

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

ANA PAULA DE ARAÚJO BOLETI

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E
ESTUDO DA ATIVIDADE INSETICIDA E FUNGICIDA DA
LECTINA DE SEMENTES DE *Pouteria torta* (MART.) RADLK**

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de mestre em Biologia Funcional e Molecular, na área de Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Lígia Rodrigues Macedo

2003

Campinas, 27 de outubro de 2003

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Lígia Rodrigues Macedo (Orientadora)

Assinatura

Prof. Dr. Sérgio Marangoni

Assinatura

Prof. Dr. Ladaslav Sodek

Assinatura

Prof. Dr. José Camillo Novello

Assinatura

À minha mãe Ironilda, que nunca mediu esforços para que eu pudesse realizar meus sonhos e objetivos, me ajudando e apoiando em todos os momentos da minha vida.

À minha orientadora Maria Lígia, pela orientação, ensinamentos e pelo apoio incansável para a realização deste trabalho. Obrigado Lígia por me mostrar que com trabalho e dedicação podemos vencer até mesmos os obstáculos mais difíceis.

*Ao Laboratório de Purificação de
Proteínas e suas Funções Biológicas pela
ajuda e colaboração para o
desenvolvimento deste trabalho.*

AGRADECIMENTOS

À amiga e co-orientadora (de coração) Maria das Graças Machado Freire, por todos os auxílios e ajuda que muito contribuiu para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Sérgio Marangoni e ao Prof. Dr. José Camillo Novello pela oportunidade, colaboração e apoio.

A Profa. Nilce Meirelles, ao Prof. Tomomasa Yano e ao Prof. Sérgio Marangoni, pela participação no exame de qualificação onde apresentaram importantes sugestões e observações para a revisão deste trabalho.

Aos professores Sérgio Marangoni e Ladaslav Sodek por participarem da banca examinadora desta dissertação, valorizando o meu trabalho.

Aos demais professores do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia/Unicamp, pelos ensinamentos e cooperação.

Às amigas Gláucia Coelho de Mello e Mirela Batista Coelho pela ajuda e colaboração no desenvolvimento deste trabalho e principalmente pela amizade e convivência durante estes anos.

Aos demais colegas e funcionários do Departamento de Bioquímica pelo convívio e que direta e indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos técnicos Paulo Baldasso e Marino pelo apoio constante e pela ajuda e colaboração.

Aos meus amigos da Moradia Ana Lygia, Cris, Junko, Mirela, Tânia, Bruna, Lucy, Deyvisson e Alan (Cords) por fazerem parte da minha vida, como amigos, irmãos e cúmplices.

À Capes, pelo apoio financeiro.

Índice

I. Introdução	1
1- Lectinas de Plantas	2
1.1 -Subdivisões de Lectinas vegetais de acordo com a estrutura	2
1.1.1-Merolectinas	2
1.1.2- Hololectinas	2
1.1.3- Quimerolectinas	3
1.1.4- Superlectinas	3
2- Classificação das Lectinas de Plantas	4
2.1- Lectinas de legumes	5
2.2- Lectinas de monocotiledôneas ligantes de manose	6
2.3- Lectinas ligantes a quitina	6
2.4- Proteínas inativadoras de ribossomo tipo 2 (RIP)	7
2.5- Família Jacalina	8
2.6- Lectinas do Floema de Curcubitaceae	8
2.7- Lectinas de Amaranthaceae	9
3. Especificidade de ligação ao carboidrato das lectinas de plantas	10
3- Características Gerais das Lectinas	12
4- Papel das lectinas de plantas no mecanismo de defesa das plantas	13
4.1- Papel bactericida das lectinas de plantas	14
4.2- Papel fungicida das lectinas de plantas	16
4.2.1- Parede Celular dos fungos	16
4.2.2- Contaminação por fungos	16
4.2.3- Fungos fitopatogênicos	17
4.2.4- Mecanismo de ação de lectinas sobre fungos	18
4.3- Papel inseticida das Lectinas de Plantas	20

4.3.1- Morfologia da Digestão dos insetos _____	21
4.3.2- Membrana Peritrófica dos insetos _____	23
4.3.3. Mecanismo de ação das lectinas sobre insetos _____	24
4.3.4- Toxicidade das lectinas a Coleopteras e Lepidopteras. _____	26
5- Plantas transgênicas _____	27
II- Objetivos _____	29
III. Materiais _____	30
1- Árvores e Sementes de <i>Pouteria torta</i> _____	30
2- Insetos _____	32
3- Fungos _____	33
3- Reagentes _____	34
IV- Métodos _____	35
1- Preparação da Farinha _____	35
2- Extração de Proteínas _____	35
3- Dosagem de Proteínas _____	35
4- Atividade hemaglutinante _____	35
5- Purificação da lectina de <i>Pouteria torta</i> _____	36
5.1- Cromatografia de exclusão molecular de Sephacryl S-200 HR Hi-Prep _____	36
5.2- Cromatografia de troca iônica em coluna Source 15Q _____	36
5.3- Cromatografia em coluna de troca iônica HiTrap SP _____	37
5.4- Cromatografia de afinidade em coluna de glicose-agarose _____	37
5.5- Cromatografia de afinidade em coluna de manose-agarose _____	37
6- Caracterização físico-química da lectina de <i>P. torta</i> _____	38
6.1- Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS _____	38

6.2- Efeito do pH sobre a atividade hemaglutinante _____	39
6.3- Efeito da temperatura sobre a atividade hemaglutinante _____	39
6.4- Efeito de agentes quelantes sobre a atividade hemaglutinante _____	39
6.5- Determinação de massa molecular relativa de PtLec _____	40
6.6- Dosagem de carboidratos totais _____	40
6.7- Ação inibitória de carboidratos sobre a atividade hemaglutinante _____	40
6.8- Composição de aminoácidos _____	41
6.9- Determinação da estrutura N-terminal _____	42
6.9.1- Eletroforese em gel de poliacrilamida e transferência _____	42
6.9.2- Seqüência N-terminal _____	42
7- Estudo dos Papéis Biológicos de PtLec _____	43
7.1- Estudo da atividade inseticida _____	43
1- Criação dos insetos _____	43
2- Preparação das sementes artificiais contendo PtLec para <i>C. maculatus</i> _____	43
3- Preparação da dieta artificial contendo PtLec para <i>A. kuehniella</i> _____	44
4- Análise estatística _____	45
7.2- Estudo da atividade fungicida _____	45
1- Manutenção dos microrganismos _____	45
2- Extração de esporos dos fungos filamentosos _____	46
3- Preparo das células de levedura _____	46
4- Ensaio de inibição do crescimento dos fungos _____	46
<i>V-Resultados</i> _____	47
1- Purificação da lectina de <i>Pouteria torta</i> _____	47
1.1- Cromatografia de exclusão molecular Sephacryl S-200 HR Hi-Prep _____	47
1.2- Cromatografia de troca iônica em coluna Source 15Q _____	48
1.3- Cromatografia de troca iônica em coluna HiTrap SP _____	49
1.4- Cromatografia de afinidade em coluna de glicose-agarose _____	50

1.5- Cromatografia de afinidade em coluna de manose-agarose _____	51
2- Estudo da Atividade Hemaglutinante _____	52
3- Caracterização Físico-Química da lectina de <i>P. torta</i> _____	53
3.1- Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS _____	53
3.2- Determinação da massa molecular relativa de PtLec _____	54
3.3- Determinação da massa molecular de PtLec em coluna Superdex 75 equilibrada com glicose 100 mM _____	55
3.4- Dosagem de carboidratos totais _____	56
3.5- Ação inibitória de carboidratos sobre a atividade hemaglutinante _____	56
3.6- Efeito da temperatura sobre a atividade hemaglutinante _____	57
3.7- Efeito do pH na atividade hemaglutinante _____	58
3.8- Efeito de agentes quelantes sobre a atividade hemaglutinante _____	59
3.9- Composição de aminoácido _____	60
3.10- Determinação da Estrutura N-terminal _____	61
4- Os Papéis Biológicos de PtLec _____	62
4.1- Estudo da atividade inseticida _____	62
4.1.1- Efeito de PtLec sobre o desenvolvimento larval de <i>C. maculatus</i> _____	62
4.1.2- Efeito de PtLec sobre o desenvolvimento larval de <i>A. kuehniella</i> _____	64
4.1.3- Consumo e utilização de alimentos _____	67
4.2- Estudo da Atividade Fungicida _____	69
4.2.1- Efeito de PtLec sobre o crescimento dos fungos _____	69
4.2.2- Microscopia óptica mostrando o efeito de PtLec sobre o crescimento dos fungos _____	72
VI- Discussão _____	73
VII- Conclusões _____	82
VIII. Referências Bibliográficas _____	84

Índice de Figura

<i>Figura 1: Subdivisão de lectinas de plantas de acordo com a característica estrutural</i>	4
<i>Figura 2: Diagrama Geral do canal alimentar de um inseto</i>	23
<i>Figura 3: Árvore, frutos e sementes de P. torta</i>	31
<i>Figura 4: C maculatus sobre grãos de feijão Vigna unguiculata (Foto: P.C.Strikis)</i>	32
<i>Figura 5: Inseto adulto de A. kuehniella (Foto: Van Waters G. Rogers)</i>	33
<i>Figura 6: Cromatografia de exclusão molecular em coluna Sephacry S-200 HR Hi-Prep.</i>	47
<i>Figura 7: Cromatografia de troca iônica em coluna Source 15Q</i>	48
<i>Figura 8: Cromatografia de troca iônica em coluna HiTrap SP</i>	49
<i>Figura 9: Cromatografia de afinidade em coluna de glicose-agarose</i>	50
<i>Figura 10: Cromatografia de afinidade em coluna de manose-agarose</i>	51
<i>Figura 11: PAGE-SDS (15 %) das etapas de purificação da lectina de sementes de P. torta</i>	53
<i>Figura 12: Determinação da massa molecular relativa de PtLec em coluna de exclusão molecular Superdex 75</i>	54
<i>Figura 13: Determinação da massa molecular relativa de PtLec em coluna de exclusão molecular Superdex 75 equilibrada com glicose 0,1 M</i>	55
<i>Figura 14: Efeito da temperatura na atividade hemaglutinante de PtLec</i>	57
<i>Figura 15: Efeito dos pH na atividade hemaglutinante de PtLec</i>	58
<i>Figura 16: Efeito de PtLec sobre larvas de 20 dias de C. maculatus alimentadas com dieta artificial. (A) N° de sobreviventes (B) peso médio</i>	63
<i>Figura 17 : Variação no tamanho das larvas de 4° instar de C. maculatus. (A) larvas alimentadas com PtLec 0,1 % e (B) dietas controles</i>	64
<i>Figura 18: Efeito de PtLec sobre larvas de 24 dias de A. kuehniella alimentadas com dieta artificial. (A) N° de sobreviventes (B) peso médio</i>	65

<i>Figura 19: Variação no tamanho das larvas de 4º instar de A. kuehniella. (A) dieta controle e (B e C) alimentadas com PtLec 0,1 %</i>	66
<i>Figura 20: Consumo e utilização de alimentos pelas larvas de A. kuehniella alimentadas com PtLec. (A) dieta consumida/larva (B) fezes produzidas/larva</i>	68
<i>Figura 21: Efeito de PtLec sobre o crescimento de fungos. (A) F. oxysporum e (B) C. musae</i>	70
<i>Figura 22: Efeito de PtLec sobre o crescimento da levedura S. cerevisiae</i>	71
<i>Figura 23: Microscopia óptica de F. oxysporum e C. musae depois de 60 h de crescimento dos fungos</i>	72

Índice de Tabela

<i>Tabela 1: Família das Lectinas de Plantas: ocorrência e especificidade</i>	4
<i>Tabela 2: Especificidade de ligação a Carboidrato das Lectinas de Plantas</i>	11
<i>Tabela 3: Atividade hemaglutinante de PtLec</i>	52
<i>Tabela 4: Ação inibitória de carboidratos sobre a atividade hemaglutinante de PtLec</i>	56
<i>Tabela 5: Efeito dos agentes sobre a atividade hemaglutinante</i>	59
<i>Tabela 6: Composição de aminoácidos de PtLec</i>	60
<i>Tabela 7: Seqüência N-terminal de PtLec</i>	61
<i>Tabela 8: Digestibilidade aparente (AD), eficiência de conversão do alimento ingerido (ECI), eficiência de conversão do alimento digerido (ECD), custo metabólico (CM), das larvas de <i>A. kuehniella</i> criadas em dietas na presença de PtLec 0,5% e em dietas controle.</i>	67

ABREVIACÃO PARA AMINOÁCIDOS

AMINOÁCIDOS	ABREVIACÃO (3 LETRAS)	SÍMBOLO
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Glutamina	Gln	Q
Ácido glutâmico	Glu	E
Glicina	Gly	G
Histidina	Hys	H
Isoleucina	Iso	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

Nomenclatura IUPAC

ABREVIACOES

PtLec –lectina de *Pouteria torta*

DTT – ditioneitol

GlcNac – N-acetilglicosamina

Gal – galactose

GalNac – N-acetilgalactosamina

kDa – kilodalton

NeuAc – cido neuramnico

PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida

PSA – persulfato de amônia

PVDF – polivinildilenodifluoreto

SDS – dodecil sulfato de sódio

TEMED – N'-N'-N'-N'- tetra metilenodiamina

Tris – hidroximetil aminometano

EDTA – cido etilenodiaminotetracido

EGTA – cido etilenodiaminoglicoltetracido

Resumo

Lectinas são proteínas ligantes de carboidratos de origem não imune. Este grupo de proteínas é amplamente distribuído na natureza e têm sido encontrados em vírus, microrganismos, plantas e animais. Lectinas de plantas têm sido isoladas e caracterizadas em relação as suas propriedades físico-químicas, estruturais e biológicas. Dentre os papéis biológicos, podemos destacar sua ação fungicida, antimicrobiana e inseticida.

