



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

**Avaliação do Potencial Fungicida e Termiticida
de uma Fração Protéica Lectínica de Sementes de
Platypodium elegans Vogel e Obtenção da Lectina
Purificada**

Raquel Guimarães Benevides

**Fortaleza
Março – 2008**



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

Avaliação do Potencial Fungicida e Termiticida de uma Fração Protéica Lectínica de Sementes de *Platypodium elegans* Vogel e Obtenção da Lectina Purificada

Dissertação submetida à
Coordenação do Curso de Pós-
Graduação em Bioquímica como
requisito para obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica

Raquel Guimarães Benevides

**Fortaleza
Março – 2008**

DEFESA DE DISSERTAÇÃO:

**Avaliação do Potencial Fungicida e Termiticida de uma
Fração Protéica Lectínica de Sementes de *Platypodium
elegans* Vogel e Obtenção da Lectina Purificada**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica
como requisito para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica

Raquel Guimarães Benevides
Bacharel e Licenciada em Biologia

BANCA EXAMINADORA:

Professor Doutor Benildo Sousa Cavada (Orientador)
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará

Professor Doutor José Tadeu Abreu de Oliveira
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará

Doutor Celso Shiniti Nagano
Departamento de Engenharia de Pesca
Universidade Federal do Ceará

Fortaleza
Março - 2008

A Deus,
A meu pai Ricardo (*in memoriam*)
A minha mãe Lindóia,
A minhas irmãs Rafaela e Rebeca,
A meu amado marido Elton,

Dedico

“Diga-me e eu esquecerei;
Ensina-me e eu aprenderei;
Envolve-me e eu lembrarei”

Benjamim Franklim

AGRADECIMENTOS...

De modo bem especial ao Professor Doutor **Benildo Sousa Cavada**, pela orientação e ensinamentos, não só para a conclusão deste trabalho, como para toda minha vida acadêmica até então. Sua muita dedicação, compreensão, amizade e oportunidade que me proporcionaram trilhar novos caminhos jamais poderão cessar os meus eternos agradecimentos. Obrigada por acreditar em mim!

Ao Professor Tadeu, por toda a sua orientação e ensino, que me abriram a mente e diversificaram meu saber científico.

Ao amigos e colegas de trabalho Roberto Sá e Celso Nagano, pela amizade, paciência, orientação e ajuda neste trabalho.

De modo especial aos amigos Emmanuel e Márcia Marinho, meus grandes amigos, cujos ensinamentos e alegria no dia-a-dia jamais serão esquecidos.

Aos grandes amigos do BioMol-Lab, grandes incentivadores e apoiadores do meu trabalho. Sem vocês, sem dúvida alguma, não teria conseguido chegar até aqui: Talinhos (obrigada por tudo!), Júlia, Eduardo, Márcia, Ramon, Soraya, Jéssica, Felipe Silveira, Cícero, Sâmia, Sara, Victor, Kyria, Bruno, Rodrigo, Vavá, Raniere, Ito, Alysson.

Aos meus novos amigos e colegas companheiros da turma de Bioquímica 2007.1, em especial, pela amizade, apoio, solidariedade e incentivo.

Aos meus eternos companheiros de turma Henrique, Carla Maria, Davi Coe, Marcelo Moro e Diego Coelho, pela grande amizade incondicional, sempre mais próximos e zelosos... vou sentir saudades.

Agradeço em especial toda a turma Biologia 2002.1, pela companhia e amizade na grande caminhada pelas descobertas diárias na universidade.

Meu sincero agradecimento a todos os professores e mestres da bioquímica e departamentos vinculados, de quem tive a grande oportunidade de desfrutar momentos de ensinamentos engrandecedores, científicos e de vida, abrindo-me novos horizontes.

De maneira especial e particular, agradeço à minha família, minha mãe Lindóia e irmãs Rafaela e Rebeca e meu cunhado Muniz, que me deram todo o suporte em amor, compreensão e paciência durante essa fase, compartilhando meus obstáculos e apoiando: vocês são minha maior motivação.

Agradeço aos meus familiares, tios, tias, primos e primas com quem compartilho longos caminhos, pelo apoio, amor e carinho.

A todas as pessoas amigas e companheiras que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho, com críticas construtivas, favores, incentivos e apoio.

Registro aqui também o meu muito obrigado, faltando-me palavras para expressar minha gratidão, amor e grande felicidade de poder ter ao meu lado Elton Menezes Leite, meu grande amor, companheiro, incentivador e muitas vezes guia, a quem devo muito o que hoje sou...muito obrigada por tudo.

Por último, declaro aqui minha grande gratidão à minha existência e ao modo como tenho conseguido triunfar meio a obstáculos, limites e medos... Não por forças próprias, mas por Aquele que foi e é o grande Autor da vida, em todas as suas formas, belezas e integridade: Deus.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	10
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE TABELAS	14
LISTA DE GRÁFICOS	14
RESUMO	15
ABSTRACT	16
<u>1. INTRODUÇÃO:</u>	17
<u>2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA:</u>	20
<u>2.1. Mecanismo de defesa de plantas</u>	21
2.1.1. Introdução	21
2.1.2. Interações entre plantas e seus predadores: defesas mecânicas e defesas químicas	23
2.1.3. Fitoalexinas como compostos vegetais de defesa	25
<u>2.2. Histórico e definição de lectina</u>	27
<u>2.3. Ocorrência e Função Endógena</u>	31
<u>2.4. Lectinas de Plantas</u>	31
<u>2.5. Lectinas de Leguminosas</u>	32
<u>2.6. Propriedades químicas, físicas e biológicas</u>	34
<u>2.7. Lectinas como Proteínas Vegetais de Defesa</u>	34
2.7.1 Evidências indiretas sobre o papel defensivo de lectinas de plantas	35
2.7.2. Evidências diretas sobre lectinas com papel de defesa em plantas	36
a) Atividade Antiviral de Lectinas de Plantas	37
b) Atividade Antibacteriana de Lectinas de Plantas	37
c) Atividade Antifúngica de Lectinas de Plantas	38
d) Atividade Inseticida de Lectinas de Plantas	39
e) Toxicidade de Lectinas de Plantas Para Animais Superiores	41
f) RIPs Tipo 2: Uma Classe Especial de Quimerolectinas Com Uma Toxicidade Geral Para Todos Os Eucariotos	42
<u>2.8. Preservação da Madeira</u>	43
2.8.1. Introdução	43
2.8.2. Preservação da Madeira no Passado	44

2.8.3. Preservativos Atuais	45
2.8.4. No Futuro	47
<u>2.9. Térmitas</u>	48
<u>2.10. Fungos</u>	53
<u>2.11. <i>Platypodium elegans</i> Vogel</u>	54
<u>2.12. Lectina de <i>Platypodium elegans</i></u>	55
<u>2.13. Hipótese de Trabalho</u>	57
<u>3. OBJETIVOS:</u>	58
<u>3.1. Objetivo Geral</u>	59
<u>3.2. Objetivos Específicos</u>	59
<u>4. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS:</u>	60
<u>4.1. Materiais Reagentes</u>	61
<u>4.2. Material Biológico</u>	62
<u>4.3. Equipamentos</u>	62
<u>5. METODOLOGIA/ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL:</u>	63
<u>5.1. Procedência do Material</u>	64
<u>5.2. Obtenção de Farinha</u>	64
<u>5.3. Extração Total de Proteínas da Farinha de Sementes de <i>Platypodium elegans</i></u>	65
<u>5.4. Detecção de Atividade Hemaglutinante (A.H.) no Extrato Total</u>	65
<u>5.5. Dosagem de Proteínas Solúveis</u>	66
<u>5.6. Cálculo da Atividade Específica</u>	67
<u>5.7. Inibição da A.H. por Açúcares Simples, Glicoproteínas e Açúcares Sulfatados</u>	67
<u>5.8. Isolamento por Cromatografias de Afinidade e Troca Iônica</u>	68
5.8.1. Cromatografia de Afinidade em Quitina	68
5.8.2. Cromatografia de Troca Iônica em DEAE-Sephacel	68
5.8.3. Cromatografia de Troca iônica em HiTrap SP acoplada a HPLC	70
<u>5.9. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em Presença de SDS</u>	70
<u>5.10. Atividade Inseticida contra Cupins</u>	71
5.10.1. Atividade Termiticida	71
5.10.2. Ensaio de Repelência	72
<u>5.11. Atividade Fungicida</u>	72

<u>6. RESULTADOS OBTIDOS:</u>	74
<u>6.1. Detecção de Atividade Hemaglutinante (A.H.) no Extrato Total</u>	75
<u>6.2. Dosagem de Proteínas Solúveis e Cálculo da Atividade Específica</u>	75
<u>6.3. Inibição da A.H. por Açúcares Simples, Glicoproteínas e Açúcares Sulfatados</u>	75
<u>6.4. Isolamento por Cromatografias de Afinidade e Troca Iônica</u>	75
6.4.1. Cromatografia de Afinidade em Quitina	75
6.4.2. Cromatografia de Troca Iônica em DEAE-Sephacel	78
6.4.3. Cromatografia de Troca iônica em HiTrap SP acoplada a HPLC	81
<u>6.5. Tabela de Purificação da Lectina de <i>P. elegans</i></u>	81
<u>6.6. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em Presença de SDS</u>	81
<u>6.7. Atividade Inseticida contra Cupins</u>	85
6.7.1. Atividade Termiticida	85
6.7.2. Ensaio de Repelência	85
<u>6.8. Atividade Fungicida</u>	89
<u>7. DISCUSSÃO:</u>	92
<u>8. CONCLUSÃO:</u>	100
<u>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:</u>	102

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- A.H.:** Atividade Hemaglutinante
- ACA:** *Amaranthus caudatus* agglutinin
- ACQ:** Alkaline Copper Quat
- BSA:** Albumina Sérica Bovina
- CA:** Copper Azole
- CB:** Copper Betaine
- CCA:** Chromated Cooper Arsenato
- CN:** Hemácias de Coelho Nativas
- ConA:** Concanavalina A, lectina de *Canavalia ensiformes*
- ConBr:** Lectina de *Canavalia brasiliensis*
- CP:** Hemácias de Coelho Papainizadas
- CRD:** Domínio Globular de Reconhecimento ao Carboidrato
- CT:** Hemácias de Coelho Tripsinizadas
- CX:** Copper Lylogen
- DCOIT:** Isotiazolona- 4,5-dicloro- 2-*n*-octil-4-isothiazol-3-ona
- DDAC:** Cloreto de Didecildimetilamônio
- DEAE:** Trocador Aniônico Dietilaminoetano
- GalNac:** N-acetil-galactosamina
- GlucNac:** N-acetil-glucosamina
- Gp120, 160 e 41:** Glicoproteínas de HIV
- HIV:** Vírus da Imunodeficiência Humana (Human Immunodeficiency Virus)
- HPLC:** Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (High Performance Liquid Chromatography)
- PDB:** Protein Data Bank
- Penta:** Pentaclorofenol
- pH:** Potencial Hidrogeônico
- PHA:** Lectina de *Phaseolus vulgaris* (*Phaseolus vulgaris* Agglutinin)
- PPL2:** lectina de *Parkia platycephala* 2
- RIPs:** Proteínas Inativadoras de Ribossomos (Ribosome Inactivating Proteins)
- RNAr:** Ácido ribonucléico ribossômico
- SAR:** Resistência Sistêmica Adquirida (Systemic Acquired Resistance)
- SD:** desvio padrão

SDS: Dodecil Sulfato de Sódio

SDS-PAGE: Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em presença de Dodecil Sulfato de Sódio

SP: Trocador Catoônico Sulfopropil

SVN: Scitvirina, lectina isolada de *Scytonema varium*

TxLC-I: Lectina de Tulipa

U.H.: Unidades de Hemaglutinação

UDA: Lectina de Urtiga (*Urtica dioica* Agglutinin)

URM: University Recife Mycology

WGA: Lectina do Trigo (Wheat Germ Agglutinin)

YNB: Yeast Nitrogen Base

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Pisatina, a primeira fitoalexina isolada e caracterizada (CRUICKSHANK & PERRIN, 1960)	2624
Figura 2: Representação Esquemática de Merolectinas, Hololectinas, Quimerolectinas e Superlectinas (VAN DAMME <i>et al.</i> , 1998).	87
Figura 3: Estrutura Tridimensional de Lectinas de Plantas.	
Figura 4. <i>Nasutitermes corniger</i>	52
Figura 5: <i>Platypodium elegans</i> .	56
Figura 6. Representação do fruto e semente de <i>P. elegans</i> . (a) Fruto maduro (b) Detalhes da Semente.	64
Figura 7. Representação esquemática de hemaglutinação por lectinas, baseada em KENNEDY <i>et al</i> (1995).	66
Figura 8. Grupo funcional DEAE (dietilaminoetano) utilizado no gel de DEAE-Sephacel	69
Figura 9. Grupo funcional SP (sulfopropil) utilizado em Hitrap SP	70
Figura 10. Representação Esquemática do Ensaio “com escolha” de Repelência de Térmitas pela Lectina de <i>P. elegans</i> .	73
Figura 11: Cromatografia de Afinidade em Quitina.	79
Figura 12: Comparativo de Perfil Cronatográfico em DEAE-Sephacel a pH's distintos.	79
Figura 13: Cromatografia de Troca Iônica em DEAE-Sephacel.	80
Figura 14: Cromatografia de Troca Iônica em Hitrap SP acoplada HPLC.	82
Figura 15. Esquema Geral da Obtenção da Lectina de <i>P. elegans</i>	83
Figura 16: SDS-PAGE (12,5%).	84
Figura 17. Efeito do contato com a lectina de <i>P. elegans</i> em operários de <i>N. corniger</i> .	87
Figura 18. Comparativo do efeito do contato com a lectina de <i>P. elegans</i> em operários de <i>N. corniger</i> .	87
Figura 19. Efeito do contato com a lectina de <i>P. elegans</i> em soldados de <i>N. corniger</i> .	88
Figura 20. Comparativo do efeito do contato com a lectina de <i>P. elegans</i> em soldados de <i>N. corniger</i> .	88

Figura 21. Crescimento dos fungos <i>F. solani</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F. decemcellulare</i> , <i>F. moniliforme</i> e <i>F. lateritium</i> em meio YNB.	90
Figura 22. Percentual de Inibição do Crescimento dos Fungos <i>F. solani</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F. decemcellulare</i> , <i>F. moniliforme</i> e <i>F. lateritium</i> em meio YNB.	91
Figura 23. Cromatografia de Exclusão Molecular em TSK acoplada a HPLC.	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Listagem de gêneros de cupins que ocorrem no Brasil, nas Américas e no mundo e são considerados como espécies-praga.	51
Tabela 2. A.H. - Extrato Total – Coelho	76
Tabela 3. Atividade Específica - Extrato total	76
Tabela 4. Inibição da A.H. por Açúcares – Extrato Total	77
Tabela 5. A.H. das Frações obtidas do “Screening” de pHs para Cromatografia em DEAE-Sephacel.	80
Tabela 6. Tabela de Purificação da Lectina de <i>P. elegans</i>	82
Tabela 7. Percentual de Sobrevivência de térmitas operários de <i>N. corniger</i> .	86
Tabela 8. Percentual de Sobrevivência de térmitas soldados de <i>N. corniger</i> .	86
Tabela 9. Medidas, médias e desvios padrões dos Halos de Crescimento (mm) dos fungos testados com 20 ug de lectina de <i>P. elegans</i> .	90

RESUMO

Sementes de *Platypodium elegans* Vogel, pertencente à Família Fabaceae, sub-família Papilionoideae, Tribo Dalbergiae possui uma lectina Manose/Glicose ligante. Na purificação da lectina em estudo, o extrato total de sementes de *P. elegans* preparado em NaCl 0,15M teve sua fração hemaglutinante isolada por cromatografia de afinidade em quitina, trocas iônica em DEAE-Sephacel e em HiTrap SP, essa última acoplada a HPLC. As frações ativas para atividade hemaglutinante obtidas sequencialmente nesses procedimentos foram avaliados quanto à sua atividade específica e homogeneidade em SDS-PAGE. A lectina em seu último passo de purificação apresentou massa molecular aparente de 55 KDa. A fração pré-purificada ativa obtida em DEAE-Sephacel foi caracterizada quanto ao seu potencial termiticida e fungicida. A atividade termiticida contra operários e soldados de *Nasutitermes corniger*, induzindo 100% de mortalidade em ambas as classes, foram melhor visualizadas com as concentrações 1,0 e 0,8mg/mL, entre 8 e 9 dias para operários e 7 e 8 dias para soldados, onde ainda não se havia registrado menos que 50% de mortalidade no controle negativo. A fração testada não apresentou efeito repelente. Em relação à atividade fungicida, 20 ug da fração chegou a inibir consideravelmente *Fusarium lateritium* (33%), *F. oxysporum* (19,4%) e *F. solani* (14,3%). *F. decemcellulare* teve uma inibição de 4,8% e *F. moniliforme*, 3,3%. Essas duas atividades reforçam a participação dessa lectina na defesa vegetal, fazendo-a uma potente ferramenta biotecnológica a ser mais profundamente investigada e estudada em relação a seu papel na defesa vegetal e na potencial utilização na resistência de madeiras susceptíveis a cupins.

Palavras-chave: *Platypodium elegans*, Lectina, Atividade Termiticida e Atividade Fungicida.

ABSTRACT

Seeds of *Platypodium elegans* Vogel, pertaining to the Family Fabaceae, Papilionoideae sub-family, Dalbergiae Tribe, possess a specific mannose/glucose lectin. In the purification of the lectin in study, the total extract of seeds of *P. elegans* prepared in NaCl 0,15M had its isolated active fraction for chromatography of affinity in chitin, exchange ionic in DEAE-Sephacel and HiTrap SP, this last one connected the HPLC. The active fractions for hemmagutinant activity gotten in these procedures had been sequentially evaluated how much to its specific activity and homogeneity in SDS-PAGE. The lectin in its last step of purification presented apparent molecular mass of 55KDa. The active fraction gotten daily pay-purificaded in DEAE-Sephacel was characterized how much to its termiticidal and fungicidal potential. The termiticidal activity against laborers and soldiers of *Nasutitermes corniger*, inducing 100% of mortality in both the classrooms, better had been visualized with the concentrations 1,0 and 0,8mg/mL, between 8 and 9 days for laborers and 7 and 8 days for soldiers, where not yet it had been registered less than 50% of mortality in the negative control. The tested fraction did not present repellent effect. In relation to the fungicidal activity, 20ug of the fraction arrived to inhibit considerably *Fusarium lateritium* (33%), *F. oxysporum* (19.4%) and *F. solani* (14.3%). *F. decemcellulare* had a inhibition of 4,8% and *F. moniliforme*, 3.3%. These two activities strengthen the participation of this lectina in the vegetal defense, making it a powerful tool biotechnological more deeply to be investigated and studied in relation its paper in the vegetal defense and the potential use in the resistance of susceptible wood to termites.

Key-words: *Platypodium elegans*, lectin, Termiticidal Activity and Fungicidal Activity

1. INTRODUÇÃO

Apesar das lectinas terem sido descobertas há mais de 100 anos, estas proteínas permaneceram por muitas décadas como meras curiosidades científicas. Foi somente a partir dos anos 60 que a comunidade científica despertou um real interesse por estas moléculas. Atualmente, entretanto, estas proteínas têm mostrado aplicabilidades em diversas áreas científicas, abrangendo aplicações que vão da medicina à agricultura, sendo muitas destas proteínas consideradas como ferramentas básicas para áreas de ponta como a biotecnologia, tendo em vista suas várias propriedades, tais como: atividade anti-inflamatória e pró-inflamatória (ASSREUY *et al.*, 1997, ALENCAR *et al.*, 1999), atividade inseticida (GRANGEIRO *et al.*, 1999a; GRANGEIRO *et al.*, 1999b), agentes em *drug delivery* (BANCHONGLIKITKUL *et al.*, 1998), proteção de cistite hemorrágica (ASSREUY *et al.*, 1999), indução da liberação de óxido nítrico (ANDRADE *et al.*, 1999), indução do fenômeno de apoptose (BARBOSA *et al.*, 2001) e proteção parcial contra *Leishmania in vitro* (BARRAL-NETTO *et al.*, 1992) e *in vivo* (BARRAL-NETTO *et al.*, 1996).

Embora lectinas apresentem a propriedade comum de se ligar, reversivelmente, a carboidratos, elas apresentam características próprias, principalmente no que diz respeito a aplicações biológicas. Assim, mesmo lectinas que apresentem alto grau de homologia de seqüências entre si, mostram-se diferentes quanto às várias propriedades biológicas. Isto faz com que, via de regra, cada lectina tenha as suas potencialidades de aplicação, o que justifica que cada uma delas, por mais semelhante que possa parecer com outra lectina, mereça ser estudada isoladamente. Fica evidente, então, que a descoberta, o isolamento e a caracterização química, físico-química e biológica de novas lectinas se revestem de grande importância, na medida em que novas lectinas com diferentes aplicabilidades podem ser encontradas. Além disto, visto hoje em dia ser forte a corrente que defende o papel de moléculas de comunicação para as lectinas, a descoberta de novas lectinas com especificidades diferentes se torna atrativa, uma vez que podem servir de novos modelos para o entendimento destes processos dinâmicos de comunicação célula-célula, célula-microrganismo ou célula-vírus.

A ligação específica de lectinas a carboidratos tem um importante papel também na interação de plantas com outros microorganismos (PEUMANS & VAN DAMME, 1995). Há fortes evidências crescentes de que lectinas de plantas poderiam agir como moléculas de defesa contra insetos e outros herbívoros (VASCONCELOS & OLIVEIRA, 2004). A atividade inseticida de muitas lectinas de plantas tem sido documentada em ensaios de nutrição *in vitro* e em estudos com plantas transgênicas

(CARLINI & GROSSI-DE-SÁ, 2002; MACEDO *et al.*, 2002). Isso se constitui um bom potencial econômico contra pestes, já que, sendo as lectinas um produto metabólico primário, seus genes seriam bons candidatos para conferir resistência a insetos em linhagens transgênicas. Portanto, a purificação e caracterização de lectinas de novas fontes podem revelar genes com grande potencial para engenharia genética (SHANGARY *et al.*, 1995; KAUR *et al.*, 2005; SINGH *et al.*, 2004).

Lectinas ligantes a quitina, por outro lado, também têm sido isoladas de diversas fontes, incluindo bactérias, insetos, plantas e mamíferos (CAMPOS-OLIVAS *et al.*, 2001; VUOCOLO *et al.*, 2001; VAN DEN BERGH *et al.*, 2002; VAN DELLEN *et al.*, 2002; REBERS & WILLIS, 2001; SUZUKI *et al.*, 2002), e muitas têm mostrado atividade antifúngica contra espécies fitopatogênicas. Essas lectinas têm demonstrado afetar o crescimento e o desenvolvimento de fungos, perturbando a síntese e/ou a deposição de quitina, componente da parede celular, em fungos verdadeiros (SELITRENNIKOFF, 2001; NG, 2004).

Lectinas de plantas, em particular, têm sido intensivamente estudadas em inúmero aspectos, particularmente por seus potenciais antifúngicos e inseticidas que podem ser aproveitados para transformação de plantas que expressem lectinas seguras para o homem (CARLINI & GROSSI-DE-SÁ, 2002; PEUMMANS & VAN DAMME, 1996).

Novas lectinas têm sido descobertas a cada dia em células de mamíferos, em microorganismos ou em plantas, sendo encontradas envolvidas em intricados processos bioquímicos e biológicos. Principalmente após o estabelecimento de carboidratos como moléculas portadoras de informação biológica, lectinas têm sido estabelecidas como importantes instrumentos biotecnológicos, valiosíssimos e adequados para o estudo de fundamentos celulares, propriedades moleculares e mecanismos de defesa.

2. FUNDAMENTAÇÃO

TEÓRICA

2.1. Mecanismo de defesa de plantas

2.1.1. Introdução

As células dos organismos vivos – plantas, bactérias, fungos, insetos e animais superiores – são laboratórios onde se realiza a síntese de uma enorme variedade de substâncias orgânicas, muitas das quais de grande importância, não só para a sobrevivência das próprias espécies que as fabricam como para a humanidade, que pode utilizá-las como ferramentas biológicas.

Nas plantas, esses processos partem de materiais extremamente simples, como água e dióxido de carbono, utilizando a energia do sol para produzir carboidratos, no processo conhecido como fotossíntese. Uma série de reações metabólicas, conhecidas como “processos do metabolismo primário”, leva à produção de outras substâncias simples, fabricadas pelas plantas com a introdução de nutrientes retirados do solo - nitrogênio, fósforo e sais minerais. Essas substâncias, que têm a função de promover os processos básicos da planta, são: os ácidos carboxílicos do ciclo do ácido cítrico (ciclo de Krebs); os cerca de vinte aminoácidos que constituem a maioria das proteínas; os ácidos graxos e lipídeos; e os açúcares comuns e seus derivados. São substâncias que existem em todas as plantas e constituem a matéria-prima de reações posteriores, catalisadas por enzimas e controladas geneticamente. São estas reações que levam à produção dos chamados compostos do metabolismo secundário das plantas (LEDNICER, 1997).

Usualmente, os compostos naturais presentes nas plantas são separados em compostos do metabolismo primário (aminoácidos, lipídios, carboidratos) e do metabolismo secundário (flavanóides, alcalóides, terpenos etc.). Os metabólitos primários são amplamente distribuídos nos seres vivos, enquanto os metabólitos secundários são de ocorrência restrita, embora essenciais para os organismos que os produzem (MANN *et al.*, 1994).

As funções fisiológicas de muitas substâncias extraídas das plantas ainda não estão completamente esclarecidas, mas se associa a sua produção à defesa da própria planta contra doenças, pragas e radiação solar, entre outros. Assim, essas substâncias possuem funções importantes para a sobrevivência das espécies e são produzidas principalmente pelo metabolismo secundário das plantas (INGKANINAN *et al.*, 1999).

Os metabólitos secundários podem apresentar ação farmacológica tranqüilizante, analgésica, antiviral, fungicida, inseticida, com as mais diversas aplicações, tanto na terapêutica médica, como na indústria de cosméticos, de alimentos e outras (PLETSCH, 1998).

Esta vasta gama de compostos naturais biologicamente ativos é também conhecida por suas ações repelentes ou atraentes em interações intraespecíficas e interespecíficas, na proteção contra estresses bióticos e abióticos, e na manutenção da integridade estrutural.

Além dos metabólitos secundários, alguns componentes do metabolismo primário das plantas têm sido relacionados aos mecanismos de defesa. As lectinas de plantas, por exemplo, são proteínas que podem assumir diferentes papéis biológicos. Todavia, não existe uma função universal para todas elas. De maneira abrangente, as lectinas podem assumir papéis exógenos como, por exemplo, atividade antifúngica contra fitopatógenos ou podem assumir papéis endógenos se interagirem com ligantes do próprio organismo para, por exemplo, auxiliar a deposição de proteínas de reservas nos corpos protéicos. Felizmente, as questões concernentes às funções biológicas que as lectinas desempenham nos organismos em que são produzidas têm ganhado atenção crescente, diminuindo o contraste entre função e aplicação de lectinas, que predominava no passado (PEUMANS & VAN DAMME, 1995).

O conhecimento sobre as plantas sempre tem acompanhado a evolução do homem através dos tempos. As primeiras civilizações, logo cedo, aperceberam-se da existência, ao lado das plantas comestíveis, de outras dotadas de maior ou menor toxicidade que, ao serem experimentadas no combate às doenças, revelaram, embora empiricamente, o seu potencial curativo (DI STASI *et al.*, 2002).

O Brasil é o país com maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com um total de 55 mil espécies catalogadas de um total entre 250-500 mil espécies de plantas existentes na flora mundial. Menos de 10% dessas plantas foram avaliadas sob aspectos biológicos e não mais que 5% sob aspectos químicos até meados dos anos 90 (DI STASI, 1996). Dessa forma, as plantas constituem-se, ainda, fontes importantes para a descoberta de novas substâncias biologicamente ativas.

A indústria farmacêutica mundial tem um faturamento anual que ultrapassa os 10 bilhões de dólares e o Brasil se situa entre os dez maiores consumidores de medicamentos do mundo (FERREIRA, 1998). No entanto, cerca de 60% de toda

produção de medicamentos é consumida por apenas 23% da população, devido à falta de recursos para aquisição (BERMUDEZ, 1995).

Levando em consideração o saber popular e na tentativa de suprir a falta de recursos financeiros para os setores de saúde, o uso de fitoterápicos tem crescido substancialmente. No Brasil, país com maior diversidade genética vegetal do mundo, estima-se que o mercado de fitoterápicos tenha alcançado, em 2001, a casa dos US\$ 550 milhões. Nesta sua revitalização, a fitoterapia tem sido acompanhada pelo abandono de seu empirismo inicial, agora se apresentando respaldada por um crescente número de pesquisas e estudos, dando conta de constituintes químicos ativos e novas tecnologias, o que pode ser traduzido como uma síntese da relação dialética entre o saber popular e o conhecimento científico (ARAÚJO, 2002).

2.1.2. Interações entre plantas e seus predadores: defesas mecânicas e defesas químicas

As plantas, assim como os animais, estão sujeitas, durante todo seu ciclo de vida, ao ataque de microorganismos causadores de doenças. Por serem organismos sedentários, representam um substrato extremamente atrativo para o desenvolvimento de patógenos que podem comprometer seu desenvolvimento normal, causando inclusive sua morte. Apesar disso, em ambientes naturais, o aparecimento de doenças em plantas é um evento raro, graças à existência de mecanismos de proteção que conferem resistência à maioria dos patógenos vegetais.

