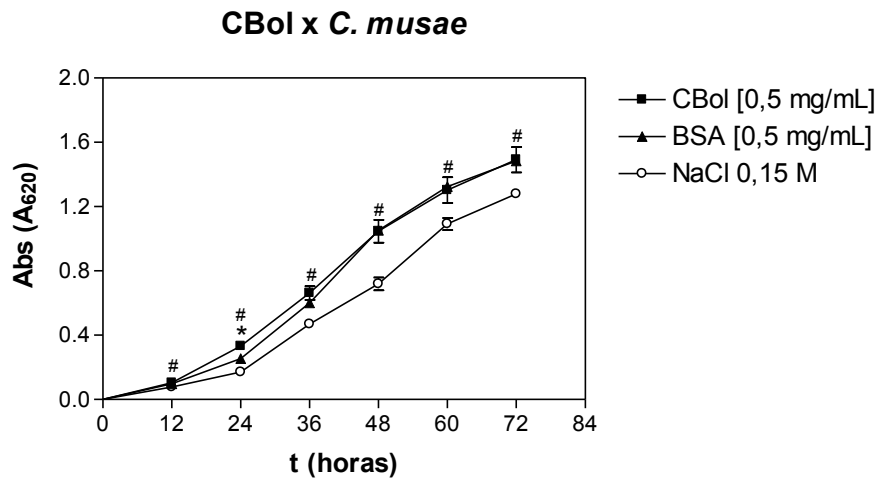
Já o efeito de CBol sobre *C. musae* não foi muito significativo. A lectina somente foi diferente de ambos os controles do tempo de 24 horas (Tabela 16 e Figura 28, p. 51).

Tabela 16 – Comparação das médias de absorvância de *C. musae* no tempo de 24 horas, após o tratamento prévio de seus esporos com CBol 0,5 mg/mL. Comparar com a absorvância dos referidos controles. Os valores médios estão acompanhados pelo desvio-padrão.

| Tempo (h)/Tratamento | CBol | BSA | NaCl |
|----------------------|---------------|---------------|---------------|
| 24 | 0,332 ± 0,011 | 0,254 ± 0,012 | 0,170 ± 0,016 |

Fonte: Dados na pesquisa

Figura 28 – Perfil de crescimento de *C. musae* quando seus esporos foram tratados com CBol a 0,5 mg/mL por 24 horas, antes se serem inoculados em meio BDC. (#): estatisticamente significativo em relação ao NaCl 0,15 M e (*) com relação à BSA 0,5 mg/mL. $p < 0,01$.



Fonte: Dados da pesquisa

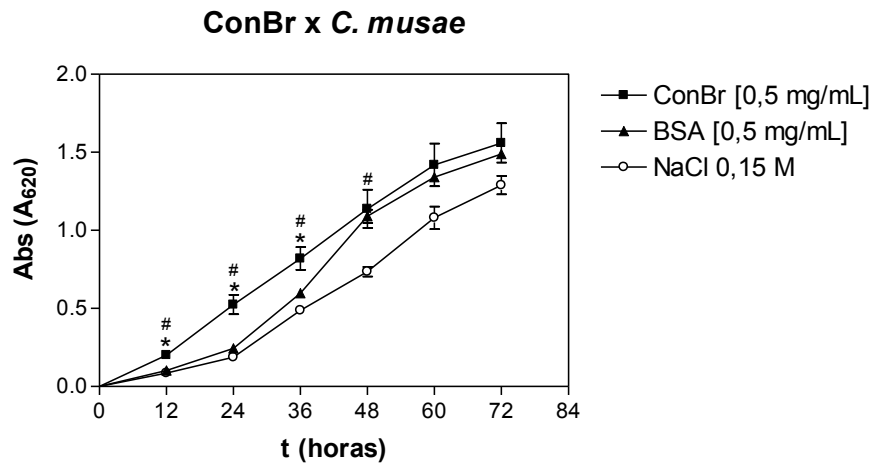
O efeito de ConBr sobre *C. musae* foi significativo em três momentos diferentes. Nestes tempos, o tratamento com a lectina foi estatisticamente diferente de ambos os controles (Tabela 17 e Figura 29, p. 52).

Tabela 17 – Comparação das médias de absorbância de *C. musae* nos tempos de 12, 24 e 36 horas, após o tratamento prévio de seus esporos com ConBr 0,5 mg/mL. Comparar com a absorbância dos referidos controles. Os valores médios estão acompanhados pelo desvio-padrão.

| Tempo (h)/Tratamento | ConBr | BSA | NaCl |
|----------------------|---------------|---------------|---------------|
| 12 | 0,200 ± 0,026 | 0,102 ± 0,008 | 0,085 ± 0,004 |
| 24 | 0,525 ± 0,063 | 0,244 ± 0,013 | 0,188 ± 0,011 |
| 36 | 0,820 ± 0,072 | 0,597 ± 0,011 | 0,487 ± 0,018 |

Fonte: Dados na pesquisa

Figura 29 – Perfil de crescimento de *C. musae* quando seus esporos foram tratados com ConBr a 0,5 mg/mL por 24 horas, antes se serem inoculados em meio BDC. (#): estatisticamente significativo em relação ao NaCl 0,15 M e (*) com relação à BSA 0,5 mg/mL. $p < 0,01$.



Fonte: Dados da pesquisa

Assim como em ConG, o tratamento com ConM foi efetivo na estimulação do crescimento de *C. musae* na maioria dos tempos avaliados (Tabela 18 e Figura 30, p. 53).

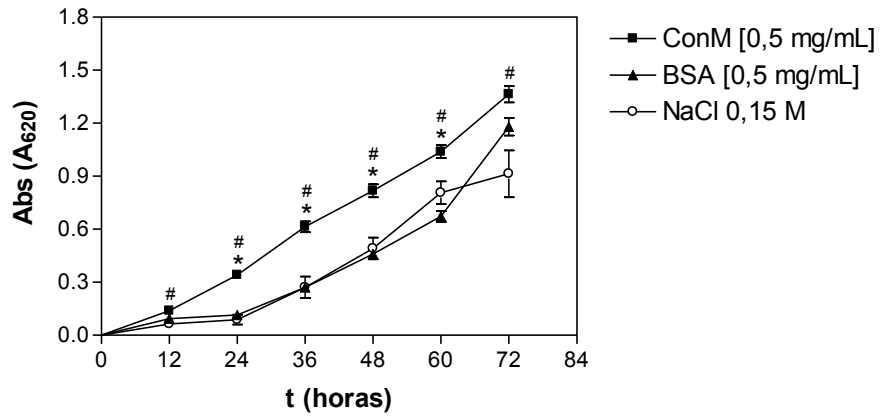
Tabela 18 – Comparação das médias de absorbância de *C. musae* nos tempos 24, 36, 48, e 60 horas, após o tratamento prévio de seus esporos com ConM 0,5 mg/mL. Comparar com a absorbância dos referidos controles. Os valores médios estão acompanhados pelo desvio-padrão.