Neste trabalho estudamos a lectina presente em sementes de *Pouteria torta*, ou abiu piloso (nome vulgar), pertencente à família Sapotaceae. A lectina de *P. torta* (PtLec) foi purificada em coluna de gel filtração Sephacryl S-200 HR Hi-Prep e colunas de troca iônica Source 15Q e HiTrap SP, apresentando através de análise em PAGE-SDS uma banda de proteína de 10 kDa. A massa molecular relativa (M_r) de 10 kDa foi estimada em coluna de gel filtração Superdex 75, confirmando seu peso molecular, e uma massa molecular de 60 kDa quando eluída com glicose 100 mM. PtLec aglutinou eritrócitos humanos e eritrócitos de rato, coelho e bovino.

Como características Físico-Químicas, destacamos: a natureza glicoprotéica (22,8 %) de açúcares neutros, especificidade por D-manose e D-glicose, dependência de íons Ca^{2+} e Mn^{2+} para exercer sua atividade hemaglutinante, estabilidade a pHs na faixa de 5-10 e a temperaturas de 37 °C a 60 °C. A composição de aminoácidos revelou uma proteína hidrofóbica, com caráter básico. A análise da seqüência N- terminal não revelou homologia com outras lectinas vegetais.

Quando PtLec foi avaliada em relação ao seu papel inseticida sobre o Coleoptera *Callosobruchus maculatus* e sobre o Lepidoptera *Anagasta kuehniella*, através de dietas artificiais, verificamos que PtLec causou 100 % de mortalidade a 0,3 % a *C. maculatus*. Quando esta lectina foi incorporada a 0,12 % causou uma redução de 50 % na mortalidade das larvas (LD_{50}) e quando incorporada ao nível de 0,08 % causou uma redução de 50 % no peso médio das larvas (WD_{50}) de *C. maculatus*. PtLec ao nível de

incorporação de 1 % causou uma mortalidade larval de 20 % a *A. kuehniella* e uma redução de 50 % no peso médio larval a 0,6 % (WD₅₀).

O consumo e utilização de alimento foi avaliada em relação ao lepidóptero *A. kuehniella*, havendo influência de PtLec sobre a digestibilidade aproximada, eficiência de conversão e sobre o metabolismo. Análise das fezes produzidas e quantidade de PtLec consumida pelas larvas também foi verificado, onde houve uma redução de 0,61 mg/larva na produção das fezes quando as larvas de *A. kuehniella* foram alimentadas com dieta contendo PtLec 0,5 %. Em relação à quantidade de dieta consumida pelas larvas, verificamos uma redução de 11,5 mg no consumo da dieta quando essa continha 0,5 % de lectina.

O estudo da atividade de PtLec sobre os fungos *F. oxysporum*, *C. musae* e *S. cerevisiae* revelou que PtLec retardou o crescimento destes fungos, exibindo uma inibição de 100 % sobre o crescimento de *S. cerevisiae*.

Nossos resultados nos mostram que PtLec é uma lectina biologicamente importante, podendo ser usada no mecanismo de defesa de plantas.

Abstract

Lectins are carbohydrate-binding proteins of non-immune origin. This group of proteins is distributed widely in nature and they have been found in viruses, microorganisms, plants and animals. Lectins of plants have been isolated and characterized according to their chemical, physical-chemical, structural and biological properties. Among their biological activities, we can stress its fungicidal, antimicrobial and insecticide action.

In this work we studied the lectins present in the seeds of *Pouteria torta*, or abiu piloso (vulgar name), belonging to the Sapotaceae family. The lectin of *P. torta* (PtLec) was purified in Sephacryl S-200 HR Hi-Prep column, ion exchange chromatography Source 15Q and HiTrap SP columns, presenting through analysis in PAGE-SDS a band of protein of 10 kDa. The relative molecular mass (Mr) of 10 kDa was estimated by gel filtration on Superdex 75 column, confirming molecular weight, and a molecular mass of 60 kDa when eluted with 100 mM of glucose. PtLec agglutinated human erythrocytes and mouse, rabbit and bovine erythrocytes.

As physical-chemical characteristics, we can stress: the glycoprotein nature (22,8%) of the neutral sugar, specification by D-mannose and D-glucose, dependence on Ca^{2+} and Mn^{2+} ions to exercise its hemagglutination activity, stable (5 to 10) at pHs and at temperatures from 37 °C to 60 °C. The composition of amino acids revealed a hydrophobic protein, with basic character. The analysis of the N- terminal sequence did not reveal homology with other vegetable lectins.

When PtLec was evaluated in relation to its insecticide role on Coleoptera *Callosobruchus maculatus* and on Lepidoptera *Anagasta kuehniella*, through artificial diets, it was verified that PtLec caused 100% of mortality to 0,3 % to *C. maculatus*. When this lectina was incorporated to 0,12% caused a reduction of 50% in the mortality of the larvae (LD_{50}) and when incorporated to the level of 0,08% it caused a 50 % reduction in the average weight of the *C. maculatus* larvae (WD_{50}). PtLec at the 1 % level of

incorporation caused a larval mortality from 20 % to *A. kuehniella* and a 50 % reduction in the average weight larval 0,6 % (WD₅₀).

The consumption and food use was evaluated in relation to the lepidóptera *A. kuehniella*, with influence of PtLec on the approximate digestibility, conversion efficiency and on the metabolism. Analysis of the produced feces and the amount of PtLec consumed by the larvae was also verified, where there was a reduction of 0,61 mg/larvae in the production of feces when *A. kuehniella* was fed with a diet containing PtLec 0,5%. In relation to the amount of diet consumed by the larvae, it was verified a reduction of 11,5 mg/larvae in the consumption of the diet when that contained 0,5% of lectin.

The study of the activity of PtLec on the fungi *F. oxysporum*, *C. musae* and *S. cerevisae* revealed that it delayed the growth of these fungi, showing an inhibition of 100% on the growth of *S. cerevisae*.

Our results suggest that PtLec is a biologically important lectin and it could be used in the mechanism of defense of plants.

I. INTRODUÇÃO

A hemaglutinação de eritrócitos em extratos de plantas, mediada por proteínas, foi primeiramente identificado por Stillmark em 1888, pesquisando fatores de toxicidade em *Ricinus communis* (Barondes, 1988). Ele mostrou que o material responsável pela hemaglutinação era uma proteína que chamou de ricina, embora agora esteja evidente que o que ele chamou de ricina era uma complexa mistura de moléculas tóxicas e lectinas não tóxicas. Boyd *et al.* (1954), chamou este novo grupo de proteínas de Lectinas, do latim *lectus*, para focar a propriedade geral destas proteínas de selecionar tipos celulares.

Peumans *et al.* (1998) definiu lectinas como proteínas com no mínimo um domínio não catalítico que ligam reversivelmente a mono ou oligossacarídeos específicos. Esta interação é mediada por pontes de hidrogênio ou forças de van der Waals (Weis *et al.*, 1996).

Algumas lectinas podem ter um segundo tipo de sítio de ligação que interage com um sítio não carboidrato. Pois, algumas enzimas de plantas são compostas de um sítio de ligação a carboidrato e um sítio catalítico, que atuam independentemente (Collinge *et al.*, 1993); segundo, várias proteínas ligantes de carboidrato possuem somente um sítio de ligação e, entretanto, não são capazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados; e terceiro, várias espécies de legumes contêm proteínas que estão relacionadas com as lectinas e são destituídas de atividade de ligação a carboidrato (Peumans *et al.*, 1995).

Lectinas estão amplamente distribuídas na natureza e centenas destas moléculas têm sido isoladas de plantas, vírus, bactérias, invertebrados e vertebrados, incluindo os mamíferos.

1- Lectinas de Plantas

As lectinas são amplamente distribuídas no reino vegetal, sendo encontradas principalmente nos órgãos de reserva (Peumans *et al.*, 1998), abrangendo principalmente as famílias Leguminosae, Gramineae, Algae, Euphorbiaceae, etc., sendo a família Leguminosae a que apresenta o maior número de lectinas isoladas e destas destacam-se principalmente as de sementes (Sharon, 1993; Prakashkumar, *et al.*, 1998; Loris *et al.*, 1998), embora possam ser encontradas também em outras partes das plantas, como folhas (Ratanapo *et al.*, 1998), frutos (Sampietro *et al.*, 2001), raízes de algumas Convolvulaceae (Peumans *et al.*, 1997; Van Damme *et al.*, 1997a) e túberculos (Suseelan *et al.*, 2002).

1.1 -Subdivisões de Lectinas vegetais de acordo com a estrutura

De acordo com Van Damme *et al.* (1998) as lectinas foram subdivididas em quatro classes principais: merolectinas, hololectinas e quimerolectinas e superlectinas.

1.1.1-Merolectinas

São proteínas que consistem exclusivamente de único domínio de ligação a carboidrato. Devido seu caráter monovalente as merolectinas são incapazes de precipitar glicoconjugados ou aglutinar células. Heveína, uma proteína do látex de seringueira (*Hevea brasiliensis*), que se liga à quitina, é uma típica merolectina (Van Parijs *et al.*, 1991).

1.1.2- Hololectinas

Também são compostas exclusivamente de domínios de carboidratos ligantes, mas com dois ou mais sítios ligantes, que são idênticos ou parecidos. Devido as hololectinas serem di ou multivalente elas podem aglutinar células e/ou precipitar

glicoconjugados. As hololectinas comportam-se como verdadeiras aglutininas e compreende a maioria das lectinas de plantas.

1.1.3- Quimerolectinas

É a fusão das proteínas compostas de um ou mais domínios de carboidratos ligantes e um domínio não relacionado com uma atividade catalítica bem definida e que age independentemente dos domínios de carboidratos ligantes. Dependendo do número de sítios de ligação a carboidratos, as quimerolectinas comportam-se como merolectinas ou hololectinas. Um representante deste grupo são as proteínas inativadoras de ribossomos (RIP tipo 2), como por exemplo a ricina (toxina da mamona), que possui dois domínios de ligação para carboidratos comportando-se como uma hololectina e um domínio para a inativação do ribossomo (Peumans *et al.*, 1998).

1.1.4- Superlectinas

As superlectinas consistem de no mínimo dois domínios de ligação para carboidratos. Diferente das hololectinas os domínios de ligação para carboidratos das superlectinas reconhecem açúcares estruturalmente e funcionalmente diferentes. Como exemplo, a lectina do bulbo de tulipa (TxLCI) que são formados por dois domínios de ligação a carboidrato, que reconhecem manose e GalNAac, respectivamente (Van Damme *et al.*, 1996f).

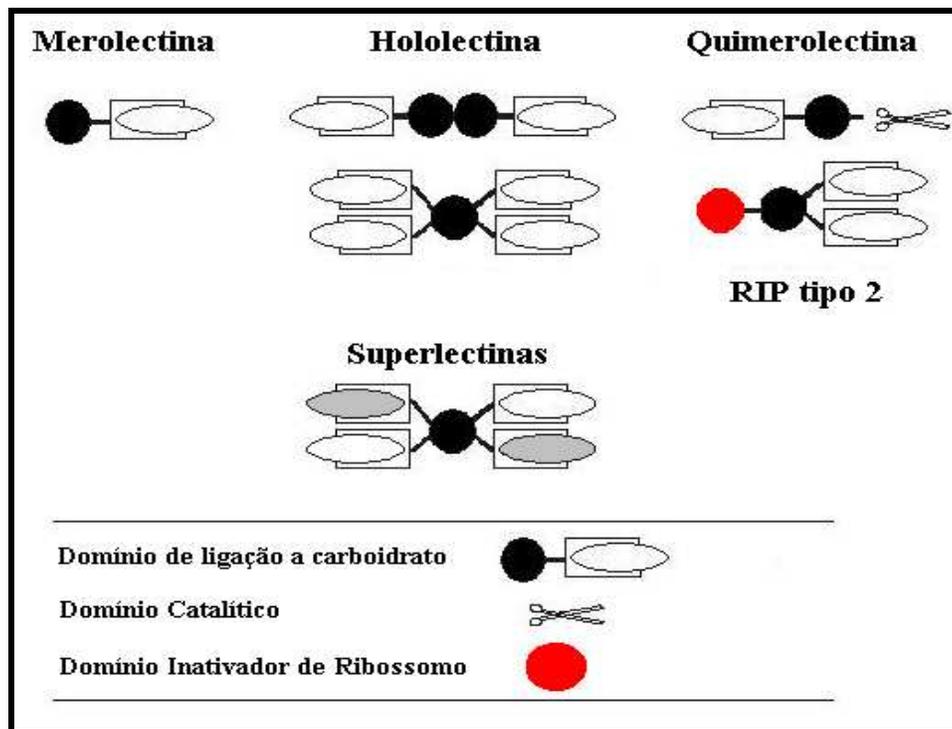


Figura 1: Subdivisão de lectinas de plantas de acordo com a característica estrutural (adaptado de Van Damme *et al.*, 1998).