A proteção natural das plantas contra patógenos ou insetos mastigadores e sugadores está, parcialmente, baseada na variedade de barreiras constitutivas já presentes na planta antes do ataque. O efeito combinado de todas essas barreiras é referido como resistência constitutiva. Em adição, plantas podem ativar mecanismos de proteção a partir do contato com invasores, o que se denomina resistência adquirida ou induzida. A importância da resistência adquirida tem sido extensamente documentada (CHESTER, 1933; GAUMMAN, 1946). Foi demonstrado que plantas inoculadas com microorganismos atenuados foram protegidas contra infecções subseqüentes com o mesmo organismo ou patógenos relacionados. Essas observações não tentaram separar a interação antagonista entre o organismo não-patogênico ou atenuado e o patógeno da ativação e mecanismos defensivos do hospedeiro. A ativação de mecanismos genuínos de resistência foi, posteriormente, relatada por estudos pioneiros de Ross (1966) e Kuc

(revisado em HAMMERSCHMIDT & KUC, 1995; MADAMANCHI, 1991). Eles demonstraram claramente que uma infecção local pode levar a uma resistência contra uma subsequente infecção com patógenos extensamente diferentes. A resistência é expressa localmente no sítio de inoculação primário, mas também sistemicamente, em tecidos distintamente localizados do tratamento inicial. Essa forma de resistência induzida, chamada Resistência Sistêmica Adquirida (SAR) (RYALS *et al.*, 1992), estende-se às raízes (GESSLER & KUC, 1982; TAHIRI-ALAOUI, 1993). Dentre os mecanismos envolvidos na SAR, inclui-se a lignificação e outras barreiras, proteínas relacionadas à patogênese e sua expressão, e os sinais para SAR, incluindo o ácido salicílico, dentre outros. Os danos nas folhas por insetos podem induzir a SAR contra ataques adicionais (RYAN, 1990). Em geral, o fenômeno da SAR pode ser comparado à imunização em animais e humanos, embora os mecanismos subjacentes sejam diferentes. Naturalmente, as plantas são continuamente expostas a vários microorganismos invasores e é provável estarem prontas com resistência contra ataques adicionais. Assim, SAR, ao lado da defesa constitutiva, contribui para a resistência total presente em plantas e pode prover uma vantagem seletiva para a sobrevivência (STICHER *et al.*, 1997)

Em resposta ao ataque por herbívoros, por exemplo, as plantas podem armar suas partes mais atraentes ou mais expostas com defesas mecânicas, como espinhos ou pêlos que cortam ou irritam a pele e produzem dor. Além disso, as defesas químicas empregadas pelas plantas contra seus predadores podem incluir desde simples toxinas até substâncias que interferem com o ciclo de crescimento e de reprodução de insetos, como taninos e fitoalexinas.

Espécies silvestres de plantas contêm, muitas vezes, toxinas com as quais conseguem controlar o ataque de herbívoros. A *Asclepia curassavica*, por exemplo, é conhecida por causar vômitos e ataques cardíacos súbitos, sendo responsável pela morte de muitos animais em fazendas. Quando essas plantas passam a ser cultivadas, as toxinas vão sendo eliminadas através do melhoramento genético e as plantas perdem sua defesa natural (THALER *et al.*, 1999).

Segundo Haslam (HASLAM, 1989), o termo "tanino" designa os metabólitos secundários de natureza polifenólica extraídos de plantas (taninos vegetais) que foram classificados em dois grupos: as proantocianidinas, que são os taninos condensados, responsáveis pelas características normalmente atribuídas a estas substâncias, como adstringência e precipitação de proteínas, e os taninos hidrolisáveis, que são ésteres do

ácido gálico e seus dímeros (ácido digálico e elágico) com monossacarídeos, principalmente a glicose.

De acordo com Santos & Mello (1999), taninos de plantas compreendem os produtos naturais e fenólicos baseados no ácido gálico (taninos hidrolisáveis) ou sobre os poliflavonoídes (taninos condensados). Segundo este autor, a habilidade natural de defesa das plantas contra os seus inimigos naturais estaria ligada à presença dos taninos. Os taninos hidrolisáveis seriam responsáveis pela defesa das plantas contra os herbívoros e os taninos condensados iriam assegurar a defesa contra microorganismos patogênicos. Quanto à ação dos taninos hidrolisáveis sobre os herbívoros, Harbone (1991) relatou que estes compostos estariam implicados no processo digestivo destes animais, dificultando-o em decorrência da complexação dos taninos com certas proteínas ligadas à produção de enzimas digestivas.

Além dos taninos, outras substâncias têm sido relacionadas a mecanismos de defesa das plantas, como as fitoalexinas e as lectinas, que serão consideradas mais adiante.

2.1.3. Fitoalexinas como compostos vegetais de defesa:

A idéia de que as plantas possuem um sistema de defesa semelhante ao sistema imunológico dos animais é bastante antiga, tendo surgido no final do século IX. Entretanto, evidências de que elas respondem ao ataque de microrganismos, alterando seu metabolismo e sintetizando substâncias capazes de protegê-las das doenças, só foram obtidas por volta de 1940. Estudos realizados na Alemanha com cultivares de batata atacados por fungos levaram à descoberta de que as plantas resistentes acumulavam substâncias de defesa, o que não ocorria nas plantas suscetíveis à doença (citado por SILVA & BRAGA, 2004). Estas substâncias foram denominadas de fitoalexinas (do grego *phyton* = planta e *alexin* = composto que repele), e sua descoberta causou mudanças no conceito de resistência de plantas a patógenos (FLORES *et al.*, 2005).

Ao contrário dos anticorpos sintetizados pelos animais, as fitoalexinas não são proteínas, não apresentam especificidade e não imunizam a planta. São produtos não detectados na planta sadia, mas que se acumulam, temporariamente, no local e nos arredores da infecção. Possuem atividade inibitória sobre bactérias, fungos, nematóides e efeito tóxico para animais e para as próprias plantas. Podem ser acumulados em

resposta a vários microorganismos, mas também como consequência de fatores que causam estresse na planta, como fermentos e exposição a substâncias tóxicas (BRAGA *et al.*, 1991).

A primeira fitoalexina caracterizada quimicamente foi a pisatina (Figura 1), isolada de plantas de ervilha *Pisum sativum* (CRUICKSHANK & PERRIN, 1960).

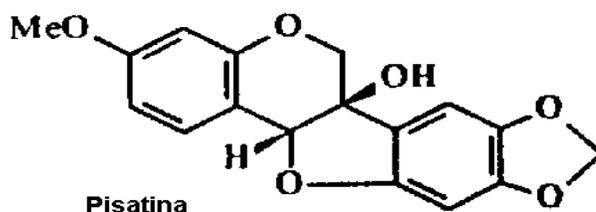


Figura 1. Pisatina, a primeira fitoalexina isolada e caracterizada (CRUICKSHANK & PERRIN, 1960)

Desde sua descoberta, diversas outras fitoalexinas tem sido obtidas de plantas cultivadas como feijão, soja, ervilha, batata, tomate, alface, algodão, arroz, cevada e banana.

Folhas, caules, raízes, sementes, flores e frutos podem sintetizar fitoalexinas em resposta à presença de um patógeno. As sementes parecem ser particularmente sensíveis à presença de microorganismos, sintetizando fitoalexinas em grandes quantidades. Como a semente representa o principal meio de dispersão e propagação da maioria plantas, a produção de substâncias de defesa durante a germinação e o crescimento inicial da planta pode ser fundamental para garantir que uma determinada espécie possa sobreviver e crescer em ambientes de mata e cerrado, onde a presença de microorganismos e a limitação de fatores como nutrientes, água e luz, tornam esses ambientes altamente competitivos (BRAGA *et al.*, 1991).

Por outro lado, algumas espécies que reconhecidamente não produzem fitoalexinas, como é o caso do café, já possuem, naturalmente, outras substâncias de defesa e que são suficientes para impedir o ataque de alguns patógenos. Isso indica que a produção de fitoalexinas parece ter sido selecionada como principal estratégia de defesa apenas em algumas plantas, havendo outros mecanismos de resistência encontrados em plantas que não acumulam fitoalexinas (BRAGA *et al.*, 1991).

2.2. Histórico e definição de lectinas

Lectinas, também denominadas aglutininas ou fitohemaglutininas, têm uma das mais longas histórias científicas de todas as proteínas de plantas.

O primeiro estudo sobre lectinas foi realizado por Stillmark (1888), na Rússia, que, estudando toxicidade de sementes de mamona (*Ricinus communis*), ligou essa toxicidade à ocorrência de um fator protéico hemaglutinante, denominando-o Ricina, descrevendo pela primeira vez em bioquímica de plantas uma proteína com atividade biológica bem definida.

Na verdade, a Ricina com que Stillmark (1888) trabalhou ainda era uma mistura complexa da verdadeira Ricina com outras aglutininas não tóxicas.

Posteriormente, efeitos semelhantes ao da ricina foram relatados com uma proteína de sementes de jeriquiti (*Abrus precatorius*) denominada Abrina, e com uma proteína de córtex de *Robinia pseudoacacia*, a Robina, citado por Van Damme *et al.* (1998).

O termo fitohemaglutinina (“Blutkörperchenagglutinin”) foi primeiramente proposto por Elfstrand (1898), referindo-se a proteínas hemaglutinantes vegetais como um nome comum a todas as proteínas de plantas que causassem agrupamento de células. Esse novo termo foi claramente inspirado pela extrema similaridade entre a atividade macroscópica de algumas proteínas vegetais e algumas aglutininas de soro animal e humano, essas últimas descritas inicialmente por Landois (1875).

A idéia de que a toxicidade é uma propriedade intrínseca dessas proteínas foi abandonada no começo do século, quando Landsteiner & Raubitschek (1907) reportaram pela primeira vez a presença de hemaglutininas não-tóxicas em leguminosas como *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum*, *Lens culinaris* e *Vicia sativa*. Após esse trabalho, muitas outras hemaglutininas vegetais não-tóxicas foram relatadas.

O próximo marco na história de lectinas foi a descoberta de que algumas hemaglutininas exibiam uma preferência clara por hemácias de um tipo particular de grupo sanguíneo humano do sistema ABO. Começou-se a observar que algumas proteínas vegetais obtidas de sementes de planta podiam reconhecer um grupo específico e aglutiná-lo, onde hemácias do sistema ABO respondiam ao contato com essas hemaglutininas de maneira distinta, umas aglutinando e outras não (RENKONEN, 1948; BOYD & REGUERA, 1949). Essa descoberta foi o motivo direto para a introdução do novo termo lectina (*legere*, do latim, significando escolher, selecionar)

para definir proteínas vegetais não só pela sua capacidade aglutinadora como também pelo seu sentido de selecionar essa interação, ficando então definida a noção de especificidade.

Summer & Howell (1936) observaram que cana-de-açúcar inibia a atividade hemaglutinante de Concanavalina A (ConA), mas só em 1952 é que se foi demonstrado que as propriedades hemaglutinantes de lectinas eram baseadas numa atividade específica de ligação a açúcar (WATKINS & MORGAN, 1952).

Com o estabelecimento do envolvimento de açúcares intermediadores nestas reações aglutinadoras, Goldstein *et al.* (1980) conceitua lectinas como sendo proteínas ou glicoproteínas de origem não-imune ligantes a carboidratos que são capazes de aglutinar células e/ou precipitar polissacarídeos ou glicoconjugados.

Essa definição, entretanto, por estar confinada a proteínas carboidrato-ligantes multiméricas, excluiria toxinas bem conhecidas que são pouco aglutinantes e que contém, na verdade, subunidades estruturalmente reconhecidas como lectinas (KOCOUREK & HOREJSI, 1983). Esses autores sugeriram então uma extensão na definição, onde as lectinas seriam proteínas ou glicoproteínas de natureza não-imune capazes de reconhecimento específico e de ligação reversível, formadoras de glicoconjugados, sem alteração da estrutura de qualquer desses ligantes reconhecidos. Dessa maneira, outras proteínas ligantes a açúcar, como eventuais enzimas, hormônios e proteínas de transporte, seriam excluídas, sendo que as lectinas monovalentes estariam inclusas.

Depois, entretanto, foi observado que algumas lectinas continham um segundo tipo de sítio de ligação que interagia com ligantes que não eram carboidratos. Lectinas de leguminosas, por exemplo, apresentam uma região rica em aminoácidos hidrofóbicos que se ligam a B-(o-iodofenil)-O-glicopiranosídico (ROUGÉ *et al.*, 1987). Observou-se, também, que lectinas que apresentavam especificidade por um determinado grupo de açúcares podiam apresentar diferenças na afinidade quando testados oligossacarídeos mais complexos, sugerindo que outros aminoácidos, além dos envolvidos no sítio de interação a monossacarídeos, interagiam com estes carboidratos, acarretando diferenças na especificidade fina.

Para envolver essa nova propriedade, Barondes (1988) redefiniu lectinas como proteínas ligantes a carboidratos que não fossem anticorpos ou enzimas. Com essa definição, a presença de pelo menos um domínio não-catalítico de ligação específica e reversível a carboidratos é o único critério para que uma proteína seja chamada de

lectina. Baseado nessas considerações, recentemente, considera-se como definição atual e, provavelmente, a mais utilizada, o conceito de Peumans & Van Damme (1995). Esses autores consideram que para que uma proteína possa ser reconhecida como lectina, deve apresentar pelo menos um domínio não-catalítico que se ligue reversível e especificamente a carboidratos, uma definição bem menos restritiva que todas as anteriores.

Considerando suas características estruturais, já que a definição de lectinas abrange proteínas que se comportam de extensas maneiras, tanto do ponto de vista de suas propriedades aglutinantes como de sua capacidade de interagir ou precipitar glicoconjugados em geral, foi proposta uma classificação estrutural desse heterogêneo grupo por Van Damme *et al.* (1998), em **Merolectinas**, **Hololectinas**, **Quimerolectinas** e **Superlectinas** (FIGURA 2).

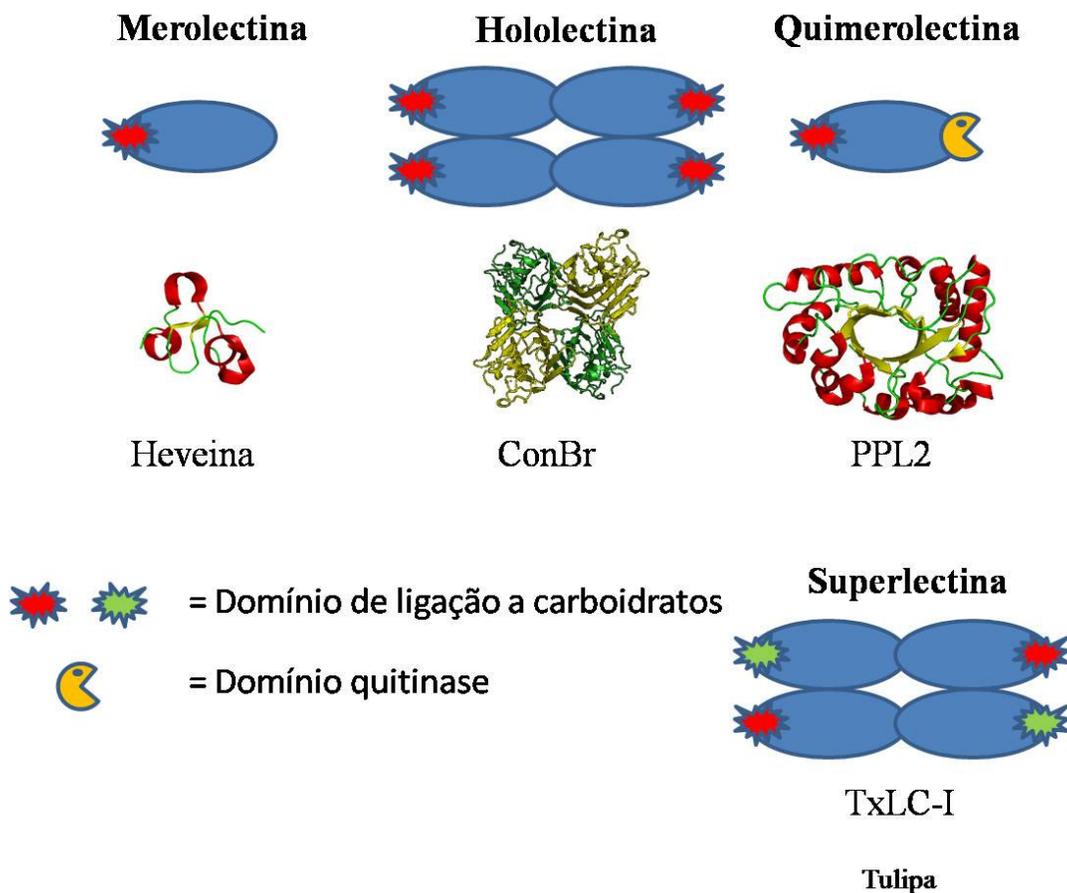


Figura 2: Representação Esquemática de Merolectinas, Hololectinas, Quimerolectinas e Superlectinas (VAN DAMME *et al.*, 1998).

Merolectinas são lectinas constituídas exclusivamente por um único sítio de ligação a carboidratos (domínio lectínico), sendo, portanto, por sua natureza monovalente, incapazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados. Como exemplo, pode-se incluir a Heveína, uma proteína quitina-ligante encontrada no látex da seringueira (VAN PARIJIS *et al.*, 1991), e as proteínas manose-ligantes, presente em orquídeas, citado por Van Damme *et al* (1996).

Hololectinas é a classe que abrange aquelas proteínas de estrutura mais complexa, possuindo dois ou mais domínios lectínicos relacionados, sendo enquadradas nesse grupo as hemaglutininas clássicas. Nesse grupo se incluem as lectinas mais estudadas. Como exemplo, tem-se a ConBr, lectina de *Canavalia brasiliensis*, uma leguminosa da subfamília Papilionoideae (SANZ-APARICIO *et al.*, 1997).

Quimerolectinas correspondem à classe que reúne proteínas que, além de ligantes a carboidratos, como as mero e hololectinas, possuem um outro domínio que apresenta atividade catalítica ou outra atividade biológica, em outro sítio de ligação de ação independente. Como exemplo, tem-se a PPL2, uma lectina quitina-ligante isolada de sementes de *Parkia platycephala* que possui um segundo sítio, no caso um sítio catalítico endoquitinásico (CAVADA *et al.*, 2006). Nesse perfil, encontram-se também as Quitinases Classe 1 em plantas e as RIPs (“ribosome inactivating proteins”) tipo 2, como abrina e ricina (VAN DAMME *et al.*, 1998). Dependendo do número de sítios ligantes a carboidratos, essas lectinas podem ser mais ou menos aglutinantes.

Superlectinas são um grupo especial de quimerolectinas que possuem dois ou mais domínios que diferem do sítio de ligação a carboidratos, tanto em estrutura como em função, ou apresentam domínios lectínicos distintos, tendo a mesma proteína especificidade por carboidratos diferentes. A lectina de Tulipa é um exemplo desse grupo, possuindo um domínio N-terminal manose-ligante arranjado a um domínio GalNac-ligante não-relacionado (VAN DAMME *et al.*, 1996).

Foi somente depois dos anos 70 que lectinas passaram a ser tema de investigação em vários grupos de pesquisa. Nos últimos 20 anos, então, centenas de lectinas têm sido purificadas e caracterizadas. O conhecimento da diversidade dessas proteínas isoladas de organismos distintos, entre eles plantas, animais e microorganismos, aliado a sua grande e diferente especificidade por açúcares, faz dessa classe de proteínas ferramentas valiosas tanto para detecção e isolamento de glicoproteínas, como também para caracterização parcial das porções de carboidrato destas e acompanhamento de mudanças que ocorrem nos açúcares de superfície das células em processo de

desenvolvimento ou de transformação. O estudo do maior número possível de lectinas é fundamental para a elucidação de suas funções biológicas endógenas. Torna-se de grande importância, portanto, o estudo dessa interação proteína-carboidrato e os processos e efeitos biológicos envolvidos nesse fenômeno.

2.3. Ocorrência

As lectinas estão amplamente distribuídas na natureza, sendo já encontradas em fungos, vírus, bactérias, insetos, animais e plantas (MOREIRA *et al.*, 1991), apresentando grande variedade de formas e tamanhos. Em plantas, são principalmente isoladas de leguminosas, onde se encontram lectinas com alto grau de homologia e similaridade (SHARON & LIS, 1995). São mais estudadas pela praticidade de obtenção de sementes secas, o que gera um grande conhecimento da diversidade de lectinas nesse grupo, além de um grande número já estabelecido.

As lectinas vegetais são mais amplamente conhecidas pelo simples fato de serem mais estudadas, não significando que seja de fato o grupo de seres que apresentem de fato mais lectinas.

São encontradas geralmente nos cotilédones e endospermas, sendo também presentes nas folhas, raízes, tubérculos e flores. A grande maioria de lectinas conhecidas é proveniente de sementes.

2.4. Lectinas de Plantas

A função fisiológica que as lectinas desempenham em plantas endogenamente tem sido aos poucos desvendado. Sugere-se o seu funcionamento como transportadoras e, conseqüentemente, no armazenamento de carboidratos (NAKAMURA *et al.*, 2004); no processo de ligação entre bactérias fixadoras de nitrogênio e a raiz na inibição do crescimento de fungos ou na proteção contra ataque por insetos (WANG *et al.*, 2000a; 2000b); na regulação hormonal do crescimento e desenvolvimento da planta (SANZ-APARICIO *et al.*, 1997).

Propõe-se também que, devido à ampla distribuição em vegetais, lectinas podem estar envolvidas em papéis de defesa dos vegetais contra ataques de bactérias e vírus patogênicos (GILES & HECTOR, 1998), até mesmo contra herbívoros, ajudando na preservação e perpetuação das espécies onde são encontradas.

As lectinas vegetais podem ser classificadas em sete famílias (FIGURA 3), de acordo com VAN DAMME *et al.* (1998):

- Lectinas de leguminosas;
- Lectinas de monocotiledôneas ligantes a manose;
- Lectinas ligantes a quitina;
- RIPs tipo 2;
- Lectinas relacionadas a jacalina;
- Lectinas relacionadas a amarantina;
- E lectinas de floema de Curcubitaceae.

2.5. Lectinas de Leguminosas

Dentro das lectinas de leguminosas, os principais grupos de especificidades encontrados, de acordo com Rudiger (1997), são:

- Manose, glicose e seus α -glicosídeos (em geral, as lectinas ligam-se igualmente tanto a manose como glicose);
- Galactose e N-acetilgalactosamina (as lectinas desse grupo são específicas para ambos os açúcares, podendo ocorrer de a ligação a um deles ser mais forte);
- N-acetilglucosamina (lectinas que se ligam mais fortemente através das formas oligoméricas do tipo β -1,4);
- α -L-fucose;
- Oligossacarídeos complexos.

As lectinas de leguminosas, em geral, são sintetizadas como protômeros de aproximadamente 30KDa, com uma seqüência sinalizadora de 20 resíduos de aminoácidos precedendo a cadeia de lectina madura, que guia seu transporte ao Retículo Endoplasmático. Essas cadeias de 30KDa podem se combinar em dímeros, ou tetrâmeros (VAN DAMME *et al.*, 1998).

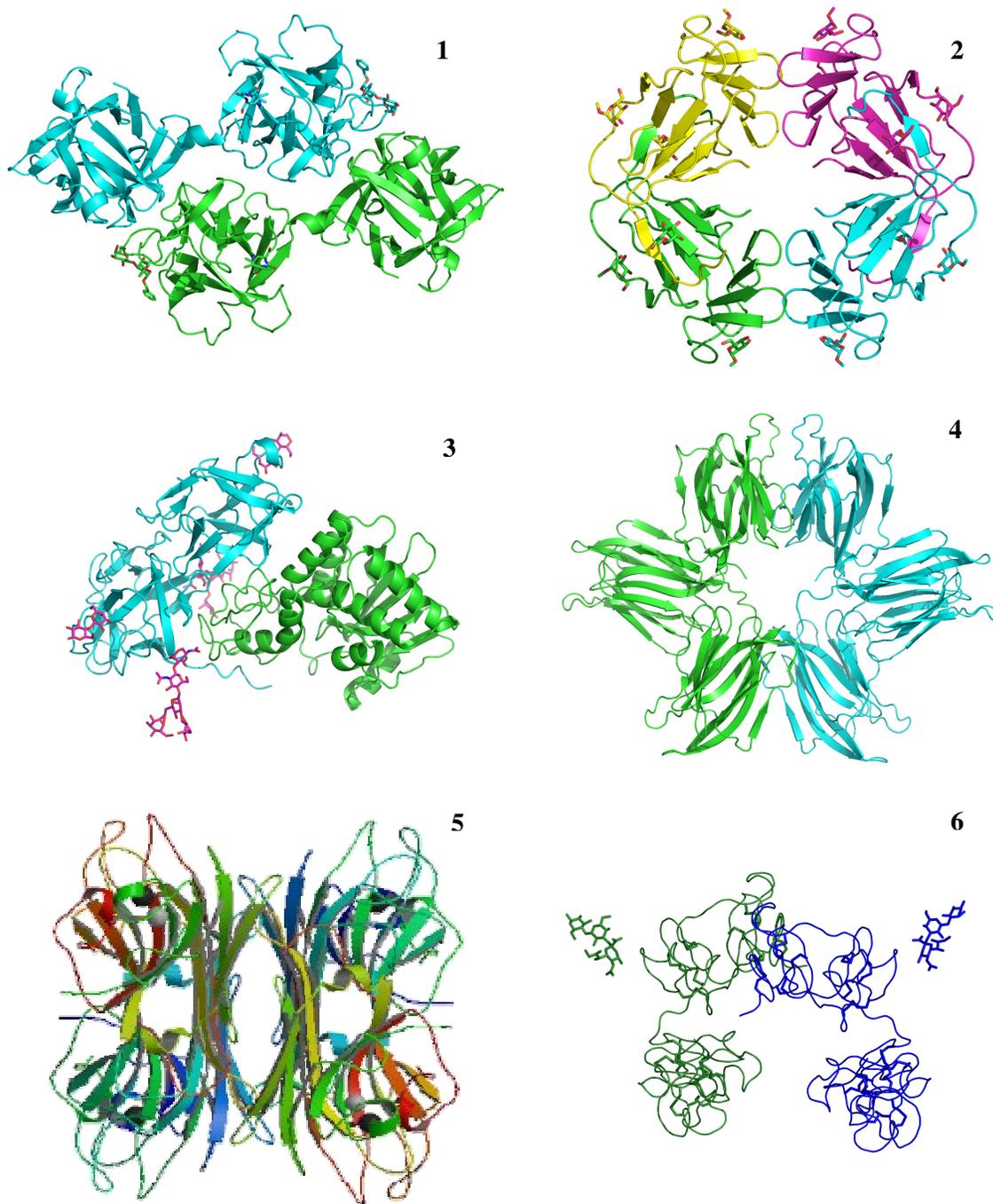


Figura 3: Estrutura Tridimensional de Lectinas de Plantas. (1) Lectina da família da amarantina (ACA - *Amaranthus caudatus* agglutinin) (2) Lectina de Monocotiledônea ligante a Manose (*Galanthus nivalis*) (3) RIP (Ricina) (4) Lectina relacionada à Jacalina (*Parkia platycephala*) (5) Lectina de Leguminosa (*Canavalia marítima*) (6) Lectina ligante a quitina (Heveína). Fonte: PDB (Protein Data Bank)

Segundo Loris *et al.* (1994), entre as lectinas de leguminosas, os sítios de ligação para resíduos hidrofóbicos, íons metais e moléculas de água são altamente conservados.

2.6. Propriedades químicas, físicas e biológicas

De acordo com Elgavish & Shaana (1997), carboidratos interagem com lectinas através de pontes de hidrogênio, coordenação por metil, Forças de Van Der Waals e interações hidrofóbicas. O grande número de hidroxilas presentes nos açúcares em geral os permite interagir através de formações de pontes de hidrogênio (hidroxilas funcionando como doadores ou receptores de hidrogênio).

A capacidade de interação com carboidrato em uma lectina é atribuída a uma porção limitada da molécula, denominada domínio globular de reconhecimento de carboidrato (CRD), geralmente com menos de 200 aminoácidos. Os CRDs de muitas lectinas conhecidas se relacionam quanto à seqüência primária, o que torna possível reuni-las em número relativamente pequeno de grupos (WEIS & DRICKAMER, 1996).

Além disso, já se demonstrou que lectinas de especificidades semelhantes por carboidratos podem, em alguns casos, apresentar afinidade pelo ligante de maneira diferenciada, como se alguma diferença estrutural entre as lectinas pudesse ocasionar diferenças de afinidade em cada complexo estabelecido entre lectina-ligante, e isto se referir na potência das atividades biológicas desempenhadas por estas proteínas (CAVADA *et al.*, 2001).

2.7. Lectinas como Proteínas Vegetais de Defesa

Desde a descoberta das lectinas, pesquisadores têm se intrigado pelos seus possíveis papéis. Uma descoberta ocorreu quando se foi entendido que a grande maioria de lectinas de plantas pode não apenas ter um papel na própria planta, por exemplo, como uma fonte de nitrogênio ou como um fator de reconhecimento específico, mas também interagindo com glicoconjugados de outros organismos, interferindo com o funcionamento normal desse organismo. É improvável que para todas as lectinas de plantas se encontre um papel na defesa. Lectinas que ocorrem em baixas concentrações podem estar envolvidas no reconhecimento de processos específicos tanto dentro como fora da planta. Lectinas de raízes de leguminosas, por exemplo, podem estar envolvidas

no reconhecimento e/ou ligação de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* sp. com a finalidade de estabelecer a simbiose (DIAZ *et al.*, 1989; BOHLOOL & SCHMIDT, 1974).