| Tempo (h)/Tratamento | ConM | BSA | NaCl |
|----------------------|---------------|---------------|---------------|
| 24 | 0,341 ± 0,022 | 0,115 ± 0,020 | 0,088 ± 0,028 |
| 36 | 0,614 ± 0,031 | 0,270 ± 0,007 | 0,271 ± 0,061 |
| 48 | 0,818 ± 0,037 | 0,459 ± 0,013 | 0,491 ± 0,061 |
| 60 | 1,039 ± 0,037 | 0,672 ± 0,031 | 0,806 ± 0,064 |

Fonte: Dados na pesquisa

Figura 30 – Perfil de crescimento de *C. musae* quando seus esporos foram tratados com ConM a 0,5 mg/mL por 24 horas, antes se serem inoculados em meio BDC. (#): estatisticamente significativo em relação ao NaCl 0,15 M e (*) com relação à BSA 0,5 mg/mL. $p < 0,01$.

ConM x *C. musae*



Fonte: Dados da pesquisa

4.3 Efeito das lectinas sobre o crescimento de *Colletotrichum lindemuthianum*

Assim como feito com os outros espécimes fúngicos, os esporos de *C. lindemuthianum* foram submetidos ao contato prévio com as lectinas antes de serem inoculados para crescimento. Os resultados mostraram que ConA não exerceu nenhuma ação significativa sobre o crescimento fúngico. Por sua vez, ConA apenas foi diferente do grupo tratado com NaCl 0,15 M no tempo de 48 horas (Tabela 19 e Figura 31).

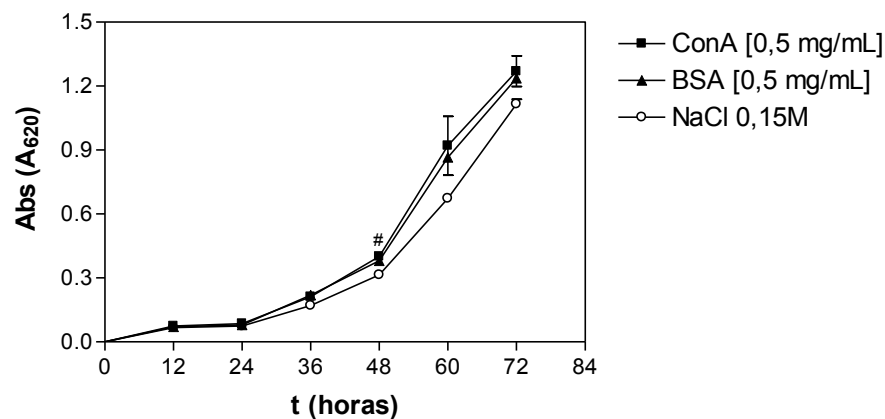
Tabela 19 – Comparação das médias de absorvância de *C. lindemuthianum* no tempo de 24, 36, 48, e 60 horas, após o tratamento prévio de seus esporos com ConA 0,5 mg/mL. Comparar com a absorvância dos referidos controles. Os valores médios estão acompanhados pelo desvio-padrão.

| Tempo (h)/Tratamento | ConA | BSA | NaCl |
|----------------------|---------------|---------------|---------------|
| 48 | 0,401 ± 0,020 | 0,381 ± 0,016 | 0,314 ± 0,021 |

Fonte: Dados na pesquisa

Figura 31 – Perfil de crescimento de *C. musae* quando seus esporos foram tratados com ConA a 0,5 mg/mL por 24 horas, antes se serem inoculados em meio BDC. (#): estatisticamente significativo em relação ao NaCl 0,15 M e (*) com relação à BSA 0,5 mg/mL. $p < 0,01$.

ConA x *C. lindemuthianum*



Fonte: Dados da pesquisa

Com relação aos resultados encontrados com o tratamento por ConG, observou-se que a lectina é diferente de ambos os controles apenas nos tempos de 12 e 36 horas. Nos tempos de 24 e 48 horas a lectina é estatisticamente diferente somente do controle negativo (Tabela 20 e Figura 32, p. 55).

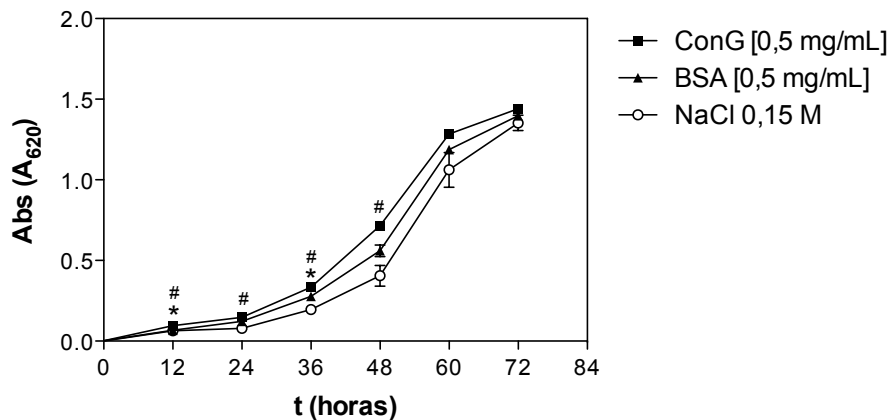
Tabela 20 – Comparação das médias de absorvância de *C. lindemuthianum* no tempo de 12 e 36 horas, após o tratamento prévio de seus esporos com ConG 0,5 mg/mL. Comparar com a absorvância dos referidos controles. Os valores médios estão acompanhados pelo desvio-padrão.

| Tempo (h)/Tratamento | ConG | BSA | NaCl |
|----------------------|---------------|---------------|---------------|
| 12 | 0,096 ± 0,009 | 0,068 ± 0,004 | 0,064 ± 0,003 |
| 36 | 0,334 ± 0,020 | 0,278 ± 0,003 | 0,196 ± 0,012 |

Fonte: Dados na pesquisa

Figura 32 – Perfil de crescimento de *C. musae* quando seus esporos foram tratados com ConG a 0,5 mg/mL por 24 horas, antes de serem inoculados em meio BDC. (#): estatisticamente significativo em relação ao NaCl 0,15 M e (*) com relação à BSA 0,5 mg/mL. $p < 0,01$.