2- Classificação das Lectinas de Plantas

As lectinas são consideradas como um grupo heterogêneo de proteínas, pois diferem de todas as outras classes de proteínas de acordo com as suas propriedades bioquímicas/físicoquímica, estrutura molecular, especificidade de ligação ao carboidrato, e atividade biológica (Van Damme *et al.*, 1998). As lectinas de plantas são classificadas em sete grupos de acordo com as semelhanças estruturais e evolutivas, que são nomeados: lectinas de legume, lectinas ligantes a quitina, lectinas de monocotiledôneas, proteínas inativadoras de ribossomo tipo 2 (RIP), floema de Cucurbitaceae, família Jacalina e Amaranthaceae (Tabela 1) (Peumans *et al.*, 1998).

Tabela 1: Família das Lectinas de Plantas: ocorrência e especificidade^a

<i>Lectinas</i>	<i>Ocorrência</i>		<i>Especificidade</i>
	Distribuição Taxonômica	N° de lectinas identificadas	
<i>Legume</i>	Legumes	>100	Diversa
<i>Monocotiledôneas</i>	Liliales	>50	Manose
<i>Ligantes a quitina</i>	Mono ou Dicotiledôneas	>100	GlcNac ou (GlcNac) _n
<i>Tipo 2 RIP</i>	Mono ou Dicotiledôneas	>20	Gal, GalNAc ou Neu5Acα(2,6)-Gal/GalNAc
<i>Floema de Cucurbitaceae</i>	Cucurbitaceae	<10	(GlcNac) _n
<i>Familia Jacalina</i>	Moraceae Convulvulaceae	<10	Gal Manose/Maltose
<i>Amaranthaceae</i>	Amaranthaceae	<10	GalNAc

^aadaptada de Peumans *et al.* (1998)

2.1- Lectinas de legumes

Esta família de lectinas é encontrada exclusivamente em Leguminosae (Sharon *et al.*, 1990). Até o momento, mais de 100 lectinas de legume foram isoladas e cerca de 70 diferentes espécies foram caracterizadas. Várias lectinas têm sido isoladas de sementes maduras onde o percentual de lectina varia de 1 a 10 % do total de proteínas solúveis. Em algumas espécies, altas concentrações têm sido observadas (50 %) (Van Damme *et al.*, 1998).

Todas lectinas de leguminosas são relatadas a nível molecular, mas mostram uma variação na especificidade de ligação ao carboidrato. Esta ampla especificidade certamente contribui para o sucesso da lectina de legume como uma ferramenta indispensável na pesquisa biológica e biomédica sendo usadas como proteínas bioativas na pesquisa e medicina (Van Damme *et al.*, 1998, Peumans *et al.*, 1998)

Lectinas de leguminosas requerem cátions divalentes em sítios ligantes a metal. Cada subunidade possui um íon Ca^{2+} e Mn^{2+} , que são essenciais para a atividade de ligação a carboidrato da lectina. Os aminoácidos envolvidos na ligação desses íons são altamente conservados (Van Damme *et al.*, 1998).

Algumas lectinas estão envolvidas na simbiose entre legumes e a fixação de nitrogênio da bactéria *Rhizobium* (Diaz *et al.*, 1989). Outras como as lectinas de *Canavalia brasiliensis*, *Dioclea grandiflora* e *D. violacea* induzem a proliferação e produção de interferon-gama por células mononucleadas, assim como apoptose (Barbosa *et al.*, 2001).

2.2- Lectinas de monocotiledôneas ligantes de manose

A lectina de bulbos de *Galantus nivalis* (GNA) foi a primeira lectina de monocotiledônea ligante de manose a ser isolada e caracterizada (Van Damme *et al.*, 1987). Desde então, proteínas similares têm sido encontradas em espécies de monocotiledôneas, como nas famílias Amalylidaceae, Alliaceae, Araceae, Liliaceae, Orchidaceae e Bromeliaceae (Van Damme *et al.*, 1995b).

Todas as proteínas de monocotiledôneas ligantes de manose são formadas de 1 a 4 subunidades de 12 kDa. Estudos com modelos moleculares indicaram que todas apresentam estruturas similares (Barre *et al.*, 1996). Devido sua exclusiva especificidade por manose, diferentes proteínas ligantes de manose de monocotiledônea recebe em grande parte atenção, pois se destacam como proteína antiviral (Balzarini *et al.*, 1991, 1992) e inseticida (Gatehouse *et al.*, 1995).

2.3- Lectinas ligantes a quitina

A proteína ligante de quitina (polímero de N-acetil-glicosamina) contém o chamado domínio (s) heveína. O termo 'heveína' refere-se a uma pequena proteína de 43

resíduos de aminoácidos encontrado no látex de árvores de seringueira (*Hevea brasiliensis*) (Waljuno *et al.*, 1975).

Heveína é uma merolectina composta de um único domínio ligante a quitina (Lee *et al.*, 1991). Muitas proteínas de plantas contêm domínios ligantes de quitina similares à heveína. Em algumas destas proteínas são encontrados um único domínio heveína, como por exemplo, o peptídeo antimicrobiano ligante de quitina isolado de *Amaranthus caudatus* (Broekaert *et al.*, 1992). Outras proteínas ligantes a quitina são compostas de 2, 3 ou 4 domínios heveína, tais como, as lectinas de *Urtica dioica* (UDA), *Phytolacca americana* e trigo, respectivamente (Raikhel *et al.*, 1993; Konami *et al.*, 1995).

As quitinases classe I, por exemplo, são quimerolectinas compostas de um único domínio heveína ligado a um domínio catalítico com atividade quitinásica (Collinge *et al.*, 1993). Em virtude da presença de um domínio catalítico, que age independentemente do domínio de ligação a quitina, a quitinase classe I possui atividade biológica que é independente da sua ligação ao carboidrato (Collinge *et al.*, 1993).

Estas lectinas também são encontradas em Gramineae, Solanaceae, Urticaceae, Papaveraceae e Amaranthaceae.

2.4- Proteínas inativadoras de ribossomo tipo 2 (RIP)

São quimerolectinas compostas de um polinucleotídeo constituído de um domínio adenosina glicosidase (cadeia A) ligado ao domínio ligante a carboidrato (cadeia B) (Barbieri *et al.*, 1993). Ambas cadeias são sintetizadas por uma única molécula precursora a qual é pós-transducionalmente processada através da excisão de uma ligação entre as cadeias A e B (Peumans *et al.*, 1998).

A maioria tipo 2 RIP ligam-se preferencialmente a Gal ou GalNAc. A tipo 2 RIP tem sido encontrado em plantas das famílias Euphorbiaceae, Fabaceae, Sambucaceae, Viscaceae, Ranunculaceae, Lauraceae, Passifloraceae, Tridaceae e Liliaceae (Peumans *et*

al., 1998). Ricina (*R. communis*) e abrina (*Abrus precatorius*) são exemplos de tipo 2 RIP com potentes atividades biológicas (Peumans *et al.*, 1998).

2.5- Família Jacalina

Jacalina, lectina específica à galactose de sementes da fruta jaca (*Artocarpus integrifolia*) é umas das clássicas lectinas de um não legume. Lectinas similares têm sido encontrados em poucas espécies de *Artocarpus* e em *Maclura pomifera* (Young *et al.*, 1989).

As lectinas de Moraceae são consideradas como uma pequena família de lectinas que ocorrem excessivamente nesta particular família de plantas. Entretanto, a clonagem molecular de uma lectina ligante a manose/maltose do rizoma de *Calystegia sepium* (Convolvulaceae), revelou que esta nova lectina compartilha de uma notável similaridade sequencial com a jacalina (Van Damme *et al.*, 1996a).

Outros membros da família Convolvulaceae *Convolvulus arvensis* e *Ipoemea batatas*, também contêm lectinas parecidas com Casélp. Sendo a indicação da ocorrência da lectina em outras famílias de plantas. Muito provavelmente, a família jacalina também é uma superfamília de lectinas que ocorrem em diferentes grupos taxonômicos.

2.6- Lectinas do Floema de Curcubitaceae

Muitas espécies de Curcubitaceae contêm alta concentração de lectinas que ligam a oligômeros de GlcNAc (Wang *et al.*, 1994). As lectinas do floema de Curcubitaceae são proteínas diméricas composta de duas idênticas subunidades de 24 kDa. Todas as lectinas conhecidas dos floemas de Curcubitaceae mostram um grau de similaridade sequencial, mas não tem qualquer similaridade sequencial com outras lectinas de plantas ou proteínas. Desse modo são consideradas como a menor família de proteínas (Peumans *et al.*, 1998).

2.7- Lectinas de Amaranthaceae

Clonagem molecular e análise de difração de raios-X revelaram que amarantina, uma lectina de semente de *Amaranthus caudatus* não se assemelha a qualquer outra lectinas de plantas com relação a sequência de aminoácidos (Raina *et al.*, 1992) e a estrutura tridimensional (Transue *et al.*, 1997). Baseado nestes dados, a amarantina é agora considerada como um protótipo da família de lectina amarantina, uma lectina ligante específica de N-acetilgalactosamina (Van Damme *et al.*, 1998). Diversas outras famílias de *Amaranthus*, como as espécies *A. spinosus*, *A. leucocarpus* e *A. cruentus* contêm lectinas que são muitos similares com a amarantina. Nenhuma outra lectina relatada tem sido encontrada em outras famílias de plantas (Peumans *et al.*, 1998).

3. Especificidade de ligação ao carboidrato das lectinas de plantas

Lectinas distinguem-se entre si de todas as outras proteínas de plantas pela sua capacidade de ligar a carboidratos simples ou complexos. Podem ser subdivididas em grupos de acordo com a sua especificidade por carboidratos (Tabela 2). Há algumas décadas, somente as lectinas ligantes de manose/glicose, Gal/GalNAc, GlcNAc/(GlcNAc)_n, fucose e ácido siálico eram conhecidas (Peumans *et al.*, 1998).

Um novo grupo de especificidade foi adicionado, o de lectinas de monocotiledôneas ligantes de manose (exibe especificidade exclusiva por manose). A existência de outro grupo foi revelada por recentes descobertas, as lectinas ligantes de manose/maltose de *Calystegia sepium* (Peumans *et al.*, 1998). Muitas lectinas não se relacionam neste grupo de especificidade devida não se ligarem a mono ou oligossacarídeos, pois requerem glicanos mais complexos para uma eficiente inibição da sua atividade hemaglutinante (Peumans *et al.*, 1998).

A especificidade das lectinas é usualmente determinada por ensaios de inibição da aglutinação das células ou da precipitação de glicoproteínas, na qual diferentes carboidratos são utilizados para verificar a sua capacidade de inibir a atividade da lectina. A ligação entre sacarídeos e lectinas pode ser observada por métodos físicos-químicos, como equilíbrio de diálise, espectrofotometria, fluorometria e ressonância magnética (Sharon *et al.*, 1990).

Tabela 2: Especificidade de ligação a Carboidrato das Lectinas de Plantas^a

<i>Especificidade</i>	<i>Lectinas</i>
Grupo Fucose	
Fucose	<i>Ulex europaeus</i>
Grupo Galactose/ N-acetilgalactosamina	
Galactose>>GalNAc	Jacalina (<i>Artocarpus integrifolia</i>)
Gal=GalNAc	<i>Clerodendron trichotomum</i>
Gal<<GalNAc	Soja (<i>Glycine max</i>)
Grupo N-acetilglicosamina	
GlcNAc	Germe de Trigo (<i>Triticum aestivum</i>)
(GlcNAc) _n	<i>Urtica dioica</i>
Grupo Manose	
Manose	<i>Galanthus nivalis</i>
Manose/Glicose	Con A (<i>Canavalia ensiformes</i>)
Manose/Maltose	<i>Calystegia sepium</i>
Grupo Àcido Siálico	
Àcido Siálico	Germe de trigo (<i>Triticum aestivum</i>)
Neu5Ac α (2,6)Gal/GalNAc	<i>Sambucus nigra</i>
Neu5Ac α (2,3)Gal/GalNAc	<i>Maackia amurensis</i>
Grupo de Glicanos Complexos	
Especificidade com complexos conhecidos	PHA (<i>Phaseolus vulgaris</i>)
Especificidade com complexos desconhecidos	<i>Euonymus europaeus</i>

^aadaptada de Peumans *et al.*, 1998.

