



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

**Caracterização Bioquímica Parcial do Látex de
Calotropis procera (Ait.) R. Br. e Efeito Sobre a Eclosão
de ovos e Desenvolvimento do mosquito transmissor da
Dengue.**

GLAÍS DE PAIVA BANDEIRA

FORTALEZA

2006

**Caracterização Bioquímica Parcial do Látex de
Calotropis procera (Ait.) R. Br. e Efeito Sobre a Eclosão
de ovos e Desenvolvimento do mosquito transmissor da
Dengue.**

GLAÍS DE PAIVA BANDEIRA

**Dissertação Submetida à Coordenação do Programa de Pós-
Graduação em Bioquímica, como Requisito para a Obtenção do Grau
de Mestre em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará.**

Orientador: Prof. Dr. Márcio Viana Ramos

FORTALEZA

2006

Esta dissertação foi apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição na Biblioteca de Ciências e Tecnologia desta Universidade.

A transcrição ou utilização de qualquer trecho deste trabalho é permitida, desde que seja feito de acordo com as normas da ética científica.

Glaís de Paiva Bandeira

Dissertação aprovada em: 18/08/2006.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Márcio Viana Ramos
Depto de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará
Orientador

Prof. Dra. Ana de Fátima F. U. Carvalho
Depto. de Biologia
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dra. Liezelotte Rezende Bomfim
Depto. de Ciências Fisiológicas
Universidade Estadual do Ceará

Muitas vezes as pessoas são
egocêntricas, ilógicas e insensatas.
Perdoe-as assim mesmo.

Se você é gentil, as pessoas podem
acusá-la de egoísta, interesseira.
Seja gentil assim mesmo.

Se você é uma vencedora, terá
alguns falsos amigos e alguns
inimigos verdadeiros.
Vença assim mesmo.

Se você é honesta e franca,
as pessoas podem enganá-la
Seja honesta e franca assim mesmo.

O que você levou anos para
construir, alguém pode destruir
de uma hora para outra.
Construa assim mesmo.

Se você tem paz e é feliz,
as pessoas podem sentir inveja.
Seja feliz assim mesmo.

O bem que você faz hoje pode
ser esquecido amanhã.
Faça o bem assim mesmo.

Dê ao mundo o melhor
de você, mais isso pode nunca
ser o bastante.
Dê o melhor de você assim mesmo.

Veja você que, no final das contas,
é entre você e Deus.
Nunca foi entre você e as
outras pessoas.

Madre Irmã Teresa de Calcutá

Dedico este trabalho
A minha mãe, **Iracé**;
A minha irmã, **Silvia**;
A minha amiga, **Dirsa**;
Com amor.

FONTES FINANCIADORAS

Este trabalho foi realizado com o suporte das seguintes instituições:

Universidade Federal do Ceará, através do laboratório de Bioquímica e Biologia de Proteínas Vegetais do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e do Laboratório de Fisiologia Animal do Departamento de Biologia;

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Ceará (FUNCAP) através do apoio aos seguintes Projetos de pesquisa: *Caracterização bioquímica e estudo das atividades biológicas do látex produzido pela planta Calotropis procera* (Edital 003/02) e *Alternativas para o controle da proliferação do mosquito transmissor da Dengue* (Edital 003/02);

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), através do apoio financeiro ao projeto *Desenvolvimento e avaliação de novas formulações para o controle do mosquito Aedes aegypti* (Processo N. 501617/2003-5);

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. **Marcio Viana Ramos**, meu orientador, por ter me recebido em seu laboratório, como estudante de Iniciação Científica e posteriormente como aluna de Pós-Graduação, mas primordialmente pela tolerância quanto as minhas limitações pessoais e por ter sempre acreditado em meu potencial;

À Professora Dra. **Ana da Fátima Fontenelle Urano de Carvalho** por ter fornecido o amparo burocrático para obtenção dos mosquitos utilizados nos ensaios biológicos e por ter gentilmente se disposto a participar da Banca Examinadora desse trabalho;

À Professora Dra. **Lieselotte Rezende Bomfim** por ter me concedido a honra de aceitar participar da Banca Examinadora visto que no início de minha caminhada científica, sua presença foi essencial; tanto no que diz respeito à transmissão de seus conhecimentos nas técnicas de laboratório, como no conforto de sua constante tranquilidade;

Ao Professor **Henri Debray** da Université de Sciences et Technologies de Lille (França) por tornar possível as análises de interação em tempo real no Equipamento

BiaCore 3000 e haver cedido as glicoproteínas imobilizadas e a lectina galactose específica de sementes de *Artocarpus integrifolia*;

Ao Professor Dr. **José Tadeu Abreu de Oliveira** do Laboratório de Proteínas de Defesa do Depto. De Bioquímica e Biologia Molecular pelo proveitoso embasamento teórico materiais para as determinações de atividades enzimáticas na amostra de Proteínas do Látex (LP), durante as aulas ministradas sobre Mecanismo de Defesa de Plantas e por ceder todas as condições físicas em seu laboratório, incluindo reagentes, assim como também aos estudantes de Pós-graduação **Simone** e **Sílvio César** que gentilmente ajudaram no desenvolvimento dos ensaios na bancada;

Ao professor Dr. **Francisco Campos** pelos esclarecimentos teóricos em Biologia Molecular ministrados durante as aulas e pela descontração atenciosa com que sempre me tratou;

À Professora Dra **Cristina Paiva da Silveira Carvalho**, pela sugestão assertiva no início da ordenação desse trabalho;

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, na pessoa do professor Dr. **Joaquim Albenísio Gomes da Silveira**;

Ao estudante de Pós-Graduação e Técnico Laboratorial **Cléverson Diniz Teixeira de Freitas** pelas incontáveis vezes em que se dispôs a ajudar no

desenvolvimento dos ensaios com larvas e ovos de *Aedes aegypti* e na análise dos resultados.

Ao estudante de Iniciação Científica **Jefferson Soares de Oliveira** (e muito em breve de Pós-Graduação) pela gentileza de auxiliar grandemente no desenvolvimento dos ensaios de eletroforese, captura de imagens, interpretação e principalmente pela ajuda na formatação das imagens usadas nos resultados. Mas primordialmente pela amizade demonstrada através da boa vontade com que se entregou em me ajudar a realizar a formatação desse trabalho e em todas as outras atividades necessárias para concluir esse trabalho em tempo hábil;

À estudante de doutorado e amiga, **Valéria Aguiar**, por todos os esclarecimentos nas minhas dúvidas na língua inglesa e por ter aceitado entrar para o meu restrito ciclo de amizades;

Ao estudante de doutorado do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica e amigo **Marcelo Silva** pelos proveitosos esclarecimentos teóricos em química que foram essenciais no momento em que redigi determinados tópicos da revisão da literatura nesse trabalho;

À Técnica Laboratorial **Helena**, do Departamento de Zootecnia, pela colaboração no intuito de tornar viável a dosagem de nitrogênio total e proteínas brutas na amostra de Proteínas do Látex (LP);

Às minhas primas **Darwina e Valderez**, funcionárias do Departamento Técnico da UFRJ por terem adquirido parte essencial material teórico para revisão da literatura desse trabalho;

Aos amigos, **Darcy Mayra, Hélio, Ruan, Fábio Rossi, Luis Aguiar, Eduardo Vogel**, pela agradável convivência durante o tempo em que permaneci nesse Departamento e os quais sempre lembrarei com muito carinho;

À estudante de Iniciação Científica **Manuela** e à professora **Raquel** pela colaboração na execução dos ensaios com as enzimas antioxidantes;

Aos colegas de laboratório, **Natalie, Delano, Diego e Raquel** pela convivência agradável durante o período em que frequentei esse laboratório. E por todos os colegas e funcionários desse Departamento que de alguma forma colaboraram comigo;

Ao meu padrinho **Francisco Correia** que viabilizou o tempo necessário para execução desse trabalho;

À querida amiga e anjo da guarda **Dirsa** que sempre me motiva a evoluir como ser humano;

Às amigas **Camila, Carol, Giu, Jeanette, Loui, Sabrina e Rossana**, pelo companheirismo e pelo apoio constante em todas as horas atribuladas da minha vida;

A minha família na figura dos meus pais, **Gilberto e Iracé**, minha irmã, **Silvia** e meu cunhado **Jorge**, que nunca mediram esforços para minha formação educacional e reconheço que sem esse alicerce não haveria chegado até aqui.

A **Virgem Maria** que sempre intercedeu por mim junto a **Deus** e que me cobriu com seu manto azul de amparo, permitindo que me erguesse sempre que necessário.

MEU MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

Iten	Título	Páginas
	LISTA DE FIGURAS	Xv
	LISTA DE TABELAS	Xvii
	ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES	Xviii
	RESUMO	Xx
	ABSTRACT	Xxi
I	INTRODUÇÃO	1
1.1	Plantas Laticíferas	1
1.2	Características Gerais do Látex	3
1.3	Composição Química do Látex	4
1.4	Proteínas Presentes em Fluídos Laticíferos	5
1.5	Caracterização Botânica da Planta <i>Calotropis procera</i> (Ait) R.Br.	7
1.6	Substâncias Identificadas no Látex de <i>Calotropis procera</i>	10
1.7	Atividades Biológicas Descritas na Planta <i>Calotropis Procera</i>	11
1.8	Dengue: Descrição e Ocorrência	13
1.9	Aspectos Biológicos do Mosquito <i>Stegomyia aegypti</i>	15
II	OBJETIVO	19
III	MATERIAIS E MÉTODOS	20

3.1	Material Botânico	20
3.2	Larvas e Ovos de <i>Stegomyia aegypti</i>	20
3.3	Reagentes Químicos	21
3.4	Coleta do Látex de <i>Calotropis procera</i>	21
3.5	Determinações Físico-Químicas	23
3.6	Determinações Bioquímicas	24
3.6.1	Nitrogênio Total	24
3.6.2	Proteínas Totais Solúveis	25
3.6.3	Determinação de Carboidratos Solúveis	25
3.6.4	Ensaio Cromatográfico	26
3.6.5	Análise de Proteínas Através de Eletroforese	27
3.6.5.1	Proteínas Ácidas	27
3.6.5.2	Proteínas Básicas	28
3.6.5.3	Deteção de Glicoproteínas em Gel	29
3.6.5.4	Eletroforese Bidimensional para Proteínas Totais	30
3.7	Deteção de Glicoproteínas Através de Ensaio Baseado em Ressonância Plasmônica de Superfície	31
3.8	Espectrometria de Massas	33
3.9	Produção de Anticorpos Policlonais em Coelhos para a Fração LP	33
3.10	Imunodifusão Dupla de Ouchesterlony	34
3.11	Determinação da Atividade Hemaglutinante	35
3.12	Ensaio Enzimático	36
3.13	Ensaio Biológico	40
3.13.1	Ensaio Biológico com o <i>Stegomyia aegypti</i>	40

3.13.1.1	Ensaio de Avaliação da Toxicidade do Látex Total de <i>Calotropis procera</i> sobre as larvas de <i>St. aegypti</i>	41
3.13.1.2	Ensaio de Avaliação da Toxicidade do Látex Total de <i>Calotropis procera</i> sobre a eclosão dos ovos de <i>Stegomyia aegypti</i>	43
3.13.1.3	Ensaio de Toxicidade das Frações do Látex de <i>Calotropis procera</i> para Camundongos	43
IV	RESULTADOS	45
V	DISCUSSÃO	72
VI	CONCLUSÃO	79
VII	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

LISTA DE FIGURAS

Número	Título	Página
1.	Fotos Ilustrativas da Planta <i>Calotropis procera</i>	9
2.	Imagens do Mosquito <i>Stegomyia aegypti</i> em Diferentes Fases de Desenvolvimento	18
3.	Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e 2-mercaptoetanol da fração de proteínas do látex (LP) de <i>Calotropis procera</i>	49
4.	Eletroforese em gel de poliacrilamida em gradiente (5 à 12,5%) de gel na ausência de SDS e 2-mercaptoetanol da fração de proteínas do látex (LP) de <i>Calotropis procera</i>	49
5.	Eletroforese para proteínas básicas em gel de poliacrilamida (12,5%), segundo o método REISFELD (1962) da fração de proteínas do látex (LP) de <i>Calotropis procera</i>	50
6.	Perfil protéico da fração protéica do látex de <i>Calotropis procera</i> em eletroforese bidimensional	51
7.	Espectro de massas da fração LP adquirido a partir de um aparelho Espectrômetro de Massas modelo MALDI-TOF com fonte de ionização do Tipo <i>Electron Spray Ionization</i> (ESI), analisador tipo <i>Time of Fly</i> (TOF) e detector do tipo multiplier	52
8.	Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) em presença de SDS e 2-mercaptoetanol da fração de proteínas do látex (LP) de <i>Calotropis procera</i>	53

9.	Perfil eletroforético de extratos protéicos obtidos a partir da fração borracha (RL) do látex de <i>Calotropis procera</i> em diferentes soluções	54
10.	Eletroforese para peptídeos em gel de tricina-acrilamida (17%) sob condições desnaturantes, SDS 10% e β -mercaptoetanol 5% para a fração DL de <i>Calotropis procera</i>	55
11.	Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%), segundo o método descrito por ZACHARIUS <i>et.al.</i> (1969) da fração de proteínas do látex (LP) de <i>Calotropis procera</i>	57
12.	Cinética da interação em tempo real da fração proteínas do látex (LP) com glicoproteínas imobilizadas (CFL, jacalina) medidas por ressonância plasmônica de superfície (SPR)	58
13.	Perfil cromatográfico das proteínas do látex em coluna de quitina	59
14.	Ensaio da atividade quitinásica em frações do látex de <i>C. procera</i>	60
15.	Efeito da temperatura sobre a atividade quitinolítica das frações LP	61
16.	Imunodifusão dupla de <i>Ouchesterlony</i> com a fração de proteínas do látex (LP) de <i>Calotropis procera</i>	63
17.	Cromatografia de troca-iônica em coluna de CM-Shepharose <i>Fast Flow</i> da fração LP de <i>C. procera</i>	67
18.	Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) da fração LP do látex de <i>Calotropis procera</i> após digestão com protease de <i>Streptomyces griseus</i>	68

LISTA DE TABELAS

Tabela	Título	Página
1.	Composição Físico-química do látex fresco da planta <i>Calotropis procera</i>	46
2.	Rendimento do fracionamento do látex de <i>Calotropis procera</i> e estimativa do teor de proteínas nas frações	47
3.	Atividades enzimáticas de enzimas do metabolismo oxidativo investigadas na fração LP do látex de <i>Calotropis procera</i>	62
4.	Atividade larvicida das frações LP e DL do látex de <i>Calotropis procera</i> para larvas do terceiro estágio no desenvolvimento do <i>Stegomyia aegypti</i> após diferentes tempos de exposição	65
5.	Atividade larvicida das frações LP e DL de <i>Calotropis procera</i> submetidas a tratamento térmico contra larvas do terceiro estágio de desenvolvimento do <i>Stegomyia aegypti</i>	66
6	Atividade larvicida das frações LP (PI, PII e PIII) contra larvas do terceiro estágio de desenvolvimento do <i>Stegomyia aegypti</i>	68
7	Efeito das frações do látex (LP e DL) do <i>Calotropis procera</i> na eclosão de ovos <i>Stegomyia aegypti</i>	70

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

A ₂₈₀	Absorbância determinada no comprimento de onda 280nm
------------------	--

APX	Peróxido do Ascorbato
BSA	Albumina Sérica Bovina
BiaCore	Núcleo de análises de interações biológicas
C	Controle
Ca ⁺⁺	Íon cálcio
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
CAT	Catalase
CBD	Domínio ligante à quitina
Cg	Carragenina
CM	Carboximetil-celulose
DL	Látex dialisado
DMAB	D- dimetilaminobenzaldeído
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
GlcNac	N-acetil-D-glucosamina
KDa	Quilodalton
Kg	Kilograma
LP	Proteínas do Látex
M	Molar
mA	Miliamper
mM	Milimolar

Mn ⁺⁺	Íon manganês
MnCl ₂	Cloreto de Manganês
NaCl	Cloreto de Sódio
NBT	ρ- nitrobluetetrazolium
ND	Não determinado
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PAGE-SDS	Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS
RL	Proteínas da Borracha
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SDS	Docecil Sulfato de Sódio
SOD	Superóxido Dismutase
TEMED	N,N,N',N' - tetrametiletilenodiamina
Tris	Hidroximetil aminometano
UH	Unidade de hemaglutinação, definida como o valor inverso da última diluição de um ensaio de hemaglutinação em que a lectina aglutina 100 % das células.
ULV	Volume Ultra-baixo

RESUMO

Título - Caracterização Bioquímica Parcial do Látex de *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. e Efeito Sobre a Eclosão de ovos e Desenvolvimento do mosquito transmissor da Dengue. **Autor** – Glaís de Paiva Bandeira.

Introdução - O arbusto *Calotropis procera* (Ait.) R.Br. é um membro da família *Asclepiadaceae*. É vastamente encontrado no Estado do Ceará e tem como característica a produção de látex. Ao látex são atribuídas propriedades tóxicas e farmacológicas. Neste trabalho, uma caracterização bioquímica parcial do látex foi estabelecida e seu efeito sobre a eclosão de ovos e desenvolvimento larval do Mosquito transmissor da Dengue (*Stegomyia aegypti*) foi avaliado.

Métodos - O látex foi coletado de plantas não cultivadas e após etapas de diálise e centrifugação deu origem a três frações: LP (rica em proteínas), DL (compostos de pequeno tamanho molecular e solúveis em água) e RL (fração rica em isopreno, insolúvel em água). Uma análise físico-química de elementos inorgânicos foi realizada. As frações foram analisadas através de eletroforese em uma e 2 dimensões, espectrometria de massas, técnicas cromatográficas e atividades enzimáticas. A presença de glicoproteínas foi investigada através de coloração em gel e análise por Ressonância Plasmônica de Superfície. Bioensaios para atividade ovicida e larvicida foram realizados com as frações LP e DL, além do látex íntegro.

Resultados – A fração LP representou 10,03 % da massa seca do látex enquanto que DL representou menos que 1 % e RL 84,97 %. O látex possui quantidades apreciáveis de HCO_3^- , Mg^{+2} , Cl^- , quantidades menores de SO_4^- , NO_3^- , NO_2^- , NH_4^+ e P^{-3} , enquanto que Ca^{+2} e Fe^{+2} não foram detectados. A fração PL apresentou proteínas com massa molecular relativa entre 8.000 - 97.000 Da e isto foi confirmado por Espectrometria de massa. Foi verificado que as frações RL e LP eram similares e peptídeos foram detectados na fração DL. A fração LP mostrou-se heterogênea em gel de eletroforese 2-D e as proteínas exibiram caráter essencialmente básico. Três picos protéicos foram recuperados por troca iônica. A fração LP foi capaz de se ligar à matriz de quitina e foi detectada atividade quitinásica. Atividades para, superóxido dismutase e ascorbato peroxidase foram detectadas, mas não para catalase. Glicoproteínas do tipo oligomanosídicas e *N*-acetilactosamina parecem estar presentes na fração LP. O látex total causou 100 % de mortalidade para larvas do terceiro estágio de *St. aegypti*. As frações também foram tóxicas causando 100 % mortalidade em 24 hs. Quando as frações LP e DL foram aquecidas a 100 °C a ação larvicida da fração LP diminuiu e a da fração DL foi pouco afetada sugerindo pouca termoestabilidade dos componentes ativos em LP. As frações LP e DL foram parcialmente efetivas em prevenir a eclosão dos ovos do mosquito e muitos dos indivíduos não atingiram o primeiro ou segundo estágio. É esperado que os efeitos tóxicos observados sobre a eclosão dos ovos e desenvolvimento das larvas poderiam ser, em parte, devido ao conteúdo protéico de LP.

ABSTRACT

Calotropis procera (Ait.) R.Br. (Asclepiadaceae) is a well-known medicinal plant with leaves, roots and bark being exploited by popular medicine to fight many human and animal diseases. Despite, the lack of information about its biochemical content has stimulated the present study. Healthy plants of *C. procera* growing in the field around the beaches of Fortaleza were used as the source of fresh latex. The latex was collected in distilled water to give a dilution rate of 1:2 (v:v). The mixture was gently agitated during collection to overcome the natural coagulation effect of the material. Later in the laboratory the samples were centrifuged at 5.000 x g during 10 min at room temperature. The rubber-rich precipitate was separated and the supernatant was exhaustively dialyzed against distilled water at room temperature and recentrifuged using the conditions described above. Three distinct fractions were obtained: LP (rich in proteins); DL (rich in low molecular weight molecules) and RL (rich in poly-isoprene rubber). LP fraction constitutes 10.03 % of the dry matter of the latex while DL > 1% and RL 84.97 %. The latex possesses relevant amounts of HCO_3^- , Mg^{+2} , Cl^- , lower quantities of SO_4^{-2} , NO_3^- , NO_2^- , NH_4^+ and P^{-3} , while Ca^{+2} and Fe^{+2} were not detected. Proteins in LP showed molecular mass varying between 8,000 - 97,000 Da further confirmed by mass spectrometry. They are essentially basic proteins. RL and LP exhibited similar protein profile and peptides were detected in DL. LP could be fractionated in three newly fractions by ion exchange chromatography and able to bind chitin. Enzymatic activity of chitinases, superoxide dismutase and ascorbate peroxidases were detected. Glicoproteínas bearing oligomanosídic and *N*-acetylgalactosamine seems to be present in LP. The whole latex was shown to cause 100 % mortality of 3rd instars within five minutes. Both LP and DL fractions were partially effective to prevent egg hatching and most of individuals growing under experimental conditions died before reaching 2nd instars or stayed in 1st instars. Besides, the fractions were very toxic to 3rd instars causing 100 % mortality within 24 hs. When both fractions were submitted to heat-treatment the toxic effects of LP were strongly diminished while that of DL diminished slowly suggesting low thermostability of the toxic compounds in LP. According to the results, the latex of *C. procera* exhibits strong insecticide action upon *St. aegypti* and it is expected that proteins are at least in part involved in that an activity.

I - INTRODUÇÃO

1.1. Plantas Laticíferas

No reino Plantae as plantas que exsudam um líquido, na maioria das vezes de aparência leitosa, quando as mesmas são submetidas a injúrias mecânicas, foram denominadas laticíferas. A referida classe é formada por mais de 12.000 espécies, pertencentes a 900 gêneros, subdivididas em 12 famílias. Dentre essas, aproximadamente 1000 produzem polímeros em seu fluido laticífero que têm características colante e plástica quando são exsudados. Esses compostos são genericamente chamados de borracha e normalmente prevalece no fluido laticífero como o componente mais abundante em termos comparativos com os demais. Desta forma, o termo látex é intimamente relacionado ao termo borracha (YEANG *et al.*, 2002).

Dentre as famílias de plantas que apresentam esta propriedade destacam-se Euphorbiaceae (LYNN & CLEVETTE-RADFORD, 1988), Asclepiadaceae (BROCKBANK & LYNN, 1979), embora outras famílias como Moraceae, Compositae, Anarcadiaceae, Sapotaceae e Apocynaceae produzam látex em quantidades suficiente para que estejam inclusas entre o grupo de famílias que mereçam ser alvos de investigações científicas (DELTA, 1982).

Plantas comuns como Jasmim (*Plumeria rubra* L.), Aveloz (*Euphorbia tirucalli*) e Sapoti (*Achras sapota*) são plantas laticíferas. Entretanto, sem qualquer dúvida, a planta laticífera mais conhecida em todo o mundo é a árvore da borracha ou mais comumente chamada de seringueira (*Hevea brasiliensis*). A matéria prima oriunda da seringueira, extraída de seu fluido laticífero revolucionou a indústria e gerou uma considerável gama de produtos industrializados dos quais se destacam o pneu para automotivos e os produtos cirúrgicos descartáveis como as luvas utilizados por todos os profissionais da área de saúde (SUSSMAN *et al.*, 2002).

No contexto da morfologia vegetal, o látex é um conteúdo citoplasmático circulante em canais específicos onde organelas citoplasmáticas estão imersas e há intensa síntese de proteínas e comumente de um polímero de poliisopreno que dá ao material a propriedade de borracha (KEKWICK, 2001). Daí o conteúdo interior dos laticíferos ser denominado de células laticíferas (KEKWICK, 2001).

Os canais laticíferos podem estar presentes em todas as partes da planta ou apenas em tecidos ou órgãos restritos. A extração de látex de *H. brasiliensis* ocorre através de incisões realizadas em seu caule, enquanto que em *C. procera* o látex é abundante apenas em suas extremidades foliares e não é possível coletar látex a partir de sua porção lenhosa.

Ainda considerando aspectos morfológicos, dois tipos distintos de laticíferos são observados. Os laticíferos articulados são formados por células sequenciais que são interrompidas pela parede celular enquanto nos não articulados as células subjacentes mantêm trocas mais intensas de materiais circundantes (KEKWICK, 2001).