2.7.1 Evidências indiretas sobre o papel defensivo de lectinas de plantas

Desde que as lectinas foram distinguidas de todas as outras proteínas de planta por sua atividade de ligação a carboidrato, pode-se assumir de maneira razoável que seu papel fisiológico envolve sua propriedade de ligação ao carboidrato. Em princípio, qualquer reação mediada por lectina utiliza-se da sua especificidade de ligação a um receptor glicoconjugado (independente deste receptor se encontrar dentro ou fora da planta). Consequentemente, a busca pelo papel fisiológico de lectinas de plantas esteve sempre intimamente ligado à busca por seus receptores naturais. No caso de lectinas, os receptores podem ser definidos como glicoconjugados que possuem uma molécula de carboidrato disponível com estrutura complementar àquela do sítio lectínico. Isso implica que glicoconjugados de diferentes naturezas, mas com idêntica ou similar estrutura, podem agir como receptores para a mesma lectina (PEUMANS & VAN DAMME, 1995).

Embora a primeira descoberta de lectina de planta tenha sido baseada na ligação da lectina de mamona a glicoconjugados de membrana de hemácias humanas, assumiu-se inicialmente que receptores de lectinas deveriam estar presentes na própria planta. Entretanto, já que a busca por receptores endógenos não renderam dados significantes, essa idéia foi sendo gradativamente abandonada (PEUMANS & VAN DAMME, 1995).

Com exceção de algumas enzimas (quitinases, glucanases e glicosidades), as lectinas são as únicas proteínas de plantas que são capazes de reconhecer e de se ligar a glicoconjugados presentes na superfície de microorganismos (bactérias e fungos) ou comprometer o trato intestinal de insetos ou mamíferos herbívoros. Dada a diversidade de glicanos microbianos e animais, a extensa variedade de especificidade de ligação a carboidrato de lectinas pode ser interpretado como um indicador de sucesso de desenvolvimento de moléculas de reconhecimento contra diferentes tipos de receptores com açúcares (PEUMANS & VAN DAMME, 1995).

Alguns argumentos evolucionários, moleculares, bioquímicos, celulares e fisiológicos indicam que lectinas têm um papel na defesa da planta. O maior argumento é a observação de que lectinas de planta se ligam a glicoconjugados de outros organismos. Embora muitas lectinas de planta sejam hábeis para se ligarem a açúcares

simples como Glicose, Manose ou Galactose, elas têm uma afinidade muito maior por oligossacarídeos, os quais não são comuns ou são totalmente ausentes em plantas (PEUMANS & VAN DAMME, 1995).

Por exemplo, lectinas de planta ligantes a quitina reconhecem um carboidrato típico constituinte da parede celular de fungo e do exoesqueleto de invertebrados. Similarmente, lectinas ligantes a ácido siálico de *Sambucus* sp. (SHIBUYA *et al.*, 1987) e *Maackia amurensis* (KNIBBS *et al.*, 1991) ligam-se a açúcares que estão ausentes em plantas, mas constituem o componente carboidrato majoritário de glicoproteínas animais. O mesmo se mostra verdade para todas as lectinas que se ligam exclusivamente a complexos oligossacarídicos típicos de glicoproteínas animais.

Um argumento circunstancial a favor é a estabilidade marcante de muitas lectinas sob condições desfavoráveis. Muitas lectinas são estáveis a uma extensa faixa de pH, são hábeis a diferentes temperaturas e são resistentes a proteases de animais e insetos. Entretanto, lectinas são degradadas *in vivo*, e alguns herbívoros possuem proteases capazes de digerir lectinas de planta presentes em sua dieta, tornando-se resistentes (PEUMANS & VAN DAMME, 1995).

Órgãos de estocagem em dormência e sementes são particularmente vulneráveis, já que são bastante atrativos a potenciais parasitas e predadores e podem não dispor de um sistema de defesa ativo (por causa do seu estado metabólico inativo). Por exemplo, sementes infectadas por um inseto ou bulbos atacados por ratos não são mais viáveis. Em contraste, uma planta crescente que está metade atacada por insetos pode sobreviver e produzir uma prole viável. Tomando por consideração a adaptação evolucionária das plantas, um argumento razoável pode ser que elas tenham desenvolvido um sistema de defesa (passivo) para proteger seus órgãos de estocagem e sementes. Por esse ponto de vista, o acúmulo preferencial de lectinas em típicos órgãos de estocagem é certamente indicativo. Além disso, já que a maioria das lectinas estão presentes em grandes quantidades e se comportam como proteínas de reserva, algumas plantas acumulam uma parte de sua reserva de nitrogênio como proteínas ligantes a carboidratos (PEUMANS & VAN DAMME, 1995).

2.7.2. Evidências diretas sobre lectinas com papel de defesa em plantas

Evidências diretas dos efeitos de lectinas de plantas sobre várias classes de organismos (vírus, bactéria, fungos, insetos, animais superiores) foram obtidos

utilizando a proteína purificada em dietas artificiais ou utilizando plantas transgênicas, além dos efeitos de uma classe especial de lectinas, as RIPS tipo 2.

a) Atividade Antiviral de Lectinas de Plantas

Além dos efeitos posteriormente descritos sobre RIPS tipo 2, não se tem reportado inibição da infecção, replicação ou propagação em vírus de plantas por lectinas de plantas, provavelmente por causa da ausência de glicanos no vírus. Diversas lectinas de plantas são potentes inibidores *in vitro* de alguns vírus animais e humanos, os quais possuem glicoproteínas (BALZARINI *et al.*, 1992). Algumas lectinas de plantas podem possuir um efeito antiviral indireto: a presença de lectinas inseticidas podem prevenir e /ou reduzir a dispersão de doenças virais transmitidas por insetos, por exemplo.

Um exemplo de lectina com atividade antiviral, mas contra vírus de animal, é a Scitovirina (SVN), uma proteína com potente atividade anti-HIV (Human Immunodeficiency Virus), originalmente isolada a partir de extratos aquosos da cianobactéria *Scytonema varium* (BOKESCH *et al.*, 2003). SVN liga-se às proteínas gp120, gp160 e gp41 de HIV-1, inativando, a concentrações nanomolares, linhagens de laboratório e isolados primários de HIV-1. Demonstrou-se que a inibição envolve interações seletivas entre a SVN e glicoproteínas que possuem oligossacarídeos ricos em manose (BOKESCH *et al.*, 2003).

b) Atividade Antibacteriana de Lectinas de Plantas

A parede celular bacteriana constitui-se uma eficiente barreira física de proteção. O componente rígido da parede celular bacteriana é o heteropolímero que alterna ligações β 1-4 entre resíduos de Ácido N-acetilglucosamina e Ácido N-acetilmurâmico. O polímero linear está presente do lado de dentro e fora da parede celular, apresentando ligações cruzadas com pequenos peptídios, numa estrutura exata da qual depende a bactéria, prendendo fortemente a cadeia polissacarídica que envolve a célula inteira, prevenindo a turgescência celular ou a lise devido a entrada osmótica de água (LEHINGER, 2005)

A parede celular de bactéria também impossibilita qualquer interação entre glicoconjugados de sua membrana e proteínas ligantes a carboidratos, além de prevenir

que essas proteínas penetrem no seu citoplasma; conseqüentemente, lectinas de plantas não podem alterar a estrutura ou permeabilidade da membrana ou perturbar o processo intracelular. Se lectinas de planta têm um papel na defesa contra bactéria, é necessário, portanto, um mecanismo indireto, que é baseado nas interações com os carboidratos da parede celular ou glicanos externos. Lectina de batata, por exemplo, considerada como uma proteína de parede celular, imobiliza linhagens consideradas avirulentas de *Pseudomonas solanacearum* na parede celular (SEQUEIRA & GRAHAM, 1977), enquanto que linhagens virulentas não foram reconhecidas pela lectina, escapando da ligação com a parede celular, multiplicando-se e propagando-se na planta com sucesso.

Outro mecanismo de defesa indireto é o bloqueio de movimentos de uma bactéria normalmente móvel na interface ar-água por lectina de semente de *Datura stramonium* (BROEKAERT & PEUMANS, 1986). O efeito é totalmente revertido por fetuína, que se liga fortemente à lectina.

O bloqueio da mobilidade bacteriana mediado pela lectina *in vitro* foi correlacionado com a rápida e específica liberação da lectina do revestimento e da epiderme da semente, contendo o movimento da bactéria no solo, prevenindo assim a invasão potencial pela bactéria (BROEKAERT & PEUMANS, 1986).

Estudos mais recentes da ligação de lectinas de planta aos peptidoglicanos da parede celular bacteriana indicaram que diversas lectinas de leguminosas interagem fortemente com ácido murâmico, ácido N-acetil-murâmico e dipeptídeo muramil, demonstrando que o envolvimento de lectinas na defesa da planta contra microorganismos estava sendo subestimado (AYOUBA *et al.*, 1994).

c) Atividade Antifúngica de Lectinas de Plantas

De maneira similar à interação com bactérias, lectinas de planta precisam de mecanismos indiretos de ligação aos carboidratos expostos na superfície da parede celular fúngica, já que não podem se ligar aos glicoconjugados da membrana fúngica e nem penetrar no citoplasma, o que interferiria diretamente no crescimento e desenvolvimento desses organismos.

Por virtude de sua especificidade, lectinas ligantes a quitina parecem ter um provável papel na defesa de plantas contra fungo (e insetos). Como exemplo, estudos *in vitro* demonstrando a inibição da germinação de esporos e do crescimento de hifas de *Trichoderma viride* por WGA (wheat germ agglutinin, lectina do trigo), suportando

fortemente a hipótese do papel antifúngico de lectinas de planta ligantes quitina, mas a preparação lectínica encontrava-se contaminada com quitinases (SCHLUMBAUM *et al.*, 1986).

Posteriormente, BROEKAERT *et al.* (1989), demonstrou que uma preparação lectínica de Urtiga (UDA, *Urtica dioica* agglutinin), livre de quitinase, continha propriedades antifúngicas, inibindo o crescimento de *Botrytis cinerea*, *Trickoderma kamatum* e *Pkycomyces blakesleeanus*. O mecanismo exato da lectina de urtiga ainda não foi completamente elucidado, mas certamente não é baseado em atividade quitinásica e não afeta o metabolismo normal das células fúngicas. Apenas a síntese da parede celular parece ser afetada, como resultado de um distúrbio na síntese e/ou deposição de quitina (VAN PARIJS *et al.*, 1992). Considerando os efeitos de modificação da lectina de urtiga sobre a parede celular fúngica e a morfologia da estrutura das hifas, acredita-se que essa lectina esteja envolvida no controle da colonização de rizomas por endomicorrizas (PEUMANS & VAN DAMME, 1995).

Diversas outras proteínas vegetais ligantes a quitina possuem propriedades antifúngicas, como as merolectinas ligantes a quitina (Heveína, Van Parijs *et al.*, 1991), e as quimerolectinas pertencentes às quitinases classe I, que conferem resistência a fungos patogênicos devido a sua cadeia catalítica (Collinge *et al.*, 1993)

d) Atividade Inseticida de Lectinas de Plantas

As células epiteliais ao longo do trato digestivo de insetos fitófagos estão diretamente expostos ao conteúdo da dieta e, portanto, são possíveis alvos para proteínas vegetais de defesa. Já que glicoproteínas são um dos maiores constituintes dessas membranas, o lado luminal do trato digestivo está literalmente coberto por potenciais sítios de ligação para lectinas da dieta. Quando a lectina se liga ao receptor glicoproteína, pode-se provocar um efeito deletério sistêmico ou local, podendo pelo menos repelir, retardar seu crescimento ou até mesmo matar o inseto.

A PHA (*Phaseolus vulgaris* agglutinin) foi a primeira lectina com propriedade inseticida descrita, baseada no seu efeito deletério sobre a larva de *Callosobruchus maculatus*. Ironicamente, essa primeira referência de um papel protetor de lectinas contra insetos foi baseada em um falso positivo, onde os efeitos eram devidos a uma contaminação por α -amilase (HUESING *et al.*, 1991a).

Experimentos recentes demonstraram que lectinas de gérmen de trigo (WGA), tubérculo de batata e de sementes de amendoim, maçã-de espinho ou zabumba (*Dratura stramonium*) e *Maclura pomifera* têm efeito inibitório sobre o desenvolvimento de larvas de *Callosobruckus maculatus*, somente sendo ativa a uma concentração fisiológica a de gérmen de trigo (MURDOCK *et al.*, 1990).

As lectinas quitina-ligantes de arroz (*Oryza sativa*) e de urtiga também inibiram o crescimento da larva de *Callosobruckus maculatus* (HUESING *et al.*, 1991b), mas parece que esse predador típico de sementes é insensível a maioria das lectinas de plantas e é moderadamente afetado pelas presumíveis lectinas tóxicas (trigo, arroz e urtiga).

Insetos do milho parecem ser mais sensíveis a lectinas dietéticas do que esses predadores de sementes: *Ostrinia nubilalis* e *Diabrotica undecimpunctata*, ambos se alimentam de milho (CZAPLA & LANG, 1990). WGA e lectina de semente de *Bauhinia purpurea* foram letais à larva neonata de *Ostrinia nubilalis* a baixas concentrações. Similarmente, a lectina de *Phytolacca Americana* matou a larva de *Diabrotica undecimpunctata*, enquanto que outras lectinas, incluindo WGA, inibiram seu crescimento (CZAPLA & LANG, 1990).

Resultados promissores foram obtidos com algumas lectinas manose-ligantes de Monocotiledôneas. Dietas triviais com lectinas purificadas de *Galantus nivalis* e *Allium sativum* mostraram ser moderadamente ativas contra *Callosobruckus maculatus* e *Spodoptera littoralis*.

Mais importante, a lectina de *Galantus nivalis* mostrou uma alta toxicidade contra insetos da cana-de-açúcar não apenas em testes com dietas artificiais, mas também em experimentos com plantas transgênicas (HILDER *et al.*, 1995).

Em geral, há três tipos de interações possíveis entre as lectinas e o trato gastrointestinal do inseto (adaptado de PEUMANS & VAN DAMME, 1995):

- Ligação da lectina à quitina da membrana peritrófica (lectinas quitina-ligantes);
- Ligação da lectina aos glicoconjugados expostos sobre as células epiteliais ao longo do trato digestivo (podendo ser internalizada ou não);
- Ligação de lectinas às enzimas digestivas glicosiladas.

e) Toxicidade de Lectinas de Plantas Para Animais Superiores

Como em insetos, as células epiteliais ao longo do trato digestivo de animais superiores estão totalmente expostos ao conteúdo da dieta. Supõe-se que as plantas tenham desenvolvido suas proteínas de defesa com ação sobre esse sítio de interação com os predadores. Desde que as células do lúmen do trato digestivo estejam cobertas com glicoproteínas de membrana e mucinas altamente glicosiladas, existem incontáveis alvos para interação com lectinas de plantas dietéreas. Tomando por consideração a diversidade de lectinas e sua especificidade por glicanos animais, pode-se prever que essas proteínas protegem a planta contra predadores animais. Felizmente, a toxicidade de lectinas para animais superiores é bem documentada por causa da possibilidade de risco de saúde causado por lectinas presentes em plantas utilizadas para produção e alimentação.

Uma boa parte do nosso conhecimento sobre propriedades tóxicas de lectinas de plantas e seus efeitos em animais e humanos tem sido obtido a partir de experimentos com dietas com PHA purificada e de envenenamento acidental por humanos com feijão cru ou mal cozido (*Phaseolus vulgaris*). A PHA ingerida, a qual é altamente resistente a proteases, liga-se às vilosidades das células do intestino, onde é rapidamente endocitada. Quando a lectina entra na célula, induz-se um aumento da atividade metabólica, que eventualmente leva à hiperplasia e/ou hipertrofia do intestino delgado (PUSZTAI *et al.*, 1990).

Além disso, a ingestão de PHA ou de feijões crus causa náusea aguda seguida por vômito e diarreia. Esse desconforto é tão severo que animais experimentais são muito relutantes para consumir uma dieta contendo PHA, e algumas vezes eles rejeitam. Os efeitos severos da PHA ilustram o potencial de lectinas na proteção contra predadores.

Embora a maioria das pesquisas sobre a toxicidade de lectinas tenha sido feita com PHA, há uma abundância de evidências de que outras lectinas provocam efeito similar. Por exemplo, as lectinas de *Robinia pseudoacacia* e *Sambucus nigra* causam os mesmos sintomas de toxicidade severa. Como ambas as lectinas são abundantes, essas duas espécies nunca são atacadas por roedores, cervos, ou outros animais selvagens,

enquanto que espécies rodeantes livre de lectinas (álamo, salgueiro, maçã selvagem), são o alimento favorito para os mesmos animais (PEUMANS & VAN DAMME, 1995).

Diversas outras lectinas de sementes e órgãos de reserva vegetais ligam-se à mucosa intestinal de ratos e então perturbam o funcionamento normal do intestino. Em adição, algumas causam efeitos sistêmicos, como o crescimento do pâncreas (PUSZTAI *et al.*, 1993). Essas lectinas podem também ter um papel na defesa contra predadores. A presença de proteínas moderadamente tóxicas em sementes e em órgãos de reserva podem ser uma adaptação evolucionária. Embora a presença de lectinas tóxicas possa não proteger completamente uma semente ou parte da planta, a reação de renúncia pelo animal pode ser benéfica para a sobrevivência da espécie.

f) RIPs Tipo 2: Uma Classe Especial de Quimerolectinas Com Uma Toxicidade Geral Para Todos Os Eucariotos

RIPs tipo 2 são conhecidas por serem potentes agentes citotóxicos. A cadeia B de ligação ao açúcar liga-se a um receptor (glicoconjugado) sobre a superfície celular, promovendo assim a endocitose da cadeia A. Após sua entrada na célula, a cadeia A inativa cataliticamente os ribossomos eucarióticos pela clivagem de uma ligação N-glicosídica de um resíduo simples de adenina da subunidade maior do RNAr. Em princípio, RIPs tipo 2 são extremamente tóxicas para todos os eucarióticos ao alcançarem o citoplasma.

Insetos parecem reagir diferencialmente após dieta com RIPs tipo 2. A Ricina, lectina de mamona, foi altamente tóxica para os coleópteros *Callosobruchus maculatus* e *Anthonomus grandis*, mas não teve efeito algum sobre os lepidópteros *Spodoptera littoralis* e *Heliothis virescens* (GATEHOUSE *et al.*, 1990). O fato de que alguns insetos sobrevivem à dieta contaminada com ricina indica que eles tanto podem inativar a toxina ou não ligar-se à toxina. Outra RIP tipo 2, a lectina de *Eranthis hyemalis* (KUMAR *et al.*, 1993) foi muito tóxica para larvas de *Diabrotica undecimpunctata* (maior peste de inseto do milho). Parece provável, portanto, que RIPs tipo 2 ofereçam boa proteção à planta contra animais e também alguns insetos.

Em princípio, RIPs tipo 2 são também tóxicas para fungos, entretanto, já que elas não penetram no citoplasma, é difícil propor que tenham um efeito deletério direto sobre a invasão fúngica. Ribossomos bacterianos são insensíveis a RIPS tipo 2, o que implica que essas toxinas não podem exercer algum efeito sobre bactéria.

Surpresamente, RIPs tipo 2 exibem uma atividade inibitória contra vírus de planta, embora o mecanismo de ação seja desconhecido. Possivelmente as RIPs incluídas em suspensões de vírus usadas em testes de infectividade matam as células da planta por inativação de seus ribossomos, provocando uma forma de resposta hipersensitiva (PEUMANS & VAN DAMME, 1995).

2.8. Preservação da Madeira

2.8.1. Introdução

Produtos da madeira são extensivamente utilizados em construção residencial e outras aplicações externas, onde a madeira pode ser degradada por diferentes organismos. Para prevenir a degradação, produtos da madeira não duráveis usados nessas aplicações onde estão susceptíveis à biodeterioração são tratados com biocidas. A madeira tratada é um material sustentável, de baixo custo e efetiva para construção, que requer relativamente pouca energia para ser manufaturada, já que árvores sequestram dióxido de carbono da atmosfera para prover seu crescimento. Portanto, madeira tratada é um material de construção econômico e provê benefícios ecológicos à sociedade. Entretanto, a preservação da madeira tem recentemente atravessado dramáticas mudanças mundiais (PRESTON, 2000). Essas mudanças têm sido dirigidas tanto por interesses ambientais reais e perceptíveis como por regulamentações governamentais. A proteção da madeira contra os muitos organismos que podem degradá-la tem problemas únicos. Os vetores empregados devem ser efetivos contra uma extensa variedade de organismos e devem permanecer por anos mantendo a madeira tratada. O mercado mundial para biocidas madeira-preservadores tem um nível ativo relativamente pequeno, cerca de U\$ 0,6 bilhões, quando comparado com os U\$ 36 bilhões para agroquímicos (PRESTON, 2003). Além disso, o custo contribuinte do tratamento ao final do produto da madeira é relativamente pequeno comparado com o do produto total, usualmente menos que 15%, mas se o produto falha durante sua longa vida útil, o preservativo é responsável pelo o produto inteiro. Portanto, preservação da madeira tem um relativo pequeno potencial lucrativo, mas carrega um alto potencial de responsabilidade (PRESTON, 2003). Em adição à biodegradação, outro desafio com a madeira para exposição externa é que a madeira é um material higroscópico que incha quando umedece e encolhe quando seca, embora cada efeito varie entre as espécies. Isso

pode levar a mudanças dimensionais indesejáveis que resultam em madeira rachada ou enlodada com o tempo (PRESTON, 2000; EVANS, 2003). Além disso, a superfície da madeira exposta à luz do sol pode fotodegradar e a madeira exterior pode ter sua superfície modificada, se deixada sem manutenção. Portanto, certas espécies de madeira perdem gradualmente sua aparência atrativa inicial e requer manutenção de tempos em tempos. Isso faz com que a madeira seja vista como uma matéria-prima barata com propriedades inferiores, quando comparada com outros materiais de construção competidores (SCHULTZ *et al.*, 2007).

2.8.2. Preservação da Madeira no Passado

A proteção da madeira industrial era tradicionalmente feita apenas com a primeira geração de preservativos, que possuem um bom espectro de atividade contra muitos organismos que podem degradar a madeira, são de baixo custo e permanecem efetivos por muitos anos. Primeira geração de preservativos: Creosoto, Pentaclorofenol (à base de óleo) e os Arsênicos (à base de água), principalmente o CCA (Chromated Cooper Arsenate) (LEVI, 1973). Antes do desenvolvimento do Creosoto, o primeiro preservativo industrial desenvolvido há aproximadamente 170 anos atrás, a escolha era usar o cerne naturalmente durável de certas árvores ou fazer uso de ciclos rápidos de substituição de produtos de madeira não duráveis. A diminuição da disponibilidade de madeira durável permitiu o desenvolvimento de preservativos manufaturados para espécies de madeira não duráveis, mas tratáveis (PRESTON, 2000; FREEMAN *et al.*, 2003).

Creosoto é uma mistura complexa viscosa de hidrocarbonetos poliaromáticos e outros orgânicos. Foi primariamente utilizado em aplicações não residenciais, principalmente em nós de vias férreas. Recentemente somava cerca de 15 % do volume de árvores tratadas na América do Norte, mas algumas localidades estavam começando a restringir seu uso e também não foi extensivamente permitido em países da Europa (PRESTON, 2000; FREEMAN *et al.*, 2003).

Pentaclorofenol (Penta) é um biocida orgânico à base de óleo que foi desenvolvido em torno de 1930 e substituiu o Creosoto em muitas aplicações industriais, somando cerca de 5% do volume de madeira tratada na América do Norte, mas também não foi extensivamente permitido em países europeus (PRESTON, 2000; FREEMAN *et al.*, 2003).

Os maiores preservativos de madeira durante a última metade do século vinte foi os Arsênicos Metálicos à base d'água, principalmente o CCA (PRESTON, 2000; FREEMAN *et al.*, 2006). Sendo à base d'água, tratamento com CCA deixou a madeira sem resíduos de óleo na superfície e a madeira tratada com CCA provou ser um produto utilizável para a grande maioria de ambientes e aplicações. O relativo baixo custo químico do CCA fez dele um excelente preservativo para aplicações residenciais. Nos últimos 40 anos na América do Norte o volume total de madeira tratada para aplicações industriais se manteve constante, enquanto que o mercado residencial tem aumentado satisfatoriamente. A madeira tratada para aplicações residenciais na América do Norte chegou a somar cerca de 70% dos aproximadamente 18 milhões de m³ de madeira tratada anualmente (PRESTON, 2000).

No início dos anos 90, as preocupações sobre a exposição a arsênicos e crômicos aumentaram (PRESTON, 2000; FREEMAN *et al.*, 2003; REISCH, 2004). Enquanto que algumas empresas vinham debatendo essa questão a um grau considerável (ENGLLOT, 2006; SAXE *et al.*, 2007; DUBE, 2003), o resultado foi que nos anos 90 ocorreu uma rápida remoção de arsênicos e crômicos de muitas aplicações de preservativos na Europa e no Japão, e uma segunda geração de preservativos foi introduzida. Em torno da última década, essa mesma mudança ocorreu na América do Norte, onde o CCA agora só é permitido em aplicações industriais e em agriculturas.

2.8.3. Preservativos Atuais

Os biocidas que substituíram CCA para aplicações residenciais são a segunda geração dos Sistemas Ricos em Cobre à base d'água, que contêm Cobre (II) complexado e um cobiocida orgânico para controlar fungos tolerantes a Cobre (PRESTON, 2000; EVANS, 2003; FREEMAN *et al.*, 2003; FREEMAN *et al.*, 2006). Os principais sistemas são: ACQ (alkaline copper quat), CA (copper azole), CX (copper lylogen) e CB (copper betaine). Esses preservativos são os similares efetivos do CCA e, já que eles são à base d'água, são seguros para aplicações residenciais (FREEMAN *et al.*, 2006).

Outro tipo de preservativo a base d'água não-metálico disponível para aplicações residenciais são as formulações com borato, como o Octaborato disódio (PRESTON, 2000; FREEMAN *et al.*, 2003; FREEMAN *et al.*, 2006). Boratos têm baixo custo, têm uma toxicidade extremamente baixa para mamíferos, e um largo

espectro de atividade contra fungos e insetos, sendo não corrosivo, sem cor ou odor e têm uma longa história como preservativo de madeira. Entretanto, boratos podem ser facilmente carregados por água, então madeira tratada com borato é limitada para aplicações sem ou mínimo potencial de lavagem (REISCH, 2004).

Há uma expectativa geral de que a terceira geração de sistemas orgânicos irá eventualmente ser utilizado para aplicações externas residenciais em regiões do mundo onde o maior mercado para madeira tratada existe (EVANS, 2003; FREEMAN *et al.*, 2006). Biocidas e agroquímicos orgânicos empregados ou sendo considerados para preservação da madeira incluem: a família de biocidas conhecida como Triazoles, Tebuconazoles ou Propiconazoles, os quais são altamente efetivos contra um largo espectro de fungos Basidiomicetos e exibem uma boa estabilidade e resistência à lavagem da madeira; e os piretróides sintéticos, como a Permetrina, ou os altamente ativos Neonicotinóides (imidacloprida ou tiametoxam), para prevenir ataque por térmita/inseto. Poucos biocidas têm o potencial de controlar ambos fungos e insetos no mesmo grau. Entre eles, incluem-se: Clorotalonil, baixo custo e baixa toxicidade para mamíferos, além de resistência a lavagem, mas muito difícil para formular; DDAC (didecyldimethylammonium chloride) e DCOIT (isothiazolone 4,5-dichloro- 2-*n*-octyl-4-isothiazol-3-one), os quais exibem extensa eficácia contra deterioração por fungo e insetos e têm uma excelente estabilidade na madeira.

Como a grande maioria dos novos biocidas orgânicos, derivados de agroquímicos são efetivos contra apenas poucos dos vários organismos que podem degradar a madeira, uma combinação de dois ou três biocidas orgânicos pode ser necessária em algumas formulações, dependendo do nível de uso e aplicação. Para direcionar alguns dos problemas com sistemas totalmente orgânicos, especialmente o alto custo e a biodepleção por biocidas orgânicos, como microorganismos não-deteriorizantes habitantes da madeira, estudos têm sido feitos com aditivos não-biocidas, de baixo custo e seguros. Esses aditivos foram desenvolvidos baseados no conhecimento fundamental de que a degradação por fungo emprega reações mediadas por metal para gerar radicais livres que atacam e degradam a madeira (GOODELL, 2003). Portanto, biocidas orgânicos foram combinados com compostos complexados com metal para se ligar aos metais e radicais livres para prevenir a degradação da madeira por radicais (SCHULTZ & NICHOLAS, 2002; SCHULTZ *et al.*, 2005).

Repelentes a base d'água provêm múltiplas vantagens para produtos de madeira, incluindo redução da deterioração potencial e da lavagem de biocidas da madeira

tratada, além de um aumento na estabilidade dimensional em exposição externa. Muitos desses repelentes são baseados em ceras de hidrocarbono e/ou termoplásticos, com o produto de madeira sendo tratado usando uma formulação em emulsão (SCHULTZ *et al.*, 2007).

A pesquisa está sendo conduzida sobre outros sistemas repelentes que poderiam ser utilizados apenas em baixa deterioração de ambientes de risco ou combinados com biocidas para condições de risco de maior deterioração. Por exemplo, um sistema a base d'água tem sido formulado a partir de resinas ácidas naturais e repelência a base d'água tem sido descoberta em arranjos obtidos com cera baseada em petróleo (SCHULTZ *et al.*, 2007).