3- Características Gerais das Lectinas

Geralmente, as lectinas estão distribuídas por todas as partes da planta. A maior parte, porém, é encontrada nos órgãos de armazenamento. Outras partes das plantas como folhas, caule, raízes e flores principalmente, contém pouca quantidade que não necessariamente são idênticas em estrutura ou especificidade a carboidratos com as lectinas de órgãos de armazenamento (Rüdiger, 1998).

As lectinas são geralmente ricas em aminoácidos ácidos e básicos e pobres em aminoácidos contendo enxofre, sendo que a maioria é glicoproteína com conteúdo de açúcar variável.

Algumas lectinas são classificadas como metaloproteína, pois necessitam de cátions como Ca^{2+} e Mn^{2+} para realizar a sua atividade hemaglutinante, sendo que estes íons estão associados a uma série de aminoácidos conservados que participam da ligação ao carboidrato (Moreira *et al.*, 1990, Murdock *et al.*, 2002).

Lectinas são geralmente glicosiladas e compostas de 2 ou 4 protômeros ligadas não covalentemente. O peso molecular das lectinas de plantas varia de 8,5 a 265 kDa como em *Urtica dioica* (Broekaert *et al.*, 1989) e *Phaseolus lunatus* (Moreira *et al.*, 1990), respectivamente.

Uma das propriedades gerais de muitas proteínas que está diretamente envolvida com o mecanismo de defesa de plantas é sua acentuada estabilidade em amplas faixas de pH e temperatura. Muitas lectinas de plantas não são degradadas por proteases do intestino de animais e insetos (Peumans *et al.*, 1995).

4- Papel das lectinas de plantas no mecanismo de defesa das plantas

Plantas em seu habitat natural estão expostas continuamente à ameaças e ao ataque de uma variedade de organismos. Dependendo da sua taxonomia e danos que provocam nas plantas, estes organismos podem estar divididos em três grandes grupos: vírus, bactérias e insetos.

Um exemplo é a infestação de árvores *Citrus* com o micoplasma *Spiroplasma citri*, que pode resultar na completa aniquilação das plantações em curto período de tempo (Peumans *et al.*, 1995).

Diferente dos animais, as plantas não possuem um sistema imunológico para a sua defesa contra patógenos e microrganismos. Devido à absoluta imobilidade, as plantas não podem evitar ou escapar ao ataque de predadores. Entretanto, elas podem depender de outro sistema de defesa desenvolvido ao longo de sua evolução. Basicamente os mecanismos de defesas das plantas podem ser divididos em sistemas passivo e ativo.

Sistema de defesa ativo é também conhecido como reação de hipersensibilidade, é induzido em plantas resistentes em resposta a todos os grupos de patógenos de plantas conhecidos, como vírus, bactérias, fungos e nematóides (Cornelissen *et al.*, 1993). Esta reação de hipersensibilidade é caracterizada por uma rápida necrose localizada no sítio da infecção.

Sistema de defesa passivo é constitutivamente expresso para antecipar um ataque por predadores e patógenos. Neste sistema estão incluídos as barreiras físicas e adaptações morfológicas, como, por exemplo, espessas paredes celulares, sementes cobertas e a presença de espinhos e pêlos, as quais agem como obstáculo para a penetração de patógenos. Um outro sistema de defesa passivo é baseado na bioquímica e até certo ponto nas adaptações morfológicas. Um exemplo é o acúmulo constitutivo de componentes tóxicos de baixo peso molecular (ex: saponinas, alcalóides, glicosídeos, componentes fenólicos). Muitas espécies de plantas acumulam vários tipos de proteínas tóxicas nos tecidos como mecanismo de defesa, sendo que algumas podem ser muito

potentes, como a ricina e abrina. Outras exibem uma toxicidade seletiva contra um grupo particular de organismos (proteínas fungicidas, enzimas líticas, proteínas inseticidas, inibidores de α -amilase, inibidores de proteases e lectinas).

As evidências obtidas com relação à função das lectinas na defesa de plantas indicam que pelo menos algumas destas proteínas são componentes importantes do mecanismo de defesa passivo contra insetos fitófagos e animais herbívoros, e possivelmente contra microrganismos (Peumans *et al.*, 1995).

4.1- Papel bactericida das lectinas de plantas

A habilidade das lectinas de plantas para interagirem com carboidratos expostos na superfície de microorganismos tem proporcionado o possível uso destas proteínas como ferramenta na identificação de bactérias patogênicas (Gaidamashvili *et al.*, 2002).

A parede celular das bactérias, não somente previne qualquer interação entre os glicoconjugados da sua membrana com as proteínas que se ligam a carboidratos, como também evita que estas proteínas penetrem no citoplasma. Assim, as lectinas de plantas não podem alterar a estrutura e /ou a permeabilidade da membrana ou alterar o processo intracelular normal dos micróbios invasores. Desta maneira, se as lectinas desenvolverem um papel de defesa na planta contra bactérias, deve ser através de um mecanismo indireto, o qual se baseia na interação com estruturas glicídicas expostas na superfície da parede celular bacteriana ou polissacarídeos extracelulares (Peumans *et al.*, 1995).

Um dos primeiros exemplos documentados de mecanismo indireto envolve o estudo das interações entre *Pseudomonas solanacearum* e a lectina de batata. Experimentos *in vitro* demonstraram que somente o tipo avirulento foi reconhecido e aglutinado pela lectinas e o tipo virulento não reagiu devido à presença de polissacarídeos extracelulares (Sequeira *et al.*, 1977).

Outros exemplos de um mecanismo indireto pelo qual as lectinas de plantas podem apresentar papel de defesa contra micróbio são a inibição da mobilidade da bactéria. Tem sido observado que a lectina de *Datura stramonium* causa bloqueio no movimento normal de diferentes espécies de bactérias fitopatogênicas (Broekaert *et al.*, 1986). Para comprovar que a lectina de *D. stramonium* tem ação sobre a bactéria, incubou-se a lectina com fetuína, um açúcar para o qual a lectina apresenta alta afinidade, o que resultou na diminuição da mobilidade bacteriana.

A lectina de folha *Morus alba* (MLL 1) causou a aglutinação da bactéria fitopatogênica *Pseudomonas syringae pv mori* (Ratanapo *et al.*, 2001). Aglutininas de plantas medicinais da África do Sul foram examinadas com relação à interação com duas bactérias gram-positivas, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*. As aglutininas *Hypoxis hemerocallidea* e *Combretum mkhuzense* agregaram *S. aureus* na concentração de 4-5 µg/ml enquanto que as aglutininas *C. mkhuzense*, *Kniphofia spp.* e *Tulbaghia violacea* aglutinaram *B. subtilis* na concentração de 33,7 µg/ml (Gaidamashvili *et al.*, 2002).

Observações levando em consideração a ligação das lectinas de plantas a peptidoglicanos da parede celular bacteriana (como ácido murâmico, ácido N-acetilmurâmico e N-acetilglicosamina) revelaram que lectinas de sementes de várias espécies de leguminosas interagem fortemente com estes carboidratos da superfície bacteriana (Ajouba *et al.*, 1994). Evidentemente, a observação de que lectinas de semente de leguminosas podem reconhecer e se ligar à parede celular bacteriana não implica que esta tal interação ocorra *in vivo* e certamente não prova que estas lectinas estejam envolvidas na proteção das plantas contra bactérias. Entretanto, esta descoberta necessita de estudos mais detalhados a respeito dos receptores (afinidade de ligação) das lectinas de plantas, para definir seus potenciais organismos alvo.

4.2- Papel fungicida das lectinas de plantas

4.2.1- Parede Celular dos fungos

A parede celular dos fungos é altamente versátil, sendo continuamente expandida durante o crescimento e extensivamente remodelada durante o desenvolvimento. Quimicamente, a parede contém 80 a 90% de polissacarídeos, sendo o restante consistindo de proteínas e lipídeos. Em algumas espécies são encontrados quantidades apreciáveis de pigmentos (melanina), polifosfatos e íons inorgânicos.

Fisicamente, a parede celular é formada por microfibrilas entrelaçadas, embebida numa matriz amorfa. Quitina e celulose são os principais componentes microfibrilantes da maioria dos fungos filamentosos, enquanto que nas leveduras ou fungos unicelulares, a parede contém principalmente glucanas não celulósicas. Proteínas e vários polissacarídeos (glicanas, mananas, galactanas e heteropolissacarídeos) são as principais substâncias cimentantes. Os monossacarídeos mais freqüentemente encontrados na parede celular dos fungos são: D-glicose, N-acetil-D-glicosamina, D-manose, D-galactose, D-galactosamina, L-fucose, D-glicosamina, xilose e ácido D-glicurônico. Desses, glicose, N-acetil-D-glicosamina e manose são encontrados na maioria dos fungos. Ocasionalmente ramnose, ribose e arabinose podem ser observadas (Bartinicki-Garcia, 1968).

4.2.2- Contaminação por fungos

Os fungos causam grandes prejuízos na agricultura, pois estes são responsáveis pela deteriorização dos grãos. Da mesma maneira que os insetos, a infecção causada por fungos começa no campo e é levada para locais de estocagem. A umidade relativa alta é um fator crucial para a infecção por fungos. O aumento no grau de umidade nos locais de armazenagem pode ocorrer por diversos fatores: se o produto não secou suficientemente depois da colheita, se ocorreu infestação por insetos, que resulta em manchas quentes e

umidade aumentada, ou se foi empregada técnica de armazenamento imprópria que permite contato com água de chuva ou condensação de umidade. A infecção causada por fungos resulta na redução da qualidade do grão, mudança na coloração, gosto, cheiro, valor nutricional, aumento do teor de ácidos graxos livres e redução da capacidade de germinação (Santoso *et al.*, 1996).

A presença de insetos pode ter um efeito profundo na disseminação de doenças causadas por fungos, pois podem transmitir os esporos aumentando a área susceptível à infecção fúngal, o que eventualmente pode acarretar o aumento da produção de micotoxinas, substâncias tóxicas produzidas por estes durante o crescimento e desenvolvimento. Como as micotoxinas são substâncias bastante estáveis e não são destruídas durante o processamento dos alimentos, o único meio de evitá-las é prevenir o crescimento dos fungos (Sallam, 2000).

Dunkel *et al.* (1982) mostraram que algumas espécies de insetos de armazenamento são disseminadoras de fungos, enquanto outras são exterminadoras; alguns fungos de armazenamento atraem insetos e promovem o aumento da população desses, enquanto outros os repelem ao secretar toxinas prejudiciais aos insetos. Portanto, o conhecimento das relações biológicas básicas entre insetos e fungos no ecossistema do grão armazenado é importante para o manejo destes. Vários estudos demonstram a importância dos insetos como facilitadores da infecção fúngal. Na Nigéria, Acholo *et al.* (1997) mostraram que o besouro de inhame, *Heteroligus meles*, maior causador de danos aos tubérculos, facilita a expansão de diferentes espécies de *Fusarium*, bem como de outros fungos menos abundantes.

4.2.3- Fungos fitopatogênicos

Os fungos são organismos eucarióticos e em sua maioria filamentosos, que ocorrem no solo como células ou estruturas de repouso (esporos), como hifas (filamentos microscópicos) ou micélio (conjunto de hifas). Não possuem clorofila, sendo, portanto

heterotróficos, obtêm energia e carbono de compostos orgânicos. Embora não sejam predominantes em termos numéricos, representam 70-80% da biomassa microbiana da maioria dos solos. Sua ocorrência está diretamente relacionada ao teor de matéria orgânica, sendo também influenciada pelo pH e umidade do solo. Predominam em solos ricos em matéria orgânica e com pH na faixa ácida. Milhares de espécies, pertencentes a todas as classes, já foram isoladas do solo, sendo a maioria pertencente à classe *Deuteromycetes*. Os fungos mais representativos do solo são espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizoctonia*, *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Phytium*, *Fusarium*, *Phytophthora*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Phycomyces*, *Verticillium*, *Pilobulus*, *Humicola*, *Gaeumannomyces* e *Chaetomium* (Siqueira *et al.*, 1988).

A principal função dos fungos resulta da sua atividade heterotrófica sobre restos vegetais depositados no solo e a formação de relações simbióticas, mutualistas (micorrizas) e parasíticas (doenças) com as plantas. São importantes agentes de controle biológico de outros fungos e nematóides fitopatogênicos.

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

4.2.4- Mecanismo de ação de lectinas sobre fungos

Devido a sua especificidade, lectinas ligante de quitina sem atividade enzimática podem estar incluídas na função de defesa das planta contra fungos. Como exemplos podem ser citadas a heveína (4,7 kDa), proteína rica em cisteína, extraída do látex da *Hevea brasiliensis* (Archer,1960) e que apresenta homologia com outras proteínas ligantes de quitina como a WGA (36 kDa) (Wright *et al.*, 1985); e a UDA de

peso molecular de 8,5 kDa (Chapot *et al.*, 1986) e outras quitinases de plantas (Boller, 1988).