Este detalhe estrutural poderia explicar porque em algumas plantas laticíferas é mais prático coletar maiores quantidades de látex enquanto em outras, embora haja produção do fluido, sua coleta é extremamente laboriosa.

1.2. Características Gerais do Látex

É interessante saber que nem sempre o látex de plantas tem aparência leitosa. Existem registros de plantas que, por outro lado, produzem um líquido de cor amarela, como no caso de plantas da família Papaveraceae, ou marrom-amarelado, como a Cannabis, ou então límpido como em Morus e Nerium *oleander* (METCALFE, 1967). O látex poder ser extraído a partir do caule (*Hevea brasiliensis*), tubérculos (*Manihot glaziovii*) (PEREIRA *et al.*, 1999), folhas (*C. procera*), galhos (*Plumeria rubra*) ou do fruto (*Achras sapota*, *Carica papaya*).

Considerando-se *H. brasiliensis*, quando o látex é submetido à centrifugação é possível visualizar a formação de fases, destacando-se entre elas uma fase constituída essencialmente de um polímero de poliisopreno sendo responsável por aproximadamente 37 % do volume total do fluído (D'AUZAC & JACOB, 1988a). Uma fração aquosa denominada soro citoplasmático ou soro C, que representa 48 % do volume e uma terceira fase chamada soro de sedimentação ou soro S, que ocupa o volume referente a 15 % do conteúdo total. Nessa terceira fase são encontradas várias partículas como os lutóides, vesículas e vacúolos que contêm em seu interior um fluído denominado soro B (WEBSTER & PAARDEKOOOPER, 1969; D'AUZAC & JACOB, 1988b), enquanto que um pequeno percentual em relação ao volume total

é representado pelas partículas de Frey Wyssling (WEBSTER & PAARDEKOOOPER, 1969).

A coagulação do látex, fenômeno que permite a paralisação do escoamento do fluido através da superfície da planta, é um fenômeno complexo e várias são as hipóteses destinadas a esclarecer este processo. Dentre elas é destacada a participação dos lutóides que liberam substâncias envolvidas no processo de coagulação do látex em consequência das injúrias mecânicas sofridas pela planta (D'AUZAC, 1988a). O termo coagulação faz referência a uma analogia a coagulação do sangue onde uma fase líquida forma um emaranhado de redes dando um aspecto semi-sólido ao material e aprisiona moléculas solúveis em seu interior.

1.3 - Composição Química do Látex

O Látex é constituído por diversas substâncias, como polímeros de hidrocarbonetos, poliisopreno e proteínas (YEANG *et al.*, 2002). Em látex também são encontrados terpenos (SABY JOHN *et al.*, 1999), polifenóis (SABY JOHN *et al.*, 2003) carbonatos, alcalóides, vitaminas, lipídeos e aminoácidos, além de uma diversidade de componentes celulares (MORCELLE *et al.*, 2004).

A borracha, um hidrocarboneto formado por polímeros de isopreno, tem sido alvo de intensos estudos em virtude da sua grande utilização e por apresentar grande valor comercial (SILER & CORNISH, 1995). Estas partículas são rodeadas por uma camada de proteínas adsorvidas na interface borracha-água que determinam a estabilidade e o comportamento coloidal do látex apresentando massa molecular que varia de 10^4 a 2×10^6 Da, dependendo da espécie vegetal (KEKWICK, 2001).

Embora as plantas laticíferas sejam um atraente modelo biológico para estudo científico, investigações sobre as propriedades bioquímicas e fisiológicas de látex são ainda bastante precárias. No tocante à caracterização bioquímica, isolamento e purificação de proteínas, bem como de outros compostos presentes nesta secreção não há muitos exemplos amplamente descritos na literatura.

1.4 - Proteínas Presentes em fluidos laticíferos

Muitas das proteínas presentes em preparações feitas a partir de fluidos laticíferos são proteases, que diante dos seus altos níveis de atividade enzimática detectados, levam a crer que assumam importante papel fisiológico, na proteção das plantas contra o ataque de predadores (SMITH *et al.*, 1955; BOLLER, 1986) confirmado através da presença da ação bacteriolítica detectada no látex de *Carica papaya* (HOWARD & GLAZER, 1969), *Ficus glabrata* (GLAZER *et al.*, 1969) e *Ervatamia coronaria* (KIDWAI & MURTI, 1963). Muitas delas são classificadas como peptidases, de especial interesse, devido a sua resistência em manter-se ativa em larga faixa de temperatura e pH. São comumente encontradas em diversas famílias como na Caricaceae (SCHACK, 1967), onde várias endopeptidases cisteínicas foram purificadas a partir do fruto da *Carica papaya* L., e foram denominadas papaínas (EC 3.4.22.2), quimopapaínas A e B (3.4.22.6), papaia endopeptidases III e papaia endopeptidase IV (1,2) e a endopeptidase Ω (3) (SILVA *et al.*, 1997), Moraceae (SGARBIERI *et al.*, 1964), Euphorbiaceae (LYNN & CLEVETTE-RADFORD, 1988) e Apocynaceae (JAFFÉ & LYNN, 1979). Dentre essas já foram purificadas e caracterizadas: 1 endopeptidase a partir da *Asclepias*

fruticosa L. (TREJO *et al.*, 2001), 1 protease cisteínica estável, denominada proceráina obtida a partir da *C. procera* (DUBEY *et al.*, 2003), 3 endopeptidases cisteínicas, denominadas araujaína h I, II e III, da *Araujia hortorum* Fourn. (PRIOLO *et al.*, 2000; OBREGON *et al.*, 2001) e 1 endopeptidase cisteínica, denominada morrenaína b I, obtida a partir do látex de *Morrenia brachistephana* Griseb (CAVALLI *et al.*, 2003). Outras 4 proteases cisteínicas, denominadas Calotropina FI, FII, DI e DII, purificadas a partir de *Calotropis gigantea* (ABRAHAM & JOSHI, 1979), ervatamina A, B e C, a partir da *Ervatamia coronaria* (SUNDD *et al.*, 1998; KUNDU *et al.*, 2000), asclepaína c I, obtida a partir de *Asclepias curassavica* (LIGGIERI *et al.*, 2004) .Cabe salientar que as diversas proteases purificadas a partir de uma mesma espécie apresentam diferenças na sua composição de aminoácidos e perfis cromatográficos e eletroforéticos distintos, sendo possível afirmar que as múltiplas formas de proteases purificadas não foram obtidas de autodigestão de um precursor (JONES & GLAZER, 1970).

No entanto, a espécie *H. brasiliensis* tem sido a mais bem estudada planta laticífera. Conhecida popularmente como seringueira, originária do Brasil, produz a única borracha usada comercialmente e daí o motivo pela qual tornou-se o principal alvo de estudo. Conforme registros da literatura, tanto já foram identificadas proteínas na fração protéica referente à borracha, como na fração solúvel. Algumas destas proteínas presentes no látex desta planta encontram-se associadas à borracha e são reportadas por estarem envolvidas em processos alergênicos (SUSSMAN *et al.*, 2002). A polifenol oxidase (PPO), que em plantas superiores está localizada em membranas tilacóides dos cloroplastos e outras organelas de plastídeos, foi caracterizada e purificada da fração borracha (WITITSUWANNAKUL *et al.*, 2002).

Lectinas, quitinases (JEKEL *et al*, 1991), β -1,3-glucanases (CHEY & CHEUNG, 1995), lisozimas, RIPs, glicosidasas (GIORDANI & LAFON,1993) que estão envolvidas no processo de degradação da parede celular durante a diferenciação de laticíferos articulados, como a N-acetil- β -D-glucosaminidase (GIORDANI *et al.*, 1992), amilases (LYNN & CLEVETTE-RADFORD, 1987), quitinases (JEKEL *et al*, 1991) e inibidores de proteinases foram também encontradas (ARCHER, 1983; LIN & LU, 1994).

1.5. Caracterização Botânica da Planta *Calotropis Procera* (Ait.) R.Br

Calotropis procera pertence à família Asclepidaceae. Entretanto há descrição literária que sugere sua inclusão entre as Apocynaceas (HENEIDAK *et al.*, 2006). A planta é um arbusto perene, ereto, pouco ramificado, que alcança até 3,5 metros de altura quanto adulta. As folhas são grandes subcoreáceas e muitas vezes cobertas por serosidade, notada principalmente nas plantas mais jovens. Os frutos são cápsulas infladas e globosas, grandes (7-10 cm), com sementes envolvidas em painas sedosas e brancas (FIGURA 1). A multiplicação ocorre através de disseminação pelo vento (LORENZI & MATOS, 2002). A origem do seu nome deriva de “Asclépios” - deus grego da medicina, do grego “Kalos”= belo, “tropis” = barco e “procera” do latim “procerus”= esbelto.

É uma planta originária da Índia e está presente em grande parte do oriente médio e Norte da África. Constan registros de que ela foi introduzida no Brasil, no século XIX, mais precisamente em Recife-PE, onde é encontrada com frequência até

os dias atuais, estendendo-se por todo o Nordeste e regiões do cerrado (KISSIMAN & GROTH, 1992).

No Estado do Ceará a planta *C. procera* tem uma distribuição geográfica bem abrangente. É encontrada por vastas extensões à beira das estradas interioranas e em Fortaleza pode ser vista sobre as dunas e terrenos próximos à zona litorânea, além de terrenos desabitados. É muito freqüente em zonas de favela. Uma característica chamativa da planta é o seu hábito que não permite sombreamento. *Calotropis* é sempre encontrada em campos abertos onde há intensa incidência de raios solares e zonas de baixa altitude.

Dependendo da região onde é encontrada recebe popularmente nomes tais como flor-de-seda (CE), ciúme (CE), hortência (CE), paininha-de-seda (SP), leiteiro(MG) ou algodão-de-seda (PE).

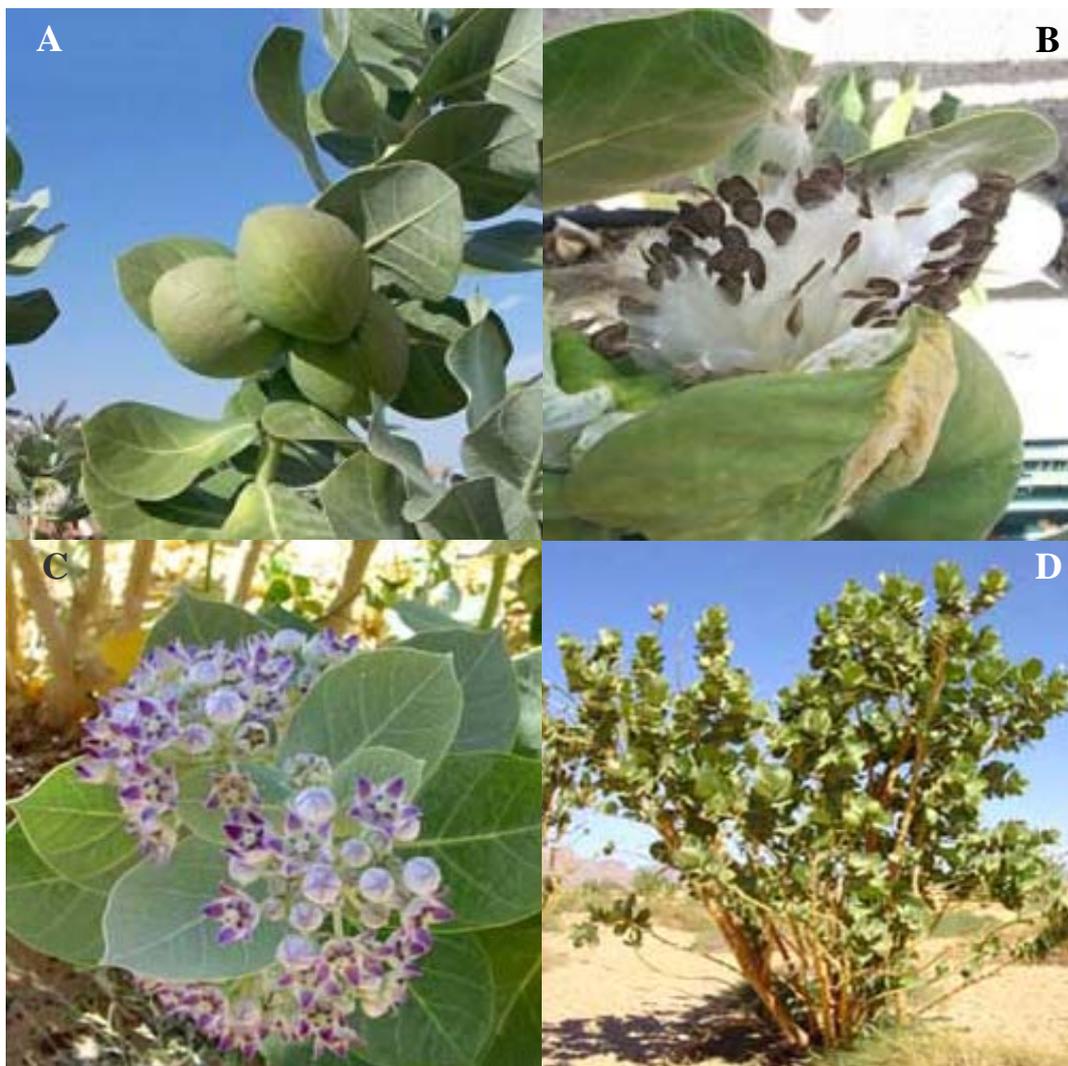


Figura 1 – Fotos ilustrativas da planta *Calotropis procera*. Fruto globoso (**A**); Sementes com detalhes dos “fios de seda” (**B**); Inflorescências (**C**) e Planta adulta ressaltando sua base lenhosa (**D**).

1.6. Substâncias identificadas no látex de *Calotropis procera*

Através de análises químicas foram isoladas e identificadas várias substâncias com potencial medicinal como o esteróide, hidroxicetona procesterol, isolado a partir das flores de *C. procera*, com fórmula molecular correspondendo a $C_{29}H_{48}O_2$, confirmada por RMN e espectrometria de massa (KHAN & MALLIK, 1989). Potentes substâncias ativas pertencentes ao grupo dos cardenolídeos como a Calotropina e a Proceragenina, onde a última foi isolada por extração metanólica de *C. procera*, com fórmula molecular correspondente a $C_{23}H_{34}O_4$ apresentaram atividade bactericida contra o *Micrococcus luteus*, *Aeromonas caviae*, *Pseudomonas pseudomolliae* e *Streptococcus agalactiae* (AKHATAR *et al.*, 1992).

A partir do látex da planta foi isolado a Uscharina, um cardenolídeo com atividade molusquicida contra *Thepa pisana* (HUSSEIN *et al.*, 1994). Carbonato orgânico, como o 2-propenil-2'-hidroxietil, detectado através da análise de ressonância magnética nuclear mono e bi-dimensionais (OLEA-GALLEGOS *et al.*, 2002). Também pertencente ao grupo dos cardenolídeos, 2''-Ovoruscarina substância de fórmula molecular $C_{31}H_{41}NO_9S$ foi obtido a partir de extratos metanólicos da casca da raiz da *C. procera* e a síntese de novos derivados a partir deste apresentou intensa atividade anti-tumoral *in vitro* e alta tolerância *in vivo* contra diversas linhagens tumorais humanas (QUAQUEBEKE *et al.*, 2005).

A partir do homogenato do látex de *C. procera* DUBEY & JAGANNADHAM (2003) purificaram a Proceraina, uma protease cisteínica com massa molecular de 28,8 kDa e ponto isoelétrico 9,32. A molécula contém 8 resíduos de triptofano, 20 de tirosina e 7 de cisteína, formando 3 pontes dissulfeto e com alta

estabilidade ao calor bem como à presença de compostos químicos desnaturantes ou solventes orgânicos.

1.7. Atividades Biológicas Descritas na Planta *Calotropis procera*

Devido ao caráter das suas propriedades medicinais, várias partes da planta *C. procera* vêm sendo reportadas por apresentarem inúmeras propriedades biológicas (KIRTIKAR & BASU, 1935). Segundo relatos populares, esta é usada como purgativo e anti-helmíntico (KIRTIKAR & BASU, 1935), e suas raízes e folhas para atenuar dores (THE WEALTH OF ÍNDIA, 1992). Na Índia, extratos alcoólicos de folhas da planta são comumente utilizados no tratamento de febres (KAPOOR & KAPOOR, 1980). Botões florais moídos ingeridos juntamente com pimenta preta e sal são mencionados possuidores de atividade antipirética (ANIS & IQBAL, 1986), enquanto que folhas e raízes moídas consumidas na forma de tabletes são utilizadas para aliviar os efeitos dos sintomas de febre amarela (SINGH & ALI, 1994). Já o consumo de folhas secas é empregado para reverter os efeitos desagradáveis de enxaqueca (PRASAD, 1985). Além disso, os resultados obtidos com o extrato de suas raízes extraído com clorofórmio conferiu significativa atividade anti-úlceras (SEM, *et al.*, 1998). Outro grupo também verificou a eficácia do extrato aquoso, preparado a partir do caule, no combate a congestionamento bronquial (DIEYE, A.M *et al.*, 1993). Registros de estudos relatam a presença de atividade espermicida, antiimplantação do óvulo e abortiva em ratos (PRAKASH *et al.*, 1978; GUPTA *et al.*, 1990; QURESHI *et al.*, 1991), bem como atividade anti-fertilidade (KAMATH & RANA, 2002).

O látex quando submetido à extração com solventes orgânicos ou alcoólicos apresentou atividades molusquicida (HUSSEIN *et al.*, 1994), antifúngica (LARHSINI *et al.*, 1997), antibacteriana (LARHSINI *et al.*, 1999; LARHSINI, M. *et al.*, 2001), antidiarréica (KUMAR *et al.*, 2001) e esquistossomicida (SHARMA & SHARMA, 1999 e 2000).

O látex de *C. procera* também tem sido reportado por apresentar intensa atividade inseticida (MESHARAM, 1995; PEREIRA *et al.*, 1999), larvicida (MARKOUK *et al.*, 2000; MOURSY *et al.*, 2001), além de ser utilizado no controle de mosquitos vetores de algumas doenças, como o *Stegomyia aegypti*, principal transmissor da dengue (GIRDHAR *et al.*, 1984); nomeado até o ano de 2004 como *Aedes aegypti*, momento no qual foi realizado um estudo detalhado sobre a filogenia do gênero *Aedes* e outros 45 grupos; resultando na reclassificação da taxonomia desses mosquitos. Uma das mais importantes alterações foi no subgênero *Stegomyia*, que foi elevado ao status de gênero. Desta forma, o então *Aedes aegypti* tornou-se *Stegomyia aegypti* o *Aedes albopictus* tornou-se *Stegomyia albopicta*, neste último caso, o nome masculino foi passado para a forma feminina para concordar com o nome do gênero *Stegomyia* (REINERT & HARBACH, 2005). A efetiva ação inseticida do referido látex contra outros mosquitos vetores de doenças tropicais, como o *Anopheles stephensi* (transmissor da malária) e *Culex fatigan* (transmissor da febre amarela), também foram demonstradas por GIRDHAR *et al.* (1984). Recentemente, Ramos *et al.* (2006) (In Press) mostraram que constituintes do látex de *C. procera* produzem efeitos tóxicos sobre o desenvolvimento larval e eclosão de ovos do mosquito transmissor da Dengue.

Estudos preliminares com o látex de *C. procera* relatam a presença de ação cicatrizante, hemólise de células sanguíneas e atividade anti-plasmodial (RASIK *et al.*, 1999; SHARMA *et al.*, 2000) bem como atividade antitumoral *in vivo* e citotóxica contra linhagens de células tumorais humanas (CHOEDON *et al.*, 2006). Outros ensaios mostraram a presença de atividade analgésica (BASU & NAGCHAUDHURI, 1991; DEWAN *et al.*, 2000), antiinflamatória quando administrada por via oral (KUMAR & BASU, 1994; MAJUMDAR & KUMAR, 1997; ARYA *et al.*, 2005) e pró-inflamatório quando administrada por via parenteral (SINGH *et al.*, 2000). As atividades antiinflamatória e analgésica também foram observadas em uma fração solúvel em água e rica em proteínas obtida a partir do látex da planta (ALENCAR *et al.*, 2004; SORAES *et al.* 2005).

Estudos toxicológicos foram desenvolvidos a partir do látex de *C. procera* que foi administrado em cabras, pelas vias intravenosa e intraperitoneal (1mL/ Kg). O látex foi capaz de causar mortalidade dos animais entre 20 minutos e 4 dias. Enquanto que a administração diária de doses baixas por via oral ou intramuscular (0.005 mL/Kg) foi capaz de produzir várias mudanças comportamentais negativas nos animais, como também por via intramuscular foram visualizadas imperfeições (el BADWI *et al.*, 1998).

1.8. Dengue: descrição e ocorrência

A dengue, como outras doenças tropicais, é transmitida através de um mosquito, na maioria das vezes a espécie *Stegomyia aegypti* é a responsável pela transmissão (embora existam registros de envolvimento de outras espécies como

Stegomyia albopicta, *Aedes polynesiensis* e *Aedes mediovittatus* na transmissão da dengue) o qual carrega o arbovírus responsável pela referida doença (MONATH & HEINZ, 1996). Ela é causada por quatro vírus antigenicamente relacionados (DEN-1, DEN-2, DEN3 e DEN-4), pertencentes ao gênero *Flavivírus*, e à família Flaviviridae (GUBLER, 1988).

O que tem levantado preocupação mundial das autoridades governantes, nos últimos anos tem sido observado um aumento nas epidemias de dengue na maioria das regiões tropicais e subtropicais do planeta, regiões essas que apresentam condições climáticas favoráveis para a procriação do *St. aegypti* (MAILLARD *et al.*, 1993), favorecido pelo desmatamento para a construção de zonas urbanas, forçando o mosquito vetor a se deslocar para os centros urbanos com uma estimativa de 50 milhões de infecções sendo registradas nessas regiões a cada ano (WHO. 2002).

No caso do Brasil o *St. aegypti* é amplamente encontrado em todas as regiões do país, e essa larga distribuição se deve em parte aos elevados níveis de pobreza associada à ausência de saneamento básico em que se encontra uma significativa parcela da população (TEIXEIRA *et al.*, 2002).

Contudo, a atenção voltada para a transmissão da dengue ocupa um lugar primordial em relação a outras doenças transmitidas pelo mesmo mosquito, como a febre amarela (GLUBER, 1989). A prioridade é justificável devido já existir uma vacina efetiva para a erradicação da febre amarela, enquanto que, até a presente data, a única maneira eficaz para o controle da dengue é através do monitoramento dos locais de provável ocorrência das larvas do *St. aegypti* (GLUBER, 1989). O combate ocorre com o uso de inseticidas (CEPLEANU, 1993), que muitas vezes são diluídos em querosene e aplicados em pequenas quantidades através de um aerossol, técnica

conhecida como ULV (LOFGREN, 1970). Porém, esses tratamentos atualmente utilizados são a base de compostos organofosforados reconhecidamente cancerígenos e de vagarosa biodegradação, e que em vários casos são ineficazes devido à plasticidade genética do *St. aegypti* (CEPLEANU, 1993; BLANEY *et al.*, 2006). Além disso, boa parte das áreas submetidas ao tratamento é muito populosa, o que contribui para a limitação do seu sucesso, bem como o uso desses compostos estarem vinculados a problemas de irritação em habitantes dessa circunscrição (MATTHEUS, 1996). Portanto, a idéia extremamente aceita na última década como uma alternativa sensata para o uso dessas substâncias químicas nocivas é a substituição por produtos naturais, sejam elas, formulações e suspensões à base de microorganismos como o Vectobac – preparado a partir de *Bacillus thuringiensis* e testado de maneira eficaz contra determinados mosquitos vetores de doenças tropicais (WILSON *et al.*, 2005), ou de substâncias extraídas de plantas (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994; CARVALHO, *et al.*, 2003), como é o caso do látex exudado por determinadas árvores, sendo alvo de diversos estudos nos últimos anos, levando a obtenção de resultados animadores como o recente isolamento de acetogeninas, com atividade inseticida e anti-tumoral, extraídas da madeira e das folhas de membros de Annonaceae (MATOS *et al.*, 2006).

1.9. Aspectos Biológicos do Mosquito *St. aegypti*

O artrópode *St. aegypti* pertence à família Culicidae. Seu aspecto é de um mosquito preto, com alguns riscos brancos no dorso, cabeça e patas. As asas são translúcidas e produz um ruído praticamente inaudível para seres humanos.