ConG x *C. lindemuthianum*



Fonte: Dados da pesquisa

Já para CBol, os dados mostram que apesar de haver uma tendência na estimulação do crescimento fúngico por parte do grupo tratado com a lectina, somente houve diferença significativa entre os grupos controle e a lectina nos tempos de 36 e 72 horas (Tabela 21 e Figura 33, p. 56).

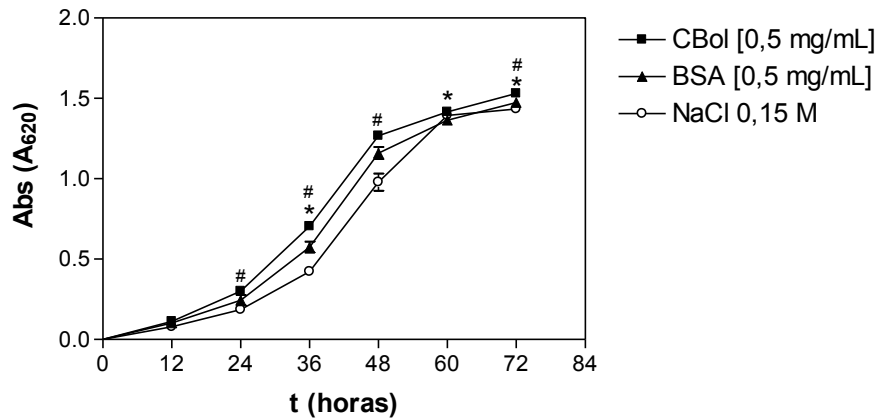
Tabela 21 – Comparação das médias de absorvância de *C. lindemuthianum* no tempo de 36 e 72 horas, após o tratamento prévio de seus esporos com CBol 0,5 mg/mL. Comparar com a absorvância dos referidos controles. Os valores médios estão acompanhados pelo desvio-padrão.

| Tempo (h)/Tratamento | CBol | BSA | NaCl |
|----------------------|---------------|---------------|---------------|
| 36 | 0,704 ± 0,007 | 0,575 ± 0,034 | 0,422 ± 0,018 |
| 72 | 1,531 ± 0,011 | 1,474 ± 0,019 | 1,434 ± 0,010 |

Fonte: Dados na pesquisa

Figura 33 – Perfil de crescimento de *C. musae* quando seus esporos foram tratados com CBol a 0,5 mg/mL por 24 horas, antes de serem inoculados em meio BDC. (#): estatisticamente significativo em relação ao NaCl 0,15 M e (*) com relação à BSA 0,5 mg/mL. $p < 0,01$.

CBol x *C. lindemuthianum*



Fonte: Dados da pesquisa

ConBr foi a lectina que melhor estimulou o crescimento de *C. lindemuthianum*. Seu perfil de estimulação foi visto na maioria dos tempos testados. Nestes, ConBr foi estatisticamente diferente tanto do controle negativo quanto do controle proteico (Tabela 22 e Figura 34, p. 57).

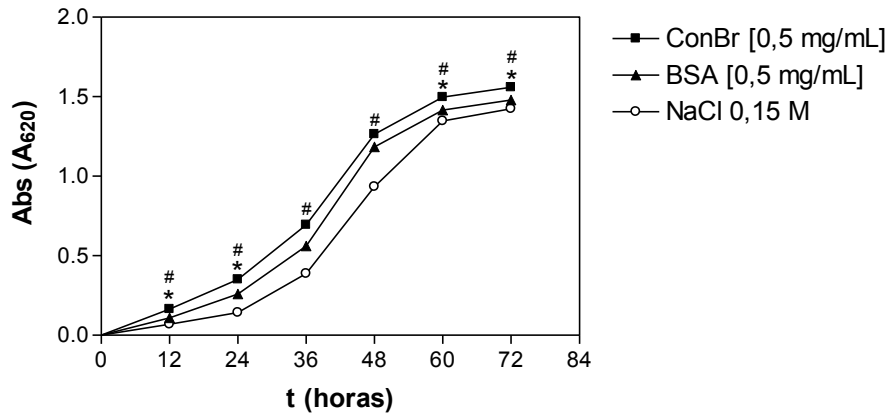
Tabela 22 – Comparação das médias de absorbância de *C. lindemuthianum* no tempo de 12, 24, 60 e 72 horas, após o tratamento prévio de seus esporos com ConBr 0,5 mg/mL. Comparar com a absorbância dos referidos controles. Os valores médios estão acompanhados pelo desvio-padrão.

| Tempo (h)/Tratamento | ConBr | BSA | NaCl |
|----------------------|---------------|---------------|---------------|
| 12 | 0,164 ± 0,008 | 0,109 ± 0,012 | 0,069 ± 0,002 |
| 24 | 0,351 ± 0,005 | 0,259 ± 0,024 | 0,142 ± 0,008 |
| 60 | 1,498 ± 0,002 | 1,416 ± 0,012 | 1,347 ± 0,034 |
| 72 | 1,560 ± 0,002 | 1,479 ± 0,008 | 1,425 ± 0,022 |

Fonte: Dados na pesquisa

Figura 34 – Perfil de crescimento de *C. musae* quando seus esporos foram tratados com ConBr a 0,5 mg/mL por 24 horas, antes se serem inoculados em meio BDC. (#): estatisticamente significativo em relação ao NaCl 0,15 M e (*) com relação à BSA 0,5 mg/mL. $p < 0,01$.

ConBr x *C. lindemuthianum*



Fonte: Dados da pesquisa

Por fim, quando os esporos de *C. lindemuthianum* foram previamente tratados com ConM, nenhum resultado significativo foi refletido no crescimento fúngico. ConM foi diferente do controle negativo nos tempos 12, 48 e 60 horas, e do proteico após 72 horas (Tabela 23 e Figura 35, p. 58).