Em 1975, foi observado que aglutinina de germe de trigo (WGA) inibia a germinação de esporos e crescimentos de hifas de *Trichoderma viride* e interferia na síntese de quitina (Mirelman *et al.*, 1975). Esta proteína interage especificamente com oligômeros de quitina (Allen *et al.*, 1973) e pode ligar-se às extremidades de hifas e esporos jovens, além de possuir afinidade por zigósporos.

Ciopruga *et al.* (1999) estudaram o efeito da WGA sobre *Fusarium graminearum* e *Fusarium oxysporum* e mostraram que a ligação dessa lectina à parede celular dos fungos afetou o compartimento interno e o crescimento dos germens, o que pôde ser comprovado pelas mudanças drásticas na morfologia dos fungos, tais como a lise das hifas e o extravasamento do conteúdo celular. Essas observações são consistentes com o papel de proteção contra fungos das lectinas ligantes de quitina, que poderia diminuir o desenvolvimento da parede celular por se ligar aos polímeros de N-acetilglicosamina, desestabilizando assim o equilíbrio entre a hidrólise e a síntese de quitina da parede celular dos fungos (Bartniki-Garcia, 1973).

Lectina de rizomas de *Urtica dioica* (UDA) possuem propriedade fungicida apesar de não apresentarem atividade quitinase, inibindo o crescimento de *Botrytis cinerea*, *Trichoderma hamatum* e *Phycomyces blakes leeanus*. Pouco é conhecido sobre o mecanismo da inibição do crescimento dos fungos por UDA; sugere-se que, devido ao pequeno tamanho, a UDA penetre a parede celular e afete a sua síntese (Broekaert *et al.*, 1989; Van Parijs *et al.*, 1992).

Does *et al.* (1999) expressou o gene de *Urtica dioica*, à isolectina 1 em folhas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) e verificou a atividade fungicida contra *Botrytis cinerea*, *Trichoderma viride* e *Colletotrichum lindemuthianum*, na qual a inibição do crescimento pela isolectina 1 ocorreu em fases específicas do crescimento dos fungos e é temporal, sugerindo que os fungos apresentam um mecanismo adaptativo.

Outras lectinas apresentam efeitos inibitórios sobre o crescimento de fungos: lectinas de folha de *Ginkgo biloba* inibiu o crescimento das hifas de *Pellicularia sasakii* Ito (Huang *et al.*, 2000); homólogos a heveína (isolados de *Pharbitis nil* L.) exibem ação fungicida inibindo o crescimento das hifas de *B. cinerea* e *Phytophthora parasítica* em 98 % (Koo *et al.*, 1998). A lectina de *Talisia esculenta* (TEL) inibiu o crescimento dos fungos em 280 µg quando foram incubadas na presença de *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum lindemuthianum* e *Saccharomyces cerevisiae* (Freire *et al.*, 2002).

Recentemente, Kanrar *et al.*, 2002, expressou a heveína em mostarda e verificou a atividade fungicida contra *Alternaria brassicae*, uma das mais comuns e destrutivas doenças de sementes de mostarda na Índia foi diminuída em 60 %.

As quimerolectinas também estão envolvidas na defesa de plantas contra fungos. As quimerolectinas com ação fungicida pertencem à classe das quitinases de classe I que possuem na região N-terminal um domínio ligante de quitina e na região C-terminal um domínio do tipo quitinase. Este último domínio, que confere atividade enzimática à proteína, é o responsável pela ação fungicida das quimerolectinas (Beintema, 1994).

4.3- Papel inseticida das Lectinas de Plantas

A membrana das células epiteliais ao longo do trato digestivo dos invertebrados fitófagos e animais superiores que se alimentam de planta estão expostos a proteínas presentes na dieta. Como conseqüência, estas células epiteliais são alvo potente para proteínas de defesa das plantas. Dependendo da interação que decorre da ligação da lectina com glicoproteínas, em particular na célula epitelial, o efeito nesta célula ou no órgão, ou possivelmente no organismo, pode ser favorável, neutro ou nocivo.

Invertebrados fitófagos foram o primeiro grupo de organismos expostos aos possíveis efeitos deletérios de lectinas. Historicamente a possível função de lectina na defesa de planta contra insetos foi documentada em 1976, quando Jansen e seus

colaboradores observaram que fitohemaglutininas (PHA) de *Phaseolus vulgaris* exibiam ação inseticida contra o bruquídeo *Callosobruchus maculatus* (Jansen *et al.*, 1976). Mais tarde foi demonstrado que a PHA não apresentava efeito inibitório sobre *C. maculatus* (Murdock *et al.*, 1990). Resultados obtidos por Huesing e seus colaboradores demonstraram que o efeito atribuído a PHA foi devido a uma contaminação pelo o inibidor de α -amilase (Huesing *et al.*, 1991a).

Entretanto, estudos posteriores comprovaram o efeito inseticida de outras lectinas. Observou-se mais tarde a atividade inseticida das frações de lectina de *Phaseolus acutifolius* (Pratt *et al.*, 1990) contra larvas do bruquídeo *Acanthoscelidis obtectus* e uma alta atividade inseticida de lectina de sementes de *Psophocarpus tetragonolobus* sobre larvas de *Callosobruchus maculatus* (Gatehouse *et al.*, 1991). A lectina de amendoim específica para manose/glicose apresentou ação antinutritiva para *Chilo partellus* (Law *et al.*, 1997); a lectina de *Galanthus nivalis* (GNA), estritamente específica para manose, e *Canavalia ensiformes* (ConA), ligantes de glicose/manose, mostraram efeito tóxico sobre larvas de *Lacanobia oleracea* (Fitches *et al.*, 1997, 1998; Gatehouse *et al.*, 1997, 1999). A lectina de *Talisia esculenta* ligante de glicose/manose causou efeito deletério aos coleópteros *Callosobruchus maculatus* e *Zabrotes subfasciatus* (Macedo *et al.*, 2002).

4.3.1- Morfologia da Digestão dos insetos

De acordo com a Figura 2, podemos observar um diagrama geral do canal alimentar de um inseto proposto por Terra *et al.* (1994). O intestino anterior é constituído pela boca onde encontramos as glândulas salivares quando presente em suas cavidades, faringe, esôfago e o papo. O proventrículo é um órgão de trituração em alguns insetos e em muitos deles, atua como uma válvula que controla a entrada do alimento na porção do intestino médio que é o local principal da digestão e absorção de nutrientes.

O intestino médio consiste de um tubo simples (ventrículo) que pode sofrer ramificações, dando origem ao ceco gástrico, onde se processam a produção de enzimas e

a maior parte da digestão e a absorção dos alimentos. O alimento atacado pelas enzimas é fracionado no interior da membrana peritrófica. Depois as partículas digeridas atravessam essa membrana e seguem, por um sistema de circulação, até as células, que absorvem os nutrientes (Terra *et al.*, 1991).

Na maioria dos insetos, o intestino médio é revestido por uma estrutura quitinosa, a membrana peritrófica, que separa o conteúdo luminal em dois compartimentos o espaço endoperitrófico e o espaço ectoperitrófico, que permite a passagem dos alimentos decompostos, enzimas e água. Na região do esfíncter, separando o intestino médio do posterior, os órgãos de excreção que se ramificam lateralmente são os túbulos de Malpighi. O intestino posterior inclui o íleo e o reto, envolvidos na absorção de água e íons, terminando no ânus.

A compartimentalização das enzimas é outra propriedade importante. Aquelas envolvidas na digestão inicial são encontradas no espaço endoperitrófico o qual é envolvido pela membrana peritrófica, cuja capacidade em compartimentalizar as enzimas digestivas depende de sua permeabilidade (Terra *et al.*, 1994). Portanto, a integridade desta membrana quando afetada pode interferir no processo de digestão e absorção de nutrientes e, conseqüentemente, causar danos no desenvolvimento do inseto (Shewry *et al.*, 1997, Habibi *et al.*, 2000).

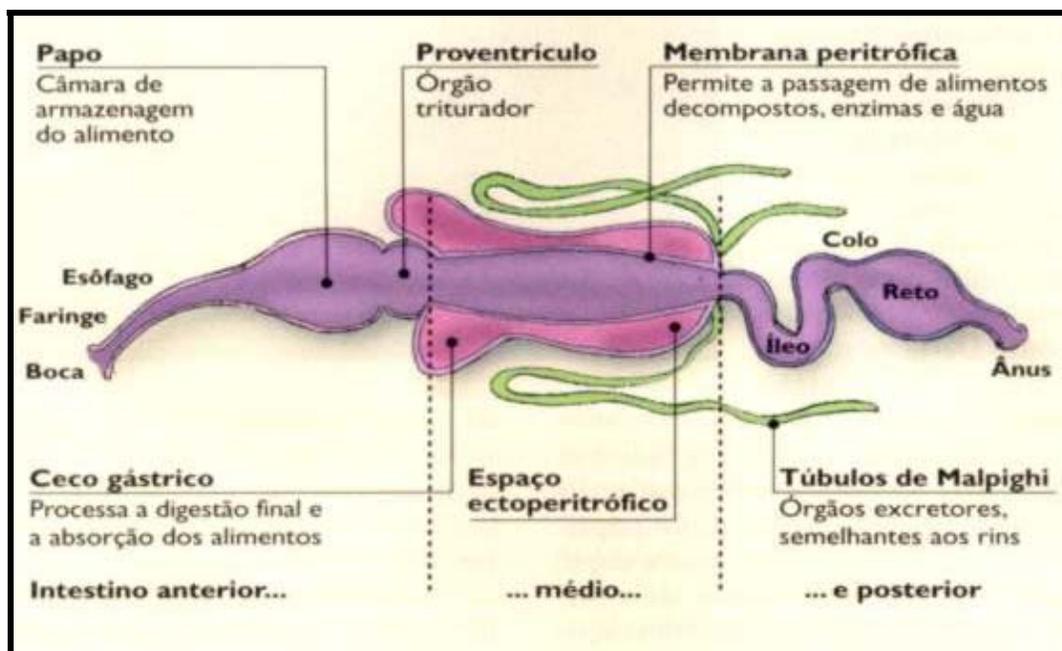


Figura 2: Diagrama Geral do canal alimentar de um inseto
(Adaptado de Terra *et al.* 1994)

4.3.2- Membrana Peritrótica dos insetos

A membrana peritrótica ou matriz (PM) do sistema digestivo dos insetos é uma estrutura seletivamente permeável que é secretada pelas células do mesentério e envolve o alimento ingerido (Richard *et al.*, 1977; Spence, 1991, Peters, 1992). Muitos insetos apresentam quitina e proteínas, algumas glicosiladas. As estruturas resistentes da membrana peritrótica são dadas pelas microfibrilas de quitina, uma subestrutura trabalhada, que embebem as proteinases da matriz superestrutural (Spence, 1991).

A membrana peritrótica pode ser de dois tipos: tipo I e tipo II. A PM do tipo I é formada ou por todo epitélio do intestino médio, ou somente por parte dele (região anterior ou posterior). Quando a PM é produzida somente na parte posterior, o epitélio da região anterior do intestino médio é protegido por um material viscoso, o gel ou matriz peritrótica, este é ausente de quitina. (Terra *et al.*, 2001).

A matriz peritrófica é comumente encontrada em insetos sem restrição na ingestão alimentar, ou seja, naqueles cuja alimentação baseia-se em substâncias de baixo peso molecular, cuja digestão luminal torna-se desnecessária. Poucas ordens não possuem a PM e muitas vezes, sua presença está associada com a idade do inseto como nos Siphonoptera, onde sua ocorrência é apenas no estágio larval, borboletas (Lepidoptera) que aparecem em alguns adultos (Peters, 1992). Nos Coleopteras da família Bruchidae não existe uma membrana bem definida, acredita-se que esta família apresente estruturas quitinosas (Firmino *et al.*, 1996).

A PM auxilia na digestão e absorção dos alimentos (responsável pela compartimentalização dos eventos digestivos) e age como uma barreira protetora contra os efeitos dos micróbios e partículas alimentares abrasivas. O rompimento da PM pode causar danos nas microvilosidades do epitélio do intestino médio e permite contato direto com patógenos podendo inibir o crescimento e desenvolvimento larval (Harper *et al.*, 1998).

4.3.3. Mecanismo de ação das lectinas sobre insetos

São quatro os prováveis mecanismos de ação onde a lectinas podem atuar na alimentação do inseto, causando o bloqueio da digestão, e conseqüentemente do crescimento e desenvolvimento (Murdock *et al.*, 2002).

1- o reconhecimento do alimento pelo inseto depende de receptores sensoriais localizados na ponta das patas, o tarso, nas antenas e boca. A ligação da lectina ao carboidrato associado com a membrana quimiosensorial pode bloquear o acesso ao alimento através de sinais químicos da proteína receptora. Assim, as lectinas podem romper a integridade das membranas sensoriais bem como, interferir na habilidade do inseto de detectar o alimento (Murdock *et al.*, 2002).