A alimentação é diferenciada para machos e fêmeas. Enquanto os machos alimentam-se de frutos, as fêmeas precisam de sangue, preferencialmente humano, para que os ovos possam amadurecer (SCOTT *et al.*, 1993a). Estes são depositados nas paredes internas de objetos, próximos a extensas superfícies de água limpa, onde terão mais chances de sobreviver (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002; TAUIL, 2002). Estudos recentes confirmaram que dois dos fatores ecológicos que contribuem para que o micro-ambiente se torne mais adequado para a eclosão e desenvolvimento dos ovos são a presença de vegetação próxima e alta que possa proporcionar sombra nos recipientes que apresentam foco do mosquito (TAUIL, 2002).

Segundo TAUIL (2001), no instante em que os ovos são depositados não apresentam coloração, tornando-se logo em seguida negros e brilhantes. Os ovos continuam viáveis mesmo na ausência de água e ao primeiro contato com a mesma eclodirão. Caso sejam postos por uma fêmea contaminada pelo vírus da dengue, ao completar seu ciclo biológico, transmitirão a doença.

O ciclo de vida do mosquito apresenta duas fases ecológicas interdependentes. A fase aquática constituída de três etapas de desenvolvimento após eclosão do ovo: larva e pupa e a fase terrestre quando o mosquito se torna adulto (FIGURA 2). Nas condições adequadas os ovos eclodem em 5 dias e o ciclo de vida é concluído em 18 dias (GLUBER, 1989).

Embora o mosquito *St. aegypti* seja originário do Egito ele foi amplamente disseminado nas regiões tropicais e subtropicais do planeta, sendo responsabilizado pela transmissão da febre amarela e da dengue na América Central e na América do Sul (MONATH, 1996).

No Brasil, o primeiro registro de casos de dengue ocorreu na década de 1920 (PEDRO, 1923). Devido a essa espécie ter se adaptado muito bem a ambientes urbanos, ou seja, habitats artificiais de recipientes abandonados e preenchidos pelas águas das chuvas, como pneus, caixas de água, tonéis, latões e cisternas (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994), é comum o seu envolvimento com surtos e epidemias, como foi o caso ocorrido na década de 90 na cidade de Ribeirão Preto (SP), com mais de 6.000 casos registrados (SUCEN, 1990).

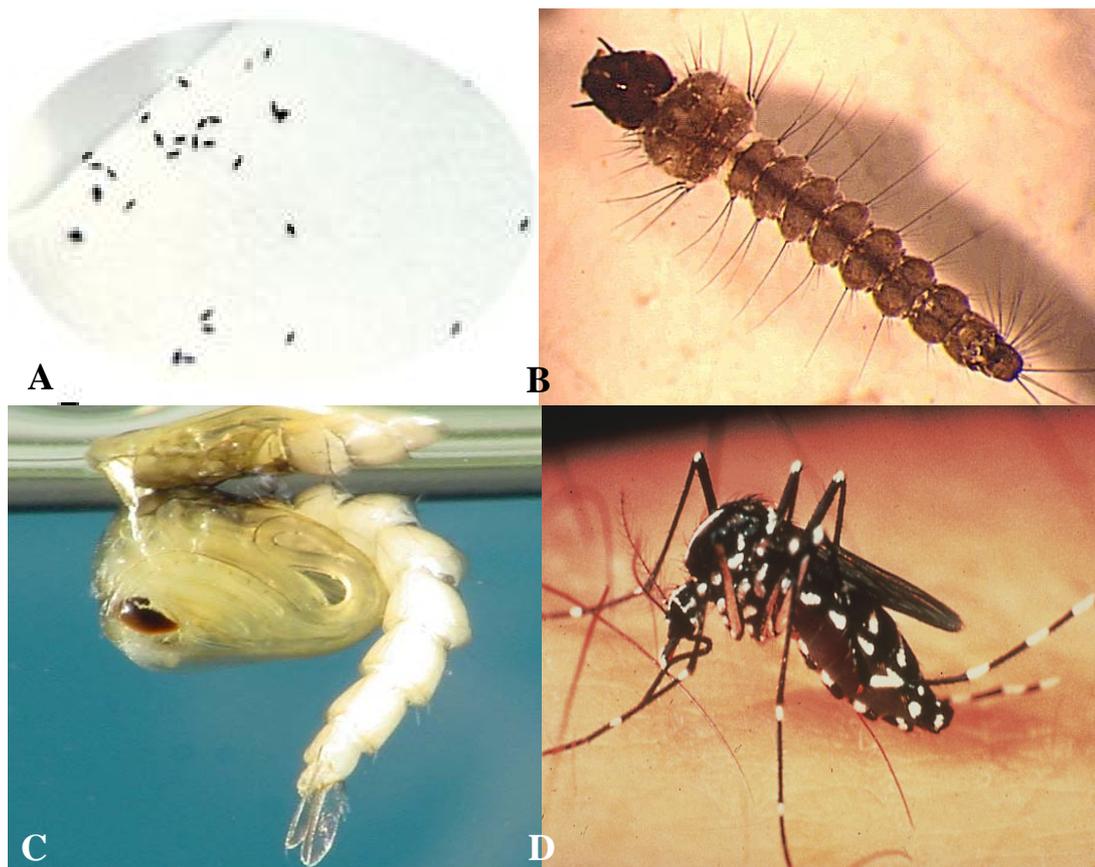


Figura 2 – Imagens do mosquito *Stegomyia aegypti* em diferentes fases de desenvolvimento. Ovos do mosquito (A); Terceiro instar (B); Estágio de pupa (C); Mosquito adulto (D). As imagens foram capturadas a partir dos sites www.dengue.gov.sg/subject.asp?id=12 (ovos); www.bio.ilstu.edu/juliano/mortal.htm (terceiro instar); www.arbovirus.health.nsw.gov.au/areas/arbovirus/mosquit/photos/mosquitphotos.htm (pupa); www.agnews.tamu.edu/westnile/graphics/ (mosquito).

Na última década estudos para avaliar a correlação entre o armazenamento de utensílios que possam servir de hábitat para as larvas do mosquito e a transmissão da dengue, têm sido conduzidos, fornecendo dados para que sejam aplicadas estratégias

alternativas no controle das larvas do mosquito (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 1995).

II. OBJETIVO

1 - Analisar o látex de *C. procera* em seus aspectos bioquímicos, quanto a sua constituição e desenvolver um protocolo de fracionamento que permita produzir frações do látex isentas de sua composição de polímeros isoprênicos.

2 - Investigar a presença no látex da atividade de enzimas envolvidas no mecanismo de defesa e no metabolismo oxidativo de plantas.

3 – Avaliar frações do látex quanto ao possível efeito deletério sobre ovos e larvas do inseto vetor de transmissão da Dengue (*St aegypti*).

4 – Avaliar a toxicidade do látex para animais, utilizando camundongos como modelo biológico.

III - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Material Botânico

A identificação botânica da planta *Calotropis procera* foi realizada pelo professor Edson de Paula Nunes, taxonomista do Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará. Uma exsicata foi depositada no referido Herbário sob o número de identificação 32663. Esta espécie é amplamente encontrada no litoral nordestino, incluindo a cidade de Fortaleza, local esse, onde o material foi coletado.

3.2 - Larvas e Ovos de *St. aegypti*

Ovos de *St. aegypti* foram adquiridos no Núcleo de Endemias Transmissíveis por Vetores (NUEND), órgão da Secretaria de Saúde do Estado do Ceará. Os ovos foram fornecidos desidratados, aderidos em folhas de papel de filtro.

Para a obtenção de larvas, pedaços de folhas com ovos foram submersas em água destilada ou água potável da rede de abastecimento local (CAGECE) e deixados à temperatura de 25 °C até a eclosão e desenvolvimento das larvas até o terceiro estágio. Alguns miligramas de farinha de soja eram adicionados ao volume de água de (aproximadamente 3 litros) como fonte de nutrientes. O recipiente usado tinha profundidade de 5 cm, de plástico polietileno. Larvas do terceiro estágio eram

classificadas através de análise microscópica por estereoscópio para verificar a presença do sifão respiratório, em tamanho e grau de quitinização, referentes a esse estágio de desenvolvimento (THANGAN & KATHIRESAN, 1991).

3.3 - Reagentes Químicos

Os reagentes utilizados nas eletroforeses em uma e duas dimensões foram essencialmente adquiridos pela (GE Healthcare, Piscataway, USA). Os reagentes utilizados nos ensaios enzimáticos foram da (Merck, Darmstadt, Germany). A coluna de quitina foi preparada a partir de quitina bruta comercializada pela (Sigma, St. Louis, USA). CM - Sepharose FastFlow foi adquirida da (GE Healthcare, Piscataway, USA). Outros reagentes tais como ácidos, bases e soluções salinas e tampões foram preparados a partir de reagentes de grau analítico.

3.4 - Coleta do Látex de *Calotropis procera*

As coletas foram realizadas durante todo o ano e sempre no período da manhã, entre seis e oito horas. É importante relatar que a coleta de látex não compromete a saúde das plantas alvo de coletas e que após coleta é observada uma completa regeneração da área cortada em poucos dias e a planta, aparentemente, não diminui sua taxa de crescimento.

O látex de *C. procera* foi coletado através de injúrias mecânicas realizadas nas extremidades dos ramos da planta. O látex quando exsudado sofre um processo natural de endurecimento quando em contato com o ar. O material assume um aspecto duro,

resistente e com característica colante. Este fenômeno é pensado ser devido ao elevado teor de poliisopreno que dar ao material um aspecto de borracha. O processo poderia ser comparado por analogia ao processo de coagulação sanguínea em seu aspecto visual. Como a finalidade de diminuir este evento não desejado, as coletas foram realizadas de modo que o látex exsudado era coletado diretamente em água destilada, respeitando a proporção de uma parte de látex para uma parte de água destilada com base em volume (1:1, v:v). É possível coletar de um só indivíduo de porte médio de 1,5 m aproximadamente 30 ml de látex. O tempo médio para a coleta de 10 ml é de aproximadamente 15 minutos. Na coleta foram utilizados tubos do tipo Falcon, contendo 20 mL de água destilada sobre os quais eram coletados 20 ml de látex. Uma leve agitação da mistura foi realizada e ao final os tubos foram fechados. Este procedimento diminui consistentemente o natural efeito “coagulante” do látex.

Os tubos contendo as amostras foram transportados para o laboratório e submetidos à centrifugação, utilizando a velocidade aproximada de 5000 x g em uma centrífuga de bancada não refrigerada, durante 10 minutos, à temperatura média de a 25 °C. Ao término da centrifugação, o precipitado resultante, com aspecto denso, rico em borracha, foi congelado. O sobrenadante, com aspecto leitoso, característico de látex de plantas, foi transferido para membranas de diálise, para que fossem exaustivamente dialisados contra água destilada. As membranas de diálise tinham poros de tamanho de exclusão correspondente a 8.000 Da (Sigma, St. Louis, USA) . As diálises foram realizadas contra água destilada e mantidas sob refrigeração a 8 °C durante 60 horas e com troca da água a cada 4 horas durante o dia. Ao final foi observado no material em diálise a formação de um precipitado similar àquele obtido no precipitado da primeira centrifugação. Este material foi separado da parte solúvel através de nova etapa de

centrifugação como descrita anteriormente. O precipitado foi então coletado e unido àquele produzido após a primeira centrifugação. O sobrenadante apresentava-se límpido, solúvel e sem qualquer traço aparente do material contendo borracha. Esta fração foi denominada de Proteínas do Látex (LP). O material precipitado foi denominado de Borracha (B) e proteínas posteriormente extraídas a partir deste material foram denominadas de Proteínas da Borracha (RL). Uma última fração do látex foi obtida após centrifugar o látex oriundo da coleta, seu volume foi medido antes de iniciar a diálise. A diálise foi então iniciada de tal forma que o volume de água destilada utilizada foi igual ao volume de látex na membrana de diálise. Esta diálise, realizada em proveta foi deixada prosseguir por uma hora. Ao final, a membrana de diálise foi colocada em um volume maior de nova água destilada e a diálise prosseguiu como anteriormente descrito. Entretanto, o volume de água de diálise inicial, onde a membrana havia sido submersa foi coletado e liofilizado. Esta fração deveria conter todas as moléculas oriundas do látex que eram passíveis de atravessar os poros da membrana (massa molecular inferior a 8.000 Da). Esta fração foi denominada de água da diálise ou látex dialisado (DL).

3.5 - Determinações Físico-Químicas

O látex total de *C. procera* foi alvo de análise físico-química para a determinação qualitativa de diversos elementos inorgânicos. O látex foi coletado em água e posteriormente dez mililitros foram diluídos, também em água destilada, para um volume final de 2000 ml. Três amostras independentes foram preparadas e analisadas. As análises foram realizadas no Núcleo de Tecnologia do Estado do Ceará (NUTEC)

situado no Campus do Pici da UFC. Os ensaios foram realizados sob a responsabilidade de um químico do setor de análise físico-química. Foi avaliada a presença dos seguintes íons: HCO^{-3} , Ca^{+2} , Mg^{+2} , Cl^- , Fe^{+2} , SO_4^{-2} , NO_3^- , NO_2^- , NH_4^+ , P^{-3} .

3.6 - Determinações Bioquímicas

3.6.1 - Nitrogênio Total

A determinação do teor de nitrogênio total foi realizada através de método descrito pela AOAC (1990), sendo feitas às devidas adaptações necessárias para análise de proteínas vegetais. Esta determinação foi realizada apenas na fração denominada de proteínas do látex (LP).

A digestão de 100 μg de fração protéica do látex de *C. procer*a liofilizado foi realizada pela adição de 2,3 g da mistura catalisadora (sulfato de potássio e sulfato de cobre) e 2,3 ml de H_2SO_4 em tubo de micro-Kjeldahl (TECNAL 40/25) .

A temperatura de execução da digestão foi de 370°C , e foram necessárias 8 horas para sua conclusão. A amostra digerida foi transferida para outro balão volumétrico e colocada em contato com uma solução de 5 ml de ácido bórico, adicionada 2 a 3 gotas de indicadores vermelho de metila ou verde de bromocresol, 10 ml de solução de NaOH a 50 % . Posteriormente foram coletados 50 ml do destilado e titulado com HCl 0,02 N até o aparecimento da coloração violeta ou rosa.

Como se supõe que a proteína tem 16 % de nitrogênio, o fator 6,25 (100/16) foi usado para converter o nitrogênio total em proteína total.

3.6.2 - Proteínas totais solúveis

O teor de proteínas solúveis em quaisquer das amostras avaliadas foi estimado através do método de BRADFORD (1976) que utiliza o corante Coomassie Brilliant Blue G-250 como agente revelador. Volumes de 100 µl de amostra, foram analisados em diferentes concentrações (partindo de 10 mg/ml), adicionados 2,5 ml de reagente de BRADFORD. As amostras foram levemente agitadas e após 10 minutos as medidas espectrofotométricas das amostras foram determinadas em 595 nm usando um aparelho espectrofotômetro UtroSpec1000 (Pharmacia Bioscience, Piscataway, USA). Albumina Sérica Bovina, BSA (Sigma, St.Louis, USA) foi utilizada como padrão de referência para preparar o reagente.

3.6.3 - Determinação de Carboidratos solúveis

O teor de carboidratos da amostra foi determinado através do método descrito por DUBOIS *et al.* (1956). Respeitando a concentração de 10 mg/ml, foram utilizadas 0,5 ml da amostra, em diferentes concentrações; adicionados 0,5 ml de fenol 5 % e 2,5 ml de ácido sulfúrico concentrado. As misturas foram agitadas e após 15 minutos feitas as leituras das absorbâncias a 490 nm. A determinação da quantidade de carboidratos foi realizada, utilizando a glucose, como padrão, para a construção da curva de calibração.

3.6.4 - Ensaios Cromatográficos

Três ensaios cromatográficos distintos foram realizados com a fração LP no intuito de caracterizá-la quanto a sua composição protéica. O primeiro procedimento foi submeter uma amostra de LP a uma coluna de quitina. Uma massa correspondente a 10 mg de LP liofilizada foi solubilizada em água destilada e submetida a centrifugação em centrífuga modelo 5417-R (Biopharma, New York, USA) durante 10 minutos a 10 °C. Após a centrifugação o material solúvel foi aplicado na coluna de quitina que havia sido previamente equilibrada na mesma solução de dissolução da amostra. A cromatografia foi realizada à temperatura de 25 °C, com fluxo constante de 30 ml/hora. As frações foram coletadas em tubos (3 ml/tubo). A presença de proteínas nas frações coletadas foi avaliada através da leitura de absorbância de cada fração em 280 nm usando um Espectrofotômetro UtroSpec1000 (Pharmacia Biosciences, Piscataway, USA). Após a detecção da passagem das proteínas não retidas na coluna, a mesma foi então lavada com uma segunda solução de HCl 0,1 N com o objetivo de eluir possíveis proteínas retidas na matriz. A detecção destas foi realizada da mesma forma descrita acima. As frações contendo proteínas eluídas com cada uma das soluções foram reunidas, submetidas à diálise e liofilizadas para análise posterior.

O segundo ensaio cromatográfico foi realizado em uma coluna de Sepharose 4B (Sigma, St.Louis, USA) contendo tripsina bovina imobilizada. Sobre esta matriz a fração LP foi cromatografada em tampão Tris-HCl 100 mM, pH 7,6 contendo 150 mM. A amostra foi preparada de forma similar à descrita acima. As condições da cromatografia foram as mesmas salvo que o fluxo foi de 10 ml/h, frações de 2,5 ml

foram coletadas e a coluna foi eluída posteriormente com tampão glicina 100 mM pH 2,6 contendo NaCl 150 mM.

O terceiro procedimento cromatográfico foi um re-fracionamento da fração LP em coluna de CM-Sepharose Fast Flow (GE Healthcare, Piscataway, USA). Esta cromatografia de troca-iônica foi realizada em pH 5,0 com tampão acetato de sódio 50 mM. A amostra foi preparada sob as mesmas condições anteriores, mudando apenas as soluções. O fluxo foi de 15 ml/h, frações coletadas de 2 ml e após a eluição das proteínas não retidas, a coluna foi lavada com soluções de NaCl em crescente concentração. As frações oriundas desta cromatografia foram analisadas em eletroforese e alvo de ensaios larvicida contra o *St. aegypti*.

3.6.5 - Análise de Proteínas Através de Eletroforese

3.6.5.1 - Proteínas ácidas

Os experimentos de eletroforese em gel de poliacrilamida foram conduzidos de acordo com o método descrito por LAEMMLI (1970), e adaptado para experimentos de géis em placas. O gel de aplicação foi preparado respeitando a concentração de 5 % de poliacrilamida e montado em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8. O gel de separação foi preparado através de um gradiente variando entre 5 a 12,5 % de poliacrilamida. A solução utilizada nas câmaras catódica e anódica foi o tampão Tris-HCl 3 M, pH 8,8. A fração protéica liofilizada na concentração de 10 mg/ml, foi dissolvida em tampão Tris-HCl 625 mM, pH 6,8. Foi acrescentado às amostras 2 mg de sacarose e 3 µl de azul de

bromofenol. As amostras foram aplicadas em alíquotas correspondentes a 25 µl. As condições de corrida estabelecidas foram para voltagem de 85 a 100 V e para amperagem de 10 a 30 mA. O tempo de corrida foi de aproximadamente 2,5 horas, à temperatura de 25 °C. Ao término da corrida, cada gel foi corado em solução corante Coomassie Brilliant Blue-250 (1 %) por 4 horas e, em seguida, descorados em solução de ácido acético, água destilada e metanol (1:8:3,5,v,v,v).

3.6.5.2 - Proteínas básicas

Os experimentos de eletroforese para proteínas básicas foram conduzidos de acordo com o método descrito por REISFELD (1962), e adaptado para géis em placas. O gel de aplicação foi preparado respeitando a concentração de 5 % de poliacrilamida e montado em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8. O gel de separação foi preparado na concentração de 12,5 % de poliacrilamida. A solução utilizada nas câmaras catódica e anódica foi o tampão β-Alanina-ácido acético, pH 4,5. A fração protéica liofilizada na concentração de 10 mg/ml foi dissolvida em tampão KAc 500 mM, pH 6,8. Foi acrescentado 1 µl de β-mercaptoetanol, centrifugadas em centrífuga de bancada, em rotação correspondente a aproximadamente 6000 rpm, durante 5 minutos. Em seguida, foi adicionado ao sobrenadante obtido 2 mg de sacarose e 3 µl de fucsina básica. As amostras foram aplicadas em alíquotas de 20 µl.

As condições de corrida estabelecidas foram voltagem de 85-100 V e de amperagem 10-30 mA. O tempo de corrida foi de aproximadamente 2,5 horas, a temperatura de 25 °C. Ao término da corrida o gel foi corado em solução corante

Comassie Brilliant Blue (1 %) durante 4 horas e descorados em solução de ácido acético, água destilada e metanol (1:8:3,5,v,v,v).

3.6.5.3 - Detecção de Glicoproteínas em Gel

Os experimentos de eletroforese para caracterizar a presença de glicoproteínas, foram conduzidos de acordo com o método descrito por ZACHARIUS *et al.* (1969), e adaptado para géis em placas. O gel de aplicação foi preparado respeitando a concentração de 5 % de poliacrilamida e montado em tampão Tris-HCl 0,5M, pH 6,8. O gel de separação foi preparado através de um gradiente variando de 5 a 12,5 % de poliacrilamida. A solução utilizada nas câmaras catódica e anódica foi o tampão Tris-HCl 3 M, pH 8,8. A fração protéica liofilizada, na concentração de 10 mg/ml, foi dissolvida em tampão Tris-HCl 625 mM, pH 6,8. Foram acrescentadas às amostras 20 mg de sacarose e 3 µl de azul de bromofenol. As amostras foram aplicadas em alíquotas correspondentes a 25 µl.

As condições de corrida estabelecidas foram voltagem de 85-100 V e para amperagem de 10-30 mA. O tempo de corrida foi de aproximadamente 2,5 horas, à temperatura de 25 °C. Ao término da corrida, o gel foi transferido para uma solução fixadora de ácido acético 7,5 % e após 1 hora foi novamente transferido para uma solução de ácido periódico 0,2 %, deixado por aproximadamente 45 minutos, em temperatura de 4 °C. Em seguida, o gel foi corado com o Reagente de Schiff, a temperatura de aproximadamente 8 °C, por 45 minutos. O descoramento foi feito com solução de metabissulfito de potássio 0,5 % em HCl 0,05 N.

3.6.5.4 - Eletroforese Bidimensional Para Proteínas Totais

Para a focalização isoeétrica foram utilizados géis com gradiente de pH imobilizado produzido pela (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden). Os géis tinham 11 cm de comprimento e a faixa de pH variava entre 6 e 11. As amostras referentes a quantidade de 1 mg da fração protéica LP foram aplicadas nos géis durante a re-hidratação, sendo solubilizadas em 200 µl em solução de hidratação contendo Uréia 8 M, Tiouréia 2 M, DTT 65 mM, Triton-X100 1 %, Tampão IPG 5 % e Azul de Bromofenol. Com o intuito de efetivar a absorção da amostra pela fita de gel (11 cm x 0,4 cm), foram deixadas em contato durante 12 horas, em uma cuba de re-hidratação “Reswellin Tray”(Pharmacia Biotech, Piscataway, USA) e cobertas com óleo DryStrip (Pharmacia Biotech, Piscataway, USA) para evitar ressecamento ou evaporação da amostra. A focalização isoeétrica foi realizada em um aparelho Multiphor II (Pharmacia Biotech, Piscataway, USA) alimentado por uma fonte EPS 3500XL (Pharmacia Biotech, Piscataway, USA) em modo gradiente. O procedimento transcorreu em cinco etapas: i) 1h; 200V, ii) 1h; 500 V, iii) 1h; 1000V, iv) 1h; 2500 e v) 3500 V.

Após a focalização isoeétrica as tiras de géis foram tratadas em solução contendo Tris-HCl 50 mM , glicerol 30 %, Uréia 6 M, SDS 2 % e Azul de Bromofenol. Para equilíbrio dos géis, estes foram transferidos para frascos contendo 10 ml de solução de equilíbrio e 100 mg de DTT, sendo submetidas à suave agitação durante 10 minutos. Em seguida, os géis foram postos no topo do gel de segunda dimensão e fixados com tampão de corrida contendo 1,5 % de agarose. A eletroforese da segunda dimensão foi realizada em sistema vertical. As dimensões dos géis utilizados foram 14 X 14 cm, contendo 30 ml do gel de separação a 15 % de poliacrilamida. O sistema foi

alimentado por uma fonte Power-Pac 3000 (BIO-Rad, Foster, USA). As condições estabelecidas para a corrida foram voltagem de 180 V e amperagem de 30 mA. A corrida foi realizada em 6 horas. Ao término da corrida, os géis foram corados em solução corante Comassie Brilliant Blue-R (1 %) durante 6 horas e em seguida descorados em solução de ácido acético, água destilada e metanol (1:8:3,5,v,v,v).

3.7 - Detecção de Glicoproteínas Através de Ensaio Baseado em Ressonância Plasmônica de Superfície.