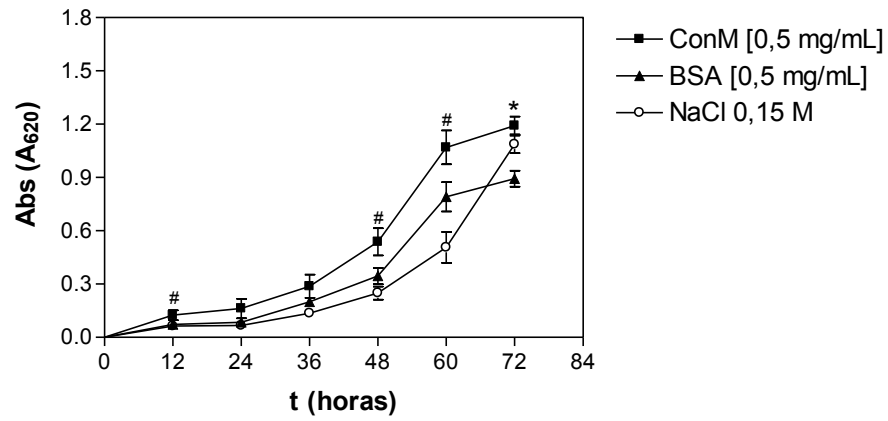
Tabela 23 – Comparação das médias de absorvância de *C. lindemuthianum* no tempo de 12, 48 e 60 horas, após o tratamento prévio de seus esporos com ConM 0,5 mg/mL. Comparar com a absorvância dos referidos controles. Os valores médios estão acompanhados pelo desvio-padrão.

| Tempo (h)/Tratamento | ConM | BSA | NaCl |
|----------------------|---------------|---------------|---------------|
| 12 | 0,125 ± 0,028 | 0,073 ± 0,005 | 0,063 ± 0,004 |
| 48 | 0,538 ± 0,076 | 0,345 ± 0,046 | 0,249 ± 0,037 |
| 60 | 1,069 ± 0,095 | 0,791 ± 0,083 | 0,506 ± 0,087 |

Fonte: Dados na pesquisa

Figura 35 – Perfil de crescimento de *C. musae* quando seus esporos foram tratados com ConM a 0,5 mg/mL por 24 horas, antes se serem inoculados em meio BDC. (#): estatisticamente significativo em relação ao NaCl 0,15 M e (*) com relação à BSA 0,5 mg/mL. $p < 0,01$.

ConM x *C. lindemuthianum*



Fonte: Dados da pesquisa

5 DISCUSSÃO

A unidade propagativa dos fungos, o esporo, tem função semelhante à de uma semente, diferindo dela por não conter um embrião pré-formado. Os esporos germinam, sob condições favoráveis, emitindo o tubo germinativo ou hifa primária, que se ramifica formando o micélio (conjunto de hifas). Hifas especializadas para a nutrição, chamadas hifas vegetativas, penetram no substrato em busca de alimento, enquanto que hifas reprodutivas ou aéreas especializam-se na produção de esporos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2000).

Lectinas representam um grupo estruturalmente heterogêneo de proteínas de origem não-imune que possuem a característica de se unir a carboidratos com alta especificidade (CAVADA *et al.*, 2001). São proteínas bem versáteis e por isso possuem aplicações diretas na pesquisa biológica e biomédica. Em consequência disto, possuem o potencial de serem utilizadas diretamente como ferramentas biotecnológicas (SHARON; LIS, 1989).

Desde muito cedo se sabe que possivelmente devido a sua especificidade, lectinas ligantes à quitina sem atividade enzimática podem desempenhar papel de defesa das plantas contra o ataque de fungos. Como exemplos se pode citar a heveína (4,7 kDa), proteína que possui cisteína em grande quantidade, extraída do látex da *Hevea brasiliensis* (ARCHER, 1960) e que apresenta homologia com outras proteínas ligantes de quitina como a WGA (36 kDa) (WRIGHT; BROOKS; WRIGHT, 1985).

Lectinas isoladas de semente, específicas para glicose/manose possuem ação sobre o crescimento de fungos fitopatogênicos como comprovado por Boleti (2003). Em sua tese de doutorado, a autora demonstrou que a lectina da semente de *Pouteria torta* inibiu o crescimento de esporos dos fungos *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum musae*.

No presente estudo foi demonstrado que a lectina de *Canavalia ensiformis* a qual possui especificidade pelos carboidratos glicose/manose inibiu o crescimento de esporos do fungo *Mucor sp.*, no entanto, a mesma lectina possuiu efeito estimulatório sobre os esporos de dois outros fungos fitopatogênicos, *Rhizoctonia solani* e *Colletotrichum musae*. No trabalho de Boleti em 2003, foi demonstrado que *Colletotrichum musae* teve seus esporos inibidos pela lectina de *Pouteria torta* (BOLETI, 2003). Na presente pesquisa, apenas *C. lindemuthianum* não sofreu nenhuma atividade biológica significativa quando teve seus esporos submetidos ao contato com a lectina ConA.

A lectina de *Canavalia brasiliensis* difere em apenas dois resíduos de aminoácidos da lectina de *Canavalia ensiformis*, sendo que estes resíduos não estão próximos do sítio de ligação a carboidratos em ambas as proteínas (GRANGEIRO *et al.*, 1997; SANZ-APARICIO *et al.*, 1997). Apesar desta diferença estrutural mínima, o efeito da lectina ConBr sobre o fungo *Mucor sp.* foi exatamente o contrário do encontrado nos testes realizados utilizando-se a lectina ConA, visto que a lectina de *Canavalia brasiliensis* estimulou o crescimento dos esporos do zigomiceto *Mucor sp.* Acredita-se que as atividades biológicas distintas apresentadas pelas lectinas de *Canavalia ensiformis* e *Canavalia brasiliensis* se devem ao fato de que são consequências de apenas uma substituição não-conservativa que afeta o sítio de ligação a carboidratos, fazendo com que este fique mais aberto em ConBr do que em ConA (SANZ-APARICIO *et al.*, 1997). Assim sendo, ConBr (e outras lectinas isoladas de *Canavalia*) não devem ser consideradas meramente como lectinas “ConA-like”, uma vez que pequenas modificações podem ser indicativas de alteração na intensidade da atividade biológica ou mesmo inversão de seu efeito.

Em 2005 foram demonstradas atividades biológicas diferentes entre ConA e ConBr com relação à modulação da plasticidade do sistema nervoso central por tais lectinas. No referido trabalho, a atividade exercida pela lectina ConBr foi capaz de induzir a fosforilação de ERK1/2 em sinaptossomas, mas não a fosforilação de JNK1/2, sugerindo que possíveis alvos de lectinas na membrana sinaptossomal podem estar ativando a cascata de ERKs. Já a lectina ConA não foi capaz de induzir a fosforilação de ERK1/2 em sinaptossomas, demonstrando resultados diferentes entre lectinas com similaridade estrutural (PEREIRA, 2005).

Com relação aos fungos é importante salientar que o gênero *Mucor* ganha destaque na biotecnologia sendo responsável pela produção de várias enzimas como: amilase, lipase, pectinase e protease (ALVES *et al.*, 2002). *Mucor hiemalis*, *M. racemosus* (PERRAUD; LABORET, 1995) e *M. miehei* são espécies que apresentam atividade enzimática de importância comercial, com enzimas proteásicas já purificadas e comercializadas (ESCOBAR; BARNETT, 1993) Considerando-se que ConBr exerceu forte estímulo no crescimento de *Mucor sp.*, tal lectina poderá ser utilizada como um adjuvante no crescimento de tais fungos em ambiente industrial, e assim aumentar a produção de enzimas como as outrora citadas.