2- interação da lectina a matriz peritrófica. Como exemplo pode-se citar a ingestão da WGA por larvas de *Ostrinia nubilalis* causando anormalidades na estrutura da

membrana peritrófica (Harper *et al.*, 1998). Harper e seus colaboradores sugeriram duas hipóteses para o mecanismo de ação da WGA: alta afinidade da lectina pelos oligômeros de GlcNac, o maior componente da membrana peritrófica e a ligação à glicoproteínas da membrana.

3- interação com as células epiteliais digestivas do intestino médio dos insetos. Estas células secretam enzimas digestivas e absorvem os produtos químicos da digestão. Vários estudos têm demonstrado o efeito das lectinas que se ligam à superfície das células epiteliais. Zhu-Salzman *et al.* (1998) preparou uma série de mutações em sítios específicos com a lectina de *Griffonia simplicifolia*, ligante de GlcNac. As formas mutantes rGSII que preservaram a capacidade de ligar a GlcNac também mantiveram a habilidade para ligar-se aos intestinos médios, e diminuíram o crescimento e desenvolvimento de *Callosobruchus maculatus*.

4- interferência nas enzimas digestivas e proteínas assimilatórias, inibindo a digestão e absorção do alimento. Dependendo da resistência da lectina à proteólise pelas enzimas digestivas do inseto e de sua especificidade para carboidratos, as lectinas podem se ligar a diferentes partes do intestino delgado, causando várias mudanças na função e morfologia (Pusztai *et al.*, 1990). Como exemplo de lectina resistente à digestão pelas enzimas digestivas de insetos, podemos citar a lectina de *Talisia esculenta* que mostrou uma forte resistência às enzimas digestivas papaína (proteínase cisteínica) e pepsina (proteínase aspártica) por homogeinatos do intestino médio dos bruquídeos *Callosobruchus maculatus* e *Zabrotes subfasciatus*, dois predadores do feijão de corda (Macedo *et al.*, 2002).

A exposição dos insetos à lectinas presentes na dieta pode gerar mudanças ultraestruturais no epitélio intestinal. O rompimento de microvilosidades e anormalidades das células epiteliais têm sido observado em *Nilaparvata lugens* quando alimentado com GNA (Powell *et al.*, 1998). Powell *et al.* (1998) revelou através de estudos imunohistoquímicos, a presença de GNA associada aos corpos gordurosos e a hemolinfa do Lepidoptera *Nilaparvata lugens*, provocando efeitos sistêmicos.

4.3.4- Toxicidade das lectinas a Coleopteras e Lepidopteras.

Coleopteras da família *Bruchidae* são considerados uma das grandes pragas das culturas de feijão. Estes insetos (pequenos besouros conhecidos por gorgulhos ou carunchos) atacam as sementes durante o armazenamento, afetando severamente a qualidade e a estocagem dos alimentos. Os principais coleópteros que predam os grãos estocados são: *Callosobruchus maculatus* (Fabr), *Zabrotes subfasciatus* (Borh) e *Acanthoscelides clandestinus* (Most) (Singh *et al.*, 1985). Outra ordem que se destaca é a dos Lepidopteras, da família *Pyralidae*, que são pequenas mariposas, denominadas traças que também são pragas de produtos armazenados como farinha de cereais, farelos. Uma das principais espécies de Lepidopteras é a *Anagasta kuehniella* (Zeller), que ocorre em regiões temperadas e subtropicais de todo mundo (Gullan *et al.*, 1994).

A lectina de sementes de *Koelreuteria paniculata* (KpLec), ligante de N-acetilglicosamina, exibe efeitos tóxicos sobre o desenvolvimento larval de *C. maculatus* e *A. kuehniella*, mostrando uma redução de 50 % no peso médio larval de *C. maculatus* a 0,7 % e uma redução de 50 % no peso médio larval de *A. kuehniella* a 0,2 % (Macedo *et al.*, 2003). A lectina isolada de folhas de *Griffonia simplicifolia*, específica para GlcNAc mostrou efeito tóxico no desenvolvimento de *C. maculatus* (Zhu-Salzman *et al.*, 1998). A lectina de *Talisia esculenta* ligante de glicose/manose produziu 90% de mortalidade quando incorporada a 2 % em dieta artificial para *Callosobruchus maculatus* e *Zabrotes subfasciatus* (Macedo *et al.*, 2002).

Algumas lectinas têm mostrado efeito sobre algumas espécies de lepidópteros: lectinas de germe de trigo, *Bauhinia purpurea* e *Ricinus communis* (ligantes de GlcNAc, GalNAc e Gal, respectivamente) foram letais para *Ostrinia nubilalis* quando oferecidas em dieta a 2%, porém a aglutinina de *Galanthus nivalis* (GNA) e *Canavalia ensiformes* (Con A) quando incorporadas em dieta artificial exerceram efeito detrimental sobre larvas de *Lacanobia oleracea* (praga do tomate) (Fitches *et al.*, 1998, Fitches *et al.*, 2001, Gatehouse *et al.*, 1999).

O efeito de várias lectinas de plantas com diferentes especificidades por carboidratos, também foram analisados sobre *Maruca vitrata* (praga que ataca legumes). A lectina de *Allium sativum* (Man), *Calystegia sepium* (Man/mal), *Pisum sativum* (Man/Glc), *Bauhinia purpúrea* (Gal/GalNAc), *Urtica dioica* (GlcNAc), *Maackia amurensis* (ácido siálico) e *Colchium autumnale* (glicanos complexos) promovem retardo no desenvolvimento de *Maruca vitrata* (Machuka *et al.*, 1999b).

5- Plantas transgênicas

Doenças causadas por patógenos são responsáveis por perdas substanciais nas colheitas todos os anos (Shah *et al.*, 1995). Estima-se uma perda anual de 37 % da produção mundial, sendo que 13 % são causados por insetos (Jouanin *et al.*, 1998).

O objetivo na produção de plantas transgênicas expressando genes de lectinas tem como objetivo a proteção de culturas. Vários experimentos têm apresentado evidências diretas que as lectinas podem atuar como uma proteção da planta contra insetos predadores e oferecem a possibilidade de investigar como as lectinas agem em associação com outros compostos defensivos presentes nas plantas (Gatehouse *et al.*, 1998).

Plantas transgênicas resistentes a insetos têm sido produzidas para plantações economicamente importantes no mundo como o milho, algodão, arroz e batata. Embora muita atenção tenha sido focada em genes resistentes a insetos de origem bacteriana, primariamente codificado a partir das toxinas do *Bacillus thuringiensis*, outros genes potencialmente inseticidas estão sendo examinados, incluindo as proteínas defensivas de plantas (Fitches *et al.*, 2001).

GNA, lectina ligante especificamente a manose, exibe toxicidade a insetos de diferentes ordens, incluindo Homoptera, Coleoptera, Lepidoptera. Linhagens transgênicas expressando GNA tem gerado várias espécies de plantas geneticamente modificadas tais como: batata (Birch *et al.*, 1999), tabaco (Hilder *et al.*, 1987), trigo (Stoger *et al.*, 1999),

arroz (Rao *et al.*, 1998) e cana-de-açúcar (Allsopp *et al.*, 1996). O efeito do consumo GNA pelos insetos varia entre as espécies devido à diferença no comportamento alimentar do inseto e digestão destes. Esta lectina recentemente foi expressa em cana-de-açúcar e testada contra dois Lepidopteras, *Eoreuma loftini* (Dyar) e *Diatraea saccharalis* (F.), ambos praga da cana-de-açúcar. GNA apresentou redução na longevidade das fêmeas adultas de ambas as pragas (Sétamou *et al.*, 2002).

II- OBJETIVOS

Este trabalho teve por objetivo, fazer um estudo das sementes de *Pouteria torta* (abiu piloso), com ênfase em seu conteúdo protéico, no que diz respeito as lectinas. Logo, pretendeu-se:

- Isolar e purificar a primeira lectina da família Sapotaceae, presente em sementes de *Pouteria torta*;
- Determinar a especificidade desta proteína por açúcares e diferentes tipos sanguíneos;
- Realizar a caracterização físico-química desta lectina, determinando sua massa molecular relativa e sua estabilidade a diferentes condições de pH, temperatura e agentes quelantes;
- Determinar a composição de aminoácidos e a seqüência do N-terminal;
- Avaliar as seguintes atividades biológicas da lectina de *P. torta*:
 - Potencial inseticida sobre *C. maculatus* e *A. kuehniella*;
 - Ação inibitória no desenvolvimento de fungos fitopatogênicos.

III. MATERIAIS

1- Árvores e Sementes de *Pouteria torta*

Pouteria torta (Mart.) Radlk, conhecida como abiu piloso, é uma espécie pertencente à família Sapotaceae. A árvore apresenta cerca de 8 a 14 metros de altura e 30 a 40 centímetros, suas folhas são do tipo coriáceas, concentrada nas extremidades dos ramos. *P. torta* é encontrada na região Amazônica, até o Rio de Janeiro, Minas Gerais, Goiás, São Paulo e Paraná, nas florestas semicíduas e pluvial (Lorenzi, 1992).

A madeira é apropriada para construção civil, marcenaria e obras internas de carpintaria. A árvore floresce durante os meses de outubro e novembro. Os frutos amadurecem em dezembro e janeiro. Os frutos são comestíveis e muito saborosos. As sementes são retiradas dos frutos através da abertura manual (Figura 3) (Lorenzi, 1992).

As sementes de *P. torta* foram coletadas no município de Três Lagoas-MS.

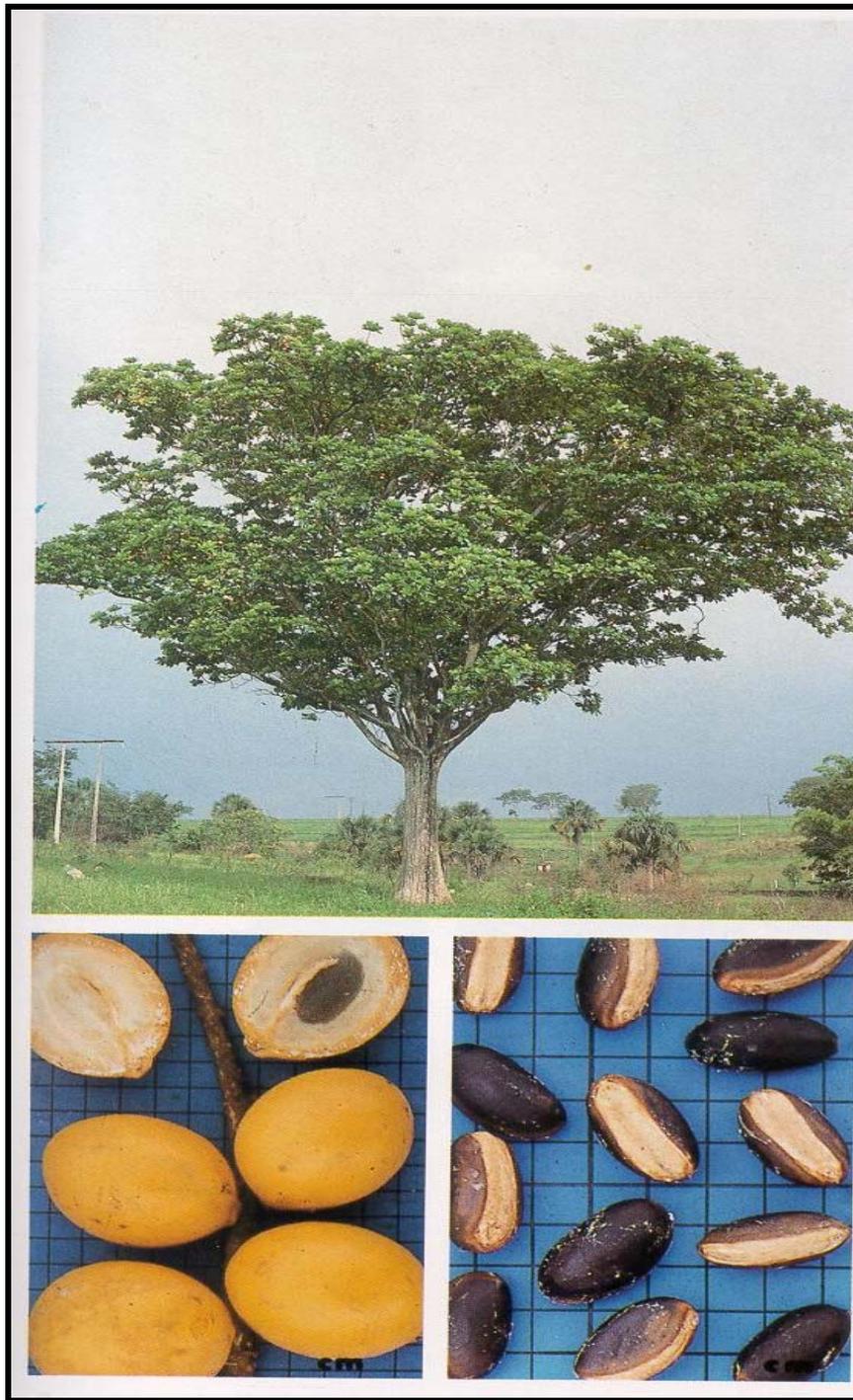


Figura 3: Árvore, frutos e sementes de *P. torta* (Lorenzi, 1992).