A interação cinética das proteínas solúveis presentes na fração LP com as lectinas de sementes de *Cratylia floribunda* e lectina de sementes de *Artocarpus integrifolia* immobilizadas foi medida em tempo real, baseando-se na técnica de Ressonância Plasmônica de Superfície, utilizando um aparelho BiaCore 3000 (Pharmacia Biosensor, Piscataway, USA). Uma descrição acessível do princípio desta tecnologia foi descrito por RAMOS (1996) e mais recentemente por BOMFIM (2005). Outras citações importantes sobre o equipamento e suas aplicações podem ser conseguidas em referências complementares (ZENG *et al.*, 1998; SATOH & MATSUMOTO, 1999; CANZIANI *et al.*, 1999).

Lectina de sementes de *Cratylia floribunda* denominada CFL foi purificada no laboratório. Esta proteína tem sítios de interação para carboidratos que reconhecem com elevada especificidade estruturas oligomanosídicas (RAMOS *et al.*, 1999; RAMOS *et al.*, 2002). As sementes de *Artocarpus integrifolia* possuem duas lectinas distintas. A lectina que possui especificidade por α -galactose foi utilizada nos experimentos. A lectina foi uma doação do Professor Henri Debray da Université des Sciences et

Tecnologies de Lille (França). Ambas as proteínas purificadas (200 µg/ml), foram ligadas a uma camada de dextrano do “sensor chip” CM-5 utilizando um kit de ligação amino, seguindo as instruções do fabricante. Para ligar-se, cada lectina (1 mg/ml) foi dissolvida em tampão acetato 10 mM, pH 4,0. Os grupos bloqueados não-reacionais remanescentes, foram abertos com etanolamina. A fração LP (100 - 1000 µg/ml), foi injetada na superfície celular do sensor na taxa de fluxo de 5 µl/min durante 300 segundos (fase de associação) e dissociação para um tempo equivalente em tampão HBSBiacore® (Pharmacia Biosensor, Piscataway, USA) . A intensidade de interação foi considerada como a diferença entre unidades arbitrárias de ressonância (RU) no momento da injeção e o início e final da fase de dissociação desprezando o tamanho da contribuição causado pela passagem da amostra sobre a superfície do sensor. Para os ensaios de inibição, 25 µl de 100 mM de α -metilmanosídeo foram injetados no final da fase de dissociação e deduzidos para interação durante 300 segundos, e seguido pela corrida em tampão HBSBiacore® (Pharmacia Biosensor, Piscataway, USA). Todos os experimentos foram conduzidos a 25 °C. A regeneração do fluxo da célula foi obtida por duas injeções sucessivas de 10 µl 10 mM HCl e 10 mM NaOH para remover o material remanescente depositado sobre a superfície do sensor. Para investigar a possível presença de lectinas na amostra PL, a mesma foi submetida a uma análise de interação com diferentes glicoproteínas. Estas foram lactotransferrina Humana (LTF), lactotransferrina Bovina (LTB), sorotransferrina Humana (LTF) e a própria lectina jacalina (JACALIN), que é uma glicoproteína. Os processos de imobilização foram similares aos descritos acima e aparecem com detalhes em RAMOS *et al.* (2000) e RAMOS *et al.* (2001).

3.8 - Espectrometria de massas

Um espectro de massas para a fração LP foi adquirido a partir um aparelho Espectrômetro de Massas modelo MALDI-TOF (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) com fonte de ionização do tipo *Electron Spray Ionization* (ESI), analisador tipo *Time of Fly* (TOF) e detector do tipo multiplier. Esta análise foi realizada na Université des Sciences et Technologies de Lille e conduzida pelo especialista em espectrometria de massas responsável pela manipulação do aparelho.

3.9 - Produção de anticorpos policlonais em coelhos para a fração LP

A síntese de anticorpos policlonais para as proteínas da fração LP foi estimulada em coelho albino (*Oryctolagus cuniculus*) da linhagem Nova Zelândia. O animal foi adquirido do criatório de coelhos do Departamento de Zootécnica da Universidade Federal do Ceará. O coelho ainda jovem foi permitido atingir a idade adulta (seis meses) mantido no biotério do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC. No dia inicial da estimulação, o animal foi sangrado através de uma punção na veia principal marginal da orelha e aproximadamente 25 ml de sangue foi coletado e mantido em estufa bacteriológica durante uma hora a temperatura de 37 °C até a coagulação. Posteriormente o soro foi separado da fase sólida (coágulo) e centrifugado em centrífuga de bancada durante 10 minutos, temperatura média de 25 °C em velocidade correspondente a 5000 x g. O precipitado obtido (fragmentos celulares) foi descartado e o sobrenadante submetido a diálise e liofilização. Este material foi denominado soro não imune.

A primeira administração do antígeno foi realizada por via intramuscular na coxa traseira do animal. A amostra constituiu-se de 10 mg/ml de LP dissolvidas em solução salina 150 mM unida a igual volume do adjuvante completo de Freund completando um volume de 1 ml. Este dia foi contado como dia “zero” da administração do antígeno. Doses de reforço para estimulação da produção de anticorpos foram realizadas nos dias 21, 36 e 42. Nestas ocasiões as amostras, na mesma concentração anterior, foram dissolvidas somente em salina 150 mM sem o adjuvante, e a injeção de 1 ml foi administrada por via sub-cutânea no dorso do animal. A coleta de sangue para obtenção do soro foi realizada no dia 35 (antes da administração da dose de reforço), sendo seguido o mesmo procedimento descrito acima até a obtenção dos anti-soros liofilizados correspondentes aos dias 36 e 42.

3.10 - Imunodifusão Dupla de Ouchesterlony

Os ensaios de imunodifusão dupla foram realizados em gel de agarose (Pharmacia Biotech, Piscataway, USA) 2 % contendo 0,02 % de azida sódica. O gel, recém preparado e aquecido a 100 °C foi depositado sobre lâminas microscópicas (26 x 76 mm) perfazendo um volume médio de 5,5 ml. Após resfriamento e solidificação dos géis nas placas estes foram perfurados com o auxílio de um instrumento cilíndrico cortante que produziu furos esféricos de diâmetro aproximado de 2 mm e capacidade volumétrica média de 10 µl. Os furos foram feitos em posições equidistantes e em distribuição radial, havendo um furo no centro.

As soluções de antígenos (LP) e anticorpos (anticorpos totais polinoclonais anti-LP produzidos em coelho e soro não imune) foram preparados em solução de cloreto de

sódio 150 mM contendo 0,02 % de azida sódica. Os anticorpos em estado liofilizado foram preparados para encerrar a concentração de 35 mg/ml. O antígeno foi preparado a 1 mg/ml e a partir desta solução outras diluições foram preparadas.

As amostras foram depositadas nas placas de modo que os anticorpos ocuparam sempre a posição central e as soluções de antígeno em diferentes concentrações foram aplicadas nos poços radiais. A dupla difusão de antígenos e anticorpos foi realizada durante 48 horas a temperatura de 25 °C em ambiente de câmara umedecida com solução de azida sódica 0,02 %. Ao final do período de difusão, as placas com gel foram imersas em uma solução de 0,1 % de corante de Coomassie Brilliant Blue R-350 (GE Healthcare, Piscataway, USA) em ácido acético 7% por 1 minuto, seguido de descoloramento em solução contendo 5 % (v/v) de metanol, 7 % (v/v) de ácido acético glacial e água 88 %. Ao final, as placas foram submetidas cuidadosamente a um fluxo de calor com o uso de um secador de cabelos de modo a serem desidratadas e posteriormente fotografadas e analisadas.

3.11 - Determinação da Atividade Hemaglutinante

O ensaio da atividade hemaglutinante foi realizado segundo a metodologia descrita por MOREIRA e PERRONE (1977). As amostras a serem avaliadas foram submetidas a diluições seriadas em tubos de ensaio na presença de NaCl 0,15M (1/2; 1/4; 1/8; 1/16). A cada 100 µl de cada diluição foram adicionados 100 µl de uma suspensão de hemácias (2 %), tratadas ou não com a enzima proteolítica tripsina, previamente preparada. Os tubos foram posteriormente incubados a 37 °C por 30 minutos e deixados em repouso à temperatura ambiente, por mais 30 minutos, sendo

então centrifugados a 4000 x g, durante 30 segundos. A presença dos aglutinados foi observada visualmente e os resultados foram expressos em unidade de hemaglutinação (UH), definida como o inverso da maior diluição da amostra, ainda capaz de aglutinar hemácias.

A técnica utilizada para o tratamento enzimático dos eritrócitos necessários nesse experimento, foi descrita por LIS e SHARON (1972). As amostras de sangue foram lavadas três vezes com NaCl 0,15 M. Posteriormente foi adicionada a enzima tripsina na proporção de 0,1 mg para 10 ml da suspensão de eritrócitos 2 %.

A suspensão foi incubada durante 1 h por 4 °C e após esse período foi centrifugada a 4000 x g, 5 minutos. Os eritrócitos tratados com a enzima foram novamente lavados com NaCl 0,15M por mais 6 vezes. O sobrenadante foi descartado e material de interesse suspenso em um volume de NaCl 0,15M para obtenção de hemácias a 2 %.

3.12 - Ensaio enzimáticos

Ensaio enzimáticos foram realizados na fração LP com o objetivo de caracterizar a presença de enzimas relacionadas à defesa e ao metabolismo oxidativo de plantas. Foram realizados ensaios para determinar a presença de atividades para as enzimas quitinase, APX, catalase e SOD.

A determinação da atividade quitinolítica em diferentes frações do látex de *C. procer*a foi conduzida de acordo com a metodologia descrita por BOLLER (1992). A metodologia consiste em avaliar por meio de colorimetria, a liberação de *N*-acetil-D-glucosamina (NAG), em função da atividade da enzima quitinase sobre quitina coloidal.

Foram preparadas amostras do látex fresco dialisado, da fração protéica liofilizada, pico não retido na coluna de quitina (PI) e o pico retido na coluna de quitina (PII), dissolvidas em água destilada, todas respeitando a concentração de 10mg/ml. Para o início do ensaio foram pipetados 250 µl de cada uma das amostras em eppendorfs de 1,5 ml contendo 250 µl de quitina coloidal (10 mg/ml). As amostras (exceto as correspondentes ao controle do ensaio) foram incubadas, à temperatura de 37 °C, durante 60 minutos. Em seguida, foram submetidas à fervura em banho-maria, à temperatura de 80 °C, durante 10 minutos, visando interromper a reação enzimática. Após o resfriamento, todas as amostras foram centrifugadas, em centrífuga refrigerada modelo 5417 R (Biopharma, New York, USA) a velocidade de 10.000 x g, à temperatura de 25 °C, durante 30 minutos. Foram coletados 300 µl do sobrenadante resultante de cada uma das amostras e colocados em contato com 10 µl uma solução diluída da enzima glucoronidase (E.C. 3.2.1.31, Sigma, St.Louis, USA); a mistura reacional foi incubada a 37 °C, durante 60 minutos. A reação enzimática foi interrompida através de fervura em banho-maria, a 100 °C, durante 10 minutos. Após resfriamento, foram adicionados a cada eppendorf 190 µl de água grau Milli-Q, 100 µl de tetraborato de sódio e potássio 0,6 M. A mistura foi aquecida em banho-maria a 100 °C, durante 5 minutos. Quando as amostras atingiram a temperatura ambiente, foi adicionado a cada eppendorf 1 ml de solução ρ-dimetil-aminobenzaldeído (DMAB) (100 mg/ml). A leitura para a determinação óptica de *N*-acetil-D-glucosamina, liberado durante a reação enzimática, foi medida a 585 nm. Os cálculos referentes aos dados colorimétricos foram executados através da construção de uma curva padrão a partir de concentrações conhecidas de *N*-acetil-D-glucosamina, variando de 100 a 500 µM (REISSIG *et al.*,1955). A atividade quitinásica foi expressa em nanokatal (nkat) por

miligrama de proteína, em que 1 nkat equivale a liberação de 1,0 μmol de *N*-acetil-D-glucosamina por mililitro por minuto.

Com a finalidade de avaliar a termoestabilidade da atividade quitinásica presente na fração protéica liofilizada, amostras de concentração referente a 10mg/ml, foram dissolvidas em água destilada, centrifugadas em centrífuga eppendorf modelo 5417 R (Biopharma, New York, USA) a velocidade de 10.000 x g, a temperatura de 25 °C, durante 10 minutos. O sobrenadante obtido foi transferido para eppendorfs e exposto a diferentes temperaturas, durante 30 minutos. As temperaturas selecionadas para exposição das alíquotas foram: 45 °C, 60 °C e 80 °C, antes que fossem submetidas ao ensaio para determinar a atividade quitinolítica, conforme descrito no item anterior.

A determinação da atividade da enzima peroxidase do ascobarto (APX) na fração protéica do látex de *C. procera* foi investigada através do método espectrofotométrico descrito por NAKANO (1981), no qual a enzima APX catalisa a reação em que o H_2O_2 é degradado. Foram dissolvidos 50 mg da fração protéica do látex *C. procera* liofilizado em 5 ml de tampão fosfato de Potássio dibásico 100 mM, contendo EDTA 0,1 mM, pH 7,0. Em seguida a mistura foi centrifugada em centrífuga eppendorf modelo 5417 R (Biopharma, New York, USA), na velocidade 10.000 x g, durante 10 minutos, à temperatura 4 °C. A solução reacional foi preparada em tubos de ensaio com 1350 μl de tampão fosfato de potássio monobásico 50 mM, contendo EDTA 0,25 mM, pH 6,0. Foram adicionados 50 μl das alíquotas do sobrenadante obtido após a centrifugação, 50 μl de solução de peróxido de hidrogênio 30 mM e 50 μl de ácido ascórbico 15 mM. As amostras foram mantidas em banho-maria, à temperatura de 30 °C, durante todo o experimento. A leitura das absorbâncias da mistura reacional foi

medida a 290 nm e os valores obtidos utilizados para determinar a atividade enzimática da APX.

A determinação da atividade da enzima catalase (CAT) na fração protéica do látex de *C. procera* foi investigada através do método descrito por BEERS (1952), fundamentada na capacidade da enzima CAT catalisar a degradação de H₂O₂ em água e oxigênio gasoso. Foram dissolvidos 50 mg da fração protéica do látex *C. procera* liofilizado em 5 ml de tampão fosfato de potássio dibásico 100 mM, contendo EDTA 0,1 mM, pH 7,0 centrifugadas em centrífuga eppendorf modelo 5417 R (Biopharma, New York, USA) , na velocidade 10.000 x g, durante 10 minutos, a temperatura 4 °C. A solução reacional foi preparada em tubos de ensaio com 1290 µl de tampão fosfato de potássio monobásico 100 mM, contendo EDTA 0,1 mM, pH 7,0, adicionados 150 µl das alíquotas do sobrenadante obtido após a centrifugação, 60 µl de solução de peróxido de hidrogênio 500 mM , as amostras foram mantidas em banho-maria, a temperatura de 30 °C, durante todo o experimento. A leitura das absorbâncias da mistura reacional foi medida a 240 nm e os valores obtidos utilizados para determinar a atividade enzimática da CAT.

A determinação da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) na fração protéica do látex de *C. procera* foi investigada através do método descrito por GIANNOPOLITIS (1977). A referida enzima é capaz de inibir a formação de Formanzana (cor azul), na reação em que o radical superóxido, formado a partir da redução da riboflavina, responsável pela liberação de elétrons para o oxigênio, é reduzido a peróxido de hidrogênio. Foram dissolvidos 50 mg da fração protéica do látex *C. procera* liofilizado em 5 ml de tampão fosfato de Potássio dibásico 100 mM, contendo EDTA 0,1 mM, pH 7,0 centrifugadas em centrífuga eppendorf modelo 5417 R

(Biopharma, New York, USA), na velocidade 10.000 x g, durante 10 minutos, a temperatura 4 °C. A solução reacional foi preparada em tubos de ensaio com 1000 µl de tampão fosfato de potássio monobásico 50 mM, contendo EDTA 0,1 mM, metionina 19,5 mM, pH 7,8. Foram adicionados 50 µl das alíquotas do sobrenadante obtido após a centrifugação, e na ausência de luz, foram adicionados a cada eppendorf 150 µl de solução de NBT 750 mM e 300 µl de riboflavina 10 µM. As amostras foram transferidas para uma caixa iluminada por uma lâmpada fluorescente de 20 W, durante 15 minutos. A leitura das absorbâncias da mistura reacional foi feita a 560 nm, se resguardando da luminosidade, e os valores obtidos utilizados para determinar a atividade enzimática da SOD.

3.13 - Ensaio Biológico

3.13.1 - Ensaio Biológico com o *St. aegypti*

Foi realizada uma série de ensaios independentes que tiveram como principal objetivo investigar o possível efeito deletério do látex de *C. procerca* sobre a eclosão de ovos do inseto ou sobre seu desenvolvimento. Os ensaios foram conduzidos tanto com o látex fresco coletado em água destilada (1:1;v:v) como para as seguintes frações: a fração não dialisável contra água e livre de borracha e posteriormente liofilizada (LP); os três picos (PI,PII e PIII) obtidos pelo fracionamento de LP em cromatografia de troca-iônica em coluna de CM-Sepharose Fast Flow (GE Healthcare, Piscataway, USA) posteriormente dialisados e liofilizados e a fração correspondente a água usada após uma hora de diálise contra água destilada.

3.13.1.1. - Ensaio de Avaliação da Toxicidade do látex Total de *C. procera* sobre larvas de *St. aegypti*

Os ensaios realizados com o intuito de avaliar a toxicidade do látex fresco e os efeitos das LP e DL sobre as larvas no terceiro estágio de desenvolvimento foram conduzidos da seguinte maneira: o látex fresco de *C. procera* foi coletado em água destilada, como descrito anteriormente, e diluições em série (a partir de 1:10.000) foram preparadas em ordem, para obter concentrações decrescentes de seus componentes tóxicos. Dez larvas no terceiro estágio larval foram adicionadas a tubos de ensaio (20 mm x 100 mm) contendo 5 ml de cada diluição. O procedimento experimental, realizado, em triplicata, foi mantido por 24 h a 25 °C.

A fração LP liofilizada, na concentração de 10 mg/ml, foi diluída em água destilada em tubos de ensaio, para as dadas diluições em série 1:2, 1:10, 1:50, 1:100 e 1:500. Dez larvas no terceiro estágio foram adicionadas a cada tubo e seu desenvolvimento monitorado por 48 h. Os experimentos foram conduzidos a 25 °C, em triplicata com 10 indivíduos em cada tubo contendo 5 ml de solução.

A atividade larvicida dos três picos (PI, PII e PIII) obtidos a partir da fração LP, cromatografada em coluna de CM-Sepharose Fast Flow (GE Healthcare, Piscataway, USA) foram avaliados separadamente. Cada pico cromatográfico, na concentração de 200µg/ml foi diluído em água destilada em tubos de ensaio. Dez larvas no terceiro estágio foram adicionadas a cada tubo e seu desenvolvimento monitorado por 48 hs. Os experimentos foram conduzidos a temperatura ambiente, em triplicata, com 10

indivíduos em cada tubo contendo 5 ml de solução e como nos ensaios anteriores usados como controle água destilada e Albumina Sérica Bovina- BSA (Sigma, St. Louis, USA).

A fração DL e suas diluições em água destilada foram preparadas em tubos de ensaio (5 ml), em triplicata. Dez indivíduos no terceiro estágio larval de desenvolvimento foram colocados dentro de cada um dos tubos e as larvas sobreviventes observadas por 24 h. Todos os resultados foram expressos pelo percentual de mortalidade após 1, 3 e 24 h de exposição.

Com o intuito de evidenciar a natureza das substâncias que causaram a mortalidade das larvas, ambas às frações LP e DL foram submetidas a aquecimento a 100 °C por diferentes períodos de tempo. Os resultados foram expressos como o percentual de mortalidade.

Em outros ensaios, ambas as frações LP e DL foram submetidas à ação enzimática utilizando proteases de *Streptomyces griseus* (Sigma-5147, St. Louis, USA) durante 24 h a 37 °C em uma solução tampão PBS 100 mM pH 7,5. A enzima foi utilizada em uma proporção de 1: 100 (p/p) e adicionada três vezes nos intervalos de tempo correspondentes a 0 h, 12 h e 18 h de digestão. Após a digestão, as amostras foram aquecidas a 60 °C durante 10 min para inativação da ação enzimática. As amostras foram então diluídas para um volume final de 200 ml de água destilada contendo 1 % de etanol e quatro replicatas de 1000 µg/ml (PL) e 5000 µg/ml (DL) foram preparadas. Em seguida cada amostra recebeu 50 larvas no terceiro estágio de desenvolvimento larval. Controles foram feitos contendo a enzima em água e água contendo 1 % de etanol. Os experimentos foram conduzidos em recipientes de vidro de 40 ml e deixados em uma câmara de crescimento com temperatura (25 °C) com ciclo de

claro/escuro (12:12 h) controlados. O ensaio foi observado por 24 horas e os resultados foram expressos como o percentual de mortalidade.

3.13.1.2 - Ensaio de Avaliação da Toxicidade do látex Total de *C. procera* sobre eclosão de ovos do *St. aegypti*

O efeito das frações LP e DL sobre a eclosão dos ovos do *Aedes Aegypti* foi avaliado da seguinte maneira: os ovos de *St. aegypti* aderidos a tiras de papéis (1 cm²) foram contados com o auxílio de um microscópio luminoso comum e transferidos para tubos de ensaio (20 mm x 100 mm) contendo 3 ml de cada amostra. A fração protéica liofilizada (LP) foi dissolvida em água destilada, na concentração de 200 µg/ml, concentração tóxica para larvas do terceiro estágio. A DL foi preparada e usada após a diálise como descrito anteriormente ou liofilizada e re-solubilizada como anteriormente descrito. Albumina Sérica Bovina BSA (Sigma, St.Louis, USA) foi usada como padrão na mesma concentração da maior dose de LP testada nos ensaios anteriores (5 mg/ml). Todas as amostras foram diluídas em diferentes concentrações em água destilada e a eclosão dos ovos monitorada por 24, 48 e 72 h. A água destilada na ausência de proteínas foi utilizada como controle negativo. Posteriormente, ambas as frações LP e DL foram também submetidas a tratamento térmico previamente e ensaiadas como descrito. A taxa de eclosão dos ovos foi monitorada por 24, 48 e 72 h. Todos os ensaios foram conduzidos a 25°C e em triplicata.

3.13.1.3 - Ensaios de toxicidade das frações do látex de *C procera* para camundongos

O uso de camundongos para os ensaios de toxicidade foi conduzido em concordância com os princípios internacionalmente aceitos para o uso de animais de laboratório como descrito nas diretrizes da Comunidade Européia (EEC Directive of 1986; 86/609/EEC).

Grupos de seis animais (3 machos e 3 fêmeas) foram separados de forma aleatória e transferidos para gaiolas. Os animais tiveram livre acesso a água e comida e foram mantidos no laboratório a 25 °C.

A toxicidade aguda foi verificada de acordo com método descrito por MILLER & TAINER (1944). Soluções contendo 3, 10, 30, 100 e 300 mg das LP/kg de massa corpórea animal dissolvidas em 100 µl solução salina estéril (NaCl 0,15 M) foram injetadas por via endovenosa através do plexo retro-orbital dos animais.

A toxicidade da fração DL, constituída de componentes de baixa massa molecular, foi avaliada de acordo com o método previamente descrito por LITCHFIELD & WILCOXON (1949). Amostras de DL em concentrações variando de 78 a 1.250 mg de DP/kg de massa corpórea por animal, foram dissolvidas em 200 µl solução salina estéril e injetadas na cavidade peritoneal dos camundongos.

Em ambos os experimentos, os animais foram observados quanto às mudanças nos padrões fisiológicos de micção, defecação e alterações comportamentais e morte durante 48 horas.

IV. RESULTADOS

Após coleta em água, o látex de *Calotropis procera* foi submetido a etapas laboratoriais de centrifugação e diálise. Estes procedimentos permitiram a obtenção de três frações principais do látex. A fração borracha (RL), caracterizada principalmente por seu aspecto esbranquiçado; insolubilidade em água e de constituição química presumida de polímeros de isopreno. A fração LP, representada pelo material solúvel em água que ficou retido na solução pela membrana de diálise a qual foi bem caracterizada pela riqueza em proteínas e a fração DL, que reuniu as moléculas que não ficaram retidas no interior da membrana de diálise mas que eram solúveis em água. Esta fração (DL) é considerada ser constituída por íons e partículas moleculares com massas moleculares inferiores a 8.000 Da.

Neste trabalho o látex em sua forma íntegra bem como as três frações obtidas foram alvo de análise físico-química, investigações bioquímicas e ensaios de toxicidade em modelos biológicos.