2.8.4. No Futuro

Especula-se que a futura geração de produtos de proteção à madeira irá ser baseada em métodos não-biocidas para prevenir a biodeterioração. Dessa maneira, madeira não-biocida preservada já está disponível em quantidades limitadas, primariamente na Europa, e a madeira é quimicamente modificada: madeira acetilada e madeira tratada com calor (PRESTON, 2003; EVANS, 2003, ROWELL, 2006). A modificação química já tem sido estudado há mais de 50 anos por vários pesquisadores que têm descoberto que, se a madeira é tratada para um certo ganho de peso, isso satisfatoriamente aumenta a resistência a insetos e à deterioração e melhora suas propriedades temporais. Voltado para o recente interesse em madeiras livres de biocidas, modificações químicas têm sido novamente interessantes. Cerca de 15 anos atrás, pequenas fábricas produziram diversos tipos de madeira sólida modificada para aplicações especializadas no mercado japonês, e diversas acetilações ou furfurilações para modificação de madeira estão sendo consumidas e consideradas na Europa, com adicional interesse em outros países. Outra técnica de modificação na madeira que tem sido estudada por cerca de meio século e tem tido algum sucesso comercial recente, na década passada na Europa, é a madeira tratada com calor (PRESTON, 2003; EVANS, 2003). Nesse processo, a madeira é aquecida em uma atmosfera não-oxidativa, com o produto resultante utilizado para ter aumentada a resistência à deterioração e a estabilidade dimensional. Todavia, a susceptibilidade a térmitas permanece um problema maior, sendo assim, a madeira tratada com calor não é ajustável para regiões onde térmitas estão presentes.

Outro método não-biocida inclui madeira tratada com vários polímeros ou monômeros *in situ*, tanto se ligando sozinhos e/ou com os componentes estruturais da madeira (ROWELL, 2006). O custo efetivo de cada método é de ordem maior do que qualquer método biocida anteriormente citado, e os processos dos tratamentos requerem muita atenção.

Processos futuros para preservar a madeira podem envolver o retorno para o uso histórico de cerne naturalmente durável e resistente. O cerne de muitas árvores tem certa resistência natural, com excepcional alta resistência e durabilidade observada em algumas poucas espécies. Se essa durabilidade e/ou resistência poder ser entendida, pode ser possível através do uso de técnicas genéticas desenvolver plantios de árvores que desenvolvam rapidamente o cerne com uma durabilidade e resistência que se arranjam como uma madeira tratada com a segunda e terceira geração de biocidas (EVANS, 2003). Além disso, o estudo e aplicação de compostos ativos naturais presentes em plantas que lhe confirmam resistência a essa diversidade de organismos biodeterioradores também se mostram promissoras ferramentas biotecnológicas na produção de plantas transgênicas com madeira de melhor qualidade e durabilidade.

Muitos grupos pesquisadores estão se esforçando de maneira a desenvolver produtos com propriedades confiáveis e desejáveis, que podem ser comprados por consumidores para utilizá-los conforme necessidade e/ou para prover potencial lucro apropriado, com a viabilidade da longa duração de um produto industrial inovado.

2.9. Térmitas

Os cupins ou térmitas (do latim, *termes* = verme da madeira) são insetos eusociais da ordem Isoptera (do grego, *isos* = igual, *ptera* = asas, ou seja, dois pares de asas semelhantes). Restos fossilizados destes insetos já foram encontrados em formações geológicas datadas de 55 milhões de anos. Estão representados nas Américas por cerca de 90 gêneros distribuídos em 5 famílias, com cerca de 640 espécies. Registram-se no Brasil cerca de 290 espécies em 67 gêneros (FLORÊNCIO, 2006).

Ocorrem principalmente em regiões tropicais e subtropicais, com algumas espécies sendo encontradas em lugares de clima temperado e outras em regiões desérticas. Dependendo do habitat e do gênero, os cupins podem nidificar em diversos locais, construindo seus ninhos no interior de árvores (raízes, troncos), de móveis ou de estruturas de edificações; em troncos e paus em decomposição, e no solo

(subterraneamente ou exteriormente em forma de montículos), com formatos e tamanhos diversificados (KAMBHAMPATI & EGGLETON, 2000).

Vivem em colônias, em sistema de cooperação mútua, onde os indivíduos são divididos em castas: a dos reprodutores, formada basicamente pela rainha, rei e reprodutores alados (siriris ou aleluias); a casta dos operários; a dos soldados, e outras castas menores (KOSHIKAWA *et al.*, 2002).

Os soldados são morfologicamente bem diferentes dos operários e são os responsáveis pela defesa da colônia, apresentando muitas adaptações para esta função. Por exemplo: as mandíbulas podem ser muito desenvolvidas (defesa mecânica), de variadas formas, simétricas ou assimétricas; podem apresentar glândulas especiais que produzem substâncias usadas na defesa química (HOJOA *et al.*, 2002). Os soldados não realizam outras tarefas na colônia e são alimentados pelos operários.

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

Entretanto, cerca de 10% das espécies conhecidas de isópteros estão registradas como pragas. A Tabela 1 apresenta gêneros e espécies atuais que ocorrem no Brasil e no Mundo e são consideradas espécies-praga.

O principal dano causado pelos cupins é consequência da sua capacidade de “digerir” celulose. A celulose é digerida por protozoários flagelados e bactérias que vivem no tubo digestivo desses animais. Esta associação é um excelente exemplo de simbiose. Os simbiontes protozoários ocorrem em todas as famílias, exceto em Termitidae. Várias espécies de cupins são pragas agrícolas nos trópicos, alimentando-se de várias partes de plantas cultivadas, constituindo ameaças a plantações de cana-de-açúcar, eucalipto, frutíferas, entre outras (FROHLICH *et al.*, 2007).

A biodegradação da madeira por cupins é um dos problemas mais sérios para a sua utilização. Sabe-se também que os térmitas danificam uma variedade de materiais que variam de telas de papel a materiais não-celulósicos tais como o betume do asfalto e folhas de metal (BULTMAN *et al.*, 1979).

Os problemas com cupins vêm crescendo e causando prejuízos cada vez maiores em diversas áreas urbanas no Brasil e no mundo. Provavelmente o impacto ambiental provocado pelo processo de urbanização e a elevada plasticidade biológica dos cupins têm contribuído para este aumento. Os danos às estruturas de madeira e a outros materiais celulósicos causados por térmitas chegam a mais de US\$ 3 bilhões em todo o planeta, anualmente (SU & SCHEFFRAHN, 1990).

Controlar cupins é, certamente, um dos mais difíceis desafios técnicos enfrentados pelos profissionais de controle de pragas do mundo inteiro. O sucesso no controle de qualquer praga (e, em especial, as de cupins) depende diretamente do nível de conhecimento sobre a biologia e comportamento das espécies-alvo. Destacam-se como altamente prejudiciais à economia e em áreas domiciliares e peridomiciliares, os gêneros *Coptotermes*, *Heterotermes*, *Nasutitermes*, *Cryptotermes* e *Syntermes*, entre outros (SU & SCHEFFRAHN, 1990).

O método convencional de combate aos cupins tem como princípio a utilização de produtos químicos. Os inseticidas atuais, principalmente organofosforados e piretróides, apresentam toxicidade para o homem e outros seres vivos, além de risco de contaminação ambiental. Para evitar os problemas ambientais de poluição e saúde causados pelo uso de preservativos ou de pesticidas sintéticos, o interesse pelo uso de substâncias naturais, não-tóxicas ao homem e a outros animais, tem aumentado (CHANG *et al.*, 2001). As madeiras-de-lei, resistentes ao ataque de cupins, constituem potenciais exemplos de fontes alternativas de compostos destinados ao controle de térmitas (CAVALCANTE, 1982).

Atualmente, a espécie de maior expressão urbana é *Coptotermes havilandi*, bastante conhecida pelo comportamento voraz, agressivo e com alto poder de destruição patrimonial. Entretanto, um outro importante grupo de cupins vem sendo favorecido pelo desequilíbrio ambiental provocado pelo homem. Os *Nasutitermes* (Termitidae) são mundialmente conhecidos por causarem danos em diversas peças de madeiras e em construções, demonstrando sinais de acentuada nocividade, infestando residências, cercas e árvores, em decorrência do desequilíbrio causado pela ocupação inadequada pelo homem (FIGUEIREDO, 2004; FILHO *et al.*, 2006; MIURA *et al.*, 2000).

O gênero *Nasutitermes* tem distribuição mundial e é um dos mais ricos em espécies. O número de indivíduos em um ninho (FIGURA 4) pode chegar a três milhões e a longevidade máxima das colônias de *Nasutitermes*, é de 40 a 80 anos. No Brasil,

Tabela 1. Listagem de gêneros de cupins que ocorrem no Brasil, nas Américas e no mundo e são considerados como espécies-praga.

Família/Subfamília	Gêneros	No de Espécies		
		Mundo	Américas	Brasil
Família Kalotermitidae	<i>Incisitermes</i>	28	20	1
	<i>Tauritermes</i>	3	3	2
	<i>Cryptotermes</i>	54	16	4
Família Rhinotermitidae	<i>Coptotermes</i>	76	5	3
	<i>Heterotermes</i>	49	9	4
Família Serritermitidae	-	-	-	-
Família Termitidae / Subfamília Apicotermiinae	-	-	-	-
Família Termitidae / Subfamília Nasutitermitinae	<i>Nasutitermes</i>	241	72	47
	<i>Cornitermes</i>	15	15	10
	<i>Cortaritermes</i>	3	3	1
	<i>Armitermes</i>	12	12	9
	<i>Embiratermes</i>	14	14	8
	<i>Procornitermes</i>	6	5	5
	<i>Rhynchotermes</i>	6	6	5
	<i>Syntermes</i>	27	23	20
Família Termitidae / Subfamília Termitinae	<i>Amitermes</i>	104	17	3
Família Termopsidae	-	-	-	-

esse grupo tem ampla distribuição. Enquanto gênero, são morfologicamente bem diferenciados da grande maioria dos cupins pelo aspecto bem característico da cabeça nos soldados (FIGURA 4), mas a classificação ao nível de espécie não é uma tarefa fácil (KAMBHAMPATI & EGGLETON, 2000; MIURA *et al.*, 2000; CONSTANTINO, 1992; SCHEFFRAHN *et al.*, 2002).

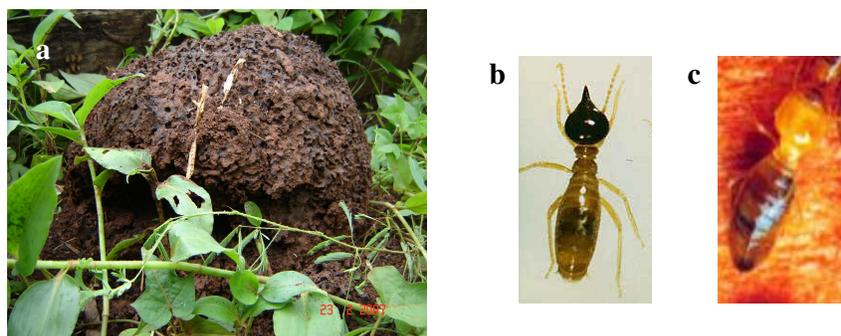


Figura 4. *Nasutitermes corniger*. (a) Ninho de *Nasutitermes corniger*. (b) Soldado e (c) operário de *Nasutitermes*.

Os ninhos de *Nasutitermes* podem apresentar padrões endógenos ou exógenos. Em seu ambiente natural, os *Nasutitermes* geralmente são cupins arbóreos, construindo seus ninhos em troncos. Algumas espécies também constroem ninhos diretamente no solo ou no sistema radicular. Todos esses casos são exemplos de padrões endógenos. Já no meio urbano, eles constroem seus ninhos preferencialmente em telhados, forros e vãos estruturais, afastados da superfície do solo, caracterizando um padrão exógeno. Os *Nasutitermes* também são capazes de caminhar sobre o solo em trilhas, semelhante às formigas cortadeiras, não necessitando a qualquer momento se locomoverem dentro de túneis (FLORÊNCIO & DIEHL, 2006; CUNHA *et al.*, 2005; FIGUEIREDO, 2004; SCHEFFRAHN *et al.*, 2002; EDWARDS & MILL, 1986).

Nas áreas propensas ou com histórico da presença de *Nasutitermes*, propõem-se ações de controle químico, ainda na fase de pré-construção dos ninhos, para prevenir infestações e, conseqüentemente, os sérios danos econômicos decorrentes da ação deste grupo. O esclarecimento da resistência natural de madeiras é uma ferramenta essencial para o desenvolvimento de substâncias que possam ser utilizadas no controle desses cupins (FILHO *et al.*, 2006).

2.10. Fungos

Os fungos são organismos não-fotossintéticos que crescem como uma massa de filamentos (hifas) entrelaçados e ramificados, conhecida como micélio. Os fungos, em sua maioria, têm sua parede celular constituída por celulose ou quitina (JAWETZ *et al.*, 1991). Estes microrganismos são ubíquos, encontrados no solo, água, vegetais, homem e detritos em geral (TRABULSI, 2000). Muitos dão origem a doenças em plantas, contudo somente cerca de 100 das milhares de espécies conhecidas de levedura e fungos filamentosos provocam doenças em seres humanos ou em animais. *Candida albicans*, levedura ovalado, trata-se de um membro da flora normal das mucosas nas vias respiratórias, gastrintestinais e genitais femininas. Nesses locais, pode predominar e associar-se às condições patogênicas, podendo provocar doença sistêmica em pacientes imunodeprimidos ou debilitados e ser comumente transmitida de um ser humano para outro (MEYER *et al.*, 2000). *Aspergillus niger* apresenta conidióforos simples, cabeça conidial grande, radiada e preta. É patogênico ao homem, capaz de provocar aspergilose pulmonar, aspergilose disseminada, lesões cutâneas, nasais e no sistema nervoso central, bem como outros processos. *Colletotrichum*, forma assexuada de *Glomerella cingulata*, apresenta micélio de coloração branca, conídios hialinos e arredondados. O *Colletotrichum gloesporioides* corresponde ao estado conidial de *Glomerella cingulata*. Este gênero é um dos mais importantes e difundidos na natureza, com mais de 1.000 espécies, sendo normalmente patógeno de plantas (LACAZ *et al.*, 1998).

Alguns fungos fitopatogênicos, principalmente do gênero *Fusarium*, como *Fusarium oxysporum*, apresentam importantes implicações na saúde das plantas e do homem (DI PIETRO *et al.*, 2003; WANG & NG, 2003).

Uma das principais propriedades das madeiras é a sua maior ou menor suscetibilidade em ser atacada por organismos xilófagos. Dentre estes, destacam-se os fungos apodrecedores. Madeiras que apresentam elevada durabilidade natural a esses organismos podem ser destacadas por um alto grau de nobreza, conferindo-lhes um amplo espectro de utilização e, conseqüentemente, tornando-as mais valorizadas no mercado. Sabe-se que o grau de resistência aos agentes biológicos é muito variável entre as madeiras, sendo um grande número destas caracterizadas por apresentarem elevada resistência ao ataque de insetos e de fungos apodrecedores. Com relação ao apodrecimento causado pela atuação de enzimas produzidas pelos fungos, Seabright (1995) afirma que estas são produzidas a partir de vários biocatalizadores, em que cada

uma dessas substâncias desenvolve funções específicas, como a aceleração ou controle das reações bioquímicas. Esses biocatalizadores são macromoléculas de proteínas com estrutura supermolecular definida, contendo um centro ativo. A hifa secreta enzimas destruidoras de celulose, quebrando a estrutura cristalina por expansão intermolecular, resultando na clivagem de algumas ligações de hidrogênio e covalentes. Várias outras enzimas agem também sinergicamente, quebrando e degradando a celulose não cristalizada em cadeias oligoméricas mais curtas e em unidades de celobiose (duas unidades de anidro-glicose), chegando, finalmente, a simples monômeros de glicose, que podem ser digeridos pelas hifas. Pode-se afirmar que a quebra enzimática consiste basicamente na transformação dos componentes insolúveis da madeira, em produtos solúveis, e em seguida em compostos químicos simples, capazes de serem metabolizados. Segundo Oliveira *et al.* (1986), esse processo pode ser relativamente rápido, demonstrando, assim, a eficiência dos fungos xilófagos em degradar substratos lignocelulósicos. Segundo Santos (1992), a madeira sob ataque de fungos apresenta alterações na composição química, redução da resistência mecânica, diminuição de massa, modificação da cor natural, aumento da permeabilidade, redução da capacidade acústica, aumento da inflamabilidade, diminuição do poder calorífico e maior propensão ao ataque de insetos, comprometendo, dessa forma, a sua qualidade e inviabilizando a sua utilização para fins tecnológicos.

2.11. *Platypodium elegans* Vogel

Platypodium elegans Vog (FIGURA 5) – Leguminosae (jacarandá-branco) é uma espécie nativa brasileira, de ocorrência natural no Cerrado e em zonas de transição Cerrado-Floresta Estacional; encontrada em terrenos bem drenados (LORENZI, 1998), sua madeira, moderadamente pesada, dura, porém de tecido frouxo, moderadamente durável quando em ambientes internos, reconhecidamente resistente, é empregada na carpintaria, marcenaria, obras internas, cabos de ferramentas, etc.; além disso, esta espécie apresenta potencial ornamental, sendo utilizada na arborização de ruas e avenidas, e, como planta pioneira e rústica, não pode faltar nos plantios mistos destinados a recomposição de áreas degradadas de preservação permanente (SCHORR *et al.*, 2004). Segundo Mendonça Filho (1996), o muriqui se alimenta de suas folhas.

Não há nenhuma aplicação medicamentosa tradicional reportada. Nomes comuns: Jacarandá do Campo, amendoim-bravo, amendoim-do-campo, faveiro,

jacarandá-bana, jacarandá-branco, jacarandá-tã, jacarandazinho, secupiruna, uruvalheira.

Possui uma altura média de 8-12 metros, folhas compostas, paripinadas, com folíolos de 3cm. Suas flores são amarelas e pequenas (floração entre Setembro e Outubro), cujo fruto alado, de aproximadamente 6cm, marrom claro, permanece muito tempo na árvore após maduro. O fruto de *P. elegans* é do tipo sâmara, apresenta um núcleo seminífero envolto por pericarpo bastante rígido e contornado por alas coriáceas vascularizadas (Barroso et al., 1999); é praticamente impossível separar a semente do fruto (Lorenzi, 1998). As sementes possuem 1,5cm de comprimento. Essa espécie já foi reportada como nodulada por Halliday & Nakao (1982).

Filogenia:

Família *Leguminosae (Fabaceae)*

SubFamília *Papilionoideae*

Tribo *Dalbergieae* DC.

Gênero *Platypodium* Vogel

Platypodium elegans Vogel

2.12. Lectina de *Platypodium elegans*

De acordo com Benevides (2006), sementes de *Platypodium elegans* possuem pelo menos uma lectina específica por manose/glicose e seus derivados, capaz de aglutinar hemácias de coelho, mas que não aglutina hemácias do Sistema ABO. Esse trabalho descreveu o isolamento e a purificação parcial desta lectina, relatando rendimentos e fatores de purificação obtidos. Seus resultados descrevem uma lectina que se constitui como uma metaloproteína típica de lectinas de leguminosas, capaz de manter 50% de sua atividade até 60°C, cujo perfil eletroforético revela a presença de um protômero (subunidade α intacta) e seus fragmentos (β e γ). Até este presente trabalho, nenhuma atividade biológica havia sido investigada e/ou relatada com preparações lectínicas de sementes de *P. elegans*.



Figura 5: *Platypodium elegans*. (a) Representação Esquemática de folhas e frutos (b) Representação esquemática da Exsicata (c) Detalhes do fruto imaturo e maduro. (d) Copa. Floração amarela, folhas compostas paripinadas (e) Tronco (f) Fruto imaturo

2.13. Hipótese de Trabalho

Sementes de *Platypodium elegans* Vogel possuem uma lectina manose/glicose ligante, com um potencial termiticida e fungicida satisfatório, os quais evidenciam a participação da lectina na defesa vegetal e a revelam como um instrumento biotecnológico explorável.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral:

Objetivou-se obter a lectina purificada de sementes de *Platypodium elegans*, avaliando seu potencial biológico na capacidade fungicida e termiticida, abrindo possibilidades de sua utilização como ferramenta biotecnológica nas áreas de engenharia genética de plantas mais resistentes, pela sua possível correlação com a defesa vegetal.

3.2. Objetivos Específicos:

- Obtenção de uma lectina de sementes de *Platypodium elegans* purificada por métodos cromatográficos tradicionais;
- Caracterizar essa lectina quanto à sua afinidade por açúcar e por seu perfil eletroforético;
- Descrever e disponibilizar um protocolo viável e reprodutivo para a obtenção de uma lectina com rico potencial biológico;
- Detectar e avaliar o potencial termiticida e/ou repelente da lectina de sementes de *P. elegans* sobre operários e soldados de *Nasutitermes corniger*, praga em grandes metrópoles, correlacionando com a possibilidade de sua ação sobre a defesa da planta, em especial sobre a semente e madeira;
- Detectar e avaliar o potencial fungicida da lectina de sementes de *P. elegans* sobre os fungos fitopatogênicos *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *F. Decemcellulare*, *F. moniliforme* e *F. lateritium*, correlacionando com seu possível papel na defesa da planta.

4. MATERIAIS E **EQUIPAMENTOS**

4.1. Materiais Reagentes:

Ácido Acético

Ácido Fosfórico

Acrilamida e Bis-acrilamida

Açúcares simples e glicoproteínas disponíveis

Ágar

Azul de Bromofenol

BSA

Cercobin

Coomassie Brilliant Blue G e R

Enzimas Proteolíticas Papaína e Tripsina

Etanol

Glicerol

Glicina

HCl

Isopropanol

Marcadores moleculares disponíveis

Matriz Quitina

Matriz Sepharose CL-6B

Meio YNB (Yeast Nitrogen Base)

Metanol

NaCl

NaOH

n-Hexano

SDS (Dodecil Sulfato de Sódio)

Sulfato de Amônio

Temed

Tris

4.2. Materiais Biológicos:

Hemácias de coelhos albinos (Nova Zelândia) adultos e sadios selecionados.

Sementes de *Platypodium elegans*.

Térmitas *Nasutitermes corniger* (Motschulsky).

Fungos *Fusarium solani* (URM-2480), *F. oxysporum* (URM-2489), *F. moniliforme* (URM-3226), *F. decemcellulare* (URM-3006) e *F. lateritium* (URM-2491).

4.3. Equipamentos:

Agitador de Tubos MA 162 Marconi

Agitador mecânico

Agitadores Magnéticos Fisatom

ÄKTA (HPLC)

Aquecedor elétrico

Balança Analítica AA-200 Denver Instruments Company

Balança Digital Bel Engineering

Banho de Álcool

Centrífuga Bancada EBA 3S Heltich

Centrifuge 5810R, Eppendorf

Electrophoresis Power Suply-EPS 3500XL Pharmacia

Espectrofotômetro VIS LBK Novaspec II Pharmacia

Estufa Biológica

Liofilizador Lyph Lock 4.5 Lab Conco

Massas magnéticas

Membranas de Celulose para diálise (Exclusão 12kDa)

Microcentrifuge SD Eppendorf

pH Meter Model 420 A Orion

Pipetas automáticas Gilson, Eppendorf, Finnpiquette Digital

Placas de Petri (9 x 1,5 cm)

Spectronic Genesys 5 Spectronic Instruments

Vidraria em geral

5. METODOLOGIA / **ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL**

5.1. Procedência do Material

Sementes de *Platypodium elegans* (FIGURA 6) foram adquiridas comercialmente da Reserva de Reflorestamento **Flora Tietê**, São Paulo. O material foi enviado ainda nas vagens, embora já maduras e parcialmente partidas, chegando-se apenas as porções que continham a semente.

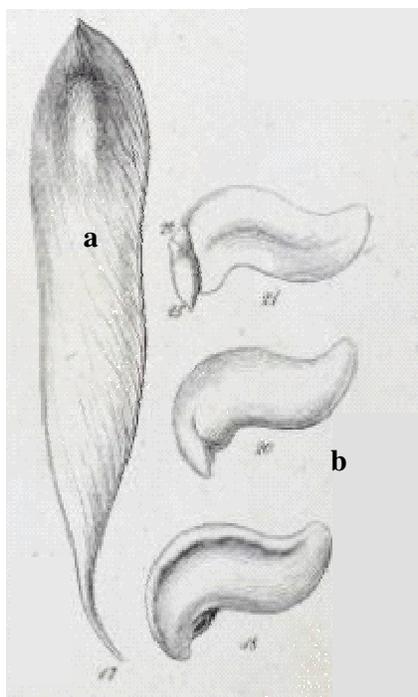


FIGURA 6. Representação do fruto e semente de *P. elegans*. (a) Fruto maduro (b) Detalhes da Semente.

5.2. Obtenção de Farinha

As sementes tiveram suas vagens retiradas, sendo então descascadas e submetidas à maceração, até a obtenção de um pó fino, denominado farinha, apropriada para o processo de extração protéica. A delipidação dessa farinha foi feita com n-Hexano, um solvente orgânico largamente usado para esse fim. Ao final desse processo, a farinha delipidada foi mantida exposta à secagem à temperatura ambiente em capela até que todo resíduo do solvente volatilizasse.

5.3. Extração Total de Proteínas da Farinha de Sementes de *Platypodium elegans*

As proteínas solúveis da farinha (delipidada) de sementes de *P. elegans* foram extraídas com solução salina (NaCl 0,15 M) na proporção de 1:10 p/v, sob agitação constante, durante de 1 hora, conforme descrito por BENEVIDES (2006).

A suspensão obtida foi centrifugada a 10000 g, temperatura 4°C, por 20 minutos. Ensaio de atividade hemaglutinante e de dosagem de proteínas solúveis, para o posterior cálculo da atividade específica, útil para futuras comparações e análises foram realizadas no sobrenadante obtido, denominado extrato total.

5.4. Detecção de Atividade Hemaglutinante (A.H.) no Extrato Total

A presença de holo ou superlectinas em uma amostra pode ser facilmente detectada a partir de ensaios de aglutinação celular, quando estas interagem com carboidratos de superfície através de seus sítios de ligação, formando um precipitado visível macroscopicamente.

A determinação da atividade hemaglutinante (A.H., FIGURA 7), foi feita segundo MOREIRA & PERRONE (1977), adaptado por CAVADA (1980). O extrato total, bem como as frações obtidas no decorrer do processo de purificação da lectina de *P. elegans*, obtido foram submetidos a esse teste da seguinte forma, utilizando-se hemácias de coelho:

As amostras, em duplas seriadas, foram diluídas em tubos (1:2, 1:4, 1:8...) em Tris-HCl 0,1M pH 7,6 contendo NaCl 0,15M. A 100uL de cada diluição adicionou-se 100uL de uma suspensão de hemácias normais e tratadas (com papaína ou tripsina) a 2% em NaCl 0,15M. O ensaio foi incubado a 37°C por 30 minutos e, após esse período, deixado em repouso à temperatura ambiente por mais trinta minutos. A presença ou não de hemaglutinação foi então detectada macroscopicamente.

Suspensões de hemácias foram previamente submetidas a dois tratamentos enzimáticos diferentes, com as enzimas Tripsina e Papaína. O objetivo deste passo foi, ao clivar cadeias protéicas presentes e expostas na membrana celular de hemácias, disponibilizar o acesso a maior variedade possível de cadeias glicanas.

O título de hemaglutinação (Unidades de Hemaglutinação-UH) foi definido como sendo o inverso da maior diluição ainda capaz de apresentar hemaglutinação visível macroscopicamente.

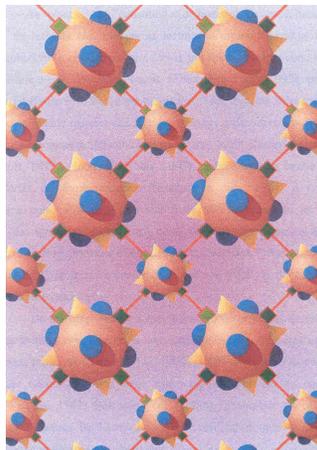


Figura 7. Representação esquemática de hemaglutinação por lectinas, baseada em KENNEDY *et al* (1995). Lectina  e seus ligantes , , , de superfície da célula, carboidratos ou não carboidratos, ligantes ou não.

5.5. Dosagem de Proteínas Solúveis

O teor de proteínas solúveis no extrato de sementes de *Platypodium elegans* e nas frações obtidas durante a purificação da lectina foi determinado pelo método descrito por BRADFORD (1976).

A cada 100uL de amostra, diluída ou não, 2,5mL do reagente de Bradford foram adicionados. A mistura foi então deixada em repouso por cerca de 10 minutos e em seguida teve sua absorbância determinada a 595nm em um espectrofotômetro de luz visível (VIS LBK Novaspec II, Pharmacia). A concentração de proteínas solúveis nas amostras analisadas foi determinada à partir de uma curva padrão obtida com o uso de soluções de concentrações conhecidas de albumina sérica bovina (BSA).

5.6. Cálculo da Atividade Específica

Após a obtenção do título de hemaglutinação e da quantidade de proteínas solúveis, a atividade específica para cada uma das frações até foi calculada, com o objetivo de se monitorar avanços na concentração/purificação da lectina em estudo.

O cálculo foi feito pela divisão do título de hemaglutinação (UH/mL) pela dosagem de proteínas solúveis (mgP/mL), cujo quociente foi expresso em UH/mgP (unidades de hemaglutinação por miligrama de proteína). Esses resultados poderão ser então comparados, levando à escolha da melhor condição / fração purificadora ou concentradora da atividade hemaglutinante.