É importante salientar ainda que os fungos foram escolhidos considerando-se sua abrangência taxonômica, pois os espécimes participantes deste estudo estavam distribuídos dentro das três grandes classes do Reino Fungi, Zygomycetes, Ascomycetes e

Basidiomycetes. Desta forma, observa-se também que mesmo fungos agrupados em categorias taxonômicas distintas podem sofrer atividades biológicas semelhantes desencadeadas por proteínas distintas, mas com afinidade por carboidratos específicos.

Não foi possível determinar o mecanismo de interação da proteína com o fungo, no entanto sabemos que o desenvolvimento de uma camada externa de proteção, nomeada de parede celular, é uma etapa crítica para o crescimento e sobrevivência da célula fúngica nos mais diversos ambientes nos quais os fungos conseguem viver. Células fúngicas desprovidas de suas paredes celulares podem regenerar a estrutura da parede sobre condições de proteção osmótica e nutricionais. Entretanto, quando as células crescem sob condições normais, o desenvolvimento da estrutura da parede celular é baseado na existência de tal parede nas células progenitoras. A parede celular serve como uma ferramenta para a incorporação de novos materiais diretamente nas regiões em crescimento (DURAN; PEREZ, 2004)

O mecanismo regulatório do desenvolvimento da parede celular em fungos parece ainda obscuro. No entanto Sestak *et al.* (2004) lançaram luz sobre este problema, quando demonstraram que duas proteínas da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, nomeadas Scw4p e Scw10p agem como gluconases ou transglicosidases em parceria com outras glicoproteínas da parede celular para assegurarem sua integridade. Finalmente, foi fornecido um exemplo de mecanismo de controle interno da parede celular favorecendo seu desenvolvimento correto. Kipnis *et al.* (2004) demonstraram que Bet1p, uma proteína envolvida na transição de constituintes da parede celular entre retículo endoplasmático e complexo de Golgi, quando defeituosa pode causar defeitos severos na síntese da parede.

Outros pesquisadores descreveram algumas características específicas da Wsc1p de *S. cerevisiae*, uma glicoproteína de membrana que age como um sensor para ativar a via de integridade da célula (cascata da MAP quinase controlada por Pkc1) pela interação com a proteína G Rho1 (VAY; PHILIP; LEVIN, 2004). Além disso, outras pesquisas também esclareceram detalhes no mecanismo de ativação das quinases que são de extrema relevância para a integridade da célula. Estes trabalhos demonstraram que a fosforilação de PDK1 é indispensável para a ativação de outras proteínas quinases que estão envolvidas diretamente na integridade da célula (ROELANTS; TORRANCE; THORNER, 2004).

6. CONCLUSÃO

Após realização da presente pesquisa é possível concluir que:

- ConA inibe o crescimento do fungo *Mucor sp.*, no entanto estimula os fungos *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum musae*. Já sobre *Colletotrichum lindemuthianum*, ConA não exerce efeito biológico estatisticamente mensurável;
- ConBr estimula fortemente o crescimento de *Mucor sp.*, *Rhizoctonia solani* e *Colletotrichum musae*. Sobre os esporos de *Colletotrichum lindemuthianum*, ConBr apresenta estatística apenas quando comparada com NaCl 0,15 M;
- CGL estimula fortemente os fungos *Mucor sp.*, *Rhizoctonia solani* e *Colletotrichum musae* e assim como ConBr em *C. lindemuthianum* apresenta estatística estimulatória quando comparada com NaCl 0,15 M;
- CBol e ConM apresentam poucos dados estatísticos que evidenciem a estimulação em *Mucor sp.*;
- CBol e ConM estimulam o crescimento de *Rhizoctonia solani*. Sobre *C. musae* a lectina de *C. boliviana* possuiu dados estatísticos em sua grande maioria quando comparados com NaCl 0,15 M. Já ConM estimula fortemente o crescimento de *C. musae*;
- CBol e ConM estimulam *C. lindemuthianum* em apenas alguns tempos de crescimento.

REFERÊNCIAS

- ALENCAR, N. M. N. *et al.* Leguminous lectins as tools for studying the role of sugar residues in leukocyte recruitment. **Mediators of Inflammation**, v. 8, n. 2, p. 107-113, 1999.
- ALVES, M. H. *et al.* Screening of *Mucor* spp. for the production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 4, p. 325-330, Oct./Dec. 2002.
- ALVES, M. H.; TRUFEM, S. F. B.; MIANEZ, A. I. Táxons de *Mucor* Fresen. (Zygomycota) em fezes de herbívoros de Recife, PE Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 25, n. 2, p. 147-160, 2002.
- ANDRADE, J. L. *et al.* Lectin-induced nitric oxide production. **Cellular Immunology**, v. 194, n. 1, p. 98-102, May 25 1999.
- ARCHER, B. L. The protein of *Hevea brasiliensis* latex. Isolation and characterization of crystalline hevein. **Biochemistry Journal**, v. 75, p. 236-240, 1960.
- ASSREUY, A. M. *et al.* Anti-inflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from Brazilian beans. **Mediators Inflamm**, v. 6, n. 3, p. 201-10, 1997.
- BARBOSA, T. *et al.* In vivo lymphocyte activation and apoptosis by lectins of the Diocleinae subtribe. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 5, p. 673-8, Jul 2001.
- BARRAL-NETTO, M. *et al.* Human lymphocyte stimulation by legume lectins from the Diocleae tribe. **Immunological Investigations**, v. 21, n. 4, p. 297-303, Jul 1992.
- BENTO, C. A. *et al.* Rat paw edema and leukocyte immigration induced by plant lectins. **Agents Actions**, v. 38, n. 1-2, p. 48-54, Jan 1993.
- BOLETI, A. P. A. **Isolamento, caracterização físico-química e estudo da atividade inseticida e fungicida da lectina de sementes de *Pouteria torta* (mart.) radlk.** 2003. (Doutorado). Doutorado em Biologia Funcional e Estrutural/Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.
- BOYD, W. C.; SHAPLEIGH, E. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). **Science**, v. 119, n. 3091, p. 419-419, 1954.
- CAVADA, B. S. *et al.* Revisiting proteus: Do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the diocleinae subtribe lectins. **Current Protein & Peptide Science**, v. 2, n. 2, p. 123-135, Jun 2001.
- CAVADA, B. S. *et al.* Isolation and partial characterization of a lectin from the *Dioclea rostrata* Benth seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 8, p. 31-36, 1996.
- CAVADA, B. S. *et al.* Primary structures and functions of plant lectins. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 5, p. 193-201, 1993.