O látex fresco de *Calotropis procera* em solução aquosa foi submetido a avaliação físico-química. Estas análises apontaram a presença em maior quantidade dos íons HCO^{-3} , Mg^{+2} , Cl^{-} e SO_4^{-2} enquanto que Ca^{+2} e Fe^{+2} não foram detectados. Quantidades mínimas de NO_3^{-} , NO_2^{-} , NH_4^{+} e P^{-3} foram identificadas (TABELA 1). O pH do látex foi determinado como sendo igual a pH 5,1.

TABELA 1 – Composição Físico-Química do látex fresco da planta *Calotropis procera*^a

Látex Fresco^b					
(mg/ml de látex)	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	X	Xσ_{n-1}
HCO⁻³	9,5459	10,3908	- 0,0246	6,6374	5,7849
Mg⁺²	6,8092	8,7324	7,2252	7,5859	1,0119
Cl⁻	5,2860	6,5149	5,4748	5,7586	0,6618
Ca⁺²	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Fe⁺²	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
SO₄⁻²	0,0256	0,0284	0,0264	0,0268	0,00144
NO₃⁻	0,0004	0,0006	0,0005	0,0005	0,0001
NO₂⁻	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0000
NH₄⁺	0,0004	0,0004	0,0004	0,0004	0,0000
P⁻³	0,0003	0,0003	0,0034	0,0013	0,0018

^a Estas análises foram realizadas no laboratório de Físico-química do NUTEC, órgão do Governo de Estado do Ceará. ^b10 mL de látex total diluído em 2000 mL de água destilada.

A partir do fracionamento do látex, suas frações foram liofilizadas e uma estimativa do rendimento desta foi estabelecida a partir de seis amostras coletadas separadamente. Para isto seis amostras independentes foram avaliadas em separado seguindo exatamente o mesmo procedimento para cada amostra. Os resultados estão apresentados na TABELA 2. Como pode ser observado, a fração com características de borracha (RL) prevalece no látex, compreendendo mais de 80 % de sua massa seca. Como será descrito adiante, uma pequena quantidade de material protéico pode ser recuperado da fração de borracha após o processo de liofilização ou por re-extração da mesma com diferentes soluções. Esta fração, que foi inicialmente denominada de proteínas ligadas à borracha foi posteriormente considerada como proteínas do látex

(LP). O látex da planta *C. procera* apresentou aproximadamente 15 % de sua massa seca constituída por proteínas. Análise quantitativa de proteínas totais solúveis presentes no látex revelou que o material apresenta em média 8,18 mg de proteína por ml de látex. Quando a fração protéica do látex foi submetida à determinação de teor de nitrogênio pelo método de AOAC (1990) a massa protéica na fração LP foi estimada corresponder a 74 % em uma massa liofilizada (74 mg de proteínas em 100 mg de material LP liofilizado). O teor de carboidratos determinado pelo método de DUBOIS *et al* (1956) foi muito baixo - (0,483 mg/ml) no látex total. Não foi avaliado o teor de carboidratos nas demais frações.

TABELA 2 – Rendimento do fracionamento do látex de *Calotropis procera* e estimativa do teor de proteínas nas frações

Amostras (20 ml de látex)	Massa De borracha		Massa de proteínas ligadas à borracha		Massa de proteínas solúveis		Total de massa protéica (mg/ml)	Teor real de proteína (mg/ml)	Teor de proteínas solúveis (Bradford) (mg/ml)
	mg	%	mg	%	mg	%			
01	1.245	87,86	Nd	Nd	172	12,1	8,6	6,31	9,7
02	1.467	87,62	66	3,9	140	8,3	10,3	7,62	5,7
03	1.381	86,23	86	5,3	135	8,4	11,05	8,17	9,8
04	1.548	81,99	108	5,7	232	12,2	17	12,5	7,5
05	1.514	84,29	102	5,6	180	10,0	14,1	10,43	N.D
06	1.623	81,85	145	7,31	215	10,84	18	13,32	N.D
\bar{X}	1463	84,97	101,4	5,56	179	10,03	13,1	9,7	8,18
SD	122,2	2,45	26,2	1,08	35,6	1,57	3,47	2,57	1,69

N.d - Não determinada; ; Teor real de proteína = massa protéica da fração LP, determinada pelo método de KJELDAHL (AOAC,1990), correspondente a 74% em massa liofilizada.

Na etapa seguinte, as frações foram avaliadas em gel de poliacrilamida na presença ou ausência de SDS e 2-mercaptoetanol. Foi observado que a fração LP apresenta diversas proteínas com massas moleculares relativas que variam entre 8.000 e 95.000Da (FIGURA 3). Este padrão protéico foi modificado na ausência de 2-mercaptoetanol, sugerindo a existência de proteínas com ligações S-S intracadeias (FIGURA 4). LP foi ainda submetida a eletroforese desenvolvida para proteínas básicas (PI > 7,0). Foi observada a presença de proteínas com caráter básico (FIGURA 5). A característica predominante de proteínas básicas na fração LP foi confirmada posteriormente através da condução de uma corrida eletroforética bidimensional, na qual a referida fração apresentou-se bastante heterogênea. Na primeira análise, usando-se um gradiente de pH de 3 a 10, praticamente todas as proteínas se concentraram na região básica do gel. Na segunda análise, um gradiente de pH imobilizado variando de 6 a 11 foi aplicado. Um conjunto de proteínas foi observado neste intervalo de pH com massas relativas condizentes com a análise em uma dimensão. Estes dados estão apresentados na FIGURA 6.

Um espectro de massas obtido por espectrometria em MALDI-TOF (MDS) confirmou o perfil protéico da fração LP (proteínas do látex) com massas de 10.000 a 97.000 Da (FIGURA 7).

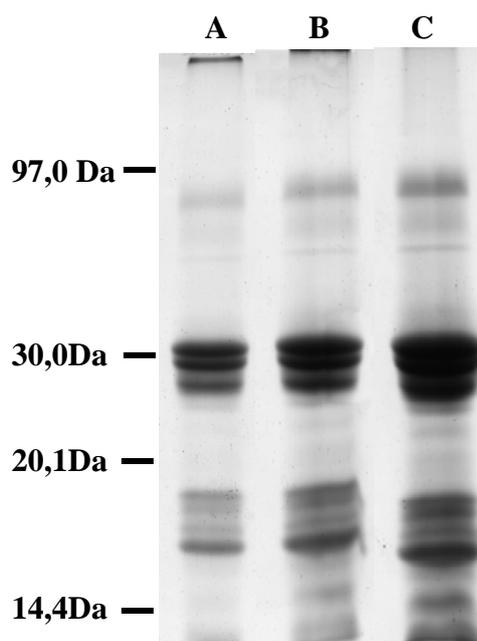


FIGURA 3 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) em presença de SDS e 2-mercaptoetanol da fração proteínas do látex (LP) de *Calotropis procera*. Foram carregados 5, 10, 15 µg da fração LP nos poços A, B e C respectivamente.

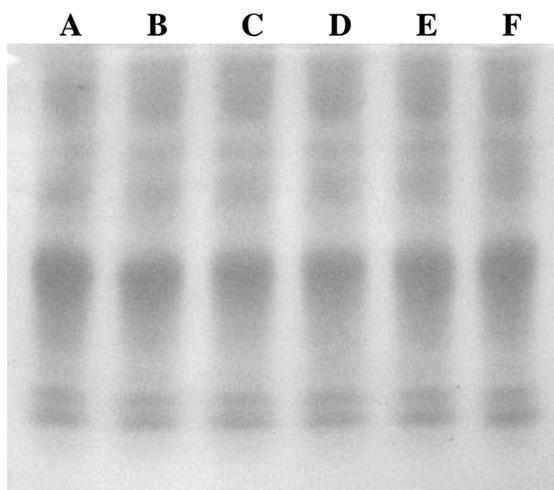


FIGURA 4 - Eletroforese em gel de poliacrilamida em gradiente (5 à 12,5%) de gel na ausência de SDS e 2-mercaptoetanol. Linhas A - F: 25 µg de proteína da fração LP do látex de *C. procera*.

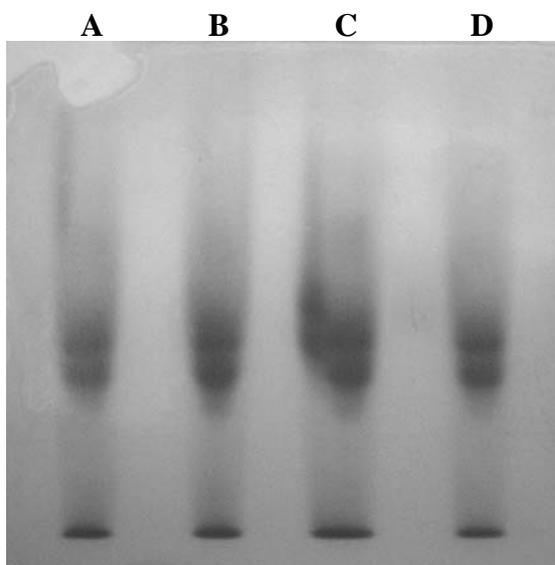


FIGURA 5 - Eletroforese para proteínas básicas em gel de poliacrilamida 12,5% segundo o método de REISFELD (1962). A fração LP do látex de *C. procera* foi solubilizada em tampão de acetato de potássio 0,5M, pH 6,8 contendo 1% de 2-mercaptoetanol. As linhas de A a D foram carregadas com 20 μ g de LP.

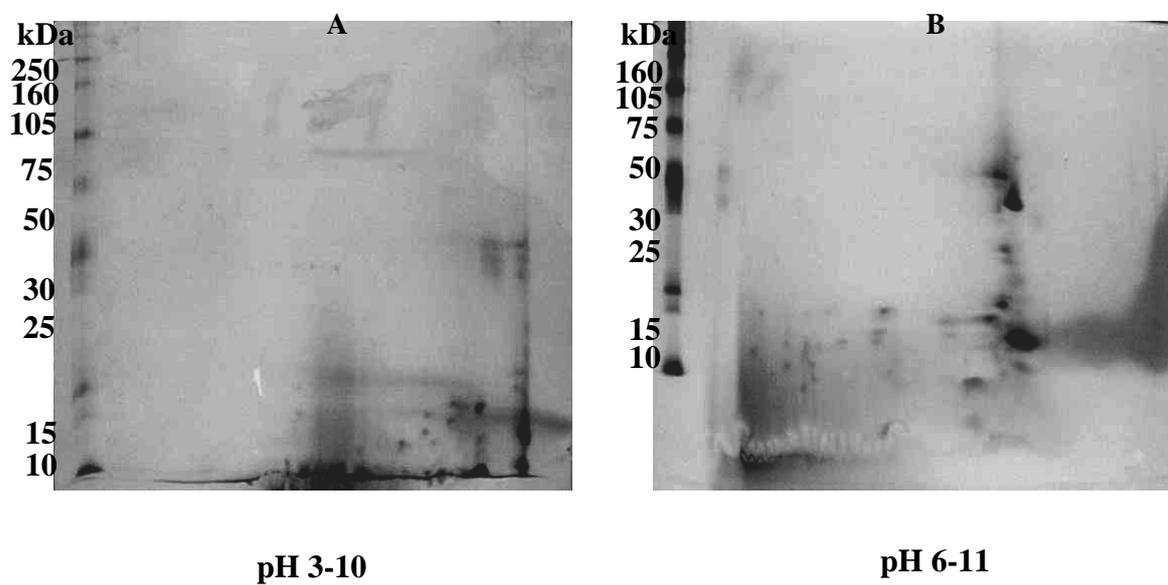


FIGURA 6 - Perfil da Fração Protéica do Látex de *Calotropis procera* em eletroforese bidimensional. (A) Focalização isoeétrica realizada utilizando strip com gradiente linear de pH variando entre 3 e 10. (B) Focalização isoeétrica realizada utilizando strip com gradiente linear de pH entre 6 e 11. 1mg da fração PL foi carregada em cada strip. Os marcadores de massa molecular usados foram os do produto Rainbow (RPN800) de (Amersham Biosciences Uppsala, Sweden).

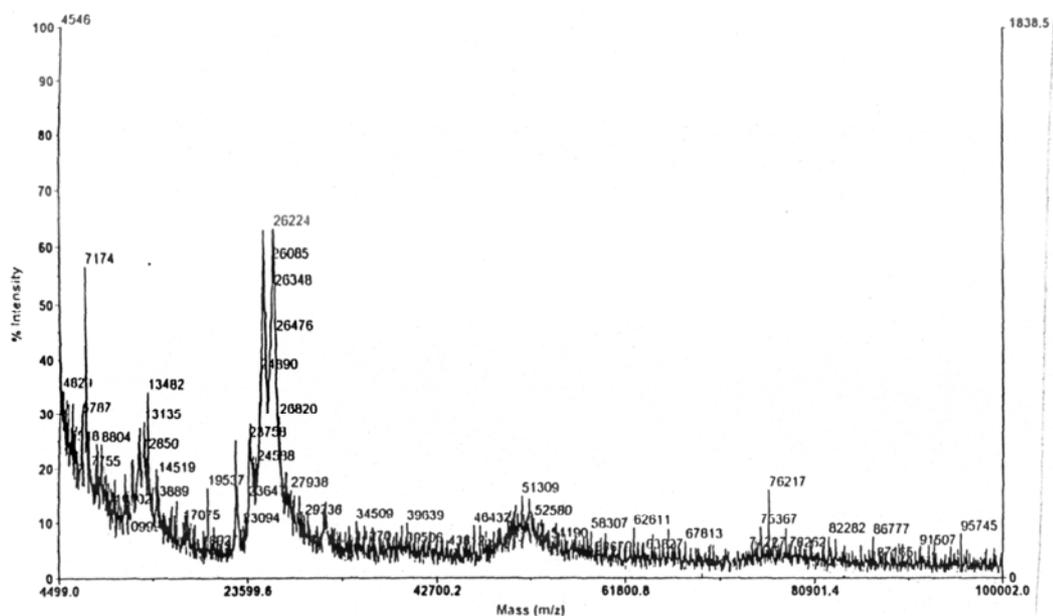


FIGURA 7 - Espectro de massas da fração LP adquirido a partir de um aparelho Espectrômetro de Massas modelo MALDI-TOF (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) com fonte de ionização do tipo *Electron Spray Ionization* (ESI), analisador tipo *Time of Fly* (TOF) e detector do tipo multiplier.

A análise através de eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes da fração borracha (BL) está mostrada nas FIGURAS 8 e 9. A fração RL foi analisada tal qual ela foi obtida, mas também foi previamente submetida à extração com água, soluções ácidas, básicas e de elevada força iônica. Seus extratos foram centrifugados, dialisados e liofilizados para análise. Como pode ser observado na FIGURA 8, RL apresenta proteínas e quando o seu perfil protéico é comparado ao perfil

protéico de LP, há uma similaridade. Todas as bandas protéicas presentes em RL estão presentes em LP.

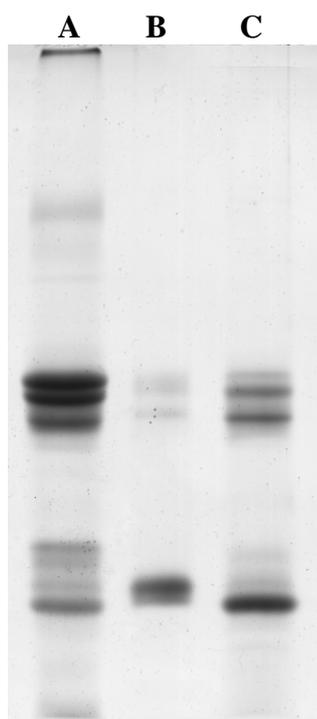


FIGURA 8 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) em presença de SDS e 2-mercaptoetanol. Linha **A** - 5 μg da fração LP do látex de *C. procera*; linha **B** - 5 μg da fração borracha (RL) e linha **C** - 5 μg de proteínas ligadas a fração borracha.

Os perfis protéicos de RL obtidos após sua extração com diferentes soluções evidenciam a presença de proteínas que foram extraídas com maior ou menor intensidade de acordo com a solução extratora (FIGURA 9). Desta forma, pode ser concluído que a fração RL tal qual é obtida no fracionamento ainda apresenta teor protéico, embora este seja provavelmente similar àquele da fração LP.

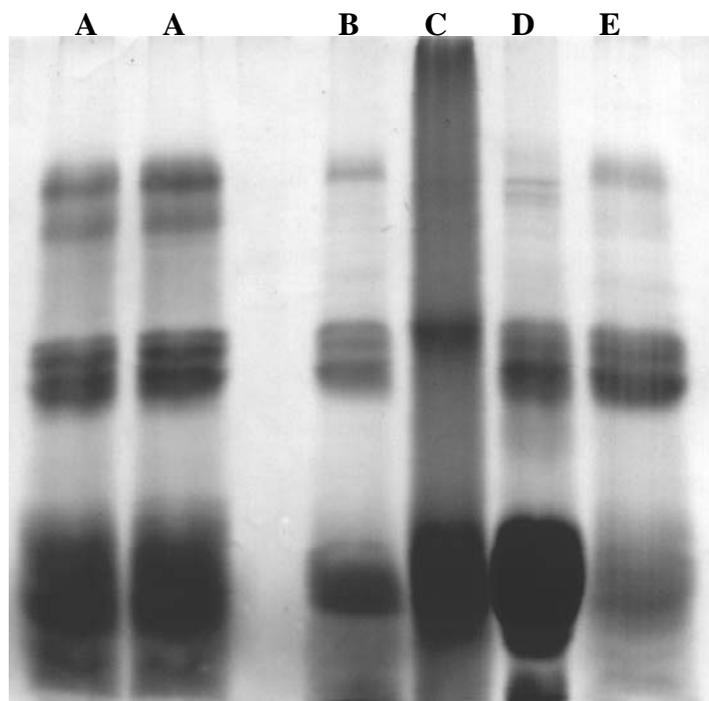


FIGURA 9 - Perfil eletroforético de extratos protéicos obtidos a partir da extração da fração borracha (RL) do látex de *Calotropis procera* em diferentes soluções. **A** - fração LP; **B** - fração da borracha extraída com NaCl 1M; **C** - fração borracha extraída com NaOH 1N; **D** - fração borracha extraída com HCl 1N e **E** - fração borracha extraída com água destilada.

A fração DL também foi avaliada através de eletroforese, entretanto, com o objetivo de detectar a presença de peptídeos, uma vez que era esperado haver somente moléculas com massa molecular inferior a 8.000 Da (cut off da membrana de diálise utilizada). A eletroforese para peptídeos, em gel de tricina-acrilamida 17 % sob condições desnaturantes, foi então usada e revelou a presença de, pelo menos, quatro

peptídeos na fração analisada. Na figura, estes são evidenciados através das setas (FIGURA 10).

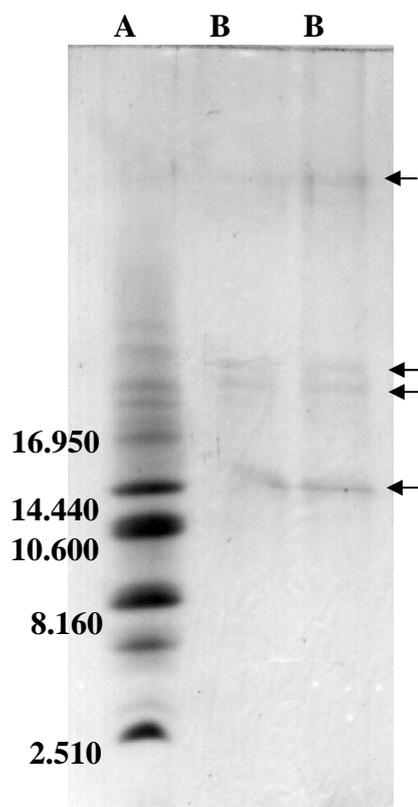


FIGURA 10 - Eletroforese para peptídeos em gel de tricina-acrilamida 17% sob condições desnaturantes (SDS 10 % e beta-mercaptoetanol 5 %). Linha **A** - marcadores de massa molecular em Da de 16.950 (Mioglobina), 14.440 (Mioglobina I+II), 10.600 (Mioglobina I+III), 8.160 (Mioglobina I), 6.210 (Mioglobina II), 2510 (Mioglobina III). Linha **B** - 40 μ g da fração DL foram aplicados no gel.

O que chama atenção imediata na figura é que não há correspondência aparente entre as massas aparentes dos peptídeos e as aquelas de marcadores de massa molecular utilizados (Sigma, St.Louis, USA). Isto é, visto que esta fração é formada por componentes que migraram do lado interno da membrana de diálise para o externo, todos deveriam certamente ter massa inferior a 8.000 Da, tamanho de exclusão da membrana utilizada. Entretanto, repetidas eletroforeses reproduziram este perfil apresentado. Embora não muito comum é possível haver uma migração anômala de tais moléculas ou então estas representariam contaminação de outras proteínas do látex, o que é pouco provável, visto que esta amostra apresentou resultados concordantes do ponto de vista qualitativo em análise em HPLC. Nesta análise a fração DL foi cromatografada em uma coluna SuperDex Peptide HR, para separar peptídeos, originou 4 picos correspondendo a massas inferiores a 8.000 Da foram recuperados.

A fração protéica do látex LP foi também investigada quanto à presença de glicoproteínas. Duas estratégias distintas foram empregadas. A primeira foi através de eletroforese em gel de poliacrilamida revelada com o reagente de Schiff quando foi observada presença de glicoproteínas na fração analisada (FIGURA 11). Posteriormente, utilizando-se duas lectinas imobilizadas em um “sensorship”, foi avaliado se proteínas do látex presentes na fração PL seriam reconhecidas. As lectinas imobilizadas foram a CFL, que reconhece fortemente glicoconjugados do tipo oligamansídico e com menor intensidade glicanos do tipo *N*-acetillactosamina e a lectina de *Artocarpus integrifolia*, que reconhece glicoconjugados do tipo *N*-acetillactosamina. A análise foi realizada em um sistema BiaCore, que mede a cinética de interação intermolecular em tempo real. Com visto na FIGURA 12, a fração LP gerou resultados coerentes com uma interação com a CFL. Assim, é provável que haja

glicoproteínas no látex com porções glicosiladas com oligomanosídeos. As medidas de interação com a lectina galactose-específica de *Artocarpus*, comumente chamada de jacalina gerou respostas menores sob as mesmas condições de análise. Este resultado sugere que também há glicoproteínas com glicanos do tipo *N*-acetillicosamina presentes na amostra.

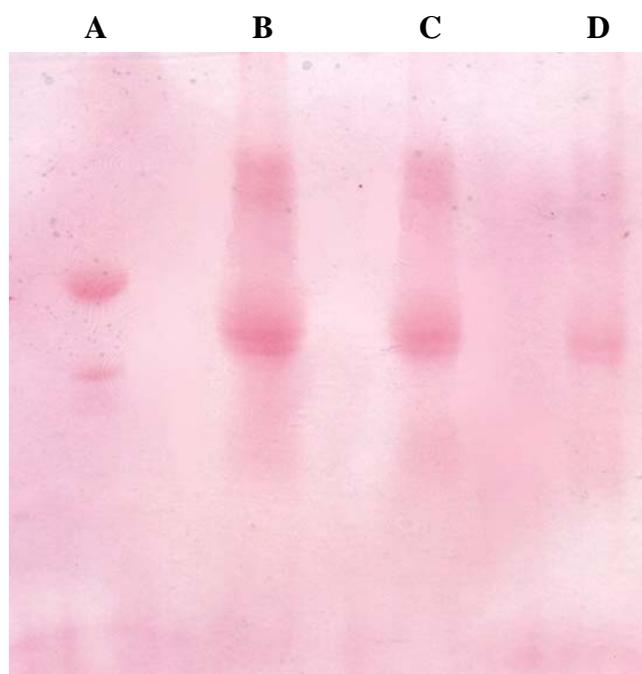


FIGURA 11 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) segundo método descrito por ZACHARIUS *et al.* (1969). A eletroforese foi revelada utilizando reagente de SCHIFF para observação da presença de glicoproteínas Linha **A**: 10 μ g da lectina de *Erythrina velutina* forma *aurantiaca* (uma glicoproteína); Linhas de **B** a **D**: 15, 10 e 5 μ g da fração protéica do látex (LP) de *C. procera*, respectivamente.