2- Insetos

Para estudo da atividade inseticida da lectina de *P. torta*, foram utilizados os insetos *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera) e *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera).

Callosobruchus maculatus Fabricius (Figura 4), é uma praga importante que ataca principalmente feijões de várias espécies do gênero *Vigna*, principalmente feijões caupi (Lienard *et al.*, 1994). É uma espécie pertencente à ordem Coleoptera, da família Bruchidae.



Figura 4: *C maculatus* sobre grãos de feijão *Vigna unguiculata* (Foto: P.C.Strikis)

O inseto *A. kuehniella* (Figura 5) é um dos principais predadores de produtos armazenados como milho (*Zea mays*), trigo (*Triticum aestivum*), arroz (*Oryza sativum*) e amendoim (*Arachis hypogea*). Porém mostra preferência alimentar por farinhas, farelos e outros produtos deixando-os, na maioria das vezes, impróprios para o consumo. O inseto *Anagasta kuehniella* Zell pertence à ordem Lepidoptera, família Pyralidae (Gullan *et al.*, 1994).



Figura 5: Inseto adulto de *A. kuehniella* (Foto: Van Waters G. Rogers)

Os insetos foram obtidos de colônias provindas do Departamento de Ciências Naturais, do Centro Universitário de Três Lagoas, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, do Laboratório de Purificação de Proteínas e Suas Funções Biológicas (LPPFB).

3- Fungos

Os fungos, *Colletotrichum musae* e *Fusarium oxysporum* foram cedidos pelo CNPF/EMBRAPA. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi obtida no Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará.

Fusarium oxysporum – ataca as folhas de cana-de-açúcar, café e feijão, além de causar murchamento das bananas.

Colletotrichum musae – responsável pela antracnose da bananeira. Esta doença causa podridão da coroa em bananeiras.

3- Reagentes

Reagentes para eletroforese: acrilamida, metilenobisacrilamida, Temed, SDS, Coomassie Brilliant Blue R-250 e persulfato de amônio foram adquiridos da Bio-Rad Laboratories (Rachamond, EUA).

Carboidratos utilizados: D(+) frutose, D(+) galactose, D(+) galactosamina, D(+) glicose, D(+) glicosamina, D(+) lactose, D(+) maltose, D(+) manose, N-acetilgalactosamina, N-acetilglicosamina, rafinose e D(+) sacarose (Sigma).

Os reagentes utilizados para a determinação da composição de aminoácidos foram adquiridos do Sigma Chemical Company (St. Louis, EUA) e Pharmacia.

As resinas utilizadas para cromatografia bem como os padrões de massa molecular foram adquiridos da Amersham Biosciences-Pharmacia (Uppsala, Sweden).

Os demais reagentes foram de grau analítico e obtido comercialmente.

IV- MÉTODOS

1- Preparação da Farinha

Para a obtenção da farinha de *P. Torta*, as sementes foram descascadas e trituradas em moinho elétrico. Em virtude das sementes serem ricas em lipídeos, a farinha foi submetida a uma delipidação por hexano. A farinha de fina granulação foi armazenada em frascos hermeticamente fechados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior utilização.

2- Extração de Proteínas

As proteínas presentes nas sementes de *P. torta* foram extraídas em solução salina 0,15 M, na relação 1:5 (p/v). A mistura foi mantida sob agitação constante por 12 hs. Após, foi centrifugada a 6000 rpm durante 30 min, obtendo-se assim um precipitado que foi descartado, e um sobrenadante denominado de extrato bruto (E.B.), que foi dializado contra água destilada e liofilizada, sendo utilizado nas etapas posteriores de purificação da lectina.

3- Dosagem de Proteínas

A concentração das proteínas obtidas foi determinada pelo método de Bradford (1976). A concentração de proteína foi avaliada utilizando albumina sérica bovina como padrão. O método consiste de 100 μl da amostra mais 2,5 ml da solução de Bradford. A leitura foi realizada 10 minutos após o início da reação a 595 nm.

4- Atividade hemaglutinante

Os testes de atividade hemaglutinante foram realizados em placas de microtitulação contendo 8 fileiras de 12 poços cada, os quais foram preenchidas com 50

μl de solução salina 0,15 M e em seguida acrescidos 50 μl da amostra nos primeiros poços das fileiras. A amostra foi então diluída serialmente, com agitação e transferência de 50 μl para o poço seguinte até o penúltimo poço da fila. Terminadas as diluições, foram adicionados 50 μl da suspensão de eritrócitos a 2 % (v/v).

As placas foram mantidas em repouso por aproximadamente 1 hora em estufa a 37 °C. A mínima concentração (ou maior diluição) que permite visualizar os eritrócitos hemaglutinados foi denominado como título hemaglutinante.

Os poços que continham somente a suspensão de eritrócitos serviram como controle.

5- Purificação da lectina de *Pouteria torta*

5.1- Cromatografia de exclusão molecular de Sephacryl S-200 HR Hi-Prep

Uma coluna (80 x 2,0 cm) Sephacryl S-200 HR Hi-Prep foi equilibrada em bicarbonato de amônio 0,05 M, pH 8,0. Em seguida 400 mg de EB de *P. torta* foi dissolvida no mesmo tampão de equilíbrio e aplicada à coluna, a leitura foi realizada a 230 nm.

Frações de 3 ml/tubo foram coletadas a um fluxo de 30 ml/hora; as frações protéicas com atividade hemaglutinante foram separadas para serem analisadas em PAGE-SDS.

5.2- Cromatografia de troca iônica em coluna Source 15Q

A fração SIII (20 mg) com atividade hemaglutinante proveniente da coluna Sephacryl S-200 HR Hi-Prep foi submetida à cromatografia em coluna de troca iônica Source 15Q (2 ml leito) equilibrada com tampão Tris 0,05 M, pH 8,0. Após eluição às proteínas não absorvidas na coluna, um gradiente salino de 0 a 1,0 M foi utilizado. A

leitura foi realizada a uma absorvância de 230 nm, sendo utilizado um fluxo de 45 ml/hora.

As frações protéicas com atividade hemaglutinante foram separadas para análise em PAGE-SDS.

5.3- Cromatografia em coluna de troca iônica HiTrap SP

A fração com atividade hemaglutinante proveniente da coluna Source 15Q foi purificada em coluna de troca iônica HiTrap SP (de leito 5 ml), equilibrada em tampão acetato 0,05 M, pH 5,0. 40 mg da fração P1 foi aplicado a coluna. Após a eluição das proteínas não absorvidas na coluna, um gradiente salino de 0 a 1,0 M foi utilizado. A leitura foi realizada a uma absorvância de 230 nm, sendo utilizado um fluxo de 45 ml/hora.

Os picos de proteínas com atividade hemaglutinante foram analisados em PAGE-SDS.

5.4- Cromatografia de afinidade em coluna de glicose-agarose

PtLec (6,0 mg) foi aplicada em coluna de glicose-agarose (0,5 x 6,0 cm), equilibrada com tampão fosfato 0,1 M, 0,1 M de NaCl, pH 7,6. A eluição de PtLec se deu com HCl 0,1 M. A leitura foi realizada a uma absorvância de 230 nm, sendo utilizado um fluxo de 10 ml/hora.

5.5- Cromatografia de afinidade em coluna de manose-agarose

PtLec (1,0 mg) foi aplicada em coluna de manose-agarose (2,0 x 1,0 cm), equilibrada com tampão fosfato 0,1 M, 0,1 M de NaCl, pH 7,6. A eluição de PtLec se deu com HCl 0,1 M. A leitura foi realizada a uma absorvância de 230 nm, sendo utilizado um fluxo de 10 ml/hora.

6- Caracterização físico-química da lectina de *P. torta*

6.1- Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS

A eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS foi realizada segundo o método descrito por Laemmli (1970). O gel de poliacrilamida foi feito em uma concentração de 15 % (a uma proporção de acrilamida/bisacrilamida 30:0,8). O gel de separação da amostra (main gel) foi preparado em tampão tris/HCl 0,1 M, pH 8,8 contendo SDS 20 %, TEMED (concentrado) e persulfato de amônio (100mg/ml). O gel superior ou de aplicação (stanking gel) foi preparado usando acrilamida/bisacrilamida 5 % em tampão tris/HCl 0,1 M, pH 6,8, SDS 20 %, persulfato de amônio (100 mg/ml) e TEMED concentrado. A eletroforese PAGE-SDS foi realizada em um sistema duplo de placas SE 250 Mighty Small (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA).

Para o preparo das amostras, utilizou-se tampão de amostra (tris/HCl 0,1 M, pH 6,8, contendo 10 % de glicerol, 0,02 % de azul de bromofenol e 20 % de SDS). Como tampão de corrida foi utilizado glicina/tris-HCl 0,18 M, 0,25 M, pH 8,3, contendo 0,1 % de SDS. A corrida foi realizada a 15 mA, deixando a voltagem livre. Um marcador de peso molecular foi utilizado como padrão.

A coloração seguiu uma modificação do procedimento de Weber *et al.*, (1969), usando-se Comassie Blue R-250 0,25 %, dissolvido em metanol, ácido acético glacial e água destilada (4:1:5; v:v:v) durante 2 horas, à temperatura ambiente (26 °C). O gel foi descorado para a visualização das bandas de proteínas por uma solução descorante, contendo metanol, ácido acético e água destilada (4:1:5; v:v:v). A placa foi conservada em solução de glicerol 10 % em água.

6.2- Efeito do pH sobre a atividade hemaglutinante

Alíquotas de PtLec (140 PtLec $\mu\text{g/ml}$), com título mínimo de 3, foram separadas em eppendorfs e diluídas em tampões com os pHs variando de 3,0 a 11,0, e em seguida foram colocadas em banho-maria a 37 °C por 1 hora. Após, foram retiradas e equilibradas com NaOH ou HCl até o pH se estabilizar entre 7,0 e 8,0. Em seguida, fez-se o ensaio de hemaglutinação de modo que cada amostra foi testada em triplicata para posterior análise.

6.3- Efeito da temperatura sobre a atividade hemaglutinante

Alíquotas de PtLec (140 $\mu\text{g/ml}$), com título mínimo de 3, foram preparadas em eppendorfs e diluídas em solução salina 0,15 M. Em seguida, cada amostra foi submetida a diferentes temperaturas variando de 37 °C a 100 °C por cerca de 30 minutos. Após o término, as amostras foram colocadas em banho de gelo. O teste de hemaglutinação foi realizado com as amostras a uma temperatura de 37 °C. Cada amostra foi testada em triplicata.

6.4- Efeito de agentes quelantes sobre a atividade hemaglutinante

O requerimento de cátions divalentes para a atividade da lectina foi primeiramente investigado acrescentando-se EDTA ao ensaio de hemaglutinação (quela Ca^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+}). Depois, EGTA (quela Ca^{2+}) foi utilizado em experimento separado para confirmar se a atividade da lectina é dependente de íon cálcio.

Primeiramente, PtLec (com título mínimo de 3) foi diluída em solução de NaCl 0,15 M, e acondicionadas em eppendorffs. Em placas de microtitulação, adicionou-se em cada poço 50 μl de NaCl 0,15 M e 50 μl de EDTA 25 mM ou EGTA 25 mM em diluições seriadas, em seguida foi adicionado a lectina (140 $\mu\text{g/ml}$), deixando em incubação por 30 minutos. Após esse período, acrescentou-se 50 μl de hemácia a 2 % em cada poço e

levou-se a incubação por 1 hora. Controles para ambos os íons foram feitos com 50 µl de solução de NaCl 0,15 M, 50 µl do íon correspondente e 50 µl de hemácia. Cada ensaio foi realizado em triplicatas.

6.5- Determinação de massa molecular relativa de PtLec

A massa molecular relativa de PtLec foi determinada no sistema Akta-Prime utilizando uma coluna de filtração em gel Superdex 75 (50 x 1,0 cm), equilibrada primeiramente com tampão tris 0,1 M, NaCl 0,1 M, pH 8,0, sob fluxo 0,3 ml/min, e após com glicose 100 mM, calibrada com proteínas de massas moleculares conhecidas. Frações de 3,0 ml foram coletadas. Os marcadores utilizados foram: albumina (67 kDa), ovoalbumina (45 kDa), quimiotripsinogênio (23 kDa) e ribonuclease A (13,7 kDa).

6.6- Dosagem de carboidratos totais

A PtLec (140 µg/ml) foi submetida ao método de Dubois *et al.* (1956) para a determinação do conteúdo de carboidratos, utilizando como padrão a glicose. O método consiste em uma relação de 10 µl de amostra para 990 µl de água, com 25 µl de fenol 80 % e 2,5 ml de ácido sulfúrico (H₂SO₄). A leitura foi realizada a 490 nm.