CHEN, J. *et al.* A novel sialic acid-specific lectin from *Phaseolus coccineus* seeds with potent antineoplastic and antifungal activities. **Phytomedicine**, v. 16, n. 4, p. 352-60, Apr 2009.

CHRISPEELS, M. J. *et al.* Characterization of the endoplasmic reticulum-associated precursor of concanavalin A. Partial amino acid sequence and lectin activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 22, p. 10021-4, Aug 5 1986.

COLOMBO, A. V. *et al.* *Corynebacterium diphtheriae* surface proteins as adhesins to human erythrocytes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 197, n. 2, p. 235-239, Apr 13 2001.

DATTA, P. K.; FIGUEROA, M. O.; LAJOLO, F. M. Purification and Characterization of Two Major Lectins from *Araucaria brasiliensis* syn. *Araucaria angustifolia* Seeds (Pinhao). **Plant Physiology**, v. 97, n. 3, p. 856-62, Nov 1991.

DELATORRE, P. *et al.* Crystal structure of a lectin from *Canavalia maritima* (ConM) in complex with trehalose and maltose reveals relevant mutation in ConA-like lectins. **J Struct Biol**, v. 154, n. 3, p. 280-6, Jun 2006.

DURAN, A.; PEREZ, P. Cell wall synthesis. In: EGEL, R. (Ed.). **The Molecular Biology of Schizosaccharomyces pombe**. New York, USA: Springer, 2004. p.269-279.

EDELMAN, G. M.; WANG, J. L. Binding and functional properties of concanavalin A and its derivatives. III. Interactions with indoleacetic acid and other hydrophobic ligands. **Journal of Biological Chemistry**, v. 253, n. 9, p. 3016-22, May 10 1978.

ESCOBAR, J.; BARNETT, S. M. Effect of agitation speed on the synthesis of *Mucor miehei* acid protease. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15, n. 12, p. 1009-1013, Dec 1993.

GALLEGO DEL SOL, F. *et al.* The first crystal structure of a Mimosoideae lectin reveals a novel quaternary arrangement of a widespread domain. **Journal of Molecular Biology**, v. 353, n. 3, p. 574-83, Oct 28 2005.

GLICK, G. D. *et al.* Ligand recognition by influenza virus. The binding of bivalent sialosides. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 35, p. 23660-9, Dec 15 1991.

GOLDSTEIN, I. J. *et al.* What should be called a lectin. **Nature**, v. 285, n. 5760, p. 66-66, 1980.

GOMES, J. C. *et al.* Histamine release induced by glucose (mannose)-specific lectins isolated from Brazilian beans. Comparison with concanavalin A. **Agents Actions**, v. 41, n. 3-4, p. 132-5, May 1994.

GOODAY, G. W. Cell walls. In: GOW, N. A. R. e GADD, G. M. (Ed.). **The growing fungus**. London, U.K.: Chapman Hall, 1995. p.43-62.

GRANGEIRO, T. B. *et al.* Molecular cloning and characterization of ConBr, the lectin of *Canavalia brasiliensis* seeds. **European Journal of Biochemistry**, v. 248, n. 1, p. 43-48, Aug 15 1997.

- GRUBHOFFER, L.; MATHA, V. Characteristics of a new l-fucose and N-acetyl-D-galactosamine specific lectin from the integument of *Galleria mellonella* larvae. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 100, n. 1, p. 73-76, 1991.
- HAMELRYCK, T. W. *et al.* Carbohydrate binding, quaternary structure and a novel hydrophobic binding site in two legume lectin oligomers from *Dolichos biflorus*. **Journal of Molecular Biology**, v. 286, n. 4, p. 1161-77, Mar 5 1999.
- HERBERT, C. *et al.* Production of a cell wall-associated endopolygalacturonase by *Colletotrichum lindemuthianum* and pectin degradation during bean infection. **Fungal Genetics and Biology**, v. 41, n. 2, p. 140-147, Feb 2004.
- HORI, K. *et al.* Hypnins, low-molecular-weight peptidic agglutinins isolated from a marine red alga, *Hypnea japonica*. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 873, n. 2, p. 228-236, Sep 1986.
- IMBERTY, A.; VARROT, A. Microbial recognition of human cell surface glycoconjugates. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 18, n. 5, p. 567-576, Oct 2008.
- JAIN, S. K.; JANGDEY, M. S. Lectin conjugated gastroretentive multiparticulate delivery system of clarithromycin for the effective treatment of *Helicobacter pylori*. **Molecular Pharmaceutics**, v. 6, n. 1, p. 295-304, Jan-Feb 2009.
- JEFFRIES, P. *et al.* THE BIOLOGY AND CONTROL OF COLLETOTRICHUM SPECIES ON TROPICAL FRUIT CROPS. **Plant Pathology**, v. 39, n. 3, p. 343-366, Sep 1990.
- KENDRICK, B. Fungal allergens. In: SMITH, E. G. (Ed.). **Sampling and identifying allergenic pollens and moulds**. San Antonio, USA: Blewstone Press, 1990. p.41-49.
- KHANG, N. Q.; JEAN-LUC, G.; HOEBEKE, J. A blood group A specific lectin from the seeds of *Crotalaria striata*. **Biochimica et Biophysica Acta: Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1033, n. 2, p. 210-3, Feb 26 1990.
- KIPNIS, P. *et al.* The ERGolgi v-SNARE Bet1p is required for cross-linking a-agglutinin to the cell wall in yeast. **Microbiology**, v. 150, p. 3219-3228, 2004.
- KNOGGE, W. Fungal infection of plants. **Plant Cell**, v. 8, n. 10, p. 1711-1722, Oct 1996.
- KOCOUREK, J.; HOREJSI, V. A note of the recent discussion on definition of the term "lectin". In: BOG-HANSEN, T. C. e SPENGLER, G. A. (Ed.). **Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**. Berlin: Walter de Gruyter, 1983. p.3-6.
- KOJIMA, K. *et al.* PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF CANAVALIA-GLADIATA AGGLUTININ. **Carbohydrate Research**, v. 213, p. 275-282, Jun 25 1991.
- LANDSTEINER, K.; RAUBITSCHKE, H. Beobachtungen über Hämolyse und Hämagglutination. **Zbl. Bakt. I. Abt. Orig.**, v. 45, p. 600-607, 1907.

LEHTONEN, M. J. *et al.* Formation of canker lesions on stems and black scurf on tubers in experimentally inoculated potato plants by isolates of AG2-1, AG3 and AG5 of *Rhizoctonia solani*: a pilot study and literature review. **Agricultural and Food Science**, v. 18, n. 3-4, p. 223-233, 2009 2009.