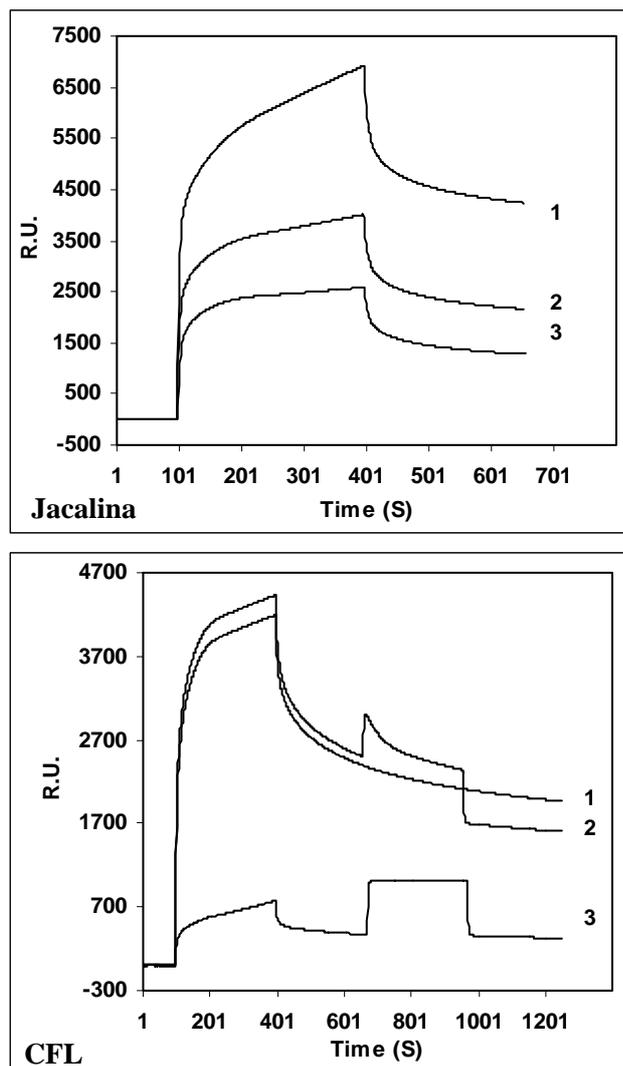


FIGURA 12 - Cinética de interação em tempo real da fração PL com glicoproteínas imobilizadas (CFL, jacalina) medidas por ressonância plasmônica de superfície (SPR). A mudança SPR é expressa em unidades de ressonância. A parte superior e inferior das curvas correspondem respectivamente as fases de associação e dissociação. Os números 1, 2 e 3 representam 1000, 500, 100 μg de LP/ml, respectivamente no gráfico da jacalina. No gráfico da CFL 1 representa a interação natural com a fração LP; 2- representa a ação inibitória de 100 mM de alfa-D-manosídeo sobre a interação; 3- passagem da solução de alfa-metilmanosídeo 100 mM.

Os resultados obtidos através da cromatografia de afinidade em coluna de quitina e os ensaios realizados com o intuito de determinar a presença de atividade quitinásica na fração LP sugerem a presença de proteínas ligantes de quitina na fração LP. Na FIGURA 13 é apresentado o perfil de eluição da fração LP sobre coluna de quitina. Um pico não retido foi recuperado e um pico retido na matriz foi eluído com solução de ácido acético 100 mM ou HCl 100 mM. Ainda na FIGURA 13 o perfil protéico destes picos em eletroforese sob condições desnaturantes é apresentado.

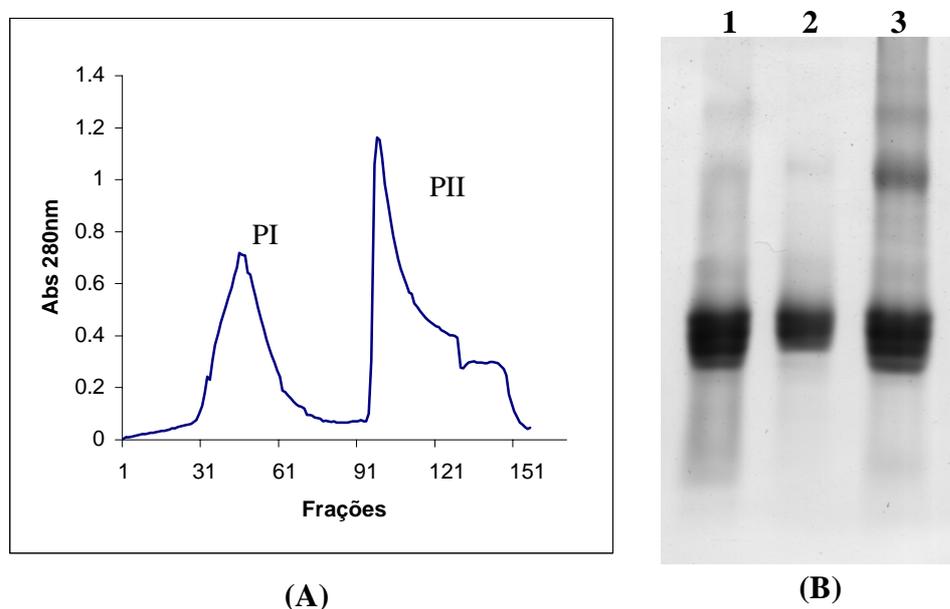


FIGURA 13 - Perfil cromatográfico das proteínas do látex em coluna de quitina. **(A)** 50 mg de LP em 5 ml de água destilada foi aplicada na coluna. O PI foi eluído com a mesma solução de solubilização. O PII foi recuperado após eluição com solução de ácido acético 100 mM. **(B)** Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5 %) da fração LP do látex (1), PI (2) e PII (3) recuperados da coluna de quitina.

Os ensaios enzimáticos realizados com o objetivo de detectar a presença de atividade quitinolítica no látex fresco de *C. procera* após coleta, na fração protéica do látex (LP) bem como nos picos provenientes da etapa de cromatografia em coluna de quitina foram conduzidos. Em todas as amostras analisadas foi observada a presença de atividade quitinolítica (FIGURA 14). A atividade mais intensa foi encontrada na fração LP. Após etapa cromatográfica a atividade quitinolítica da fração LP apresentou-se em maior intensidade no PII em relação ao PI. A atividade quitinolítica foi completamente perdida após aquecimento da fração LP à 60 °C durante 30 minutos (FIGURA 15).

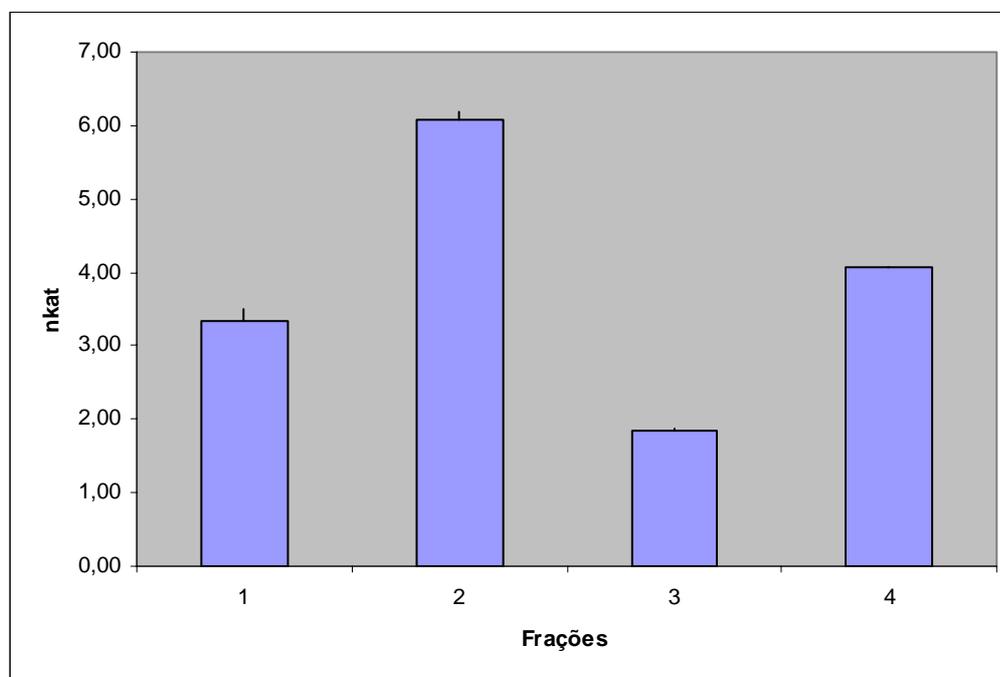


FIGURA 14 - Ensaio de atividade quitinásica em frações do látex de *C. procera*. **1**- látex fresco de *C. procera* após coleta em água, centrifugação e diálise; **2** - fração LP liofilização (10 mg/ml); **3** - Atividade quitinásica do PI obtido após etapa de cromatografia em coluna de quitina (5mg/ml) e **4** - Atividade quitinásica do PII obtido após etapa cromatográfica (5mg/ml).

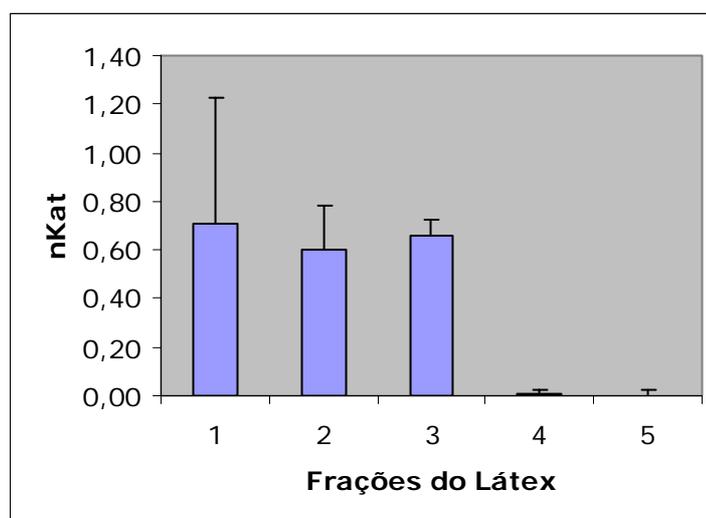


FIGURA 15 - Efeito da temperatura sobre a atividade quitinolítica da fração LP. **1** - Atividade quitinásica da fração LP (10 mg/ml); **2, 3 e 4** - fração LP (10 mg/ml) previamente aquecida a 45 °C, 60 °C e 80 °C, respectivamente.

Nos ensaios de atividade quitinásica, foi investigado se a atividade quitinolítica era derivada de hidrólise endoquitinásica ou exoquitinásica. Quando quitina coloidal foi submetida à hidrólise pela fração LP foi observada atividade quitinolítica pela presença de *N*-acetilglicosamina que se complexa com o di-metil-benzaldeído que gera uma coloração violeta, medida a 585 nm. Assim, pode ser concluído que há atividade exoquitinásica. Para avaliar a presença de atividade endoquitinolítica, foi adicionalmente utilizada a enzima glucoronidase. A glucoronidase (SIGMA, St. Louis, USA) digere fragmentos de quitina a unidades de *N*-acetilglicosamina livres. Então para que a glucoronidase tenha forte atividade é necessário haver uma digestão parcial da quitina em fragmentos, o que ocorreu nos ensaios. Assim, é esperado haver também atividade endoquitinásica na fração PL.

Na fração LP foi avaliado se havia atividade hemaglutinante, propriedade muito comum para proteínas com atividade lectínica, embora não seja um método de resultado definitivo. Através de ensaios de hemaglutinação realizados em placas de microtitulação, utilizando-se eritrócitos de coelho não tratados ou tratados com tripsina, nenhuma atividade hemaglutinante foi detectada na amostra LP. Na literatura, não há relatos de atividade hemaglutinante em fluidos laticíferos. A fração LP também não interagiu com tripsina bovina imobilizada, sugerindo não haver inibidor de tripsina na fração.

Além dos testes para avaliar a presença de lectinas e atividade quitinásica, foram realizados ensaios para detecção de atividades enzimáticas relacionadas ao metabolismo oxidativo [enzimas peroxidases do ascorbato (APX), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD)]. Os ensaios foram realizados por métodos fotolorimétricos (TABELA 3).

TABELA 3 – Atividades enzimáticas de enzimas do metabolismo oxidativo investigadas na fração LP do látex de *C. procera*

Enzima	Atividade enzimática
Peroxidase do Ascorbato (APX)	$0.117^d \pm 0.013 \mu\text{Mol (H}_2\text{O}_2\text{)}.g^{-1}.min^{-1}$
Catalase (CAT)	Não detectada
Superóxido dismutase (SOD)	$1007.749 \pm 91.892 \text{ U.A.}.g^{-1}$

Quando coelhos foram estimulados à imunização com a fração LP, estes produziram anticorpos policlonais específicos. Soluções de anti-soro foram capazes de reconhecer proteínas do látex como revelado em ensaios de imunodifusão dupla

apresentada na FIGURA 16. Na literatura há relatos de aparecimento de sintomas adversos como inflamação, irritação de pele e queratites após contato com o látex de *C. procera*. Tais reações não foram observadas no animal que recebeu proteínas do látex.

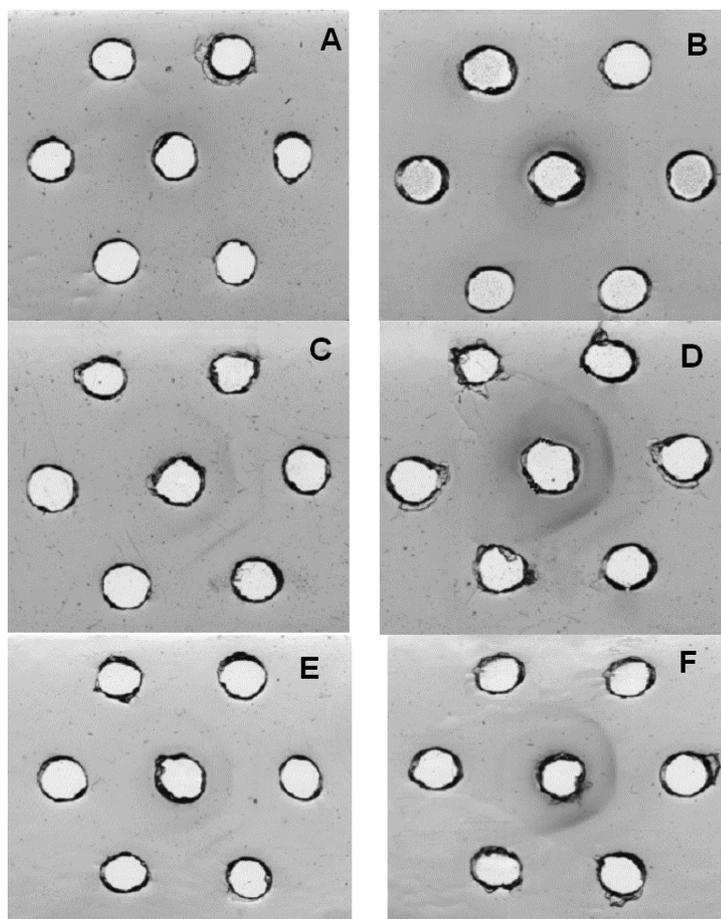


FIGURA 16 - Imunodifusão dupla de Ouchesterlony. **A** - soro de coelho não-imune 17,5 mg/ml; **B** - soro de coelho não-imune 35 mg/ml; **C** - anti-soro de coelho imune 35 dias 17,5 mg/ml; **D** - anti-soro de coelho imune 35 dias 35 mg/ml; **E** - anti-soro de coelho imune 42 dias 17,5 mg/ml; **F** - anti-soro de coelho imune 42 dias 35 mg/ml (10 μ l/poços centrais) contra as proteínas do látex (LP) em diferentes concentrações (1 mg/ml sem diluição e diluições 1:2, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80). Foram aplicados 10 μ l de amostra em cada poço radial das placas. As amostras foram distribuídas em ordem crescente de diluição, no sentido horário e aplicadas a partir do orifício posicionado na extremidade superior direita de cada placa.

Após a caracterização bioquímica parcial das frações do látex, estas foram avaliadas quanto a capacidade de produzir efeitos deletérios sobre larvas do mosquito transmissor da Dengue, o *St. aegypti*.

O látex fresco coletado em água destilada (1:1; v/v) causou 100 % de mortalidade nas larvas do terceiro estágio de desenvolvimento do *St. aegypti* em apenas cinco minutos e este efeito tóxico ainda foi observado após 24 h em uma diluição do látex de 1: 1000 vezes. Diante destes resultados, novos ensaios de avaliação foram realizados com as frações LP e DL.

A fração LP do látex foi efetiva em promover morte de larvas no terceiro estágio de desenvolvimento (TABELA 4). A dose correspondente a 1.000 µg/ml da fração LP promoveu 100 % de mortalidade das larvas em 24 h e 86,6 % das mortes ocorreram nas três primeiras horas. Entretanto, esta atividade larvicida da fração LP foi diminuída progressivamente após tratamento térmico do material a partir de 15 minutos a 100 °C (TABELA 5).

A fração LP foi submetida à cromatografia de troca iônica em gel de CM-Sepharose Fast Flow (GE Healthcare, Piscataway, USA), previamente equilibrada em tampão de acetato de sódio 50 mM, pH 5,0. A fração LP foi então dividida em três novas frações.

O pico não retido, denominado PI foi recuperado com o tampão de equilíbrio. O PII que ficou retido à matriz e foi posteriormente eluído com tampão de acetato de sódio 50 mM, pH 5,0, contendo NaCl 0,2 M e um terceiro pico, denominado PIII, retido à coluna e posteriormente eluído com tampão de acetato de sódio 50 mM, pH 5,0, contendo NaCl 0,3 M foram submetidos a novos ensaios. O perfil de eluição destes materiais está mostrado na FIGURA 17.

TABELA 4 - Atividade larvicida das frações LP e DL do látex de *Calotropis procera* para larvas do terceiro estágio do desenvolvimento do *Stegomyia aegypti* após diferentes tempos de exposição

Concentração ($\mu\text{g/ml}$)		% mortalidade ^a		
LP	1 h	3 h	24 h	
20	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	
100	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	56,6 \pm 8,16	
200	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	86,6 \pm 9,4	
1.000	33,3 \pm 16,9	83,3 \pm 9,4	100,0 \pm 0,0	
5.000	90,0 \pm 8,7	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	
BSA	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	
Água	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	
DL	1 h	3 h	24 h	
Água	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	
BSA	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	
DL não diluído	63,3 \pm 4,7	90,0 \pm 14,1	100,0 \pm 0,0	
DL ($\mu\text{g/ml}$)	1 h	3 h	24 h	
20	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	
100	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	
200	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	
1.000	20,0 \pm 10,0	23,3 \pm 5,7	50,0 \pm 17,3	
5.000	63,3 \pm 5,7	76,6 \pm 5,7	100,0 \pm 0,0	
10.000	76,6 \pm 11,54	86,6 \pm 15,2	100,0 \pm 0,0	

^a: valores são expressos como media de três replicatas. Albumina sérica bovina – BSA (Sigma, St.Louis, USA) foi utilizada a 10 mg/ml.

TABELA 5 - Atividade larvicida das frações LP e DL de *Calotropis procera* submetidas a tratamento térmico contra larvas do terceiro estágio no desenvolvimento do *Stegomyia aegypti*

Tempo de aquecimento a 100 °C (min)	Percentual de mortalidade após 24h ^a	
	PL (200 µg/ml)	DL (5 mg/ml)
0	86,7 ± 4,7	70,0 ± 26,45
15	20,0 ± 14,1	63,3 ± 15,27
30	26,7 ± 9,2	53,3 ± 10,0
45	3,7 ± 4,7	50,0 ± 10,0
60	13,4 ± 4,7	23,3 ± 15,27
Controle (água)	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0

^a: valores são expressos como media de três replicatas

Estes picos, derivados da cromatografia de troca iônica, foram avaliados quanto a toxicidade contra as larvas do terceiro estágio de desenvolvimento do *St. aegypti*. Não foi observado efeito tóxico contra as larvas nas frações de PI e PII. Entretanto, atividade tóxica foi observada na fração correspondente ao PIII (TABELA 6). Embora a atividade tóxica tenha sido observada no PIII, esta foi menor que a observada na fração LP quando utilizada uma mesma concentração de material nos ensaios (200 µg/ml). Além disso, a toxicidade da fração PIII foi observada somente após 48 h enquanto que o efeito produzido pela fração LP foi claramente observado após 24 horas.

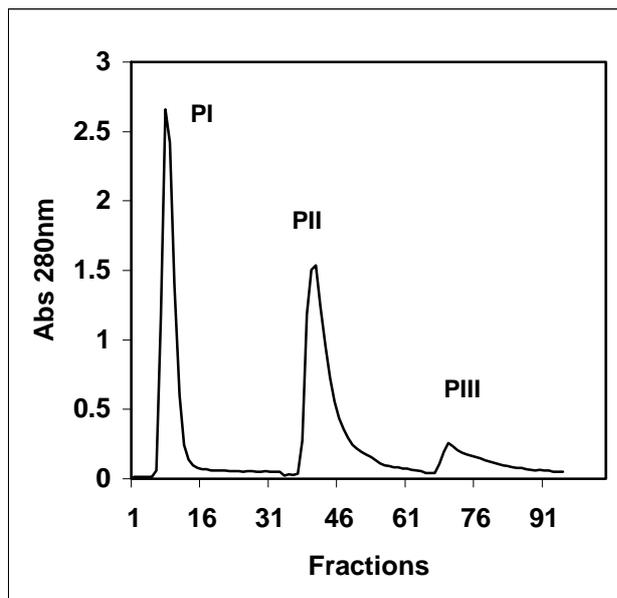


FIGURA 17- Cromatografia de troca-iônica em coluna de CM-Sepharose Fast Flow da fração LP do látex de *Calotropis procera*. A coluna foi previamente equilibrada com tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0. O PI foi eluído após aplicação do tampão de equilíbrio. PII e PIII foram obtidos após eluição com tampão de equilíbrio contendo NaCl 0,2 M e 0,3 M, respectivamente.

Ainda com o intuito de avaliar o envolvimento de proteínas na toxicidade da fração LP, esta foi submetida à digestão por protease e após 24 horas de digestão a fração LP foi avaliada quanto à presença de atividade tóxica. A digestão da fração pôde ser observada através de eletroforese em gel de poliacrilamida (FIGURA 18). A fração de proteínas do látex (LP) digerida causou 23,9 % de mortalidade das larvas no terceiro estágio de desenvolvimento enquanto que a mesma fração não submetida a tratamento digestivo matou 97,49 %. Mortes não foram observadas no grupo controle com ou sem enzima.

TABELA 6 - Atividade larvicida das frações derivadas de LP (PI, PII e PIII) contra larvas do terceiro estágio no desenvolvimento do *St. aegypti*.

Picos cromatográficos (200 µg/ml)	% mortalidade			
	1 h	3 h	24 h	48 h
PI CM-Sepharose	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
PII CM-Sepharose	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
PIII CM-Sepharose	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	28,6 ± 0,4
BSA	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Água	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0

^a: o ensaio foi realizado em triplicata como descrito em material e métodos em tubos de ensaio contendo 5 ml.

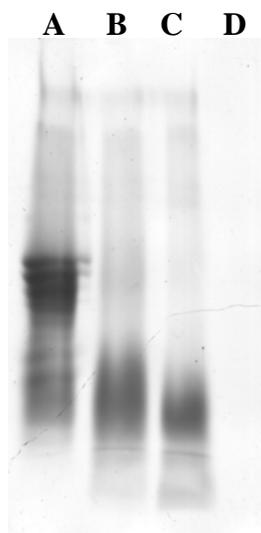


FIGURA 18 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 15% da fração LP do látex de *C. procera* após digestão com protease de *Streptomyces griseus*. **A** - Fração LP sem digestão; fração LP após 3 h (**B**) e 24 h (**C**) de digestão e (**D**) enzima.

Em um segundo momento, a toxicidade da fração LP foi avaliada sobre eclosão dos ovos do *St. aegypti*. A fração LP não foi efetiva em prevenir a eclosão dos ovos em baixas doses. A eclosão dos ovos em albumina sérica bovina e na dose de 200 µg/ml da fração LP dissolvida em água foi comparável à eclosão de ovos somente em água (TABELA 7). A eclosão de ovos na dose de 200 µg/ml da fração LP foi levemente maior quando comparado aos grupos controle, entretanto, o crescimento das larvas tanto em BSA quanto em água foi mais uniforme do que o crescimento na presença da fração LP. Além disso, foi observada expressiva morte de larvas quando estas alcançaram o segundo estágio de desenvolvimento, porém este efeito não atingiu 100 % das larvas que se desenvolveram até o segundo estágio larval. Entretanto, estes indivíduos sobreviventes em LP não atingiram o terceiro estágio de desenvolvimento nas 72 horas seguintes, diferindo do que normalmente ocorria nos grupos controle (TABELA 7). A eclosão dos ovos foi inibida quando uma dose de 10 mg/ml da fração PL foi testada.

A fração DL, correspondente à água da primeira hora de diálise, também apresentou toxicidade sobre larvas do terceiro estágio de desenvolvimento como desempenhado inferior àquela da fração LP. Uma dose de 5.000 µg/ml da fração DL promoveu 100 % de mortalidade das larvas (TABELA 4).

A fração DL também foi submetida ao mesmo ensaio de digestão pela protease como descrito para LP. O material digerido foi então avaliado quanto ao seu potencial tóxico. Após 24 horas de digestão a fração DL causou 77,49 % de mortalidade das larvas no terceiro estágio enquanto a DL não submetida ao tratamento digestivo promoveu 100 % de mortalidade das larvas, sugerindo assim que não há o envolvimento de proteínas (peptídeos) na toxicidade larval desempenhada por esta fração (TABELA 3).