5.7. Inibição da A.H. por Açúcares Simples, Glicoproteínas e Açúcares Sulfatados

Esse ensaio foi realizado com o Extrato Total, depois de submetido ao teste de AH. para se verificar em qual maior diluição essa fração ainda era capaz de apresentar AH visível a olho nu e em que tipo de tratamento enzimático das hemácias essa situação era melhor observada.

Alguns açúcares, simples ou sulfatados, bem como glicoproteínas disponíveis para o projeto, foram selecionados. 100 microlitros de cada açúcar foram adicionados serialmente em Tris-HCl 0,1M pH 7,6 contendo NaCl 0,15M. Após diluição do açúcar ou glicoproteína, 100uL da fração selecionada encerrando 4UH foram adicionados. O ensaio foi então incubado a 37°C por 30 minutos, e, após isso, mantido em repouso à temperatura ambiente por mais trinta minutos.

Duzentos microlitros de sangue de coelho tripsinizado foram acrescentados a todas as diluições dos açúcares ou glicoproteínas contendo a fração diluída. A mistura foi novamente incubada a 37°C, durante 30 minutos, e depois, deixada em repouso à temperatura ambiente por mais 30 minutos. A inibição da AH pelos açúcares foi então determinada, além de se observar, para aqueles açúcares que se mostraram capazes de inibir a AH, a maior diluição em que se permaneceu a ausência de AH, ou seja, que menor concentração de tais açúcares ainda inibe a AH (concentração mínima inibitória).

Este procedimento pôde certificar a especificidade da lectina presente na fração em estudo, já relatada por Benevides (2006).

5.8. Isolamento por Cromatografias de Afinidade e Troca Iônica

Para a obtenção da lectina purificada de sementes de *P. elegans* foram utilizadas técnicas clássicas de Cromatografias a partir de adaptações feitas de Benevides (2006).

A partir do resultado obtido com a inibição da A.H. por açúcares simples, foi possível escolher a cromatografia de afinidade como uma estratégia de maior purificação da Lectina em estudo. Nesta técnica, o açúcar determinado como forte inibidor da A.H foi imobilizado numa matriz adequada. As frações coletadas foram monitoradas por absorvância em comprimentos de onda de 280 nm.

Outras técnicas cromatográficas (troca iônica) foram utilizadas, conforme se mostraram necessárias para se obter a lectina em estado de pureza adequado, estabelecendo-se então um protocolo viável e certificado para purificação de uma lectina de *Platypodium elegans*, inclusive a utilização de cromatografias acopladas a HPLC (High Performance Liquid Chromatography).

5.8.1. Cromatografia de Afinidade em Quitina

Neste procedimento cromatográfico, a quitina foi utilizada como açúcar imobilizado, cujo monômero (GlucNac) foi determinado como um bom inibidor da A.H, a quitina.

Como ponto de partida para a purificação da lectina o extrato total foi aplicado em gel de Quitina previamente equilibrado em NaCl 0,15M, sendo incubado por 12 horas. A fração não retida foi eluída com a própria solução salina (NaCl 0,15M) e coletada em frações; logo após, a fração retida foi eluída com Tampão glicina-HCl 0,1M pH 2,6 contendo NaCl 0,15M, e também coletada em frações. As frações coletadas foram monitoradas por absorvância a 280 nm.

As frações ou picos obtidos foram exaustivamente dialisados contra água destilada e então liofilizados. A AH e o teor de proteínas solúveis foram avaliados e o cálculo da Atividade Específica dos picos obtidos calculado.

5.8.2. Cromatografia de Troca Iônica em DEAE-Sephacel

Após a cromatografia de afinidade em quitina, a fração com maior atividade específica foi submetida à Cromatografia de Troca Iônica em DEAE-Sephacel, uma

resina com trocador aniônico considerado fraco (DEAE – dietilaminoetano – FIGURA 8).



Figura 8. Grupo funcional DEAE (dietilaminoetano) utilizado no gel de DEAE-Sephacel

Com o objetivo de se selecionar o pH ideal para um melhor desempenho da Cromatografia, realizou-se um screening de pHs:

- Acetato 0,05 M, pH 4,0
- Citrato 0,025 M, pH 5,0
- Fosfato 0,02 M, pH 6,0
- Fosfato 0,02 M, pH 6,5
- Fosfato 0,02 M, pH 7,5
- Tris-Hcl 0,05 M, pH 7,0
- Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0
- Tris-HCl 0,05 M, pH 8,5

A 1mg da fração ativa da quitina foi adicionado 1mL de um dos tampões acima e, após solubilização, a suspensão foi centrifugada a 13000 g , 4°C, durante 4 minutos. O sobrenadante foi então aplicado em 1mL de gel de DEAE-Sephacel que, após lavado com os mesmos respectivos tampões para a retirada da fração não retida, foi eluído com o respectivo tampão adicionado de NaCl 1M. As frações coletadas (1 mL) foram monitoradas por sua absorbância a 280nm e avaliadas quanto à presença de AH.

Após a escolha do melhor tampão, a cromatografia foi realizada da seguinte forma: 20 mg da fração oriunda da cromatografia de afinidade em quitina, ativa, foram solubilizados em 5 mL de tampão fosfato 20mM, pH 6,5 e aplicados em 20mL de gel de DEAE-Sephacel, previamente equilibrado com o mesmo tampão. A fração não retida foi eluída com o tampão fosfato e a retida foi eluída com o tampão fosfato em presença de NaCl 0,5M. Foram coletadas frações de 2mL, que foram monitoradas a uma absorbância de 280nm.

Os picos obtidos foram exaustivamente dialisados contra água e, então, liofilizados. A AH, o teor de proteínas solúveis e a atividade específica de todos os picos foram avaliados.

5.8.3. Cromatografia de Troca iônica em HiTrap SP acoplada a HPLC

Após cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephacel, 1mg da fração ativa eluída em NaCl 0,5M, após diálise e liofilização, foi solubilizada em tampão acetato 20mM, pH 4,5.

Após centrifugação a 13000 g por 4 minutos, o sobrenadante resultante foi aplicado em HiTrap SP, uma resina com trocador catiônico forte (sulfopropil, FIGURA 9), acoplada a um Sistema HPLC.

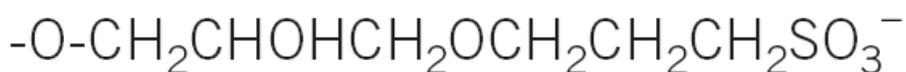


Figura 9. Grupo funcional SP (sulfopropil) utilizado em Hitrap SP

A fração não-retida foi eluída com o próprio tampão acetato e a fração retida eluída com gradiente salino NaCl 0-1 M.

Foram monitoradas variações em pH, temperatura, condutividade da fase móvel, absorbância em 280 e 216 nm, dentre outros.

Os picos obtidos foram exaustivamente dialisados contra água e, então, liofilizados. A AH, o teor de proteínas solúveis e a atividade específica foram, também, calculados.

5.9. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em Presença de SDS:

A avaliação do grau de pureza e da massa molecular aparente de todas as amostras obtidas a partir da farinha delipidada de *Platypodium elegans* e das frações obtidas nos passos estabelecidos foram feitas seguindo-se a metodologia descrita por LAEMMLI (1970), em experimentos de sistemas descontínuos de eletroforese em gel de poliacrilamida, adaptando-se a técnica para uso em placas (13,8 x 7,9 x 0,11cm).

As amostras a serem investigadas (extrato total, pico ativo Quitina, DEAE-Sephacel e HiTrap SP) foram solubilizadas em tampão Tris-HCl 0,0625M pH 8,3 encerrando concentração de 4mg/mL. Foram adicionados ao tampão de amostra: SDS 1%, uma quantidade adequada de glicerol de modo a deixar a solução densa, e azul de bromofenol 0,02%, que se utiliza para monitorar a corrida (frente de corrida).

O gel de empilhamento utilizado continha 3,5% de poliacrilamida, montado com Tris-HCl 0,5M pH 6,8 contendo SDS 1%. O gel de separação continha 12,5% de poliacrilamida, dissolvido em Tris-HCl 3M pH 8,8 contendo SDS 1%.

A corrida eletroforética foi realizada com a voltagem variando até 200V, potência até 5W, e amperagem constante de 20mA. O tampão de corrida utilizado continha Tris 0,025M - Glicina 0,192M - SDS 0,1% pH 8,8.

Após a corrida eletroforética, o gel de separação foi fixado em uma solução contendo 25% isopropanol e 10% ácido acético, por no mínimo 1 hora. O gel fixado foi então corado em Coomassie R-250 a 0,05%, dissolvido em metanol, ácido acético e água a uma proporção 1:3,5:8 (v/v/v). A retirada do excesso do corante (descoramento) foi feita em água destilada aquecida.

5.10. Atividade Inseticida contra Cupins

Colônias de *Nasutitermes corniger* (Motschulsky) foram mantidas em casa de vegetação do Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

5.10.1. Atividade Termicida

O bioensaio “sem escolha” de atividade termicida foi realizado segundo o método de KANG *et al.* (1990). Amostras de 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 mg da fração lectínica purificada em DEAE-Sephacel dissolvidas em 1mL de uma solução de NaCl 0,15M foram aplicadas em papel de filtro com 8,5 cm de diâmetro. No controle, foi utilizado papel de filtro apenas com o solvente (NaCl 0,15M). Após a remoção do solvente do papel de filtro por evaporação à temperatura ambiente, um total de 20 cupins (16 operárias e 4 soldados, proporção 4:1) do gênero *Nasutitermes* (Família Termitidae / Subfamília Nasutitermitinae), praga em grandes metrópoles, foram postos em placas de Petri (9 cm de diâmetro e 1,5 cm de altura) com um papel de filtro tratado.

O ensaio foi realizado com 3 réplicas para cada grupo (0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 mg da lectina), com exceção do controle (5 réplicas) e incubado à temperatura ambiente, na escuridão. Periodicamente, gotas de água foram adicionadas à placa.

A avaliação foi realizada diariamente até a morte de todos os insetos. O ensaio foi feito em triplicata e as taxas de sobrevivência foram obtidas para cada tratamento e expressas como uma média \pm sd.

5.10.2. Ensaio de Repelência

Um ensaio “com escolha”, baseado no método de Su *et al.* (1982) foi utilizado para avaliar a atividade repelente da lectina em estudo (FIGURA 10). Placas de Petri (9 x 1,5 cm) foram preenchidas com ágar 2% até que não houvesse espaços entre a superfície do ágar e a tampa das placas. Após a solidificação, poços foram feitos no ágar através da remoção de um cilindro central de 25 mm de diâmetro e de 8 cilindros na periferia de 6 mm de diâmetro. Em cada poço periférico foi colocado papel de filtro embebido com 15 μ L da solução lectínica obtida em DEAE-Sephacel (0,2, 0,4 e 0,8 mg/mL) e NaCl 0,15 M (controle negativo). Cada solução de tratamento estava presente em dois poços de cada placa, assim como o controle negativo. 20 cupins (16 operários e 4 soldados) foram transferidos das colônias para o poço central. As placas foram mantidas a 28 °C, no escuro, e foram observadas a presença ou ausência de cupins nos poços periféricos e os padrões de construção de túneis no ágar, além do fechamento de galerias construídas. O ensaio foi realizado em triplicata.

5.11. Atividade Fungicida

Fusarium solani (URM-2480), *F. oxysporum* (URM-2489), *F. moniliforme* (URM-3226), *F. decemcellulare* (URM-3006) e *F. lateritium* (URM-2491) foram obtidos das Coleções de Cultura do Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil (“University Recife Mycology”, URM),.

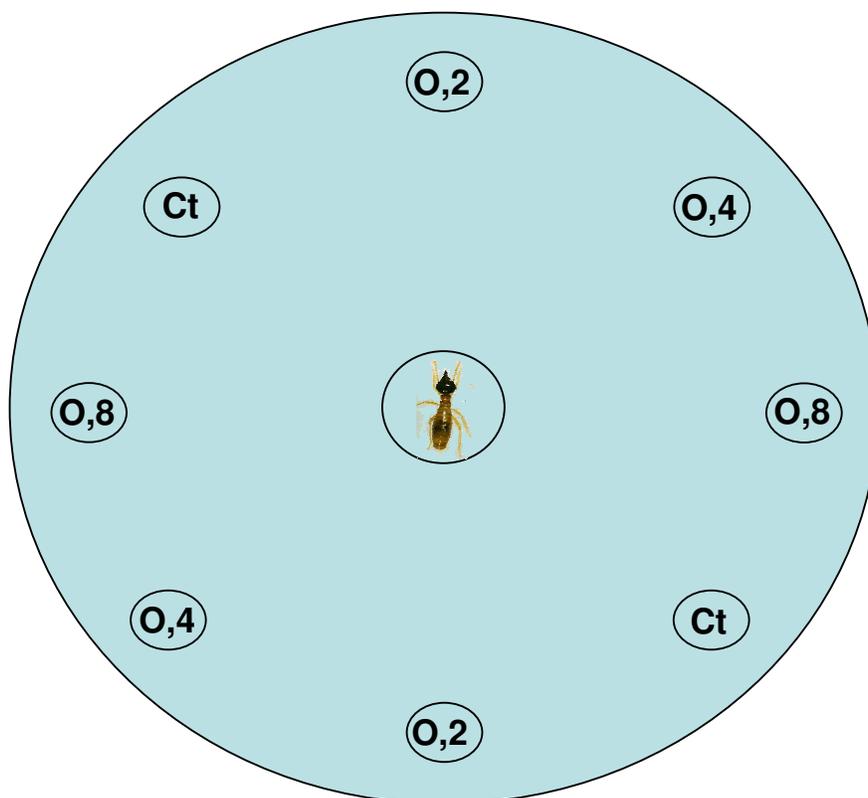


FIGURA 10. Representação Esquemática do Ensaio “com escolha” de Repelência de Térmitas pela Lectina de *P. elegans*. Concentrações utilizadas: 0,2; 0,4; 0,8 mg/mL. Ct: controle (NaCl 0,15 M).

A atividade antifúngica foi realizada através de um ensaio modificado baseado no método de WONG & NG (2005). A fração lectínica obtida em DEAE-Sephacel (50µL; 0,4mg/mL) foi espalhada em placas de Petri (10 x 1,5 cm) contendo meio YNB (Yeast Nitrogen Base). Um disco micelial (0,625 cm de diâmetro) foi disposto no centro da placa de Petri. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Uma solução salina de NaCl 0,15 M e Cercobin 10ppm foram usadas como controles negativo e positivo, respectivamente. As placas foram incubadas a 28 °C por 72 h. Atividade antifúngica foi indicada pela redução do halo de crescimento do fungo nas placas, sendo os resultados obtidos submetidos a análises estatísticas (ANOVA, intervalo de confiança de 95%).

6. RESULTADOS OBTIDOS

6.1. Detecção de Atividade Hemaglutinante (A.H.) no Extrato Total:

A Tabela 2 contém as informações sobre o título de hemaglutinação (UH – unidades de hemaglutinação) presente no extrato total da farinha de sementes de *P. elegans*, para hemácias de coelho nativas (CN), papainizadas (CP) e tripsinizadas (CT).

Em hemácias de coelho, houve prevalência de hemaglutinação quando estas foram tratadas com Tripsina e Papaína.

6.2. Dosagem de Proteínas Solúveis e Cálculo da Atividade Específica:

A quantificação de proteínas solúveis no extrato total (mgP/mL) e sua relação com a AH apresentada anteriormente (Tabela 2) encontra-se inserida na Tabela 3 (atividade específica).

6.3. Inibição da A.H. por Açúcares Simples, Glicoproteínas e Açúcares Sulfatados:

Foram testados 20 tipos de açúcares disponíveis, sendo estes açúcares simples, glicoproteínas ou açúcares sulfatados. Os resultados para menor concentração inibitória da A.H. para cada açúcar estão expostos na Tabela 4, em milimolaridade (mM).

Os açúcares com resultado satisfatório para inibição da AH foram Manose, Glucose e os relacionados à Glucose, entre eles N-acetil-glucosamina e metil- α -D-glucopiranosídeo. A manose foi capaz de inibir a A.H. a uma menor concentração, de 3,125mM. A partir desses resultados, traçou-se uma estratégia de isolamento e purificação da lectina até então detectada no extrato total salino, usando Cromatografias de Afinidade por Quitina.

6.4. Isolamento por Cromatografias de Afinidade e Troca Iônica

6.4.1. Cromatografia de Afinidade em Quitina

Dentre as cromatografias testadas para afinidade por Benevides (2006), não houve inicialmente resultados satisfatórios. Nas cromatografias em **manose-agarose** e

Tabela 2. AH presente no extrato total de sementes de *P. elegans* frente a hemácias de coelho tratadas ou não tratadas enzimaticamente

	Tratamento		
	Hemácias Nativas (CN)	Hemácias Papainizadas (CP)	Hemácias Tripsinizadas (CT)
UH/mL	2098	32768	32768

Tabela 3. AH total, Dosagem protéica solúvel e Atividade Específica do Extrato total de Sementes de *P. elegans*

Atividade Total (CT) U.H./mL	Dosagem Protéica mgP/mL	Ativ. Específica U.H./mgP
64	4,54	14,097

Tabela 4. Inibição da A.H. do Extrato Total de sementes de *P. elegans* por Açúcares ou Glicoproteínas

Açúcares Utilizados	Concentração Mínima para Inibição*	Açúcares Utilizados	Concentração Mínima para Inibição*
Galactose	-	D-Galactosamina	-
Lactose	-	Lactulose	-
N-acetil- β-D- Manosamina	-	Metil-α-D-Glucopiransídeo	12,5 mM
L-Fucose	-	Fucoidan	-
GlucNac	25 mM	Mucina	-
Glucose	50 mM	Metil-α-D-Galactopiransídeo	-
Ác. Galactoneuramínico	-	Carragenana	-
Manose	3,125 mM	D-Arabinose	-
Metil-D-Galactose	-	Polissacarídeo Sulfatado	-
		<i>Botriocladia</i>	
GalNac	-		

*Essas concentrações representam a menor molaridade de cada açúcar, a partir de 100 mM, em que ainda se exhibe Inibição da A.H.
- não detecção de inibição de AH

em **sephadex** (não representadas) não houve interação com a coluna, pois a A.H. permaneceu na fração não-retida. Nenhum destes dois procedimentos foi, portanto, efetivo para o isolamento da lectina em estudo. As cromatografias seguintes foram utilizadas, respectivamente, para purificação parcial e, por último, final da lectina de *P. elegans*.

Na cromatografia de afinidade em quitina (FIGURA 11) foram obtidas frações não-retida (P-I Quitina) e retida (P-II Quitina), o como relatada anteriormente por Benevides (2006). Embora a A.H. tenha se concentrado principalmente na fração não-retida, houve considerável concentração da A.H. (Tabela de Purificação – TABELA 6) nesta fração em relação ao extrato total. Esse procedimento, portanto, mostrou-se efetivo para o isolamento inicial da lectina em estudo.

A fração retida também apresentou A.H., embora fraca, não sendo, portanto, efetiva para o isolamento da lectina (Tabela de Purificação – TABELA 6).

6.4.2. Cromatografia de Troca Iônica em DEAE-Sephacel

A Figura 12 mostra o resultado da escolha do tampão ideal para o melhor desempenho da Cromatografia. A Tabela 5 apresenta os dados sobre a A.H. de cada uma das duas frações obtidas em todos os pH's.

A cromatografia em tampão fosfato 20mM, pH 6,5 se revelou a mais promissora de todas pelo fato de já haver concentrado a atividade total na fração retida, e por não reter boa parte do material não-ativo, mantendo-o isolado da fração ativa.

O perfil cromatográfico em DEAE-Sephacel para pH 6,5 (repetição/maior escala) está representado no Gráfico 3. A atividade hemaglutinante foi eluída em Fosfato 20 mm pH 6,5 com NaCl 0,5 M, obtendo-se um pico retido único. A adição posterior de concentrações maiores de NaCl até 2 M não eluiu nenhum material.

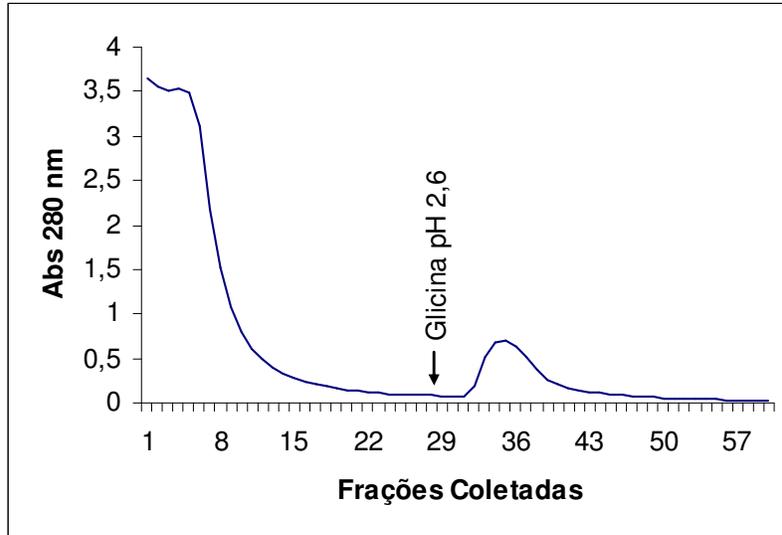


Figura 11: Cromatografia de Afinidade em Quitina. 1g de Farinha de Sementes de *P. elegans* extraída em NaCl 0,15M aplicado em quitina. O P-I Quitina foi eluído com NaCl 0,15M; o P-II Quitina, eluído com Glicina 0,1M pH 2,6 contendo NaCl 0,15M. Volume da Coluna: 7mL. Volume das frações: 2mL.

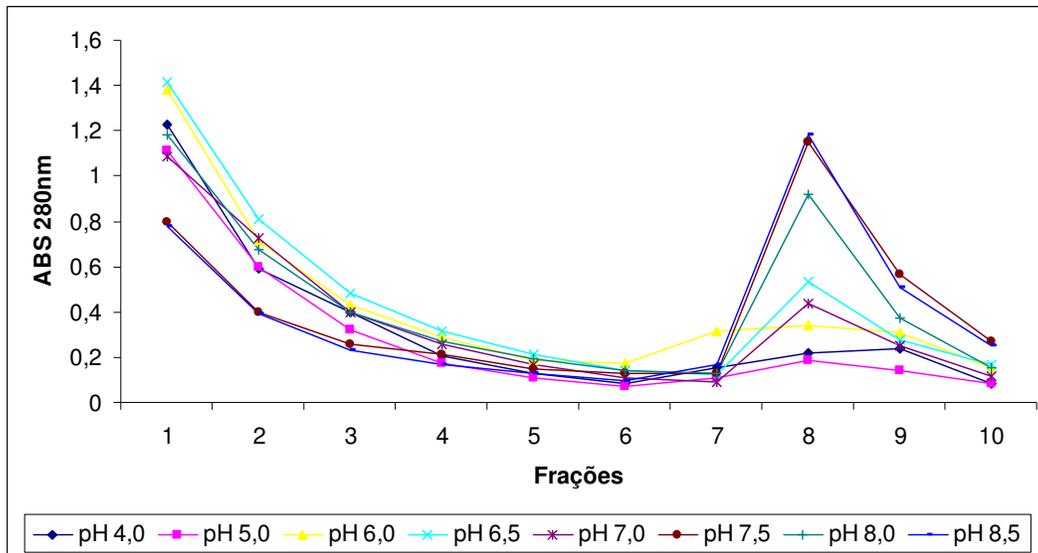


Figura 12: Comparativo de Perfil Cromatográfico em DEAE-Sephacel a pH's distintos. 1mg de P-I Quitina foi aplicado em cada experimento. O P-I DEAE foi eluído com o mesmo pH experimental respectivo e o P-II DEAE com adição de NaCl 1M. Volume da Coluna: 1mL. Volume das frações: 1mL.

Tabela 5. A.H. das Frações obtidas da Seleção de pHs para Cromatografia em DEAE-Sephacel .

pH	A.H.	
	Pico Não-retido	Pico Retido
4,0	+	-
5,0	+	-
6,0	+	+
6,5	-	+
7,0	-	+
7,5	-	+
8,0	-	+
8,5	-	+

(+) Presença de A.H. (-) Ausência de A.H.

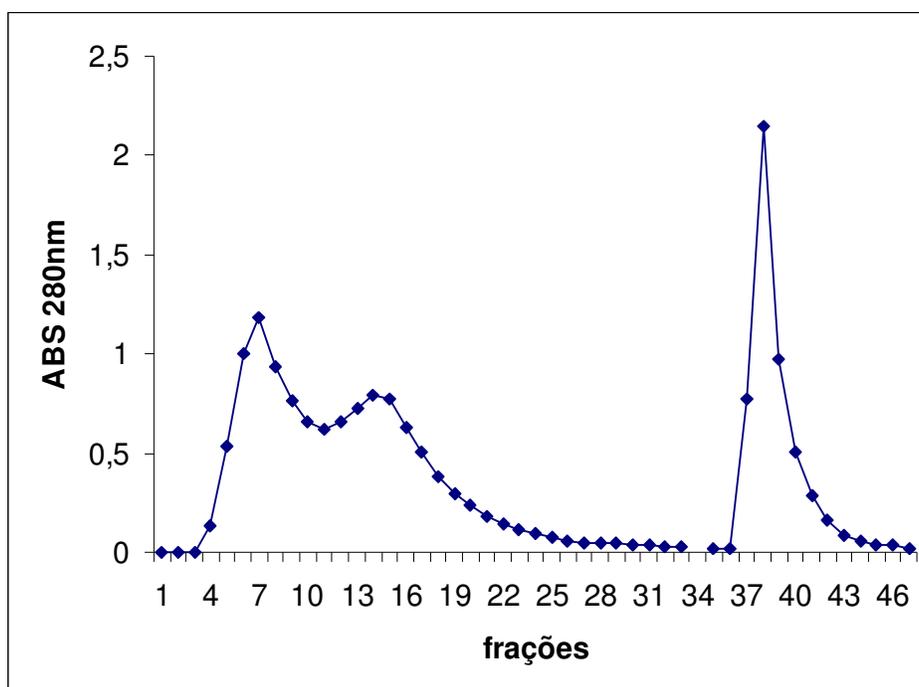


Figura 13: Cromatografia de Troca Iônica em DEAE-Sephacel. 20mg de P-I Quitina em Fosfato 20mM pH 6,5 foram aplicado. P-I DEAE foi eluído com tampão fosfato; o P-II DEAE, eluído com tampão fosfato contendo NaCl 0,5M. Volume da Coluna: 20mL. Volume das frações: 2mL.

6.4.3. Cromatografia de Troca iônica em HiTrap SP acoplada a HPLC

Esse procedimento foi utilizado com o objetivo de aumentar o grau de pureza da lectina já previamente purificada.

A fração retida obtida em DEAE-Sephacel (P-II DEAE) após aplicação em HiTrap SP (FIGURA 14) apresentou uma fração não-retida (P-I SP) e uma fração retida com dois picos (P-II e P-III SP). A fração ativa para A.H. foi apenas a P-I SP, concentradora efetiva de tal atividade, como é demonstrada na Tabela de Purificação (Tabela 6).

6.5. Tabela de Purificação da Lectina de *P. elegans*

As frações ativas obtidas durante o processo de isolamento e purificação da lectina de *P. elegans* foram todas testadas em relação à atividade específica. Extrato total, P-I e P-II Quitina, P-II Deae e P-I SP tiveram sua concentração protéica estimada e suas U.H. determinadas. Seus valores encontram-se listados na Tabela de Purificação (TABELA 6). Também se encontram nessa tabela valores como o fator de purificação de cada fração em relação ao Extrato Total. A Figura 15 mostra um esquema total da obtenção desta lectina.

6.6. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em Presença de SDS

O monitoramento da homogeneidade e da massa molecular aparente das proteínas presentes no Extrato Total e nas frações P-I Quitina, P-II Deae e P-I SP, foram avaliadas e comparadas pelos seus perfis eletroforéticos em SDS-PAGE, em condições desnaturantes não-redutoras. A lectina no último passo de purificação (P-I SP) apresentou uma banda dupla (“double band”) em torno de 55 KDa (FIGURA 16).

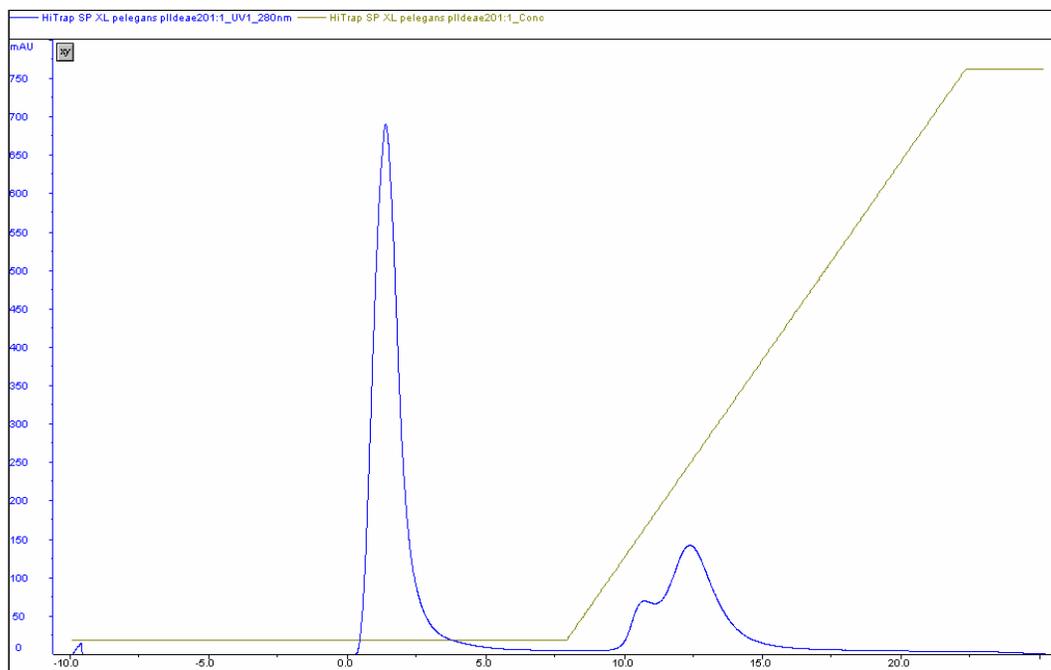


Figura 14: Cromatografia de Troca Iônica em Hitrap SP acoplada HPLC. 1mg de P-II DEAE em 1mL de Tampão Acetato pH 4,5 foi aplicado. P-I SP foi eluído com o mesmo, enquanto que o P-II SP foi eluído com adição de um gradiente salino 0-1M. Volume da Coluna: 1 mL. Volume das frações: 1mL.