LI, P. *et al.* Transgenic indica rice expressing a bitter melon (*Momordica charantia*) class I chitinase gene (McCHIT1) confers enhanced resistance to *Magnaporthe grisea* and *Rhizoctonia solani*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 125, n. 4, p. 533-543, Dec 2009.

LORIS, R. *et al.* Structural basis of oligomannose recognition by the *Pterocarpus angolensis* seed lectin. **Journal of Molecular Biology**, v. 335, n. 5, p. 1227-40, Jan 30 2004.

MERCIER, J.; JIMENEZ, J. I. Demonstration of the biofumigation activity of *Muscodor albus* against *Rhizoctonia solani* in soil and potting mix. **BioControl**, v. 54, n. 6, p. 797-805, Dec 2009.

MILLER, J. L. *et al.* The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages. **PLoS Pathog**, v. 4, n. 2, p. e17, Feb 8 2008.

MOLCHANOVA, V. *et al.* A new lectin from the sea worm *Serpula vermicularis*: isolation, characterization and anti-HIV activity. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v. 145, n. 2, p. 184-93, Mar 2007.

MOORE-LANDECKER, E. **Fundamentals of the Fungi**. 4 ed. London, UK: Prentice-Hall International (UK), 1996.

MOREIRA, R. A.; CAVADA, B. S. Lectin from *Canavalia brasiliensis* (Mart.). Isolation, characterization and behavior during germination. **Biologia Plantarum**, v. 26, n. 2, p. 113-120, 1984.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Medical Microbiology**. 6 ed. Philadelphia, PA, USA: Elsevier, 2008.

NGAI, P. H. K.; NG, T. B. A lectin with antifungal and mitogenic activities from red cluster pepper (*Capsicum frutescens*) seeds. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, n. 2, p. 366-371, Feb 2007.

PENG, H. *et al.* *Clematis montana* lectin, a novel mannose-binding lectin from traditional Chinese medicine with antiviral and apoptosis-inducing activities. **Peptides**, v. 30, n. 10, p. 1805-15, Oct 2009.

PEREIRA, S. F. **Caracterização dos efeitos biológicos das lectinas de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) e de *Canavalia ensiformes* (ConA) em preparações do sistema nervoso central e em células tumorais**. 2005. Dissertação (Mestrado). Mestrado em Neurociências/Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.

PEREZ, G. *et al.* COMPARISON OF THE AMINO-ACID-SEQUENCES OF THE LECTINS FROM SEEDS OF DIOCLEA-LEHMANNI AND CANAVALIA-MARITIMA. **Phytochemistry**, v. 30, n. 8, p. 2619-2621, 1991 1991.

PERRAUD, R.; LABORET, F. Optimization of methyl propionate production catalysed by *Mucor miehei* lipase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 44, n. 3-4, p. 321-326, Dec 1995.

PEUMANS, W. J.; DELEY, M.; BROEKAERT, W. F. An unusual lectin from stinging nettle (*Urtica dioica*) rhizomes. **FEBS Letters**, v. 177, n. 1, p. 99-103, 1984.

PEUMANS, W. J. *et al.* Isolation and partial characterization of a lectin from ground elder (*Aegopodium podagraria*) rhizomes. **Planta**, v. 164, n. 1, p. 75-82, 1985.

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

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

PINTO-DA-SILVA, L. H. *et al.* Leishmania (*Viannia*) *braziliensis* metacyclic promastigotes purified using *Bauhinia purpurea* lectin are complement resistant and highly infective for macrophages in vitro and hamsters in vivo. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 11, p. 1371-7, Oct 2002.

POTAPOV, M. I. The use of Lectin to differentiate blood antigen A from antigen A of secretions in mixed stains. **Sud Med Ekspert.**, v. 11, n. 3, p. 21-26, Jul-Sep 1968.

RADIS-BAPTISTA, G. *et al.* Crotacetin, a novel snake venom C-type lectin homolog of convulxin, exhibits an unpredictable antimicrobial activity. **Cell Biochem Biophys**, v. 44, n. 3, p. 412-23, 2006.

ROBERTS, D. D.; GOLDSTEIN, I. J. Hydrophobic binding properties of the lectin from lima beans (*Phaseolus lunatus*). **Journal of Biological Chemistry**, v. 257, n. 19, p. 11274-7, Oct 10 1982.

_____. Adenine binding sites of the lectin from lima beans (*Phaseolus lunatus*). **Journal of Biological Chemistry**, v. 258, n. 22, p. 13820-4, Nov 25 1983.

_____. Effect of carbohydrate and metal-ion binding on the reactivity of the essential thiol-groups of lima bean lectin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 259, n. 2, p. 903-908, 1984.

RODRIGUEZ, D. *et al.* Differences in macrophage stimulation and leukocyte accumulation in response to intraperitoneal administration of glucose/mannose-binding plant lectins. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 25, n. 8, p. 823-6, 1992.

ROELANTS, F. M.; TORRANCE, P. D.; THORNER, J. Differential Roles of PDK1- and PDK2-phosphorylation sites in the yeast AGC kinases Ypk1, Pkc1 and Sch9. **Microbiology**, v. 150, p. 3289-3304, 2004.

ROGERS, D. J.; BLUNDEN, G.; EVANS, P. R. Ptilota plumosa, a new source of a blood-group B specific lectin. **Med Lab Sci**, v. 34, n. 3, p. 193-200, Jul 1977.

ROGERS, D. J.; FISH, B.; BARWELL, C. J. Isolation and properties of lectins from two red marine algae: Plumaria elegans and Ptilota serrata. In: KOCOUREK, J. e FREED, D. L. J. (Ed.). **Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**. St. Louis, MO, USA: Sigma Chemical Company, v.7, 1990. p.49-52.

RUNCIO, A. *et al.* Volatile compounds of virgin olive oil obtained from Italian cultivars grown in Calabria. Effect of processing methods, cultivar, stone removal, and antracnose attack. **Food Chemistry**, v. 106, n. 2, p. 735-740, Jan 15 2008.

SAFFER, L. D.; PETRI, W. A., JR. Role of the galactose lectin of Entamoeba histolytica in adherence-dependent killing of mammalian cells. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 12, p. 4681-3, Dec 1991.

SAMPAIO, A. H. **Lectins from Ulva and Ptilota Species**. 1997. (PhD.). School of Biological Sciences, University of Portsmouth, Portsmouth/England.

SANTI-GADELHA, T. *et al.* Purification and biological effects of Araucaria angustifolia (Araucariaceae) seed lectin. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 350, n. 4, p. 1050-5, Dec 1 2006.