TABELA 7 - Efeito das frações do látex (LP e DL) do látex de *C procera* na eclosão de ovos do *St. aegypti*.

Amostras	Número de Ovos	% eclosão	Número de larvas vivas	Número de larvas mortas	% mortalidade
Água	88	40,90	46	0	0
Controle (BSA)	90	30,0	27	0	0
LP – 200 µg/ml	146	53,42	23	55	70,51
LP - 1 mg/ml	152	44,07	23	44	65,67
LP - 10 mg/ml	157	0	-	-	-
DL - 1 mg/ml	123	37,39	46	0	0
DL - 10 mg/ml	147	35,37	27	25	48,07
DL - 50 mg/ml	149	0	-	-	-
DL – 100 mg/ml	138	0	-	-	-

Albumina sérica bovina (Sigma, St.Louis, USA) foi utilizada na concentração de 10 mg/ml. Número de larvas vivas corresponde às larvas ainda vivas após 72 de observação.

Quando desafiada contra eclosão na presença da fração DL, ovos do *St. aegypti* produziram larvas no primeiro estágio de desenvolvimento nas primeiras 24 horas de modo similar ao dos controles com BSA e água. A mortalidade das larvas foi observada somente na dose de 10 mg/ml, uma tendência que foi observada até 72 horas. Altas doses da fração DL promoveram intensa atividade larvicida (TABELA 7).

Como estas frações apresentaram intensa atividade larvicida, as mesmas foram examinadas quanto à toxicidade aguda em camundongos. O resultado de toxicidade aguda em camundongos mostrou que a injeção intravenosa da fração LP não causou efeitos deletérios ou mortalidade nas concentrações correspondentes à dose que exibiu atividade larvicida. Uma DL_{50} de $25,8 \pm 4,2$ mg/kg foi encontrada. Esta dose está

distante daquela necessária para eliminar larvas do *St. Aegypti* no terceiro estágio de desenvolvimento. Assim, uma análise preliminar da fração LP poderia não exibir toxicidade contra animais em doses que sabidamente provocam morte das larvas. Doses de 3 e 10 mg/kg da fração LP quando injetadas por via endovenosa causou leve sedação dos animais enquanto que doses de 30 e 100 mg/kg promoveram modificações no padrão respiratório seguido de morte. Deve ser considerado aqui que a via de administração endovenosa é a mais eficaz na disseminação de uma droga e requer então doses menores de ação.

A toxicidade aguda também foi avaliada na fração DL através da via intraperitoneal. Uma DL_{50} correspondente a $534 \pm 21,8$ mg/kg foi determinada. A atividade larvicida da fração DL foi determinada em doses inferiores a 5000 $\mu\text{g/ml}$ (TABELA 4).

De acordo com os resultados, o látex de *calotropis procera* possui diferentes compostos com atividade larvicida sobre o *St. aegypti*. Tais compostos parecem ser de origem protéica, presentes na fração PL e metabólitos não protéicos e de baixa massa molecular presentes na fração DL.

V. DISCUSSÃO

No Reino Plantae é estimado haver mais de 12.000 espécies laticíferas. A ocorrência do fluido laticífero nos tecidos, e a abundância de sua produção varia entre estas espécies. Muito pouco é conhecido sobre estas secreções. Nem mesmo podem ser definidas como verdadeiras secreções, pois não são secretadas e sim acumuladas nos canais laticíferos. Entretanto, dentre os fluidos laticíferos já examinados em algum contexto bioquímico, é comum a descrição da ocorrência de polímeros de isopreno. Esta presença abundante confere aos fluidos laticíferos uma propriedade que os une ao conhecimento popular. Polímeros de isopreno dão origem a estruturas com características de borracha e por isto o termo látex está intimamente relacionado a borracha. Esta idéia se consolidou como consequência da exploração da árvore da borracha pela indústria. A planta *Hevea brasiliensis* não é somente de extremo valor comercial por causa da extração de seu látex, mas também por originar mais de noventa por cento da literatura conhecida sobre fluidos laticíferos se originou.

Neste trabalho, o látex da planta *C. procera* foi investigado quanto a alguns aspectos bioquímicos. Há dois ou três fortes apelos para o estudo do látex de *C. procera*. Primeiro, a planta produz tal quantidade de látex que não seria absurdo especular que *C. procera* produziria mais látex do que a própria seringueira. Segundo, há diversos relatos sobre propriedades curativas e toxicológicas do látex de *C. procera*

oriundos da medicina popular e de literatura científica; e por fim, esta planta é de grande ocorrência no Nordeste Brasileiro, sendo o Ceará uma grande área onde a planta é facilmente encontrada.

Não há na literatura uma descrição bioquímica sobre a composição do látex de *C. procera*, embora haja várias publicações que descrevem a ocorrência de moléculas presentes no fluido (ANSARI & ALI, 2001; GALLEGOS-OLEA *et al.*, 2002; KUMAR & JAGANNADHAM, 2003; SHIVKAR & KUMAR, 2003). Mais do que caracterizar aspectos bioquímicos do látex propriamente dito, este trabalho teve como objetivo fracionar o látex para estudá-lo em diversos contextos. Aqui, foi enfatizada a análise de sua composição protéica e sua atividade larvicida contra *St. aegypti*.

De acordo com os resultados, foi estabelecido que o látex de *C. procera* é composto por duas frações de características bem distintas. Prevalece fortemente a fração denominada de borracha do látex RL (> 80 %). Entretanto, o teor de proteínas no látex foi também surpreendente (> 10 %). O látex de *H. brasiliensis* é rico e diverso em proteínas enquanto que o látex de *Achras sapota* é muito pobre (YANG *et al.*, 2002; SELVARAJ & PALL, 1984).

Embora tenham sido detectadas proteínas na fração borracha, a análise destas com àquelas presentes na fração LP sugere fortemente que as proteínas presentes na fração RL são partes integrantes da fração LP que certamente co-precipitam com a borracha durante a etapa de centrifugação inicial do látex.

A formação da borracha envolve a formação de malhas de poliisoprenos que certamente aprisionam proteínas solúveis e as co-precipitam. Este fenômeno tanto ocorre no fracionamento do látex de *Hevea* que mesmo os mais avançados procedimentos industriais de processamento de sua borracha não impedem este efeito.

Um grande número de trabalhos já constatou com evidências de que materiais derivados do látex de *Hevea* induzem alergia e que a causa não seria originada da borracha, mas de proteínas do látex aprisionadas nesta em quantidades mínimas (SUSSMAN *et al.*, 2002; BINKLEY *et al.*, 2003; CHAIEAR *et al.*, 2006; BAYROU, 2006).

A fração LP não apresentou atividade do tipo lectínica em ensaios de hemaglutinação, entretanto isto não elimina a possibilidade de ocorrência de uma lectina com apenas um sítio de ligação. De fato, a melhor proteína estudada no látex de *Hevea* é uma lectina monomérica de apenas um sítio de ligação a carboidratos, a heveína (GIDROL *et al.*, 1994).

Em termos enzimáticos, a ocorrência de proteases do tipo cisteínica foi recentemente descrita no látex de *C. procera* (KUMAR & JAGANNADHAM, 2003). Posteriormente, FREITAS (2005) concluiu que não há atividade proteolítica do tipo serínica e nem atividade de metaloproteinases no látex. Proteinases parecem ser comuns em fluidos laticíferos e sua presença nestes fluidos pode estar relacionada a mecanismos de defesa, além de envolvimento em funções tais como: degradação de proteínas de reserva, ativação de zimogênios e degradação de proteínas defeituosas, morte celular programada e no reconhecimento de patógenos (RUDENSKAYA *et al.*, 1995; SOLOMON *et al.*, 1999; LIU *et al.*, 2001; KEMBHAVI *et al.*, 2003; KONNO *et al.*, 2004).

Neste trabalho foi ainda verificado que enzimas com atividades relacionadas ao metabolismo oxidativo estão presentes no látex de *C. procera*, embora não tenha sido detectada atividade de catalase. Atividades com estas características foram descritas no látex de *Euphorbia characias* e *Mango sap* (JOHN *et al.*, 2003; MURA *et al.*, 2006).

Estes dados sugerem que fluidos laticíferos participam ativamente na defesa antioxidativa do vegetal.

A atividade quitinolítica também evidencia a relevância funcional do látex. Outras quitinases já foram descritas no látex de *H.brasiliensis* e *Ficus microcarpa* (JEKEL *et al.*, 1991; TAIRA *et al.*, 2005). As enzimas quitinásicas têm como atividade a digestão de polímeros de resíduos de *N*-acetilglicosamina ligados em β -(1 \rightarrow 4). Estas seqüências ocorrem em parede celular de fungos filamentosos, muitos dos quais são fitopatogênicos; estão presentes na constituição da membrana peritrófica, que ocorre no trato digestório de insetos; além de ocorrerem em exoesqueletos de outros organismos (JACH *et al.*, 1995; TELLAM *et al.*, 1999). O fato de que plantas não possuem estruturas montadas a partir de polímeros de quitina, enquanto estas ocorrem em seus potenciais predadores, confere a estas enzimas um potencial papel de defesa. Há vários relatos na literatura de ação anti-fúngica desencadeada por atividade quitinolítica (LAWRENCE *et al.*, 1996). Embora este trabalho não tenha avaliado a capacidade da fração LP, rica em atividade quitinolítica, em inibir o crescimento de fungos, tal procedimento merece ser realizado.

A fração protéica do látex (LP) foi capaz de induzir uma resposta imunológica em coelhos quando este foi submetido a um protocolo clássico de imunização. Anticorpos policlonais foram encontrados no anti-soro produzido que foi capaz de reconhecer proteínas da fração LP. O estudo de indução de resposta imunológica do látex é muito importante. Primeiro, há intensos estudos com o látex de *Hevea*, onde 11 proteínas já foram identificadas como alergênicas e que têm provocado sérios problemas de saúde pública em profissionais que fazem uso de matérias industrializados derivados de seu látex, tais como luvas cirúrgicas (SUSSMAN *et al.*, 2002). Não há

outros estudos com outros látex sobre este assunto. O fato de que o látex de *C. procera* é utilizado na medicina popular é preocupante, visto que não há, até o presente, qualquer investigação neste contexto. Há na literatura a descrição que animais que receberam doses do látex de *C. procera* responderam, com o aumento do número de leucócitos no sangue, se comparados aos animais não tratados (DADA *et al.*, 2002; RAMOS *et al.*, 2006). Um estudo detalhado da atividade imunológica do látex de *C. procera* ou de suas frações deveria ser desenvolvido.

A terceira fração do látex obtida foi denominada de DL, fazendo referência que seus componentes foram originados de uma etapa de diálise. Embora não tenha havido uma caracterização bioquímica desta amostra, é esperado que estejam presentes nesta, metabólitos secundários, possíveis aminoácidos livres, além de muitos íons, como foi determinado na análise físico-química do látex total. O interesse nesta fração seria a possível ocorrência de peptídeos. As evidências obtidas por análise eletroforética sugerem a presença de peptídeos. Como descrito nos resultados, surpreendentemente não houve concordância nas massas relativas observadas. Entretanto, quando RAMOS *et al.* (2006) analisaram a fração DL através de cromatografia de filtração em gel em uma coluna SuperDex Peptide HR, usada para separar moléculas com massa variando entre 100 e 7.000 Da, 4 picos foram recuperados e a análise de aminoácidos destes confirmou a presença de peptídeos. Assim, a fração DL parece realmente possuir peptídeos.

Dentre os sintomas de toxicidade descritos para o látex de *C. procera* estão a irritação e o desenvolvimento de processo inflamatório após contato com o material (TOMAR *et al.*, 1970; HANDA & SHARMA, 1984). Recentemente ALENCAR e colaboradores demonstraram que o estímulo inflamatório do látex de *C. procera* está

confinado na fração DL enquanto que a fração LP não apresenta tal atividade (ALENCAR et al., 2006). Além disto, os mesmos autores demonstraram que a atividade antiinflamatória do látex está totalmente presente na fração LP estudada neste trabalho (ALENCAR et al., 2004). Estes resultados sugerem que o protocolo de fracionamento do látex de *C. procera* desenvolvido neste trabalho foi muito eficiente em separar uma atividade tóxica de uma de interesse biotecnológico.

Há um relato na literatura de que o látex de *C. procera* seria tóxico para o mosquito transmissor da dengue (SINGH, et al., 2005) e mais recentemente foi sugerido que o material também teria atividade repelente (SINGH et al., 2004). Assim, após a caracterização bioquímica parcial das frações do látex, estas foram avaliadas quanto à capacidade de produzir efeitos deletérios sobre larvas do mosquito transmissor da Dengue, o *St. aegypti*.

No primeiro ensaio, foi verificado se de fato o látex íntegro poderia causar mortalidade às larvas do terceiro estágio. De fato, a morte das larvas no látex foi quase que instantânea e nenhum indivíduo sobreviveu 24 horas na presença do látex, mesmo quando diluído mil vezes.

A atividade foi também encontrada nas frações LP e DL. A fração RL, insolúvel em água não foi testada. A atividade larvicida de LP diminuiu consideravelmente após o seu aquecimento, o que sugere ser de fato de origem protéica a atividade larvicida, mas foi a forte redução da atividade verificada após tratamento com protease que deu evidências mais sólidas para esta hipótese. A fração DL não teve sua atividade larvicida reduzida pelo aquecimento ou por tratamento com protease e isto sugere o envolvimento de outros componentes na ação larvicida. O fato é que fica evidenciado que no látex há diferentes compostos envolvidos na ação larvicida. A ação de LP sobre

as larvas poderia ser especulada se relacionar com a presença de quitinases, pois larvas do terceiro estágio possuem uma estrutura quitinásica na sua membrana peritrófica (SOUZA-NETO *et al.*, 2003). Por outro lado, a forte atividade proteolítica presente no látex poderia certamente contribuir para a digestão de estruturas protéicas das larvas. No caso da fração DL é mais difícil especular a ação inseticida. Embora haja na literatura a descrição de compostos de baixa massa molecular no látex de *C. procera* (DEWAN *et al.*, 2000) não é evidente relacioná-los a atividade observada.

A divisão da fração LP em três picos protéicos através de cromatografia de troca iônica mostrou que a atividade larvicida se concentrava no PIII. A caracterização deste pico poderia levar a identificação do(s) composto(s) envolvido(s). Esta será uma outra etapa a ser realizada.

Foi interessante observar o efeito das frações LP e DL sobre a eclosão dos ovos de *St. aegypti*. Embora a eclosão não tenha sido inibida na presença destas frações, os indivíduos foram certamente afetados em seu desenvolvimento. Uma dose elevada de PL também inibiu severamente a eclosão dos ovos. Estes resultados não puderam ser discutidos com apoio na literatura, pois não há relatos de outros exemplos com *St. aegypti* ou com o látex. Estes resultados deveriam ainda ser aprofundados. Entretanto, fica evidente de que o látex de *C. procera* é realmente uma fonte de moléculas larvicidas.

O estudo toxicológico do látex deveria também ser detalhado. Aqui foi apenas verificada sua ação em animais por via endovenosa e intraperitoneal. Os resultados sugerem que as frações possuem potencial tóxico, mas este resultado não é conclusivo e muitos outros experimentos deveriam ser realizados. Muitos estudos toxicológicos do látex são descritos na literatura, entretanto em todos os casos somente, o látex total foi

avaliado (BADWI *et al.*, 1998; MELO *et al.*, 2001). Um estudo mais detalhado certamente poderia gerar resultados mais conclusivos, principalmente se as frações individuais fossem consideradas nesses estudos.

O látex de *C. procera* é uma potencial fonte de valor biológico no contexto de identificação de moléculas envolvidas em ações biológicas benéficas e outros defeitos tóxicos. Sua caracterização bioquímica é o passo inicial para entender suas atividades endógenas e efeitos em outros sistemas biológicos.

VI. CONCLUSÃO

O estudo bioquímico e funcional do látex de *Calotropis procera* poderá levar a identificação de seus compostos envolvidos em atividades farmacológicas e toxicológicas. O fracionamento do látex executado neste trabalho mostrou que é possível separar no látex estes dois conjuntos de compostos biológicos. A atividade larvicida do látex sobre *St. aegypti* demonstra que o látex poderia ser um veículo de controle para a proliferação do mosquito se as etapas de completa caracterização da amostra e mecanismo de ação forem bem identificadas. Enquanto que as vias de administração empregadas em animais para avaliar o potencial tóxico do látex, foram superficiais para fornecer resultados conclusivos. Portanto, investigações futuras quanto a esse aspecto serão bastante válidas.

VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, K.I. & JOSHI, P.N. Studies on proteinases from *Calotropis gigantean* latex. Purification and properties of two proteinases containing carbohydrates. **Biochem Biophys Acta** 568, 111-119, 1979.

AKHTAR, N.; MALIK, A.; ALI, S.N. and KAZMI, S.U. Proceraenin, an antibacterial cardenolide from *Calotropis procera*. **Phytochem** 31: 2821-2824, 1992.

ALENCAR, N.M.N., FIGUEIREDO, I.S.T., VALE, M.R., BITENCURT, F.S., OLIVEIRA, J.S., RIBEIRO, R.A., RAMOS, M.V. Anti-inflammatory effect of the latex from *Calotropis procera* in three different experimental models: Peritonitis, Paw Edema and Hemorrhagic Cystitis. **Planta Med** 70: 1144-1149, 2004.

ALENCAR, N. M. N., OLIVEIRA, J. S., MESQUITA, R. O, LIMA, M. W., VALE, M. R., ETHELLES, J. P., FREITAS, C. D. T., RAMOS, M. V. "Pro- and anti-inflammatory activities of the latex from *Calotropis procera* (Ait.) R.Br. are triggered by compounds fractionated by dialysis. **Inflammatory Research** v.xx:xx-xx. 2006 (*In press*).

ANIS, M., IQBAL, M. 1986. Anti-inflammatory efficacy of extracts of latex of *Calotropis procera* against different mediators of inflammation. **Mediators Inflammatory** 4: 288 – 232.

ANSARI, S.H., ALI, M. Norditerpenic ester and pentacyclic triterpenoids from root bark of *Calotropis procera* (Ait) R.Br. **Pharmazie** 56(2):175-177. 2001.

ARCHER, B. Lan alkaline proteases inhibitor from *Hevea brasiliensis* latex. **Phytochem** 23: 633-39,1983.

ARYA, S. & KUMAR, V.L. Anti-inflammatory efficacy of extracts of latex of *Calotropis procera* against different mediators of inflammation. **Mediators Inflammatory** 4, 228-232, 2005.

BADWI, E. L., SAMIA, M. A. ADAM, S. E. I., SHIGIDI, M T., HAPKE, H. J. Studies on laticiferous plants: Toxic effects in goats of *Calotropis procera* latex by different rout of administration. **Dtsch Tierarztl Wschr** 105, 425-427, 1998.

BASU, A., CHAUDHURI, A. Preliminary studies on the antiinflammatory and analgesic activities of *Calotropis procera* root extract. **J Ethnopharmacol** v. 31(3):319-324. 1991.

BAYROU O. Latex allergy. **Rev Prat** 56(3):289-95, 2006.

BINKLEY HM, SCHROYER T, CATALFANO J. Latex Allergies: A Review of Recognition, Evaluation, Management, Prevention, Education, and Alternative Product Use. **Journal Athl Train** v.38(2):133-140, 2003.

BLANEY, J. E. JR., DURBIN, A. P., MURPHY, B. R., WHITEHEAD, S. S. Development of a live attenuated dengue virus vaccine using reverse genetics. **Viral Immunology** 19(1):10-32. 2006.

BOLLER, T. Chitinase: a defense of higher plants against pathogens. In: **Chitin in Nature and Technology** pp 223-231. 1986.

BOMFIM, L.R., 2005. Bases moleculares da interação de lectinas da sub tribo Diocleinae com glicoconjugados. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará – **Curso de Pós-Graduação em Bioquímica**.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities for proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem** 72:248-254, 1976.

BROCKBANK, W.J.; LYNN, K.R. Purification and preliminary characterization of two asclepains from the latex of *Asclepias syriaca* L. (milkweed). **Biochem Biophys Acta** 566: 13-22, 1979.

CANZIANI, R., VISMARA, R., BASILICO, D. AND ZINNI, L.,1999. Nitrogen Removal in Fixed-Bed Submerged Biofilters without Backwashing. **Water Science and Technology** 40,145-152.

CARVALHO, A. F. U.; MELO, V. M. M.; CRAVEIRO, A. A., MACHADO, M. I. L., BANTIM, M. B., RABELO, E. F. Larvicidal Activity of the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. against *Aedes aegypti* Linn. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 98(4): 569-571. 2003.

CAVALLI, S.E.V.; ARRIBERE, M.C.; CORTADI, A.; CAFFINI, N.O. and PRIOLO, N.S. Morrenain b I, a Papain-like endopeptidase from the latex of *Morrenia brachystephana* Griseb. (*Asclepiadaceae*). **J Protein Chem** 22(1):15-22, 2003.

CEPLEANU, F., 1993. Validation and Application of tree Bench-top bioassays for screening of crude plant extracts and subsequent activity-guided isolation. **PhD Thesis, Faculté des Sciences**, Université de Lausanne, Lausanne, 186pp.

CHAIER N, JINDAWONG B, BOONSAWAS W, KANCHANARACH T, SAKUNKOO P. Glove allergy and sensitization to natural rubber latex among nursing staff at Srinagarind Hospital, Khon Kaen, Thailand. **J. Med Assoc Thai** 89(3):368-76, 2006.

CHEY, M.L. and CHEUNG, K.Y. β -1,3-glucanase is highly-expressed in laticifers of *Hevea Brasiliensis*. **J Mol Biol** 29:397-402,1995.

CHOEDON, T., MATHAN, G., ARYA, S., KUMAR, V.L., KUMAR, V., 2006. Anticancer and cytotoxic properties of the *Calotropis procera* in a transgenic mouse model of hepatocellular carcinoma. **World J Gastroenterol** 12:16, 2517-2522.

CONSOLI, R.A. and OLIVEIRA, R.L. Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil. **FioCruz** 225,1994.

DADA, Y.O., LAMIDI, M.T., EGHIANRUWA, K.I., ADEPAJU, F. Effects of oral administration of the latex of *Calotropis procera* on weights, hematology and plasma biochemistry of rats. **Trop Vet** 20, 218-225, 2002.

D'AUZAC, J. , CRETIN, H., MARIN, B. and LIORET, C. A plant vacuolar system: the lutoid from *Hevea brasiliensis* latex. **Physiology Veg** 20: 311-331, 1982.

D'AUZAC, J. Factors envolved in the stopping of flow after tapping. Physiology of rubber tree latex, Ed. **CRC**. Boca Raton, Flórida :85-257, 1998.

D'AUZAC, J and JACOB, J.L. The composition of latex from Hevea as a laticiferous cytoplasm. Physiology of Rubber Tree Latex. Ed. **CRC**. Boca Raton, Flórida: 59-96, 1988a.

D'AUZAC, J and JACOB, J.L. Tapping system and area of drained bark. Physiology of Rubber Tree Latex. Ed. **CRC**. Boca Raton, Flórida : 221-232, 1988b.

DELTA UNIVERSAL, Rio de Janeiro **Editora Delta**, 2ª Edição, p. 1394, 1982.

DEWAN, S.; SANGRAULA, H. and KUMAR, V.L. Preliminary studies on the analgesic activity of latex of *Calotropis procera*. **J Ethnopharmacol** 73: 307-11, 2000a.

DUBEY, V.K., JAGANNADHAM, M.V. Differences in the unfolding of Procerain induced by pH, guanidine hydrochloride, urea and temperature. **J Biochem** v. 42: 12287-12297. 2003.

DUBEY, V.K., JAGANNADHAM, M.V. Procerain, a stable cysteine protease from the latex of *Calotropis procera*. **Phytochem** 62:1057-1071. 2003.

DUBOIS M.; GILLES, A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A. and SMITH F. Colorimetric method for determination of sugar in related substances. **Anal Chem** 28(3): 350-56, 1956.

FREITAS, C. D. T. **Monografia**. Caracterização bioquímica parcial, atividade ovicida e larvicida contra o mosquito *Aedes aegypti* de uma fração do látex de *Calotropis procera*. Universidade Federal do Ceará (2005).

GALLEGOS-OLEA, R.S.; OLIVEIRA, A.V.; SILVEIRA, L.M.S. and SILVEIRA, E.R. Organic carbonate from *Calotropis procera* leaves. **Fitoterapia** 73: 263-65, 2002.

GIANNOPOLITIS, C.N and RIES, S.K. Superoxide dismutases.I.Occurrence in higher plants. **Plant Physiol** 59:309-314, 1977.