Linha Azul: Abs 280 nm

Linha Amarela: Concentração de Sal (Gradiente 0-1 M)

Tabela 6. Tabela de Purificação da Lectina de *P. elegans*

Amostra	A.H. UH/mL	Proteínas mgP/mL	Ativ. Específica UH/mgP	Purificação	Rendimento (%)
Extrato	64,000	4,540	14,097	1,000	100,000
P-I Quitina	16,000	0,083	192,771	13,675	30,470
P-II Quitina	4,000	0,382	10,000	-	-
Fração DEAE	32,000	0,148	216,216	15,338	12,849
Fração SP ÄKTA	16,000	0,060	266,667	18,917	0,441

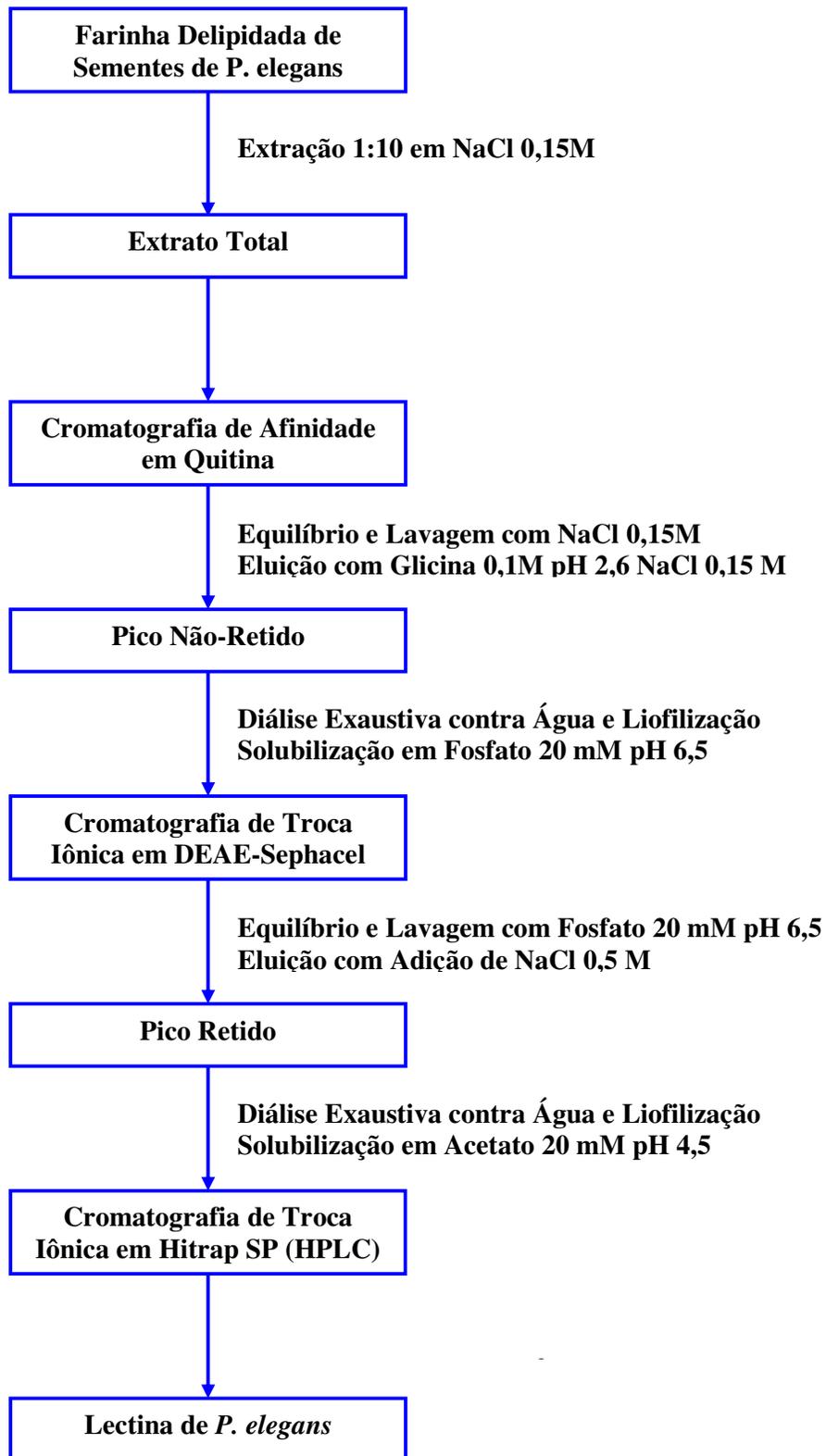


Figura 15. Esquema Geral da Obtenção da Lectina de *P. elegans*

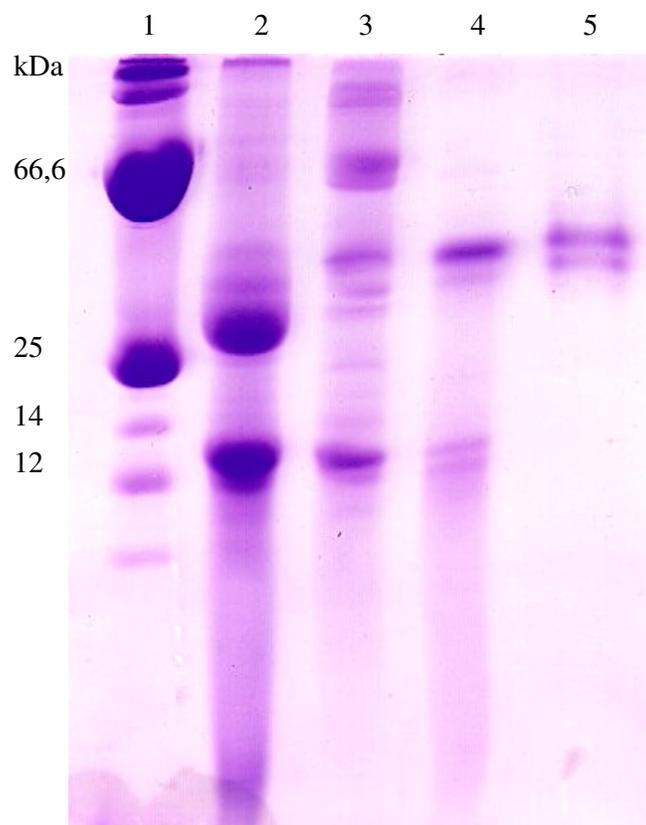


Figura 16: SDS-PAGE (12,5%). Poços: **1.** Marcadores moleculares: BSA (66,6 KDa); Subunidade α (25 KDa); β (14 KDa); e γ (12 KDa) de ConBr **2.** Extrato Total. **3.** P-I Quitina. **4.** P-II DEAE. **5.** P-I SP. Coomassie

6.7. Atividade Inseticida contra Cupins

6.7.1. Atividade Termiticida

Em relação à atividade termiticida exibida pela lectina de *P. elegans*, as Tabelas 7 e 8 reúnem os dados de sobrevivência para cupins operários e soldados, respectivamente, para todas as concentrações testadas.

O contato com a lectina de *P. elegans* em algumas concentrações testadas induziu 100% de mortalidade dos operários (FIGURA 17) e soldados (FIGURA 18), evidenciando a atividade inseticida.

Para os operários (TABELA 7), o tratamento com 1,0mg/mL (FIGURA 18a) induziu a morte de todos os insetos em 8 dias e o tratamento 0,8 mg/mL (FIGURA 18b) induziu a morte de todos os insetos entre 8 e 9 dias. No controle negativo, a morte de todos os operários ocorreu após 11 dias, e taxas de sobrevivência menores que 50% foram registradas somente após 9 dias.

A figura 19 mostra a atividade termiticida da lectina de *P. elegans* nos soldados. Para os soldados (TABELA 8), o tratamento com mg/mL (FIGURA 20a) induziu a morte de todos os insetos em 7 dias e o tratamento 0,8mg/mL (FIGURA 20b) induziu a morte de todos os insetos entre 7 e 8 dias. No controle negativo, ocorreu a morte de todos os soldados em 10 dias, e taxas de sobrevivência menores que 50% foram registradas somente após 9 dias.

6.7.2. Ensaio de Repelência:

No ensaio de repelência, túneis foram construídos sem nenhum padrão relacionado à presença ou ausência da lectina. Nenhuma das galerias foi fechada e foram observados cupins explorando tanto os poços com o controle negativo como os com a lectina. Esses resultados indicam que a lectina de *P. elegans* não apresenta efeito repelente.

Tabela 7. Percentual de Sobrevivência de térmitas operários de *N. corniger*.

Concentrações lectínicas testadas 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; e 1 mg /mL. Controle negativo:

NaCl 0,15 M

CONCENTRAÇÃO	% DE SOBREVIVÊNCIA (DIAS)											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1 mg/mL	100 (±0)	96 (±3,6)	96 (±3,6)	92 (±3,6)	85 (±7,2)	63 (±11)	31 (±6,3)	17 (±3,6)	8 (±7,2)	0	0	0
0,8 mg/mL	100 (±0)	100 (±0)	94 (±0)	94 (±0)	90 (±3,6)	75 (±6,3)	60 (±9,5)	46 (±9,5)	40 (±3,6)	2 (±3,6)	0	0
0,6 mg/mL	100 (±0)	98 (±3,6)	94 (±6,3)	92 (±3,6)	88 (±0)	67 (±7,2)	63 (±6,3)	48 (±3,6)	42 (±3,6)	33 (±7,2)	8 (±7,2)	0
0,4 mg/mL	100 (±0)	90 (±3,6)	83 (±3,6)	81 (±11)	73 (±9,5)	67 (±7,2)	52 (±7,2)	44 (±6,3)	40 (±3,6)	13 (±11)	0	0
0,2 mg/mL	100 (±0)	92 (±9,5)	83 (±9,5)	83 (±9,5)	81 (±6,3)	65 (±3,6)	46 (±3,6)	44 (±6,3)	40 (±7,2)	17 (±14)	0	0
0,1 mg/mL	100 (±0)	94 (±6,3)	94 (±6,3)	94 (±6,3)	92 (±3,6)	75 (±11)	67 (±7,2)	63 (±6,3)	56 (±6,3)	38 (±6,3)	15 (±6,3)	0 (±3,6)
NaCl 0,15 M	100 (±0)	96 (±5,6)	94 (±4,4)	94 (±4,4)	92 (±2,8)	90 (±3,4)	77 (±12)	56 (±14)	52 (±8,1)	33 (±8,1)	6 (±9,3)	0

Tabela 8. Percentual de Sobrevivência de térmitas soldados de *N. corniger*.

Concentrações lectínicas testadas 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; e 1 mg /mL. Controle negativo:

NaCl 0,15 M

CONCENTRAÇÃO	SOBREVIVÊNCIA (DIAS)											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1,0 mg/mL	100 (±0)	83 (±14)	83 (±14)	83 (±14)	83 (±14)	75 (±0)	67 (±14)	50 (±0)	0	0	0	0
0,8 mg/mL	100 (±0)	83 (±14)	75 (±0)	75 (±0)	75 (±0)	75 (±0)	67 (±14)	50 (±0)	42 (±14)	0	0	0
0,6 mg/mL	100 (±0)	83 (±14)	75 (±0)	67 (±14)	67 (±14)	67 (±14)	67 (±14)	58 (±14)	42 (±14)	42 (±14)	0	0
0,4 mg/mL	100 (±0)	75 (±0)	50 (±25)	8 (±14)	0	0						
0,2 mg/mL	100 (±0)	83 (±14)	83 (±14)	75 (±0)	75 (±0)	75 (±0)	67 (±14)	67 (±14)	33 (±14)	17 (±14)	0	0
0,1 mg/mL	100 (±0)	83 (±14)	75 (±0)	75 (±0)	75 (±0)	75 (±0)	67 (±14)	50 (±0)	50 (±0)	33 (±14)	0	0
NaCl 0,15 M	100 (±0)	100 (±0)	100 (±0)	92 (±11)	83 (±14)	83 (±14)	83 (±14)	75 (±11)	67 (±14)	58 (±18)	100 (±0)	0

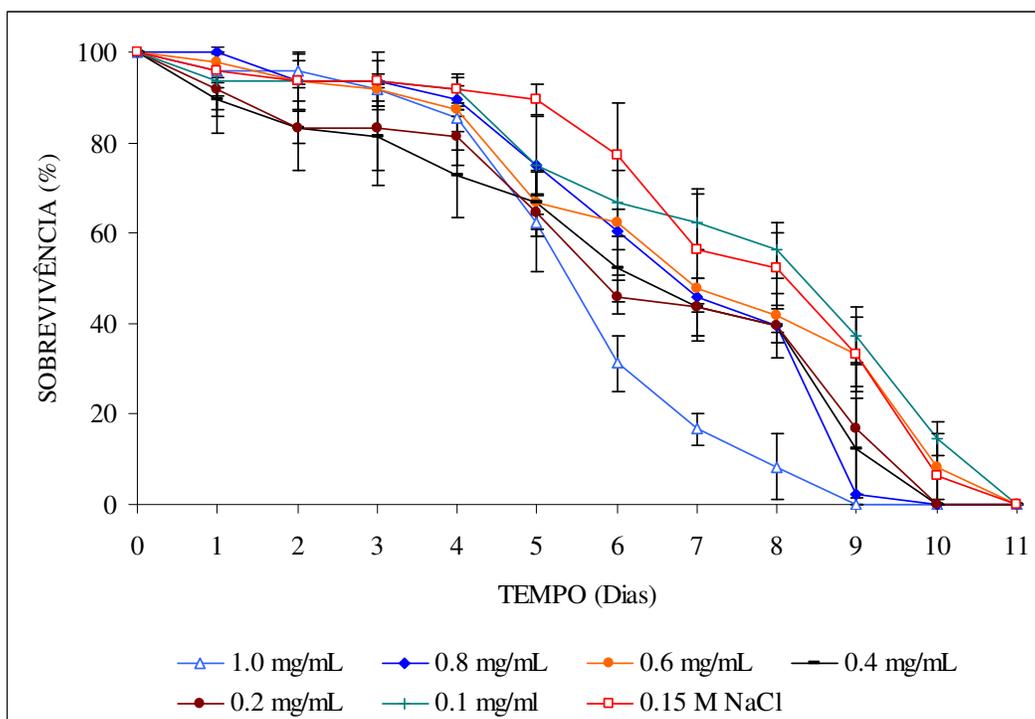


Figura 17. Efeito do contato com a lectina de *P. elegans* em operários de *N. corniger*. A lectina foi utilizada em dosagens de 0,1; 0,2; 0,4; 0,8 e 1,0 mg/mL. Controle negativo: NaCl 0,15 M. Cada ponto representa a média \pm sd de três experimentos (cinco para controle negativo).

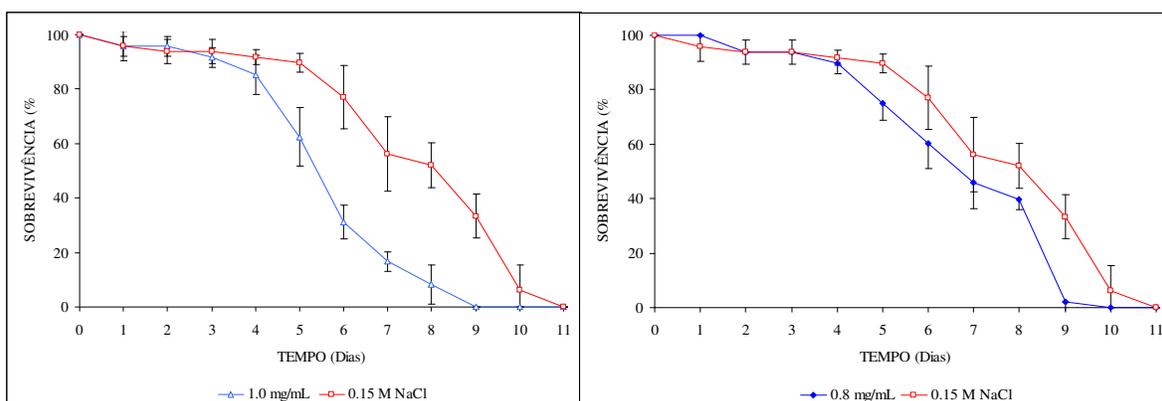


Figura 18. Comparativo do efeito do contato com a lectina de *P. elegans* em operários de *N. corniger*. O gráfico mostra a concentração lectínica (a) 1mg/mL e (b) 0,8 mg/mL, comparando isoladamente com controle negativo (NaCl 0,15 M). Cada ponto representa a média \pm sd de três experimentos (cinco para controle negativo).

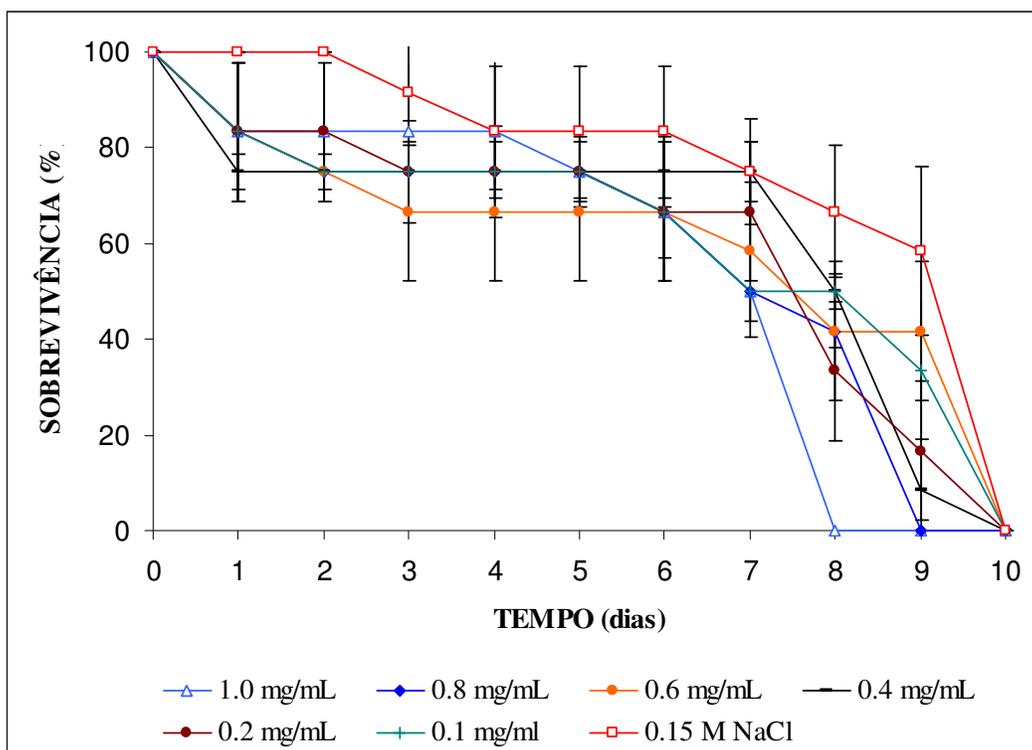


Figura 19. Efeito do contato com a lectina de *P. elegans* em soldados de *N. corniger*. A lectina foi utilizada em dosagens de 0,1; 0,2; 0,4; 0,8 e 1,0 mg/mL. Controle negativo: NaCl 0,15 M. Cada ponto representa a média \pm sd de três experimentos (cinco para controle negativo).

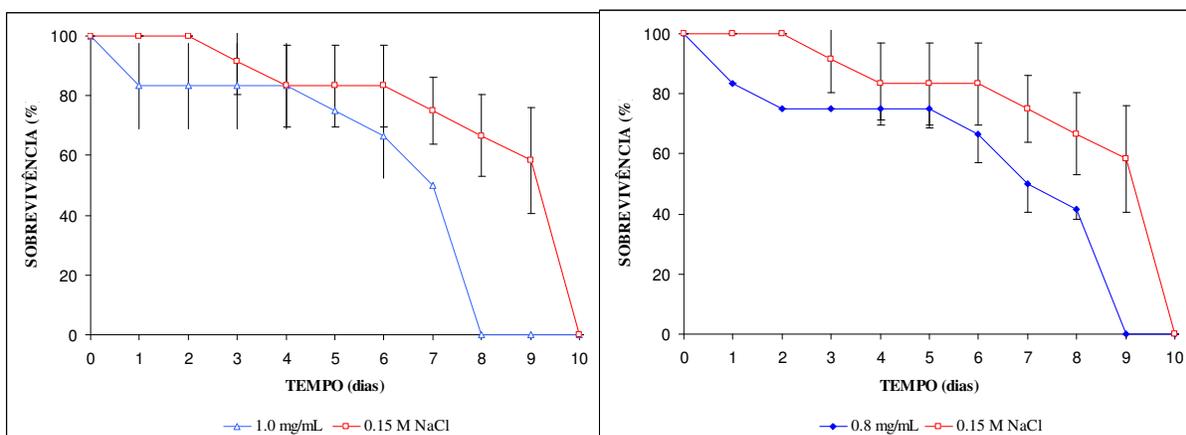


Figura 20. Comparativo do efeito do contato com a lectina de *P. elegans* em soldados de *N. corniger*. O gráfico mostra a concentração lectínica (a) 1mg/mL e (b) 0,8 mg/mL, comparando isoladamente com controle negativo (NaCl 0,15 M). Cada ponto representa a média \pm sd de três experimentos (cinco para controle negativo).

6.8. Atividade Fungicida:

A Tabela 9 e as Figuras 21 e 22 apresentam os dados da ação antifúngica de 20ug da lectina de *P. elegans* sobre os fungos *Fusarium solani* (URM-2480), *F. oxysporum* (URM-2489), *F. moniliforme* (URM-3226), *F. decemcellulare* (URM-3006) e *F. lateritium* (URM-2491).

A lectina de *P. elegans* apresentou atividade antifúngica contra a maioria das espécies testadas de *Fusarium* (FIGURAS 17 e 18). A atividade inibitória da lectina foi mais bem observada após 72 h (FIGURA 17). Percentuais consideráveis de inibição do crescimento (FIGURA 17) foram obtidos para *F. lateritium* (33%), *F. oxysporum* (19,4%) e *F. solani* (14,3%). *F. decemcellulare* apresentou um crescimento mais retardado no controle, com uma inibição de crescimento pela lectina de *P. elegans* de 4,8% e em *F. moniliforme* uma inibição de 3,3%.

Tabela 9. Medidas, médias e desvios padrões dos Halos de Crescimento (mm) dos fungos testados com 20 ug de lectina de *P. elegans*. Controle negativo: NaCl 0,15 M.

Fungo/Período (h)	0		24		48		72	
	Lec	(-)	Lec	(-)	Lec	(-)	Lec	(-)
<i>F. solani</i>	0 (±0)	0 (±0)	13 (±0)	15 (±0)	16 (±0)	20 (±0)	30 (±0)	35 (±0)
<i>F. decemcellulare</i>	0 (±0)	0 (±0)	10 (±0)	9 (±0)	15 (±0)	15 (±0)	20 (±0)	21 (±0)
<i>F. oxysporum</i>	0 (±0)	0 (±0)	13 (±0)	12 (±0)	18 (±0)	17 (±0)	25 (±0)	31 (±0)
<i>F. lateritium</i>	0 (±0)	0 (±0)	7 (±0)	12 (±0)	12 (±0)	19 (±0)	20 (±0)	30 (±0)
<i>F. moniliforme</i>	0 (±0)	0 (±0)	8 (±0)	9 (±0)	13 (±0)	13 (±0)	29 (±0)	30 (±0)

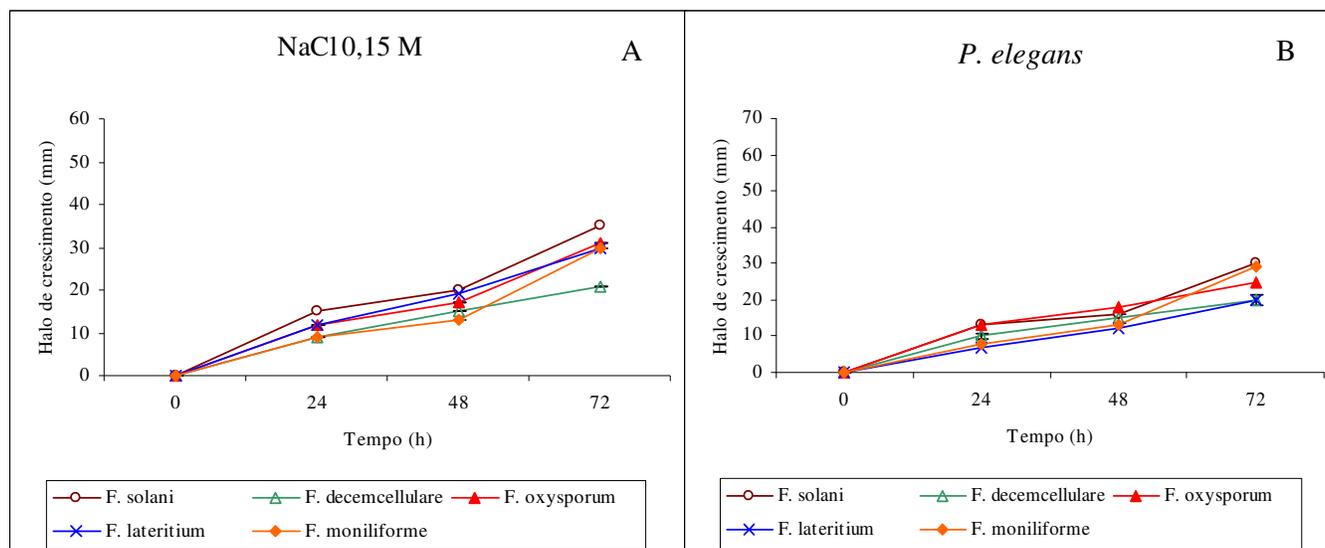


Figura 21. Crescimento dos fungos *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. Decemcellulare*, *F. moniliforme* e *F. lateritium* em meio YNB. As condições dos ensaios foram: presença de NaCl 0,15 M (A) e lectina de *P. elegans* (20 ug) (B). Cada ponto representa a média \pm d.p. de três experimentos.

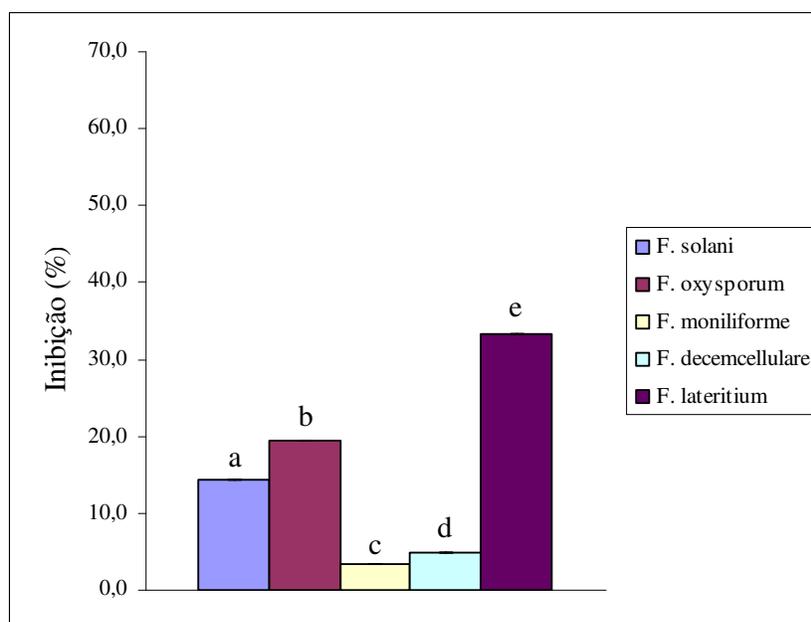


Figura 22. Percentual de Inibição do Crescimento dos Fungos *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. Decemcellulare*, *F. moniliforme* e *F. lateritium* em meio YNB. Concentração da lectina: 0,4 mg/mL. Controle negativo: NaCl 0,15 M (ANOVA, $\alpha = 0,05$)

7. DISCUSSÃO

O primeiro relato da presença de uma lectina em sementes de *Platypodium elegans* foi feito por Benevides (2006). O único relato anterior de substâncias extraídas e caracterizadas desta espécie foi feito por Amaral *et al.* (2000), que reportaram haver uma mistura rara de ácido canárico triterpeno e ácido dihidrocanárico (seco-lupanos) nas folhas. Alguns trabalhos e estudos sobre esta espécie se refere a: a germinação de sementes de *Platypodium elegans* Vog. submetidas a diferentes tratamentos pré-germinativos e substratos (PACHECO *et al.*, 2007); os efeitos da inoculação com rizóbio e micorriza, da fertilização com nitrogênio e fósforo na nodulação, na colonização micorrízica e no crescimento inicial de *P. elegans*, relatando a possibilidade de formação de micorrizas com fungos do solo (PATREZE & CORDEIRO, 2004); os estudos sobre a morfo-anatomia de seu embrião (OLIVEIRA, 1999); os estudos sobre a dispersão da semente e o escape da sua plântula a certos fungos patógenos (AUGSPURGER, 1983). O último trabalho (AUGSPURGER, 1983) relata a alta mortalidade nos três primeiros meses por “damping-off” causada por fungos, dentre outros fatores, afirmando que existe uma correlação inversa entre a incidência e a taxa de mortalidade por “damping-off” e a distância das plântulas de árvores adultas parentes, o que influencia no seu padrão de dispersão espacial, já que a semente é dispersa pelo vento, e na diversidade de espécies da região. Nas primeiras semanas, a plântula apresenta-se muito frágil em relação às suas barreiras físicas, e a susceptibilidade aos patógenos diminui com o avanço da idade.