SANZ-APARICIO, J. *et al.* The crystal structure of Canavalia brasiliensis lectin suggests a correlation between its quaternary conformation and its distinct biological properties from Concanavalin A. **FEBS Letters**, v. 405, n. 1, p. 114-8, Mar 17 1997.

SAYYAH, M.; HADIDI, N.; KAMALINEJAD, M. Analgesic and anti-inflammatory activity of Lactuca sativa seed extract in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 92, n. 2-3, p. 325-9, Jun 2004.

SESTAK, S. *et al.* Scw10p, a cell-wall glucanase/transglucosidase important for cell-wall stability in Saccharomyces cerevisiae. **Microbiology-Sgm**, v. 150, p. 3197-3208, Oct 2004.

SHARMA, V.; SUROLIA, A. Analyses of carbohydrate recognition by legume lectins: size of the combining site loops and their primary specificity. **Journal of Molecular Biology**, v. 267, n. 2, p. 433-45, Mar 28 1997.

SHARON, M. *et al.* Classification of Rhizoctonia spp. using rDNA-ITS sequence analysis supports the genetic basis of the classical anastomosis grouping. **Mycoscience**, v. 49, n. 2, p. 93-114, Apr 2008.

SHARON, N.; LIS, H. Lectins as cell recognition molecules. **Science**, v. 246, n. 4927, p. 227-234, Oct 1989.

_____. Legume lectins--a large family of homologous proteins. **FASEB Journal**, v. 4, n. 14, p. 3198-208, Nov 1990.

_____. Lectins--proteins with a sweet tooth: functions in cell recognition. **Essays Biochem**, v. 30, p. 59-75, 1995.

_____. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v. 14, n. 11, p. 53R-62R, Nov 2004.

SHIBUYA, N. *et al.* The elderberry (*Sambucus nigra* L) bark lectin recognizes the Neu5Ac(alpha-2-6)Gal/GalNAc sequence. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 4, p. 1596-1601, Feb 1987.

SHU, S. H. *et al.* Purification and characterization of a novel ribosome-inactivating protein from seeds of *Trichosanthes kirilowii* Maxim. **Protein Expr Purif**, v. 67, n. 2, p. 120-5, Oct 2009.

SMITH, S. N. *et al.* Determination of *Coniothyrium minitans* conidial and germling lectin avidity by flow cytometry and digital microscopy. **Mycological Research**, v. 103, p. 1533-1539, Dec 1999.

SMITH, S. N. *et al.* Characterization of FITC-conjugated lectin binding to *Candida albicans*. **Mycologia**, v. 93, n. 3, p. 422-431, May-Jun 2001.

SOJAR, H. T.; SHARMA, A.; GENCO, R. J. *Porphyromonas gingivalis* fimbriae binds to neoglycoproteins: evidence for a lectin-like interaction. **Biochimie**, v. 86, n. 4-5, p. 245-9, Apr-May 2004.

SUMNER, J. B.; HOWELL, S. F. Identification of Hemagglutinin of Jack Bean with Concanavalin A. **Journal of Bacteriology**, v. 32, n. 2, p. 227-37, Aug 1936.

SUZUKI, Y. *et al.* Molecular diversity of skin mucus lectins in fish. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, v. 136, n. 4, p. 723-30, Dec 2003.

TEIXEIRA, E. H. *et al.* Renal effects of the lectin from *Canavalia brasiliensis* seeds. **Protein and Peptide Letters**, v. 8, n. 6, p. 477-484, Dec 2001.

THANGAVELU, R.; SUNDARARAJU, P.; SATHIAMOORTHY, S. Management of anthracnose disease of banana caused by *Colletotrichum musae* using plant extracts. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, v. 79, n. 4, p. 664-668, Jul 2004.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6a ed. Porto Alegre, Brasil: Artes Gráficas, 2000. 827 p.

TULLIS, R. H. *et al.* Reduction of Hepatitis C Virus Using Lectin Affinity Plasmapheresis in Dialysis Patients. **Blood Purification**, v. 27, n. 1, p. 64-69, 2009.

UMETSU, K.; YAMASHITA, K.; SUZUKI, T. Purification and carbohydrate-binding specificities of a blood type B binding lectin from hemolymph of a crab (*Charybdis japonica*). **J Biochem**, v. 109, n. 5, p. 718-21, May 1991.

VAN DAMME, E. J. *et al.* Molecular cloning of two different mannose-binding lectins from tulip bulbs. **European Journal of Biochemistry**, v. 236, n. 2, p. 419-27, Mar 1996.

VANPARIJS, J. *et al.* Hevein - an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. **Planta**, v. 183, n. 2, p. 258-264, 1991.

VARKI, A. Biological roles of oligosaccharides - all of the theories are correct. **Glycobiology**, v. 3, n. 2, p. 97-130, Apr 1993.

VAY, H. A.; PHILIP, B.; LEVIN, D. E. Mutational analysis of the cytoplasmic domain of the Wsc1 cell wall stress sensor. **Microbiology**, v. 150, p. 3281-3288, 2004.

VETCHINKINA, E. P.; POZDNYAKOVA, N. N.; NIKITINA, V. E. Laccase and lectin activities of intracellular proteins produced in a submerged culture of the xylotrophic basidiomycete *Lentinus edodes*. **Current Microbiology**, v. 57, n. 4, p. 381-5, Oct 2008.

WOOLCOCK, A. J.; PEAT, J. K.; TREVILLION, L. M. Is the increase in asthma prevalence linked to increase in allergen load? **Allergy**, v. 50, n. 12, p. 935-940, Dec 1995.

WRIGHT, H. T.; BROOKS, D. M.; WRIGHT, C. S. Evolution on the multidomain protein wheat germ agglutinin. **Journal of Molecular Evolution**, v. 21, p. 133-138, 1985.

YAMADA, Y.; AKETA, K. Purification and partial characterization of hemagglutinins in seminal plasma of the sea-urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 709, n. 2, p. 220-226, 1982.

YOSHIDA, S. *et al.* Hemolytic C-type lectin CEL-III from sea cucumber expressed in transgenic mosquitoes impairs malaria parasite development. **PLoS Pathog**, v. 3, n. 12, p. e192, Dec 2007.

YU, X. Q.; KANOST, M. R. Immulectin-2, a lipopolysaccharide specific lectin from an insect, *Manduca sexta*, is induced in response to gram-negative bacteria. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 48, p. 37373-37381, Dec 1 2000.

ZHAO, J. K.; WANG, H. X.; NG, T. B. Purification and characterization of a novel lectin from the toxic wild mushroom *Inocybe umbrinella*. **Toxicon**, v. 53, n. 3, p. 360-6, Mar 1 2009.