GIDROL, X., CHRESTIN, H., TAN, H. L., KUSH, A. Hevein, a lectin like protein from *Hevea brasiliensis* (rubber tree) is involved in the coagulation of latex. **The J Biol Chem** 269 (12): 9278-9283, 1994.

GIORDANI, R.; BENYAHIA, S.; TEISSERE, M. and NOAT, G. Purification and properties of N-acetyl- β -D-glucosaminidase from *Hevea Brasiliensis* latex. **Sci Plant** 84:25-34, 1992.

GIORDANI, R. and LAFON, L. Action of *Carica Papaya* latex on cell wall glycosidases from *Lactuca sativa*. **Phytochem** 34:1473-75,1993.

GIRDHAR, G.; DEVAL, K.; MITTAL, P.K. and VASUDEVAN, P. Mosquito control by *Calotropis* latex. **Pesticides** 18(10): 26-29, 1984.

GLAZER AN, BAREL AO, HOWARD JB, BROWN DM. Isolation and characterization of fig lysozyme. **J Biol Chem** 244(13):3583 – 3589, 1969.

GUPTA, R.S., SHARMA, N., DIXIT, V.P. Calotropin – a novel compound for fertility control. **Ancient Science of life** IX 4: 224-230. 1990.

GUBLER, D.J.(1988)Dengue, IN: T.P. Monath (ed) The arboviruses: epidemiology and ecology, Vol 2. **CRC**. Press Inc., Boca Raton, Flórida, 223-260.

GUBLER, D.J. (1989). *Aedes aegypti*-borne disease control in the 1990's: top down or bottom up.**Am J. Trop Med and Hygiene** 40, 571-578.

HANDA, F., SADANA, J.K. AND SHARMA, P.K. Allergic contact dermatitis due to plant of *Calotropis procera*. **Indian Journal of Dermatology** 29, pp. 27–29, 1984.

HENEIDAK., S., GRAYER, R. J., KITEA, G. C., SIMMONDS, M. S. J. Flavonoid glycosides from Egyptian species of the tribe Asclepiadeae (Apocynaceae, subfamily Asclepiadoideae). **Biochemical Systematics and Ecology** 34(7), 575-584, 2006.

HOWARD JB, GLAZER AN. Papaya lysozyme. Terminal sequences and enzymatic properties. **J Biol Chem** 244(6):1399 - 1409. 1969.

HUSSEIN, H.I. et al. Uscharin, the most potent molluscicidal compound tested against land snails. **Journal of Chemical Ecology** v. 20 (11): 135-140.1994.

JACH, G.; GORNHARDT, B.; MUNDY, J.; LOGERMANN, J.; PINSDORF, E.; LEAH, R.; SCHELL, J. & MAAS, C. Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. **The Plant J** 8: 97-109, 1995.

JEKEL, P.A.; HARTMANN, B.H. and BEINTEMA, J.J. The primary structure of hevamine, an enzyme with lysosyme/chitinase activity from *Hevea brasiliensis* latex. **Eur J Biochem** 200: 123-130, 1991.

JOHN, K.S., BHAT, S.G., PRASADA RAO, U.J.S. Biochemical characterization of sap (latex) of a few Indian mango varieties. **Phytochem** 62:13-19. 2003.

JONES, I. K., GLAZER, A. N. Comparative studies on four sulfhydryl endopeptidases ("ficins") of ficus glabrata latex. **J Biol Chem** 245(11):2765–2772, 1970.

KAMATH, J.V. and RANA, A.C. Preliminary study on antifertility activity of *Calotropis procera* roots in female rats. **Fitoterapia** 73:111-15, 2002.

KAPOOR, S.L. & KAPOOR, L.D. Medicinal plant wealth of the Karim nagar district of Andhra Pradesh. **Bull. Med Ethnobotanical Res** 1: 120-144. 1980.

KEKWICK, R.G.O., 2001. Latex and laticíferos. **Encyclopedia of Life Science**, 1-6.

KEMBHAVI, A.A.; BUTTLE, D.J.; KNIGHT, C.G. & BARRETT, A.J. The two cysteine endopeptidases of legume seeds: purification and characterization by use of specific fluometric assay. **Arch Biochem Biophys** 303: 208-213, 1993

KHAN, A.Q. and MALIK, A. A steroid from *Calotropis procera*. **Phytochem** 28:2859-61, 1989.

KIDWAI, A.M. and MURTI, C.R.K. Purification and properties of a bacteriolytic enzyme from the latex of *Ervatamia coronaria*. **Indian J Chem** (1):177-180, 1963.

KIRTIKAR, K.R. and BASU, B.D. In: **Indian Medicinal Plants**, Lolit Mohan Basu, Allahabad, p. 1606, 1935.

KISSMANN, K.G. and GHOTH, D. Plantas Infestantes e Nocivas. Tomo II. **Editora BASF** - São Paulo, 1992.

KONNO, K.; HIRAYAMA, C.; NAKAMURA, M.; TATEISHI, K.; TAMURA, Y.; HATTORI, M.; KOHNO, K. Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex. **The Plant J** 37:370–378, 2004

KUMAR, V.L., BASU, N. Anti-inflammatory activity of the latex of *Calotropis procera*. **J Ethnopharmacol** 44(2):123-125. 1994.

KUMAR, H.S.; DEWAN, S.; SANGRAULA, H. and KUMAR, V.L. Anti-diarrhoeal activity of the latex of *Calotropis procera*. **J Ethnopharmacol** 76: 115-18, 2001.

KUMAR, V. D.; JAGANNADHAM, M. V. Procerain, a stable cysteine protease from the latex of *Calotropis procera*. **Phytochem** 62: 1057-107, 2003.

KUNDU, S., SUNDD, M., JAGANNADHAM, M.V. Purification and characterization of a stable cysteine protease Ervatamin B, with two disulfide bridges, from latex of *Ervatamia coronaria*. **J Agric Food Chem** 48: 171-179, 2000.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T₄. **Nature** 227: 680-688, 1970.

LARHSINI, M.; BOUSAID, M.; LAZREK, H.B.; JANA, M. and AMAROUCHE, H. Evaluation of antifungal and molluscicidal properties of extracts of *Calotropis procera*. **Fitoterapia** 4: 371-73, 1997.

LARHSINI, M., OUMOULID, L., LAZREK, H.B., WATALEB, S., BOUSAID, M., BEKKOUCHE, K., MARKOUK, M., JANA, M. Screening of antibacterial and antiparasitic activities of six Moroccan medicinal plants. **Therapie** v. 54(6):763-765. 1999.

LAWRENCE, C.B.; JOOSTEN, M.H.A.J. & TUZUN, S. Differential induction of pathogenesis-related proteins in tomato by *Alternaria solani* and the association of a basic chitinase isozyme with resistance. **Physiol Mol Plant Pathol** 48: 361-377, 1996.

LIGGIERI, C.; ARRIBERE, M.C.; TREJO, S.A.; CANALS, F.; AVILES, F.X. and PRIOLO, N.S. Purification and Biochemical Characterization of Asclepain c I from the latex of *Asclepias curassavica* L. **J The Protein** 23(6): 403-11, 2004.

LIN, Y.H. & LU, C.L., 1994. Latex trypsin inhibitors of sweet potato (*Ipomea batatas* Lam.) Bot. Bull. **Acad Sin** 35, 153-159.

LIS, H., SHARON, N. Soybean (Glycine max) agglutinin. **Methods in Enzymology** 28, p. 360-368, 1972.

LITCHFIELD Jr, J.T. and WILCOXON, F.A. A simplified method for evaluation of dose-effect experiments. **J Pharm Experim Therap** 96: 99-104, 1949.

LIU, Y.; DAMMANN, C. & BHATTACHARYYA, M.K. The matrix metalloproteinase gene GmMMP2 is activated in response to pathogenic infections in soybean. **Plant Physiol** 127: 1788–1797, 2001.

LOFGREN, C.S. Ultralow volume applications of concentrated insecticides in medical and veterinary entomology. **Annu Rev Entomol** 15: 321-342, 1970.

LORENZI, H and MATOS, F.J.A. Plantas medicinais no Brasil: natives e exóticas. **Instituto Plantarum** São Paulo. 315p, 2002.

LYNN, K.R. and CLEVETTE-RADFORD, N.A. Hevains: serine-centred proteases from the latex of *Hevea brasiliensis*. **Phytochem** 25(10): 2279-2282, 1986.

LYNN, K.R. & CLEVETTE-RADFORD, N.A. Acid phosphatases from lattices of Euphorbiaceae. **Phytochem** 26, 655-657, 1987..

MAILLARD, M., MARSTON, A., HOSTETTMANN, K. Search for moluscicidal and larvicidal agents from plants. **In M Balandrin Human Medicinal Agents from Plants, American Chemical Society**, Washington D.C., 359 pp., 1993.

MAJUMDAR, P.K. and KUMAR, V.L. Anti-inflammatory activity fractions of latex of *C procera* in carragenan induced rat paw oedema. **Phytotherapy Research** 11(2): 166-167, 1997.

MARKOUK, M., BEKKOUCHE, K., LARSHINI, M., BOUSAID, M., LAZREK, H.B., and JANA, M. Evaluation of some Moroccan medicinal plant extracts for larvicidal activity. **J Ethnopharmacol** 73: 293-297, 2000.

MATOS, M. F., LEITE, L. I., BRUSTOLIM, D., DE SIQUEIRA, J. M., CAROLLO, C. A., HELLMANN, A. R., PEREIRA, N. F., DA SILVA D. B. Antineoplastic activity of selected constituents of *Duguetia glabriuscula*. **Fitoterapia** 77(3):227-229, 2006.

MATTHEUS, G.A., Application of insecticides in dengue control. **Pest. Outlook**, February: 25-30, 1996.

MELO, M. M. ; VAZ, F. A. ; GONÇALVES, L. C. ; SATURNINO, H. M. Phitochemical study of the *Calotropis procera* Ait., in goats feeding: clinical effects and biochemical parameters. **Ver Bras Saúde Prod An** 2(1):15 - 20, 2001.

MESHARAM, P.B. Evaluation of some medicinal and natural plant extracts against Teak Skeletonizer. *Evietiore marhaeralis walk*. **The Indian Forester** 121(6): 526-532, 1995.

METCALFE, C.R. Distribution of latex in the plant kingdow. **Economic Botany** 21:115-27, 1967.

MILLER, H.R.P. AND TAINER, M.L. Estimulation of DL_{50} and error by mean logarithmic probit graph paper. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 57, p. 261 -264, 1944.

MONATH, T.P. & HEINZ, F.Z. Flaviviruses. **Fields virology**, 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Raven Publishers 961-1034. 1996.

MORCELLE, S.R., CAFFINI, N.O., PRIOLO, N. Proteolytic properties of *Funastrum clausum* latex. **Fitoterapia** 75(6): 480-493. 2004.

MOREIRA, R.A., PERRONE, J.C. Purification and parcial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiol** 59, p.783-787, 1977.

MOURSEY, L.E. Insecticidal activity of *Calotropis procera* extracts of the flesh fly, *Sarcophaga haemorrhoidalis* fallen. **J Egyp Soc Parasitol** 27(2):505-514, 2001.

MURA A, PINTUS F, LAI P, PADIGLIA A, BELLELLI A, FLORIS G, MEDDA R. Catalytic pathways of *Euphorbia characias* peroxidase reacting with hydrogen peroxide. **Biol Chem** 387(5):559-67, 2006.

NAKANO, Y. and ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidases in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiol** 22:867-880, 1981.

OBREGON, W.D; ARRIBERE, M.C; MORCELLE DEL VALLE, S; LIGGIERI. C; CAFFINI, N.O. and PRIOLO, N.S. Two new cysteine endopeptidases obtained from the latex of *Araujia hortorum* fruits. **J Protein Chem** 20:317-25, 2001.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: guidelines for prevention and control. Washington DC: Pan American Health Organization; 1995. (**Scientific Publication 548**)

PEDRO, A. O dengue em Nictheroy. **Bras Med** 1923; 1:173-177.

PEREIRA, L. S., GOMES, V. M., FERNANDES, K. V. S., SALES, M. P., XAVIER-FILHO, J. Insecticidal and antifungic proteins of the latex from *Manihot glaziovii* Muell. Arg. **Rev Bras Bot** 22:1, 27-30. 1999.

PRAKASH, A.O., GUPTA, R.B., MATHUR, R. Effect of oral administration of forty-two indigenous plant extracts on early and late pregnancy in albino rats. **Probe** 17: 4, 315-322. 1978.

PRASAD, G., Action of *Calotropis procera* on Migrane (Fam. – Asclepiadaceae). **J National Medical Association** 27: 6, 7-10 1985.

PRIOLO, N; MORCELLE DEL VALLE, S; ARRIBÉRE, M.C; LOPEZ, L.M.I. and CAFFINI, N.O. Isolation and characterization of a cysteine protease from the latex of *Araujia hortorum* fruits. **J Protein Chem** 19:39-49, 2000.

QUAQUEBEKE, E. V., SIMON, G., ANDRÉ, A., DEWELLE, J., EL-YAZIDI, M., BRUYNEEL, F., TUTI, J., NACOULMA, O., GUISSOU, P., DECAESTECKER, C., BRAEKMAN, J. C. KISS, R., DARRO, F. Identification of a Novel Cardenolide (2'-Oxovorucharin) from *Calotropis procera* and the Hemisynthesis of Novel Derivatives Displaying Potent in Vitro Antitumor Activities and High in Vivo Tolerance: Structure-Activity Relationship Analyses. **Medical Chemistry**, 48 (3), 849 -856, 2005.

QURESHI, M.A., QUERESH, N.M., ARSHAD, R., BEGUM, R. A study on the antispermatogenic activity in extracts from different parts of *Calotropis procera*. **Pakistan J Zoology** 23: 2, 161-165, 1991.

RAMOS, M.V., CAVADA, B.S., BOMFIM, L.R., DEBRAY, H., MAZARD, A-M., CALVETE, J.J., GRANGEIRO, T.B. and ROUGÉ, P. Interaction of the seed lectin from *Parkia platycephala* (Mimosoideae) with carbohydrates and complex glycans. **Protein and Peptide Letters** 6, 215-222, 1999.

RAMOS, M.V., BOMFIM, L.R., CAVADA, B.S., ALENCAR, N.M.N., GRANGEIRO, T.B. and DEBRAY, H. Further characterization of the glycan-binding specificity of the seed lectin from *Vatairea macrocarpa* and its dependence of pH. **Protein and Peptide Letters** 7, 241-248, 2000.

RAMOS, M.V., SAMPAIO, A.H., CAVADA, B.S., CALVETE, J.J., GRANGEIRO, T.B. and DEBRAY, H., 2001. Characterization of the sugar-binding specificity of the toxic lectins isolated from *Abrus pulchellus* seeds. **Glycoconjugate Journal** 18, 391-400.

RAMOS, M.V., CAVADA, B.S., MAZARD, A.M., ROUGE, P., 2002. Interaction of Diocleinae lectins with glycoproteins based in surface plasmon resonance. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 97:2, 275-279.

RAMOS, M.V., BANDEIRA, G.P., FREITAS, C.D.T., NOGUEIRA, N.A.P., ALENCAR, M.N., SOUSA, P.A.S., CARVALHO, A.F.U. Latex constituents from *Calotropis procera* (R.Br) display toxicity upon egg hatching and larvae of *Aedes aegypti* (Linn). **Mem Inst Oswaldo Cruz** 101(5): 503-510, 2006.

RAMOS, M.V., AGUIAR, V.C., XAVIER, A.A.S., LIMA, M.W., BANDEIRA, G.P., ETHELLES, J.P., NOGUEIRA, N.A.P., ALENCAR, N.M.N. Latex proteins from the plant *Calotropis procera* are partially digested upon in vitro enzymatic action and are not immunologically detected in fecal material. **Fitoterapia** 77, 251-256, 2006.

RASIK, A.M., RAGHUBIR, R. GUPTA, A., SSHUKLA, A., DUBEY, M.P., S., JAIN, H.K. and KULSHRESTHA. Healing potencial of *Calotropis procera* on dermal wounds in guinea pigs. **J Ethnopharmacol** 68: 261-266,1999.

REINERT, J.F. and HARBACH, R.E. Generic and subgeneric status of aedine mosquito species (Diptera: Culicidae: Aedini) occurring in the Australasian Region. **Zootaxa** 887: 1-10, 2005.

REISFELD, R.A.; LEWIS, U.J. and WILLIAMS, D.E. Disc electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. **Nature** 195:281-283, 1962.

RUDENSKAYA, G. N.; BOGDANOVA, E. A.; REVINA, L. P; GOLOVKIN, B. N. & STEPANOV, V. M. Macluralisin - a serine proteinase from fruits of *Maclura pomifera* (Raf.) Schneid. **Planta** 196(1): 174 – 179, 1995.

SABY, J. K., RAO, L. J. M., BHAT, S. G., PRASADA RAO, U. J. S. Characterization of aroma components of sap from different Indian mango varieties. **Phytochem** 52(5), 891-894, 1999.

SABY, J. K., BHAT, S. G., PRASADA RAO, U. J. S. Biochemical characterization of sap (latex) of few Indian mango varieties. **Phytochem** 62, 13-19. 2003.

SATOH, A. and MATSUMOTO, I. Analyses of interaction between lectins and carbohydrate by surface plasmon resonance. **Anal Biochem** 275:268-270, 1999.

SELVARAJ, Y., PAL, D. K. Changes in the chemical composition and enzyme activity of two sapodilla (*Manilkara zapota*) cultivars during development and ripening. **J horticultural Scienc** 59(2): 275-281, 1984.

SGARBIERI, V.C., GUPTA, S.M., KRAMER, D.E. & WHITAKER, J.R., 1964. ficus enzymes: Separation of proteolytic enzymes of *Ficus glabrata* and *Ficus carica*. **J Biol Chem** 239, 2170-2177.

SHARMA, P. and SHARMA, J.D. Evaluation of in vitro schizontocidal activity of plant parts of *Calotropis procera* – an ethnobotanical approach. **J Ethnopharmacol** 68: 83-95, 1999.

SHARMA, P. and SHARMA, J.D. In-vitro schizonticidal screening of *Calotropis procera*. **Fitoterapia** 71:77-79, 2000.

SHIVKAR, Y. M.; KUMAR, V. L. Histamine mediates the pro-inflammatory effect of latex of *Calotropis procera* in rats. **Mediators Inflammatory** 12: 299-302, 2003.

SINGH, V.K., & ALI, Z.A. Folk medicines in primary health care: common plants used for the treatment of fevers in India. **Fitoterapia** LXV 1: 68-74. 1994.

SINGH, H., KUMAR, S., DEWAN, S., KUMAR, V.L. Inflammation induced by latex of *Calotropis procera* – a new model to evaluate anti-inflammatory drugs. **J Pharmacol Toxicol Methods** 43, 219-224, 2000.

SINGH, M., JOSHI, V., SHARMA, R. C., SHARMA, K. Ovipositioning behaviour of *Aedes aegypti* in different concentrations of latex of *Calotropis procera*: studies on refractory behaviour and its sustenance across gonotrophic cycles. **Dengue Bull** 28 184-188, 2004.

SINGH RK, MITTAL PK, DHIMAN RC. Laboratory study on larvicidal properties of leaf extract of *Calotropis procera* (Family-Asclepiadaceae) against mosquito larvae. **J Commun Dis** 37(2):109-13, 2005.

SILER, D. J. & CORNISH, K. Measurement of protein in natural rubber latex. **Anal Biochem** 229:278-81, 1995.

SILVA, L.G.; GARCIA, O.; LOPES, M.T.P. and SALAS, C.E. Changes in protein profile during coagulation of latex from *Carica papaya*. **Braz. J Med Biol Res** 30(5):615-19, 1997.

SMITH, E.L., KIMMEL, J.R., BROWN, D.M and THOMPSON, E.O.P. **J Biol Chem** 67: 215, 1955.

SOARES, P.M., LIMA, S.R., MATOS, S.G., ANDRADE, M.M., PATROCINIO, M.C., DE FREITAS, C.D., RAMOS, M.V., CRIDDLE, D.N., CARDI, B.A., CARVALHO,

K.M., ASSREUY, A.M., VASCONCELOS, S.M. Antinociceptive activity of *Calotropis procera* latex in mice. **J Ethnopharmacol** 13: 99:1, 125-129, 2005.

SOLOMON. M.; BELENGHI, B.; DELLEDONNE, M.; MENACHEM, E. & LEVINE, A. The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. **Plant Cell** 11: 431–443, 1999.

SOUZA-NETO, J. A.; GUSMÃO, D. S.; LEMOS, F. J.A. Chitinolytic activities in the gut of *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae) larvae and their role in digestion of chitin-rich structures. **Comp Biochem Physiol Part A** 136, 717-724, 2003.

SUPERINTENDÊNCIA DE CONTROLE DE ENDEMIAS – SUCEN (1990). Manual de atividade para controle dos vetores de dengue e febre amarela: controle Mecânico e químico. São Paulo. 21 pp (mimiografado)

SUNDD, M., KUNDU, S., PAL, G.P., JAGANNADHAM, M.V. Purification and characterization of a highly stable cysteine protease from the latex of *Ervatamia coronaria*. **Biosci Biotechnol Biochem** 62: 1947-1955, 1998.

SUSSMAN, G.L., BEEZHOLDB, D.H., LISSC, G. Látex allergy: historical perspective. **Methods** 27: 1, 3-9. 2002.

TAIRA T, OHDOMARI A, NAKAMA N, SHIMOJI M, ISHIHARA M. Characterization and antifungal activity of gazyumaru (*Ficus microcarpa*) latex chitinases: both the chitin-binding and the antifungal activities of class I chitinase are reinforced with increasing ionic strength. **Biosci Biotechnol Biochem** 69(4):811-8, 2005.

TAUIL, P. L. Urbanization and dengue ecology. **Cad Saúde Pública** 17 Suppl:99-102, 2001.

TAUIL, P. L. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. **Cad Saúde Pública** 18:867-71, 2002.

TEIXEIRA, M. G., COSTA, M. C. N., GUERRA, Z., BARRETO, M. L. Dengue in Brazil: situation-2001 and trends. **Dengue Bull** 26:70-6 2002.

TELLAM, R.L.; WIJFFELS, G. & WILLADESEN, P. Peritrophic matrix proteins. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 29: 87-101, 1999.

THANGAN, T.S. and KATHIRESAN, N.K. Mosquito larvicidal effect of seaweed extracts. **Bot Mar** 34:433-435, 1991.

THE WEALTH OF ÍNDIA, IN: Raw Materials 3 **Publication and Information Directorate**, CSIR, New Delhi, pp. 78-84, 1992.

TOMAR, V.P.S., AGARWAL, P.K. AND AGARWAL, B.L. Toxic iridocyclitis caused by *Calotropis procera*. **Journal of the All-India Ophthalmological Society** 18, pp. 15–16, 1970.

TREJO, S.A; LOPEZ, L.M.I; CIMINO, C.V; CAFFINI, N.O. and NATALUCCI, C.L. Application of the S-pyridylethylation reaction to the elucidation of the structures and functions of proteins. **J Protein Chem** 20:431-53, 2001.

WEBSTER, C.C., PAARDEKOOOPER, E.C. The botany of the rubber tree. In: WEBSTER, C.C., BAULKWILL, W.J. Rubber. New York: **Longman Scientific & Technology** p.57-84, 1969.

WHO. Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever. Fact Sheet n°.117. **World Health Organization** Geneva. 2002

WILSON, M. D., AKPABEY, F.J., OSEI-ATWENEBOANA, M. Y., BOAKYE, D. A., OCRAN, M., KURTAK, D. C., CHEKE, R. A., MENSAH, G. E., BIRK HOLD, D.,

CIBULSKY, R. Field and laboratory studies on water conditions affecting the potency of VectoBac (*Bacillus thuringiensis* serotype H-14) against larvae of the blackfly, *Simulium damnosum*. **Med Vet Entomol** 19(4):404-412. 2005.

WITITSUWANNAKUL, R.; WITITSUWANNAKUL, D.; HAREONTHIPHAKORN, N. and PACE, M. Polyphenol oxidases from latex of *Hevea brasiliensis*: purification and characterization. **Phytochem** 61:115-21, 2002.

YEANG, H.Y.; ARIF, S.A.M.; YUSOF, F. and SUNDERASAN, E. Allergenic proteins of natural rubber latex. **Methods** 27:32-45, 2002.

ZACHARIUS, R.M.; ZELL, T.E.; MORRISON, J.H. and WOODLOCK, J.J. Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. **Anal Biochem** 30:148-152, 1969.

ZENG, Y.; BANNON, G.; THOMAS, V.H.; RICE, K.; DRAKE, R. and ELBEIN, A. Purification and specificity of beta 1,2-xylosyltransferase, an enzyme that contributes to the allergenicity of some plant proteins. **J Biol Chem** 272(50):31340-7, 1998.