A lectina de *P. elegans* parece se enquadrar na classe de lectinas de leguminosas ligantes a manose/glicose e relacionados, baseado nos resultados de inibição da AH por esses açúcares. Benevides (2006) discutiu a aparente incongruência entre esse tipo de especificidade apresentada pela lectina e sua impossibilidade de retenção em matrizes cromatográficas como Manose-Agarose, Sephadex G-50 ou pouca retenção em matriz de Quitina. A discordância desses resultados pode ser devido ao comprometimento da molécula de açúcar em relação à sua ligação na matriz cromatográfica. A provável região da molécula interativa com a lectina pode não estar livre, já que se os açúcares encontram-se imobilizados, ligados à matriz, em certa região de sua molécula. Além disto, outra possibilidade para explicar este fato seria a de que esses monossacarídeos, devido ao pequeno tamanho, não serem acessíveis espacialmente ao sítio de ligação a carboidrato da lectina.

A inibição da AH por GlucNac, apesar da não retenção da lectina por uma matriz de quitina, foi algo que estimulou a investigação de atividades inseticidas contra cupim, por causa de sua resistência na madeira, e atividades fungicidas.

Em relação aos passos de purificação, apesar de também a lectina não ter interagido efetivamente com a Quitina, polímero natural do monossacarídeo GlucNac, esse procedimento, por si, mostrou-se interessante, pois foi capaz de concentrar a A.H. em relação ao Extrato Total. A obtenção de uma considerável fração retida, embora fracamente ativa para AH, parece ter sido fundamental para a exclusão de moléculas de interesse não focado aqui, refletido no aumento da atividade específica em P-I Quitina.

Na cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephacel, uma típica trocadora aniônica, quando se comparou os pHs testados em relação à eficiência desta cromatografia, já se esperava que para pH's mais baixos, onde uma maior quantidade de proteínas apresentaria uma carga líquida positiva, haveria uma maior fração não-retida; enquanto que para pH's mais alcalinos, as proteínas apresentariam uma carga líquida mais negativa, haveria uma maior fração retida. O pH 6,5 se mostrou ideal, já que apresentou tanto fração retida como não-retida de modo significativo, concedendo à proteína previamente isolada um grau de purificação satisfatório. A hemaglutinação observada na fração retida foi obtida em crescente atividade específica. O pico apresentou-se regular e comprido, inferindo boas possibilidades sobre a homogeneidade considerável da fração protéica.

No último passo utilizado de purificação, a cromatografia de troca iônica em Hitrap SP acoplada a HPLC, planejou-se uma diminuição não muito brusca do pH utilizado para o experimento, o pH 4,5. Baixando-se o pH e utilizando-se uma resina catiônica ao invés de uma aniônica (DEAE-Sephacel) objetivou-se carregar positivamente parte das proteínas presentes no P-II DEAE e obter duas frações significativas, com a possibilidade de concentração e isolamento efetivo da lectina em estudo em uma das frações. Por não ter sido retida pela SP em pH 4,5, a lectina de *P. elegans* provavelmente encontrava-se com carga líquida total nula ou negativa, podendo-se afirmar que a lectina possui um pI ao redor ou menor que 4,5.

O rendimento final da lectina (0,12mg/g de farinha, 0,44% do total) representa um bom resultado, tendo em vista as possíveis perdas de material durante as fases do processo de purificação. O protocolo final, excetuando o passo prévio de delipidação da farinha, possui apenas três passos, sendo, portanto, prático, simples e consideravelmente eficiente.

De acordo com Van Damme *et al.* (1998), lectinas de leguminosas encontram-se representando, em algumas espécies, cerca de 1 a 10% das proteínas totais da semente, enquanto umas chegam a ter concentrações superiores a 50% , em detrimento de outras que apresentam menos de 0,1% de lectina do total de proteínas na semente, que é próximo ao rendimento final obtido para a lectina de *P. elegans*.

Em relação ao perfil eletroforético das frações ativas obtidas, foi possível observar, comparando as frações P-I Quitina, P-II Deae e P-I SP, que, entre elas, houve avanços na homogeneidade. A fração retida em SP apresentou um perfil bastante homogêneo, com uma dupla banda aparentemente em torno de 55KDa, enquanto que Benevides (2006), no passo final, em condições desnaturantes e redutoras, relatou três bandas de massas moleculares aparentes próximas a 30, 20 e 12kDa, quando relacionadas aos marcadores moleculares. Van Damme *et al.* (1998) citam que lectinas de leguminosas nativas são compostas de dois ou quatro protômeros, formando estruturas em dímeros ou tetrâmeros, unidas geralmente por interações não-covalentes. Esses protômeros são inicialmente construídos com, aproximadamente, 30kDa, consistindo de cadeias simples de polipeptídios com, aproximadamente, 250 aminoácidos. Em muitos exemplos, os protômeros são clivados (e posteriormente rearranjados) em dois peptídios menores, os quais, dependendo da posição da clivagem, são similares ou não no tamanho. Em lectinas da sub-tribo Diocleinae, já é observado a presença desse protômero de 30kDa, denominado de subunidade intacta α , e outros dois fragmentos de ocorrência natural denominados β e γ , oriundos da clivagem de α . O perfil eletroforético da fração P-II SP de *P. elegans*, parece apresentar a molécula em forma de dímero, em torno de 60 KDa, com uma massa molecular aparente de 55 KDa, enquanto que Benevides (2006) parece demonstrar as subunidades α , β e γ do protômero.

A fração P-II DEAE, apesar de ser uma fração pré-purificada, apresentou um perfil satisfatório, confirmado pelo seu perfil cromatográfico de Exclusão Molecular em TSK (condições nativas, Tris-HCl 0,05M pH 7,0), para poder ser utilizada em ensaios investigativos de detecção de atividade termiticida, de repelência e fungicida (FIGURA 23).

Reunindo todos esses dados satisfatórios, foi possível, portanto, com esse protocolo final (FIGURA 15), obter uma lectina de *P. elegans* purificada, em processos práticos, simples, eficientes e reproduzíveis.

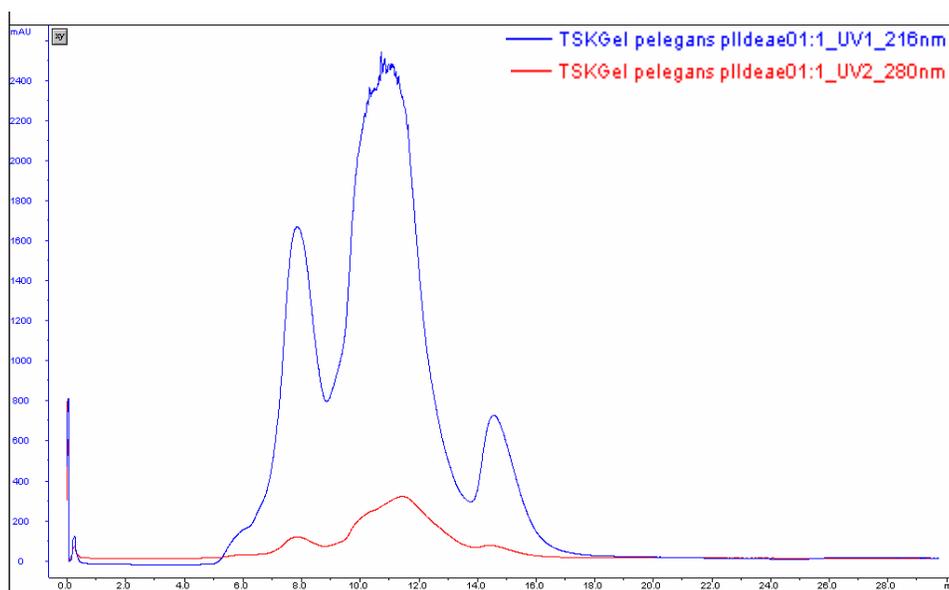


Figura 23. Cromatografia de Exclusão Molecular em TSK acoplada a HPLC. 1 mg de P-II DEAE de *P. elegans*. Condições: Tris-HCl 0,05 M pH 7,0.

Os ensaios de toxicidade geralmente consistem na inclusão da substância potencialmente inseticida em dietas artificiais oferecidas aos insetos (MACEDO *et al.*, 2004). Várias lectinas de plantas apresentaram efeitos entomotóxicos quando ingeridas por insetos. Os cupins se nutrem de muitos tipos de alimentos como húmus e materiais celulósicos, como papel e madeira, sendo a aplicação do possível agente inseticida nesses materiais uma boa forma de avaliar sua toxicidade.

Sobre a atividade termiticida exibida pela fração lectínica pré-purificada P-II DEAE, o contato com a lectina de *P. elegans* nas concentrações 0,8 e 1,0mg/mL induziu 100% de mortalidade dos operários (FIGURA 18) e soldados (FIGURA 20), evidenciando a atividade inseticida. Para os operários, a 1mg/mL, para os 44% de mortalidade, o grupo controle estava com 90% de sobrevivência, e para os 100% de mortalidade, o grupo controle estava com 33% de sobrevivência ainda; a 0,8 mg/mL, para os 25% de mortalidade, o grupo controle estava com 90% de sobrevivência, e para os 100% de mortalidade, o grupo controle estava com 6% de sobrevivência; Para os soldados, a 1mg/mL, aos 33% de mortalidade, o grupo controle estava com 83% de sobrevivência, e aos 100% de mortalidade, o grupo controle estava com 67% de sobrevivência ainda; a 0,8 mg/mL, aos 33% de mortalidade, o grupo controle estava com

83% de sobrevivência, e aos 100% de mortalidade, o grupo controle estava com 58% de sobrevivência.

A atividade termiticida de oito constituintes de óleo essencial de folhas de *Calocedrus formosana*, a 1mg/g cada, variou de 2 a 25% de mortalidade para 100% de sobrevivência do grupo controle (CHENG *et al.*, 2004) e a de 11 óleos essenciais extraídos de três coníferas a 10mg/g cada variou de 26,7 a 100% para uma sobrevivência de 97,3% do grupo controle (CHENG *et al.*, 2006). Extratos brutos etanólicos, exânicos e etílicos de *Flourensia cernua* também mostraram atividade antitermiticida a uma concentração em torno de 64mg/g variando de 84 a 100% de mortalidade para um grupo controle com 82% de sobrevivência. O autor sugere que as diferentes atividades das diferentes frações podem ser devido à presença de mais de um composto ativo (TELLEZ *et al.*, 2001). Essas atividades provavelmente envolvem componentes pertencentes ao metabolismo secundário.

Registros de atividade termiticida para compostos de metabolismo primário: atividade de uma lectina isolada de cerne de *Myracrodruon urundeuva* (Sá, 2007), onde, para operários, os tratamentos com 0,2, 0,4 e 0,8mg/mL induziram a morte de todos os insetos entre 8 e 9 dias, enquanto que no controle negativo as taxas de sobrevivência menores que 50% foram registradas somente após 13 dias. Para soldados, as mesmas concentrações em 5 dias levaram a 100% de mortalidade, enquanto que no controle, ao final de 13 dias, apresentavam taxas de sobrevivência entre 60 e 80%.

A ação tóxica de lectinas inseticidas tem sido relacionada à ligação dessas proteínas a glicoproteínas presentes no trato digestivo de animais. Lectinas entomotóxicas são resistentes à degradação proteolítica no intestino de insetos e podem se ligar à membrana peritrófica na região do intestino médio, interferindo na ação de enzimas digestivas e proteínas de assimilação (ZHU-SALZMAN *et al.*, 1998; ZHU-SALZMAN & SALZMAN, 2001). Lectinas com diferentes especificidades a carboidratos provavelmente têm mecanismos diferentes de ação.

Lectinas de plantas com especificidade por N-acetilglicosamina, por exemplo, agem principalmente por ligação à membrana peritrófica. Elas apresentaram efeito tóxico em Coleoptera (ZHU-SALZMAN *et al.*, 1998; MACEDO *et al.*, 2007), Homoptera (POWELL *et al.*, 1995), Lepidoptera (CZAPLA & LANG, 1990) e Hemiptera (HABIBI *et al.*, 1998).

A atividade termiticida considerável proporciona, desse modo, uma evidência de que a lectina de *P. elegans*, pode atuar com um papel de defesa na planta e, se presente

no cerne em vida adulta, pode estar envolvida na durabilidade natural e resistência da madeira de *P. elegans* à biodegradação. Futuros testes com a lectina purificada poderão ser ainda mais promissores em relação à resposta concentração-dependente. Estudos sobre o modo de ação da lectina sobre cupins devem ser feitos para o melhor entendimento e complementação dos resultados obtidos.

Em relação à atividade de repelência, sabe-se que cupins construtores de túneis são capazes de reagir à presença de substâncias que podem ser tóxicas. Esses cupins podem fechar as galerias construídas para evitar substâncias que possam ser tóxicas, se a mesma tiver propriedade repelente (SU *et al.*, 1982). Os ensaios termitecida e de repelência (negativo) sugerem que a atividade de lectina de *P. elegans* se deve realmente à sua toxicidade, contribuindo para levar à morte os cupins que tentam se alimentar de suas sementes. Assim, a resistência de *P. elegans* a essa espécie de cupim pode estar relacionada tanto a agentes tóxicos (como a lectina) como preservadores (os extrativos, incluindo possíveis agentes repelentes).

Reenfatizando-se o fato das lectinas serem um produto metabólico primário, e que seus genes seriam bons candidatos para conferir resistência a cupins em linhagens transgênicas, a viabilidade da obtenção de sua forma recombinante torna-se um grande objetivo, por ser um nova fonte de potencial biotecnológico.

Em geral, a habilidade de lectinas inibirem o crescimento fúngico difere entre si e entre as espécies de fungos. Sabe-se que proteínas ligantes a quitina afetam o desenvolvimento e crescimento fúngico, causando distúrbios na síntese e/ou deposição de quitina na parede celular (VAN PARIJS *et al.*, 1992).

Lectina de sementes de *T. esculenta* inibe o crescimento de *F. oxysporum*, *Colletotrichum lindemuthianum*, e *Saccharomyces cerevisiae* (FREIRE *et al.*, 2002). Por outro lado, a lectina de sementes de *Annona muricata* inibe o crescimento de *F. oxysporum*, *F. solani*, e *Colletotrichum musae* a uma concentração de 100ug/ml (DAMICO *et al.*, 2003). A lectina de *Astragalus mongholicus* exibe uma atividade antifúngica potente contra fungos comumente nocivos na agricultura: *B. cinerea*, *F. oxysporum*, *Colletotrichum* sp., e *D. Turcia* em concentrações entre 20 e 100ug/poço (YAN *et al.*, 2005).

Lectinas também interferem na germinação dos esporos, provavelmente num estágio muito inicial do processo, de forma que o período de latência que precede a germinação é estendido (LIS & SHARON, 1981). Jaquina e Frutaquina, lectinas de *A.*

integrifolia e *A. incisa*, respectivamente, inibem a germinação de 110 esporos/mL de *F. Moniliforme* a uma concentração de 2,25mg/mL (TRINDADE *et al.*, 2006).

Por outro lado, a quitinase de *Phaseolus mungo*, e a quitinase isolada de *P. vulgaris* mostram efeito antifúngico em quantidades de 60 e 300µg, respectivamente (YE & NG, 2002; YE & NG, 2005).

A atividade fungicida de 20 ug da fração lectínica pré-purificada P-II DEAE investigada contra os fungos *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *F. lateritium*, *F. moniliforme* e *F. decemcellulare* foram satisfatórias contra os três primeiros, apresentando um percentual de inibição respectivamente de 14,3; 19,4 e 33 em 72h. Os resultados indicam uma potente capacidade da proteína de inibir o crescimento fúngico.

A detecção da potente atividade antifúngica da lectina de *P. elegans* reforça a evidência inicial de que ela se constitui um componente bioativo envolvido na defesa da planta. Investigações futuras sobre o modo de ação desta lectina se mostram necessárias para o melhor entendimento deste processo.

A atividade fungicida e termiticida detectadas na lectina de *P. elegans* se mostra comparável e, muitas vezes, mais promissoras do que outras atividades descritas, tanto de lectinas como de outras moléculas biologicamente ativas acima citadas. Ressalva-se o fato de que testes futuros com a lectina purificada em seu último passo poderá render resultados ainda mais promissores.

Com esses resultados, a lectina de *P. Elegans* se constitui como uma potente ferramenta biotecnológica a ser mais profundamente investigada e estudada em relação a seu papel na defesa vegetal e na potencial utilização na resistência viável a cupim em madeiras susceptíveis.

8. CONCLUSÃO

A lectina de *P. elegans* foi obtida purificada por um protocolo prático, simples e reproduzível de três passos, com uma homogeneidade considerável em SDS-PAGE, com uma massa aparente de 55 KDa, caracterizada como uma lectina de leguminosa manose/glicose ligante. Detectou-se atividade termitocida promissora contra operários e soldados de *Nasutitermes corniger*, com 100% de mortalidade nas concentrações de 1,0 e 0,8 mg da fração lectínica pré-purificada P-II DEAE, sem efeito repelente, além de um grande potencial fungicida (20 ug da fração lectínica P-II DEAE) contra os fungos *F. solani*, *F. Oxysporum* e *F. Lateritium*. As duas atividades promissoras reforçam a evidência da participação da lectina na defesa vegetal, fazendo-a uma potente ferramenta biotecnológica a ser mais profundamente investigada e estudada em relação a seu papel na defesa vegetal e na potencial utilização na resistência a cupim em madeiras susceptíveis.

9. REFERÊNCIAS **BIBLIOGRÁFICAS**

- ALENCAR, N M N; ASSREUY, A M S; CRIDDLE, D N; SOUZA, E P; SOARES, P M G; HAVT, A; ALENCAR, N.M.N., TEIXEIRA, E.H., ASSREUY, A.M.S., CAVADA, B.S., FLORES, C.A. & RIBEIRO, R.A.. Leguminous lectins as tools for studying the role of sugar residues in leukocyte recruitment. **Mediators of Inflammation**, 8: 107-113, 1999.
- AMARAL, L. F. G., LEITÃO, S. G., MONACHE, F. D. & LEITÃO, G. G. 3,4-*seco*-Lupanes and other constituents from *Platypodium elegans*. **Fitoterapia**. 72(4): 441-443, 2001.
- ANDRADE, J.L., ARRUDA, S., BARBOSA, T., PAIM, L., RAMOS, M.V., CAVADA, B.S. and BARRAL-NETTO, M. Lectin-induced NO production. **Celular Immunology**, 194(1): 98-102, 1999.
- ARAÚJO, E.L. Produção de Plantas Medicinais para Programas de Fitoterapia em Saúde Pública no Brasil. ISHS Acta Horticulturae 569: **I Latin-American Symposium on the Production of Medicinal, Aromatic and Condiments Plants**, 2002.
- ASSREUY, A.M.S, MARTINS, G.J., MOREIRA, M.E.F., BRITO, G.A.C., CAVADA, B.S., RIBEIRO, R.A. & FLORES, C.A.. Inhibition of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis by glucose-mannose binding plant lectins. **The Journal of Urology**, 161(6):1988-93, 1999.
- ASSREUY, A.M.S., SHIBUYA, M.D., MARTINS, G. J., de SOUZA, M.L.P., CAVADA, B.S., MOREIRA, R.A., OLIVEIRA, J.T.A., RIBEIRO, R.A. & FLORES, C.A.. Antiinflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from brazilian beans. **Mediators of inflammation**, 6: 1-10, 1997.
- AUGSPURGER, C.K., Seed Dispersal of the Tropical Tree, *Platypodium Elegans*, and the Escape of its Seedlings from Fungal Pathogens. **The Journal of Ecology**. 71(3): 759-771, 1983.
- AYOUBA, A., CAUSSE, H., VAN DAMME, E.J.M., PEUMANS, W.J., CAMBILLAU, C., ROUGÉ, P. Interactions of plant lectins with the components of the bacterial cell wall peptidoglycan. **Biochem. Syst. Ecol**. 22: 153-159, 1994.
- BALZARINI, J., NEYTS, J., SCHOLS, D., HOSOYA, M., VAN DAMME,E., PEUMANS, W., DE CLERCQ, E., The mannose-specific plant lectins from *Cymbidium* hybrid and *Epipactis helleborine* and the (N-acetylglucosamine)n-specific plant lectin from *Urtica dioica* are potent and selective inhibitors of human immunodeficiency virus and cytomegalovirus replication in vitro. **Antiviral Res**. 18: 191-207, 1992.
- BANCHONGLIKITKUL, C., SMART, J.D., GIBBS, R.V., CAVADA, B.S., SAMPAIO, A.H., COOK, D.J. AND ROGERS, D.J. Lectins in drug delivery- the binding of some *Diocleae* lectins to the mucosal surfaces of the eye and mouth. **J. Pharm. Pharmacol**. 50(supplement): 104, 1998.
- BARBOSA, T., ARRUDA, S., CAVADA, B., GRANGEIRO, T.B., FREITAS, L.A.R. and BARRAL-NETTO, M. *In Vivo* Lymphocyte Activation and Apoptosis by lectins of the Diocleinae Subtribe. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 96 (5): 673-678, 2001.
- BARONDES, S. H. Bifunctional properties of lectins: lectins redefined. **Trends Biochem. Sci**. 13: 480-482, 1988.
- BARRAL-NETTO, M., VONSOHSTEN, R.L., TEIXEIRA, M., CONRADO DOS SANTOS, W.L., POMPEU, M.L., MOREIRA, R.A., OLIVEIRA, J.T.A., CAVADA, B.S., FALCOFF, E. & BARRAL, A. "*In vivo*" protective effect of

- the lectin from *Canavalia brasiliensis* on BALB/c mice infected by *Leishmania amazonensis*. **Acta Tropica**, 60: 237-250, 1996.
- BENEVIDES, R. G. Isolamento e Caracterização Parcial de uma Lectina de Sementes de *Platypodium elegans* Vogel. Fortaleza: **Monografia de Graduação**, UFC, 71pp., 2006.
- BERMUDEZ, J.A.Z. **Indústria Farmacêutica, Estado e Sociedade: Crítica da Política de Medicamentos no Brasil**. São Paulo: Hucitec/Sobravime, 1995.
- BOYD, W. C. & REGUERA, R. M. Studies on haemagglutinins present in seeds of some representatives of the family Leguminosae. **J. Immunol.** 62: 333–339, 1949.
- BRADFORD, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, 72: 248-534, 1976.
- BRAGA, M.R.; YOUNG, M.C.M.; DIETRICH, S.M.C. & GOTTLIEB, O.R., Phytoalexin induction in Rubiaceae. **Journal of Chemical Ecology** 17: 1079-1090, 1991.
- BROEKAERT, W.F., PEUMANS, W.J., Lectin release from seeds of *Datura stramonium* and interference of the *Datura stramonium* lectin with bacterial motility. ed. TC BOG-HANSEN, E VAN DRIESSCHE, , **Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**,. Walter de Gruyter, Berlin, Vol 5, pp 57-65, 1986.
- BROEKAERT, W.F., VAN PARIJS, J., LEYNS, F., JOOS, H., PEUMANS, W.J., A chitin-binding lectin from stinging nettle rhizomes with anti- fungal properties. **Science**. 245: 1100-1102, 1989.
- BULTMAN, J.D., BEAL, R.H., AMPONG, F.F.K., Natural resistance of some tropical African woods to *Coptotermes formosanus* Shiraki. **For. Prod. J.** 29: 46–51, 1979.
- C.R. CARLINI, M.F., GROSSI-DE-SÁ, Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides, **Toxicon** 40: 1515–1539, 2002.
- CAVADA, B. S., BARBOSA, T., ARRUDA, S., GRANGEIRO, T. B. & BARRALNETO, M. Revisiting Proteins: do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from end potential biotechnological use of the Diocleinae subtribe lectins. **Curr. Prot. Peptide. Science**, 2(2): 123-135, 2001.
- CAVADA, B. S., MORENO, F. B. B., ROCHA, B. A. M. da, AZEVEDO JR, W. F. de, CASTELLÓN, R. E. R., GOERSCH, G. V., NAGANO, C. S., SOUZA, E. P. de, NASCIMENTO, K. S., RADIS-BAPTISTA, G., DELATORRE, P., LEROY, Y., TOYAMA, M. H., PINTO, V. P. T., SAMPAIO, A. H., BARETTINO, D., DEBRAY, H., CALVETE, J. J. & SANZ, L. cDNA cloning and 1.75 Å crystal structure determination of PPL2, an endochitinase and N-acetylglucosaminebinding hemagglutinin from *Parkia platycephala* seeds. **FEBS Journal**. 273: 3962–3974, 2006.
- CAVALCANTE, M.S. Deterioração biológica e preservação de madeiras. **Pesquisa e Desenvolvimento.**, 8: 1-40, 1982.
- CHANG, S.T.; CHENG, S.S.; WANG, S.Y. Antitermitic activity of essential oils and components from Taiwania (*Taiwania cryptomerioides*). **Journal of Chemical Ecology**. 27: 717–724, 2001.
- CHENG, S.S., CHANG, H.T., WU, C.L., CHANG, S.T., Anti-termitic activities of essential oils from coniferous trees against *Coptotermes formosanus*. **Bioresource Technology**. 98: 456–459, 2007.

- CHENG, S.S., WU, C., CHANG, H., KAO, Y & CHANG, S.T.. Antitermitic and antifungal activities of essential oil of *Calocedrus formosana* leaf and its composition. **Journal of Chemical Ecology**, 30(10): 1957-1967, 2004.
- CHESTER, K.S., The problem of acquired physiological immunity in plants. **Q. Rev. Biol.** 8: 275–324, 1933.
- COLLINGE, D.B., KRAGH, K.M., MIKKELSEN, J.D., NIELSEN, K.K., RASMUSSEN, U., VAD, K., Plant chitinases. **Plant J.** 3: 31-40, 1993.
- CONSTANTINO, R. Abundance and diversity of termites (Insecta: Isoptera) in two sites of primary rain forest in Brazilian Amazonia. **Biotropica.** 24; 420–430, 1992.
- CRUICKSHANK, I.A.M.; PERRIN, D.R., Isolation of a phytoalexin from *Pisum sativum* L. **Nature.** 187: 799-800, 1960.
- CUNHA, F.M.; ALBUQUERQUE, A.C.; PEREIRA, K.C.A.; VEIGA, F.S.L.; ATHAYDE, A.C.R.; LIMA, E.A.L.A., Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e *Metarhizium acridum* var. *acridum* sobre *Nasutitermes coxipoensis* (Holmgren) (Isoptera: Termitidae). **Neotropical Entomology.** 34(4): 585-592, 2005.
- CZAPLA & LANG, Effect Of Plant-Lectins On The Larval Development Of European Corn-Borer (Lepidoptera, Pyralidae) And Southern Corn-Rootworm (Coleoptera, Chrysomelidae), **Journal Of Economic Entomology.** 83(6): 2480-2485, 1990.
- DAMICO, D.C.S., FREIRE, M.G.M., GOMES, V.M., TOYAMA, M.H., MARANGONI, S., NOVELLO, J.C., MACEDO, M.L.R., Isolation and characterization of a lectin from *Annona muricata* seeds, **J. Protein Chem.** 22 (7/8): 655–661, 2003.
- DI PIETRO, A.; MADRID, M.P.; CARACUEL, Z.; DELGADO-JARANA, J.; RONCERO, M.I.G. *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. **Molecular Plant Pathology.** 4: 315-325, 2003.
- DI STASI, L.C. **Plantas Mediciniais: Arte e Ciência. Um Guia de Estudo Interdisciplinar.** São Paulo: Editora da UNESP, 1996.
- DI STASI, L.C.; OLIVEIRA, G.P.; CARVALHAES, M.A.; QUEIROZ, M.; TIEN, O.S.; KAKINAMI, S.H.; REIS, M.S. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. **Fitoterapia** 73 (1): 69-91, 2002.
- DUBE E, Assessment of potential health risks from CCA-treated utility pole. **Proc Annual Meet Am. Wood-Preservers' Assoc.** 99:39–50, 2003.
- EDWARDS, R.; MILL, A.E. Termites in buildings: their biology and control. **Felcourt: Rentokil.** 1986.
- ELFSTRAND, M., Über blutkörperchenagglutinierende Eiweisse. In: **Görberdorfer Veröffentlichungen a. Band I**, Kobert, R., Ed., Enke, Stuttgart, Germany, pp 1–159, 1898.
- ELGAVISH, S., SHAANA, B., Structures of the *Erythrura corallodentron* lectin and of its complexes with mono- and disaccharides. **Journal of Molecular Biology,** 277(4): 917-932, 1998.
- ENGLOT C, Treated wood – managing the risk, **Environmental Impacts of Treated Wood**, ed. TOWNSEND TG & SOLO-GABRIELE H., CRC/Taylor & Francis, NY, Cap. 17, 2006.
- EVANS P, Emerging technologies in wood protection. **Forest Prod J.** 53:14–22, 2003.
- FERREIRA, S.H. (org.). Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil. Rio de Janeiro: **Academia Brasileira de Ciências**, 1998.

- FIGUEIREDO, L.R. *Nasutitermes*: uma nova ameaça para os grandes centros urbanos. **Boletim Bay Pro Professional (Bayer Environmental Science)**. 3: 1, 2004.
- FILHO, O.P.; DORVAL, A.; DUDA, M.J.; MOURA, R.G. Efeito de extratos de madeiras de quatro espécies florestais em cupins *Nasutitermes* sp. (Isoptera, Termitidae). **Scientia Forestalis**. 71: 51-55, 2006.
- FLORÊNCIO, D. F.; DIEHL, E. Termitofauna (Insecta, Isoptera) em Remanescentes de Floresta Estacional Semidecidual em São Leopoldo, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia**. 50(4): 505-511, 2006.
- FLORES, H.E.; COSIO, E.; VIVANCO, J.M.; LOYOLA-VARGAS, V. Mecanismos químicos de defesa en las plantas. **Investigación y Ciencia** 341: 68-75, 2005.
- FREEMAN M.H., NICHOLAS D.D. & SCHULTZ T.P., Nonarsenical wood protection: alternatives for chromated copper arsenate, creosote and pentachlorophenol, **Environmental Impacts of Treated Wood**, ed. TOWNSEND TG & SOLO-GABRIELE H. CRC/ Taylor and Francis, NY, Cap. 2, 2006.
- FREEMAN M.H., SHUPE T.F., VLOSKY R.P. & BARNES H.M., Past, present and future of the wood preservation industry. **Forest Prod J**. 53:8–15, 2003.
- FROHLICH, J.; KOUSTIANE, C.; KAMPFER, P.; ROSSELLO-MORA, R.; VALENS, M.; BERCHTOLD, M.; KUHNIGK, T.; HERTEL, H.; MAHESHWARI, D.K.; KONIG, H. Occurrence of rhizobia in the gut of the higher termite *Nasutitermes nigriceps*. **Systematic and Applied Microbiology**. 30: 68–74, 2007.
- G' AUMANN, E., Pflanzliche Infektion-slehre. Basel: Birkh' auser. 611pp, 1946.
- GATEHOUSE, A.M.R., BARBIERI, L., STIRPE, F., CROY, R.R.D., Effects of ribosome inactivating proteins on insect development e differences between Lepidoptera and Coleoptera. **Entomol. Exp. Appl.** 54: 43-51, 1990.
- GESSLER C, KUC J. Induction of resistance to *Fusarium* wilt in cucumber by root and foliar pathogens. **Phytopathology**. 72:1439–41, 1982.
- GILES, R. & HÉCTOR, H. Identificación de lectinas en plantas medicinales y su actividad sobre los mecanismos de adhesión em los procesos infecciosos causados por *E. coli*, 1998.
- GOLDSTEIN, I J., HUGHES, R.C., MONSIGNY, M., OSAWA, T., & SHARON, N. What should be called a lectin? **Nature** 285: 66, 1980.
- GOODELL B, Brown-rot fungal degradation of wood: our evolving view, *Wood Deterioration and Preservation: Advances in Our Changing World*, ed. GOODELL B, NICHOLAS DD AND SCHULTZ TP. **ACS Symposium Series**, American Chemical Society, Washington, DC, No. 845, Cap. 6, 2003.
- GRANGEIRO, T.B., FREIRE FILHO, F., CAJAZEIRAS, J.B., RAMOS, M.V., SALES, F.J.M., CAVADA, B.S. Efeito de lectinas vegetais sobre o crescimento e desenvolvimento de insetos. IN: SALES, F.J.M. (Ed.): **Leitura Entomológica**. Itaiçaba-CE. BioTools. 286p. p 87-139. 1999b.
- GRANGEIRO, T.B., MONTENEGRO DE SALES, F. J., FREIRE FILHO, F.R., CAJAZEIRAS, J.B., RAMOS, M.V. and CAVADA, B.S. Lectinas de leguminosas da subtribo *Diocleinae*: proteínas com atividades inseticida e probiótica. IN: SALES, F.J.M. (Ed.): **Leitura Entomológica**. Itaiçaba-CE. BioTools., 286p. p 207-246, 1999a.
- H.R. BOKESCH, B.R. O'KEEFE, T.C. MCKEE, L.K. PANNELL, G.M. PATTERSON, R.S. GARDELLA, R.C. SOWDER 2ND, J. TURPIN, K. WATSON, R.W. BUCKHEIT JR., M.R. BOYD, A potent novel anti-HIV protein from the cultured cyanobacterium *Scytonema varium*, **Biochemistry**. 42(9): 2578–2584. 2003.

- HABIBI, J.; BACKUS, E. A. & CZAPLA, T. H. Subcellular effects and localization of binding sites of phytohemagglutinin in the potato leafhopper, *Empoasca fabae* (Insecta: Homoptera: Cicadellidae). **Cell and Tissue Research**. 294: 561-571, 1998.
- HALLIDAY, J. & NAKAO, P.L. The symbiotic affinities of woody species under consideration as nitrogen-fixing trees. **NifTAL Resource Document**. Hawaii, University of Hawaii, 1982.
- HAMMERSCHMIDT, R., KUC J., *Induced Resistance to Disease in Plants*. **Dordrecht: Kluwer**. 182 pp, 1995.
- HARBONE, J.B. The chemical basis of plant defense. PALO, R. T.; ROBBINS, C. T. **Plant defenses against mammalian herbivory**,. New York: CRC Press, pp. 45-60, 1991.
- HASLAM, E., **Plant polyphenols - Vegetable Tannins Revisited**. Cambridge: Cambridge University Press, 1989.
- HILDER, V.A., POWELL, K.S., GATEHOUSE, A.M.R., GATEHOUSE, J.A., GATEHOUSE, L.N., SHI, Y., HAMILTON, W.D.O., MERRYWEATHER, A., NEWELL, C., TIMANS, J.C., PEUMANS, W.J., VAN DAMME, E.J.M., BOULTER, D., Expression of snowdrop lectin in transgenic tobacco plants results in added protection against aphids. **Transgenic. Res.** 4: 18-25, 1995.
- HOJOA, M.; MORIOKAB, M.; MATSUMOTOA, T.; MIURAA, T. Identification of soldier caste-specific protein in the frontal gland of nasute termite *Nasutitermes takasagoensis* (Isoptera: Termitidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. 35: 347-354, 2002.
- HUESING, J.E., MURDOCK, L.L., SHADE, R.E., Rice and stinging nettle lectins: insecticidal activity similar to wheat germ agglutinin. **Phytochemistry**. 30: 3565-3568, 1991.
- HUESING, J.E., SHADE, R.E., CHRISPPEELS, M.J., MURDOCK, L.L., α -Amylase inhibitor, not phytohemagglutinin, explains resistance of common bean seeds to cowpea weevil. **Plant Physiol**. 96: 993-996, 1991.
- INGKANINAN, K.; HERMANS-LOKKERBOL, A.C.J; VERPOORTE, R., Comparison of some centrifugal partition chromatography systems for a general separation of plant extracts. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies** 22 (6): 885-896, 1999.
- JAWETZ, E.; MELNICK, J. L.; ALDELBERG, E. A.; BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; ORNSTON, L. N. **Microbiologia Médica**. 18th ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1991.
- K.P.B. VAN DEN BERGH, P. PROOST, J. VAN DAMME, J. COOSEMANS, E.J.M. VAN DAMME, W.J. PEUMANS, Five disulfide bridges stabilize a hevein-type antimicrobial peptide from the bark of spindle tree (*Euonymus europaeus* L.), **FEBS Lett**. 530: 181– 185, 2002.
- KAMBHAMPATI, S.; EGGLETON, P. Taxonomy and phylogeny of termites. ed. ABE, T.; BIGNELL, D. E.; HIGASHI, M., **Termites: evolution, sociality, symbioses, ecology**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p. 1-23, 2000.
- KANG, H.Y., MATSUSHIMA, N., SAMESHIMA, K., TAKAMURA, N.,. Termite resistance tests of hardwoods of Kochi growth I. The strong termiticidal activity of kagonoki (*Litsea coreana* Léveillé). **Mokuzai Gakkaishi** 36, 78–84, 1990.
- KENNEDY, J. F.; PAIVA, P. M. G.; CORREIA, M. T. S.; CAVALCANTI, M. S. M.; COELHO, L. C. B. B. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Polymers** 26: 219-30, 1995.

- KNIBBS R, GOLDSTEIN IJ, RATCLIFF RM, SHIBUYA N Characterization of the carbohydrate binding specificity of the Imkoagglutinating lectin from *Maackia amurensis*. **J. Biol. Chem.** 266: 83-88, 1991.
- KOCOUREK, J. Historical background. **The Lectins, Properties, Functions, and Applications in Biology and Medicine**. LIENER, I. E., SHARON, N., AND GOLDSTEIN, I. J., Eds. Academic Press, Orlando, FL. pp. 1-32, 1986.
- KOSHIKAWA, S.; MATSUMOTO, T.; MIURA, T. Morphometric changes during soldier differentiation of the damp-wood termite *Hodotermopsis japonica* (Isoptera, Termopsidae). **Insectes Sociaux**. 49: 245-250, 2002.
- LACAZ, C. S.; PORTO, E.; HEINS-VACCARI, E. M.; DE MELO, N. T. **Guia para identificação de fungos, actinomiceto e algas de interesse médico**. São Paulo, Ed. Sarvier, FAPESP, 1998.
- LAEMMLI, U. K., Cleavage of structural proteu during the assembly of the bactetiophage t4, **Nature**, 227: 680-685, 1970.
- LANDSTEINER, K. & RAUBITSCHKE, H. Beobachtungen über Hämolyse und Hämagglutination. **Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk. Infektionskr. Hyg. Abt. 1: Orig.** 45: 660-667, 1907.
- LEDNICER, D.; MITSCHER, L.A. **The Organic Chemistry of Drug Synthesis**, New York: Wiley. vol. 1, 1977.
- LEVI MP, Control methods, **Wood Deterioration and its Prevention by Preservative Treatments**, Vol. 1., ed. NICHOLAS D.D. Syracuse University Press, NY, Cap. 5, 1973.
- LIS, H. & SHARON, N. Lectins in higher plants. In: MARCUS, A. The Biochemistry of Plants, a Comprehensive Treatise. **Proteins and nucleic acids**. New York: Academic Press, 6: 371-447, 1981.
- LORENZI, H. Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. **Nova Odessa: Plantarum**, 368p, 1998.
- LORIS, R., VAN OVERBERGE, D., DAO-THI, M. H., POORTMANS, F. MAENE, N., WYNS, L. Structural analysis of two crystals forms of lentil lectin at 1.8 Å resolution. **Protein**, 20(4): 330-346, 1994.
- M.G.M. FREIRE, V.M. GOMES, R.E. CORSINI, O.L.T. MACHADO, S.G.S. SIMONE, J.C. NOVELLO, S. MARANGONI, M.L.R. MACEDO, Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth, *Plant Physiol. Biochem.* 40(1): 61-68, 2002.
- MACEDO, M. L. R.; FREIRE, M. G. M.; SILVA, M. B. R & COELHO, L. C. B. B. Insecticidal action of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Comparative Biochemistry and Physiology A**. 146: 486-498, 2007.
- MACEDO, M.L.R.; FREIRE, M.G.M. & CASTRO, M.M., Mechanisms of the insecticidal action of TEL (*Talisia esculenta* lectin) against *Callosobruchus maculates* (Coleoptera: Bruchidae). **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**. 56: 84-96, 2004.
- MADAMANCHI NR, KUC J. Induced systemic resistance in plants. In *The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals*, ed. COLE, G.T., HOCH, H.C., **New York: Plenum**, 347-362.1991.
- MANN, J.; DAVIDSON, R.S.; HOBBS, J.B.; BANTHORPE, D.V. & HARBORNE, J.B. **Natural Products: their Chemistry and Biological Significance**. 1ª ed. New York: Prentice Hall, 1994.

- MENDONÇA FILHO, C. V. Braúna, angico, jacarandá e outras leguminosas de Mata Atlântica. Belo Horizonte: Editora Littera Maciel, 100p, 1996.
- MEYER, W., BOLLHORN, M., STEDE, M. Aspects of general antimicrobial properties of skin secretions in the common seal *Phoca vitulina*. **Diseases of Aquatic Organisms**. 41(1): 77-79, 2000
- MIURA, T.; ROISIN, Y.; MATSUMOTO, T. Molecular Phylogeny and Biogeography of the Nasute Termite Genus *Nasutitermes* (Isoptera: Termitidae) in the Pacific Tropics. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 17(1): 1-10, 2000.
- MOREIRA, R. A., AINOUS, I. L., OLIVEIRA, J. T. A. & CAVADA, B. S. Plant Lectins Chemical and Biological Aspects. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, (Suppl II), 86: 211-218, 1991.
- MURDOCK, L.L., HUESING, J.E., NIELSEN, S.S., PRATT, R.C., SHADE, R.E., Biological effects of plant lectins on the cowpea weevil. **Phytochemistry**. 29: 85-89, 1990.
- NAKAMURA, S., IKEGAMI, A., MIZUNO, M., YAGI, F. & NOMURA, K. The expression profile of lectins differs from that of seed storage proteins in *Castanea crenata* trees. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 68: 1698-1705, 2004.
- NELSON, D.L. & COX, M.M., **Lehninger, Principles of Biochemistry**. Hardcover, 4^a Ed., 1119pp, 2005.
- NG, T.B., Antifungal proteins and peptides of leguminous and nonleguminous origins, **Peptides** 25: 1215–1222, 2004.
- OLIVEIRA, A M. F. *et al.*, Agentes destruidores da madeira. ed. LEPAGE, E.S. (Coord.). **Manual de preservação de madeiras**. São Paulo: IPT, 1: 99-256, 1986.
- OLIVEIRA, D.M.T., Morfo-anatomia do embrião de leguminosas arbóreas nativas. **Revta brasil. Bot.** São Paulo, 22(3): 413-427, 1999.
- PACHECO, M.V., MATOS, V.P., BARBOSA, M.D., FERREIRA, R.L.C. & PASSOS, M.A.A., Germinação de sementes de *Platypodium elegans* Vog. submetidas a diferentes tratamentos pré-germinativos e substratos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. 11(5): 497–501, 2007.
- PATREZE, C.M. & CORDEIRO, L., Nodulation, arbuscular mycorrhizal colonization and growth of some legumes native from Brazil. **Acta bot. bras.** 19(3): 527-537. 2005.
- PEUMANS, W. J. AND VAN DAMME, E. J. M., Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiol**. 109: 347–352, 1995.
- PEUMANS, W.J., VAN DAMME, E.J. M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology** 109: 347-352, 1995.
- PEUMANS, W.J., VAN DAMME, E.J.M., Prevalence, biological activity and genetic manipulation of lectins in foods, **Trends Food Sci. Technol.** 7: 132– 138, 1996.
- PLETSCH, M.A., aplicação da biotecnologia à produção de compostos naturais biologicamente ativos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento** 4: 12-15, 1998.
- POWELL, K.S., GATEHOUSE, A.M.R., HILDER, V.A. & GATEHOUSE, J.A., Antifeedant Effects Of Plant-Lectins And An Enzyme On The Adult Stage Of The Rice Brown Planthopper, *Nilaparvata-Lugens* , 75(1): 71-79, 1995.
- PRESTON A.F., Can understanding the mechanisms of biodegradation help preservative development?, *Wood Deterioration and Preservation: Advances in Our Changing World*, ed. GOODELL B, NICHOLAS DD & SCHULTZ TP.

- ACS Symposium Series. American Chemical Society, Washington, D.C., No. 845, Cap. 22, 2003.
- PRESTON A.F., Wood preservation: trends of today that will influence the industry tomorrow. **Forest Prod J.** 50:12–19, 2000.
- PUSZTAI, A., EWEN, S.W.B., GRANT, G., BROWN, D.S., STEWART, J.C., PEUMANS, W.J., VAN DAMME, E.J.M., BARDOCZ, S., Antinutritive effects of wheat-germ agglutinin and other N-acetylglucosamine-specific lectins. **Br. J. Nutr.** 70: 313-321, 1993.
- PUSZTAI, A., EWEN, S.W.B., GRANT, G., PEUMANS, W.J., VAN DAMME, E.J.M., RUBIO, L., BARDOCZ, S., The relationship between survival and binding of plant lectins during small intestine passage and their effectiveness as growth factors. **Digestion.** 46: 308-316, 1990.
- R. CAMPOS-OLIVAS, I. HORRER, C. BORMANN, B. JUNG, A.M. GRONENBORN, Solution structure, backbone dynamics and chitin-binding of the antifungal protein from *Streptomyces tendae* TU 901, **J. Mol. Biol.** 308: 765– 782, 2001.
- REBERS, J.E., WILLIS, J.H., A conserved domain in arthropod cuticular proteins binds chitin, **Insect Biochem. Mol.** 31: 1083– 1093, 2001.
- REISCH MS, All hands on deck. **Chem Eng News.** 82:14–16, 2004.
- RENKONEN, K. O. Studies on hemagglutinins present in seeds of some representatives of Leguminosae. **Ann. Med. Exp. Biol. Fenn.** 26: 66–72, 1948.
- ROSS AF. Systemic effects of local lesion formation. In Viruses of Plants, ed. BEEMSTER, A.B.R., DIJKSTRA, J., **Amsterdam: North-Holland**, 127–150, 1966.
- ROUGÉ, P., BARRE, A., CAUSSE, H., CHATELAIN, C., AND PORTHÉ, G. Arcelin and a-amylase inhibitor from the seeds of common bean (*Phaseolus vulgaris*) are truncated lectins. **Biochem. Syst. Ecol.** 21: 695–703, 1993.
- ROUGÉ, P., RICHARDSON, M., RANFAING, P. YAEWOOD, A., CAVADA, B. S. Single- and two- chain legume lectins as phylogenetic markers of speciation. **Biochemical and Systematic Ecology**, 15(3): 341-348, 1987.
- ROWELL R.M., Chemical modification of wood: a short review. **Wood Material Science & Engineering.** 1:29–33, 2006.
- RUDIGER, H. Structure and function of plant lectin. **Glyco-sciences: status and perspectiva.** ed. GABIUS, H., J. & GABIUS, S., Published by Chaoman & Hall GmbH, Weinheim, Germany, p. 415-438, 1997.
- RYALS J., WARD E., AHL-GOY P.A., METRAUX, J.P., Systemic acquired resistance: an inducible defense mechanism in plants. **Biochemistry and Molecular Biology of Inducible Enzymes and Proteins in Higher Plants**, ed. WRAY, J.L., pp. 205–29, 1992.
- RYAN CA. Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. **Annu. Rev. Phytopathol.** 28:425–49, 1990.
- SÁ, R. A. Constituintes Químicos da Madeira-de-lei *Myracrodruon urundeuva*. **Tese de Doutorado.** Universidade Federal de Pernambuco. 139pp, 2007.
- SANTOS, S.C.; MELLO, C.P. Taninos. SIMÕES, C.M.O. (org). **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 4ª ed., Porto Alegre / Florianópolis: Editora Universitária UFRGS, Editora da UFSC, pp. 517-544, 1999.
- SANTOS, Z. M., Avaliação da durabilidade natural da madeira de *Eucalyptus grandis* W. Hill: Maiden em ensaios de laboratório.. **Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal).** Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 75 pp, 1992.
- SANZ-APARICIO, J., HERMOSO, J. GRANGEIRO, T. B., CALVETE, J. J. & CAVADA, B. S. The cristal structure of *Canavalia brasilienses* lectin suggests a

- correlation between its quaternary conformation and its distinct biological properties for an Concanavalin A, **FEBS Lett.**, 405: 114-118, 1997.
- SAXE JK, WANNAMAKER EJ, CONCLIN SW, SHUPE TF AND BECK BD, Evaluating landfill disposal of chromated copper arsenate (CCA) treated wood and potential effects on groundwater: evidence from Florida. **Chemosphere**. 66:496–504, 2007.
- SCHEFFRAHN, R.H.; CABRERA, B.J. KERN JR., W.J.; SU, N.Y. *Nasutitermes costalis* (Isoptera: Termitidae) in Florida: first record of a non-endemic establishment by a higher termite. **Florida Entomologist**. 85(1): 273-275, 2002.
- SCHLUMBAUM, A., MAUCH, F., VOGELI, U., BOLLER, T., Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. **Nature**. 324: 365-367, 1986.
- SCHORR, M.; SPONHOLZ, N.; PORTILHO, I. S. Desenvolvimento sustentável para o Vale do Ribeira. <http://www.planetaorganico.com.br/TrabSchorr.htm>. 09 Ago. 2004.
- SCHULTZ T.P. & NICHOLAS D.D., Development of environmentally benign wood preservatives based on the combination of organic biocides with antioxidants and metal chelators. **Phytochemistry**. 61:555–560, 2002.
- SCHULTZ T.P., NICHOLAS D.D., HENRY W.P., PITTMAN C.U., WIPF W.O. AND GOODELL B., Review of laboratory and outdoor exposure efficacy results of organic biocide: antioxidant combinations, an initial economic analysis and discussion of a proposed mechanism, **Wood & Fiber Sci**. 37:175–184, 2005.
- SEABRIGHT, D. Eating away at the woodwork. **Asian Timber**. 14(3): 46-47, 1995.
- SELITRENNIKOFF, C.P., Antifungal proteins, **Appl. Environ. Microbiol**. 67: 2883–2894, 2001.
- SEQUEIRA, L., GRAHAM, T.L., Agglutination of avirulent strains of *Pseudomonas solanacearum* by potato lectin. **Physiol. Plant Pathol**. 11: 43-54, 1977.
- SHARON, N. & LIS, H. Lectins-proteins with a sweet tooth functions in cell recognition. **Essays in Biochemistry**, 30: 59-75, 1995.
- SHIBUYA, N., GOLDSTEIN, I.J., BROEKAERT, W.F., NSIMBA-LUBAKI, M., PEETERS, B., PEUMANS, W.J., The elderberry (*Sambucus iügra*) bark lectin recognizes the Neu5Ac (aZ-b)Gal/GalNac sequence. **J. Biol. Chem**. 262: 1596-1601, 1987.
- SILVA, C.A., BRAGA, M.R., Liberação e atividade de moléculas indutoras de fitoalexinas em rubiáceas tropicais: influência da metilesterificação de pectinas. **Revista Brasileira de Botânica** 27: 379-393, 2004.
- STICHER, L., MAUCH-MANI, B. & METRAUX, J.P., Systemic Acquired Resistance. **Annu. Rev. Phytopathol**. 35:235–70, 1997.
- STILLMARK, H. Über Ricin ein giftiges Ferment aus den Samen von *Ricinus communis* L. und einige anderen Euphorbiaceen. *Inaugural Dissertation Dorpat*, Tartu, 1888.
- SU, N. Y.; SCHEFFRAHN, R. H. Economically important termites in the United States and their control. **Sociobiology**. 17(1): 77-94, 1990.
- SU, N.; TAMASHIRO, M.; YATES, J. R. & HAVERTY, M. I. Effects of behavior in the evaluation of insecticides for prevention of or remedial control of the Formosan subterranean termite. **Journal of Economical Entomology** 75: 188-193, 1982.
- SU, N.; TAMASHIRO, M.; YATES, J. R. & HAVERTY, M. I., Effects of behavior in the evaluation of insecticides for prevention of or remedial control of the Formosan subterranean termite. **Journal of Economical Entomology** 75: 188-193, 1982.

- SUMMER, J.B. & HOWELL, S.F., The identification of the hemagglutinin of the Jack bean with concanavalin A. **J. Bacteriol.** 32: 227– 237, 1936.
- SUZUKI, M., MORIMATSU, M., SYUTO, B., The identification and properties of chitin-binding protein b01 (CBPb01), **J. Vet. Med. Sci.** 64: 477– 481, 2002.
- T. VUOCOLO, C.H. EISEMANN, R.D. PEARSON, P. WILLADSEN, E.L. TELLAM, Identification and molecular characterization of a peritrophin gene, peritrophin-48 from the myiasis fly *Chrysomya bezziana*, **Insect Biochem. Mol.** 31: 919–932, (2001).
- TAHIRI-ALAOUI A, DUMAS-GAUDOT E, GIANINAZZI S, ANTONIOW JF.. Expression of the PR-b1 gene in roots of two *Nicotiana* species and their amphidiploid hybrid infected with virulent and avirulent races of *Chalara elegans*. **Plant Pathol.** 42:728–36, 1993
- TELLEZ, M., ESTELL, R., FREDRICKSON, E., POWELL, J., WEDGE, D., SCHRADER, K. & KOBASISY, M., Extracts of *Flourensia cernua* (L): volatile constituents and antifungal, antialgal, and antitermite bioactivities. **Journal of Chemical Ecology.** 27(11): 2275-2285, 2001.
- THALER, J.S.; FIDANTSEF, A.L.; DUFFEY, S.S.; BOSTOCK, R.M. Trade- offs in plant defense against pathogens and herbivores: a field demonstration of chemical elicitors of induced resistance. **Journal of Chemical Ecology** 25: 1597-1609, 1999.
- TRABULSI, R. **Microbiologia.** 3^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2000.
- TRINDADE , M.B., LOPES , J.L.S., SOARES-COSTA, A., MONTEIRO-MOREIRA , A.C., MOREIRA, R.A., OLIVA , M.L.V., BELTRAMINI, L.M., Structural characterization of novel chitin-binding lectins from the genus *Artocarpus* and their antifungal activity. **Biochimica et Biophysica Acta.** 1764: 146–152, 2006.
- VAN DAMME, E. J. M., BRIKÉ, F., WINTER, H. C., VAN LEUVEN, F., GOLDSTEIN, I. J., AND PEUMANS, W. J. Molecular cloning of two different mannose- binding lectins from tulip bulbs. **Eur. J. Biochem.** 236: 419–427, 1996.
- VAN DAMME, E. J. M., PEUMANS, W. J., BARRE, A. & ROUGÉ, P. Plant lectin: A composite of several distinct families of structural and evolutionary related proteins with diverse biological roles. *Crit. Ver. Plan Sciences*, 17(6): 575-692, 1998.
- VAN DELLEN, S.K., GHOSH, P.W. ROBBINS, B. LOFTUS, J. SAMUELSON, K., *Entamoeba histolytica* lectins contain unique 6-Cys or 8-Cys chitinbinding domains, **Infect. Immun.** 70: 3259– 3263, 2002.
- VAN PARIJS, J., BROEKAERT, W. F., GOLDSTEIN, I. J., & PEUMANS, W. J. Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. **Planta.** 183: 258–262, 1991.
- VAN PARIJS, J., JOOSEN, H.M., PEUMANS, W.J., GEUNS, J.M., VAN LAEIRE, A.J., Effect of the lectin UDA (*Urtica dioica* agglutinin) on germination and cell wall formation of *Phycomyces blakeslezzus* Burgeff. **Arch. Microbiol.** 158: 19-25, 1992.
- VASCONCELLOS, A.; MELO, A.C.S.; VASCONCELOS SEGUNDO, E.M.; BANDEIRA, A.G. Cupins de duas florestas de restinga do nordeste brasileiro. **Iheringia - Série Zoologia.** 95(2): 127-131, 2005.
- VASCONCELOS, I.M.; OLIVEIRA, J.T.A. Antinutritional properties of plant lectins. *Toxicon.* 44: 385–403, 2004.

- WANG, H. J. & GAO, T. B. A new lectin with highly potent antihepatoma and antisarcoma activities from the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. **Biochem. Biophys.**, 275: 810-816, 2000b.
- WANG, H. X.; NG, T. B., Purification of Castamollin, a novel antifungal protein from Chinese chestnuts. **Protein Expression & Purification**. 32: 44-51, 2003.
- WANG, H., NG, T. B., OOI, V. E. C. & LIU, W. K. Effects of lectins with different carbohydrate-binding specificities on hepatoma, choriocarcinoma, melanoma and osteosarcoma cell lines. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. 32: 365-372, 2000a.
- WATKINS, W.M. & MORGAN, W.T.J. Neutralization of the anti-H agglutinin in eel by simple sugars. **Nature** 169: 825-826, 1952.
- WEIS, W. I., DRICKAMER, K. Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. **Annu. Rev. Biochem.**, 65: 441-473, 1996.
- WONG, J.M.H. & NG, T.B. Sesquin, a potent defensin-like antimicrobial peptide from ground beans with inhibitory activities toward tumor cells and HIV-1 reverse transcriptase. **Peptides** 26: 1120-1126, 2005.
- YAN, Q., JIANG, Z., YANG, S., DENG, W., HAN, L., A novel homodimeric lectin from *Astragalus mongholicus* with antifungal activity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 442: 72-81, 2005.
- YE AND NG, A new antifungal protein and a chitinase with prominent macrophage-stimulating activity from seeds of *Phaseolus vulgaris* cv. pinto, **Biochemical And Biophysical Research Communications**. 290(2): 813-819, 2002.
- YE, X.Y. & NG, T.B., A chitinase with antifungal activity from the mung bean, **Protein Express. Purif.** 40:230-236, 2005.
- ZHU-SALZMAN, K. & SALZMAN, R. A. Functional mechanics of the plant defensive *Griffonia simplicifolia* lectin II: resistance to proteolysis is independent of glycoconjugate binding in the insect gut. **Journal of Economic Entomology**. 94: 1280-1284, 2001.
- ZHU-SALZMAN, K.; SHADE, R.E.; KOIWA, H.; SALZMAN, R.A.; NARASIMHAN, M.; BRESSAN, R.A.; HASEGAWA, P.M. & MURDOCK, L. L. Carbohydrate binding and resistance to proteolysis control insecticidal activity of *Griffonia simplicifolia* lectin II (GSII). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 95: 15123-15128, 1998.