6.7- Ação inibitória de carboidratos sobre a atividade hemaglutinante

Em placas de microtitulação foram adicionados 50 µl de diferentes carboidratos utilizando-se diluição seriada (concentração inicial de 0,1 M em NaCl 0,15 M), seguido da adição de 50 µl de PtLec (5 µg). As placas foram mantidas em repouso por 30 minutos e em seguida adicionou-se 50 µl da suspensão de eritrócitos humano tipo A a 2 % (v/v). Após repouso de 1 hora à temperatura de 37 °C, foi determinado o título hemaglutinante. Foram feitos os controles do ensaio: o controle da integridade dos eritrócitos (50 µl da suspensão de eritrócitos humano tipo A a 2 % em NaCl 0,15 M, mais 50 µl de salina);

controle da atividade hemaglutinante (50 µl da suspensão de eritrócitos humano tipo A a 2 % em NaCl 0,15 M, mais 50 µl de salina 0,15 M, mais 50 µl de PtLec (10 µg)).

6.8- Composição de aminoácidos

O aparelho de detecção e caracterização utilizado foi Biochrom 20 Plus da Amersham Biosciences-Pharmacia, onde a identificação dos aminoácidos foi feita através da cromatografia em coluna de troca iônica e catiônica para aminoácidos livres (HP ion exchange column), provenientes da derivatização com fenilisotiocianato dos aminoácidos obtidos da hidrólise ácida. Estas formas de cromóforos podem ser detectadas em concentrações de 1,0 nmol.

Para a hidrólise ácida foi colocado no fundo do frasco de reação 100 µl de uma solução de HCl 6,0 M, PtLec (100 µg), além de 1,0 mg/ml de fenol para evitar a formação de clorotirosina. Em seguida foi feito vácuo próximo de 1-2 torr até o início do borbulhamento do HCl. Fechado o vácuo, deixou-se entrar nitrogênio por 5 seg. Esta etapa foi repetida 3 vezes. A seguir a amostra foi levada ao forno de hidrólise, a 106 °C, durante 24 hs. Após este período o tubo de reação foi colocado a vácuo até 65 militorr para secagem da proteína hidrolisada.

Após a hidrólise, a amostra foi ressuspensa em água deionizada. Uma parte desta amostra (100 µl) foi misturada em 2 volumes de tampão de citrato de lítio 0,15 M, pH 2,5 para o equilíbrio da amostra.

A quantificação da amostra foi realizada por derivatização pós-coluna. Os aminoácidos foram separados usando um gradiente do tipo step wise com concentrações crescentes de tampão de citrato de amônia que variaram de 0,15 M a 3,5M e pH 2,5 a 3,5. Para integração e análise dos dados foi utilizado o programa EzChrom chromatography.

6.9- Determinação da estrutura N-terminal

6.9.1- Eletroforese em gel de poliacrilamida e transferência

Após a eletroforese em gel de poliacrilamida, de acordo com o item 6.1. Após a corrida, foi realizado a eletrotransferência de PtLec para uma membrana de PVDF, usando uma corrente de 400 mA por 60 minutos sob resfriamento à 10 °C. O tampão de transferência foi preparado com 2,8 g de tris, 13,7 g de glicina para 800 ml de água miliq e o volume final elevado a 1 litro com 200 ml de metanol, pH 8,5. Ao final da transferência, a membrana foi corada com Comassie blue R-250 por 3 minutos e descorada em solução descorante, para evidenciamento das bandas protéicas. O material de interesse foi selecionado para posterior seqüência.

6.9.2- Seqüência N-terminal

A seqüência direta do N-terminal foi realizada com a transferência da proteína da membrana de PVDF para o seqüenciador automático Procise. Os aminoácidos feniltioidantoína (PTH) foram identificados pela comparação de seus tempos de retenção com aqueles 20 aminoácidos padrões.

A sequencia N-terminal de PtLec foi pesquisada, quanto a sua homologia com outras lectinas vegetais usando os serviços eletrônicos BLAST-NCBI.

7- Estudo dos Papéis Biológicos de PtLec

7.1- Estudo da atividade inseticida

1- Criação dos insetos

Os bruquídeos *C. maculatus* (Figura 4) foram mantidos em sementes de *Vigna unguiculata* em frascos de vidro transparente, de boca larga, fechada com tampas metálicas perfuradas. As colônias foram mantidas em B.O.D. (câmaras de criação) a temperatura de 28-30 °C e umidade relativa em torno de 65-70 °C. A cada geração fez-se a infestação de novas sementes com fêmeas de 2 dias de idade, por um período de postura de 1 dia. Após um período de aproximadamente 28 dias, uma nova geração de insetos é obtida.

Os lepidópteros *A. kuehniella* (Figura 5) foram mantidos em uma sala de criação em temperatura relativa de 26-27 °C e umidade relativa de 65-70 °C. A dieta artificial foi preparada pela mistura de trigo integral, gérmen de trigo, farelo de trigo e levedura (8:2:1, 9:0:1). A cada geração foram realizados a infestação de novas colônias com ovos de um dia de ovoposição.

2- Preparação das sementes artificiais contendo PtLec para *C. maculatus*

Sementes artificiais (400 mg) foram preparadas pela mistura de farinha de feijão (*V. unguiculata*) da variedade EPACE-10 (cultivar suscetível) com a lectina PtLec. A lectina foi homogeneizada com a farinha de EPACE-10 num gral, transferidas para um molde de latão e prensados com auxílio de uma prensa manual. A pressão exercida deve permitir uma consistência e dureza que possibilite a postura e desenvolvimento do inseto (Macedo *et al.*, 1995).

As incorporações de PtLec foram realizadas nas concentrações de 0; 0,1; 0,15; 0,5 e 1,0 % e oferecidas as fêmeas de *C. maculatus* com 2 dias de nascido para

ovoposição. Após 20 dias, as sementes artificiais foram abertas e analisadas quanto ao número de larvas e o seu peso médio. Foram realizadas 30 sementes artificiais, cada uma com 4 ovos de *C. maculatus* (n=120).

3- Preparação da dieta artificial contendo PtLec para *A. kuehniella*

A dieta consistiu da mistura da farinha de trigo, germe de trigo, farelo de trigo, levedo (8:2:1,9:0,1) e PtLec. As incorporações foram realizadas nas concentrações de 0; 0,2; 0,5 e 1,0 %. Foram realizadas 20 dietas contendo 5 ovos em cada uma (n=100). Os experimentos foram analisados após 24 dias, verificando o peso médio e o número de sobreviventes de *A. kuehniella*. Também foi analisado o quanto de dieta foi consumida e a quantidade de fezes produzidas por cada larva.

3.1- Consumo e utilização de alimento

Larvas de 4º instar de *A. kuehniella* foram analisadas em relação ao consumo e utilização da dieta controle e ao tratamento com PtLec 0,5 %.

Com relação aos parâmetros nutricionais, foram determinados os seguintes índices, após 24 dias de alimentação em dietas controle e dietas com PtLec (Panizzi *et al.*, 1991).

a) Eficiência de conversão do alimento ingerido (%): $ECI = \frac{B}{I} \times 100$

b) Eficiência de conversão do alimento digerido (%): $ECD = \frac{B}{I.F} \times 100$

c) Digestibilidade aproximada (%): $AD = \frac{I-F}{I} \times 100$

d) Custo metabólico (%): $CM = 100 - ECD$

onde,

T- tempo de duração do período de alimentação;

I- alimento consumido;

F- alimento não digerido + produto de excreção;

I-F- alimento assimilado durante T;

B- peso médio da larvas durante T.

4- Análise estatística

A diferença estatística entre os grupos foi determinada através de análise de variância (*ANOVA*) e teste *Tukey* para múltiplas comparações. O $p < 0,05$ foi fixado para indicar significância estatística.

7.2- Estudo da atividade fungicida

1-Manutenção dos microrganismos

Cepas de *F. oxysporum* e *C. musae* foram inicialmente colocadas para crescer em placas de Petri contendo meio ágar Sabouraud, durante 10 dias à temperatura ambiente. Após este período, inóculos desse material (em forma de disco) foram transferidos para solução salina 0,15 M e estocados a 4 °C por até seis meses.

Células de *S. cerevisiae* crescidas em placas de Petri contendo meio ágar Sabouraud por três dias foram transferidas para ágar Sabouraud inclinado e armazenadas a 4 °C por até três meses.

2- Extração de esporos dos fungos filamentosos

Inóculos dos fungos foram colocados para crescer no centro de placas de Petri contendo ágar Sabouraud e deixados à temperatura ambiente por 10 dias. Após esse período, 10 ml de salina estéril 0,15 M foram vertidos sobre o crescimento micelial e a liberação de esporos feita com o auxílio de uma alça de Drigalski. Os esporos extraídos foram recuperados e quantificados em câmara de Neubauer com o uso de microscópio.

3- Preparo das células de levedura

Inóculos das células de *S. cerevisiae* foram retirados dos tubos contendo ágar Sabouraud inclinado e transferidos para placas de Petri contendo ágar Sabouraud. As células foram deixadas crescer por um período de três dias a temperatura ambiente. Após crescimento, um novo inóculo foi retirado das placas e transferido para solução salina 0,15 M para quantificação das células em câmara de Neubauer.

4- Ensaio de inibição do crescimento dos fungos

Esporos de *F. oxysporum* e *C. musae* (4×10^3) e células de *S. cerevisiae* (10.000 cel/ml) foram incubados em 200 μ l de caldo Sabouraud contendo 20 μ g/ml de lectina. O ensaio foi realizado em placas de cultura de células (96 poços), a temperatura ambiente por um período de 60 horas. A determinação da densidade ótica (reflexo do crescimento micelial e celular) foi feita de 6 em 6 horas em um “leitor de ELISA”, a 660 nm. Todo o procedimento de preparo do ensaio foi realizado em condições estéreis em capela de fluxo laminar. Todos os experimentos foram feitos em triplicata.

V-RESULTADOS

1- Purificação da lectina de *Pouteria torta*

1.1- Cromatografia de exclusão molecular Sephacryl S-200 HR Hi-Prep

Amostras de 400 mg de Extrato Bruto liofilizado foram solubilizadas em bicarbonato de amônia 0,05 M, pH 8,0 e aplicados à coluna Sephacry S-200 HR Hi-Prep. A eluição foi realizada com o mesmo tampão. As frações foram coletadas em um fluxo de 30 ml/h, coletando-se 3 ml/ tubo. A atividade hemaglutinante foi detectada nas frações eluídas de número 26 a 48 e 76 a 144, como mostra o perfil cromatográfico apresentado na Figura 6.

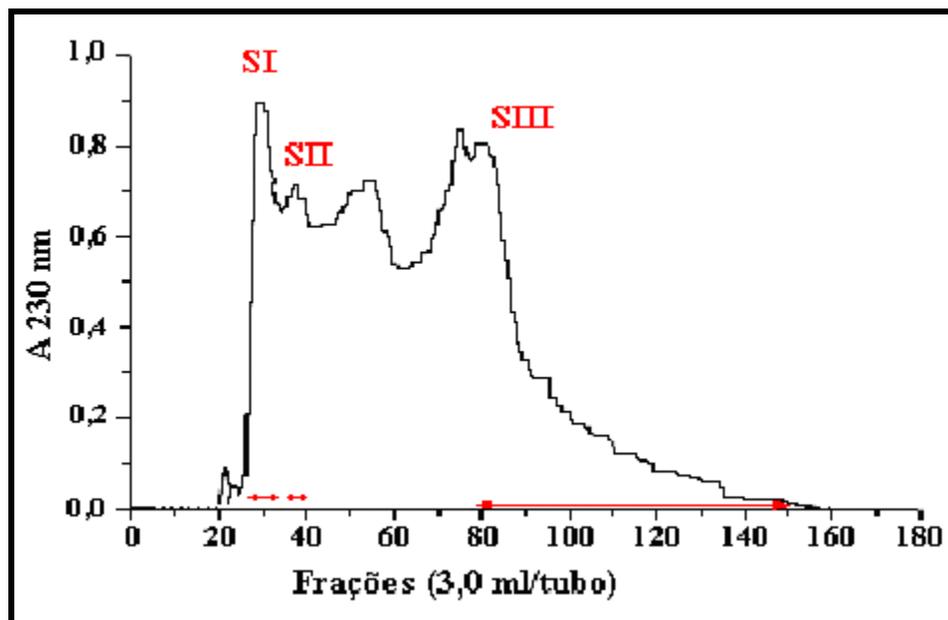


Figura 6: Cromatografia de exclusão molecular em coluna Sephacry S-200 HR Hi-Prep. A coluna (80 x 2,0 cm) equilibrada com tampão bicarbonato de amônia 0,05 M, pH 8,0. Foram coletadas frações de 3ml/tubo em um fluxo de 30 ml/hora. Absorbância monitorada a 230 nm. Atividade hemaglutinante (\longleftrightarrow).

1.2- Cromatografia de troca iônica em coluna Source 15Q

A fração SIII, proveniente da Sephacryl S-200 HR Hi-Prep foi submetida a uma cromatografia em coluna Source 15Q. A Figura 7 mostra um perfil cromatográfico de três picos de proteína, onde a atividade hemaglutinante foi detectada no primeiro pico.

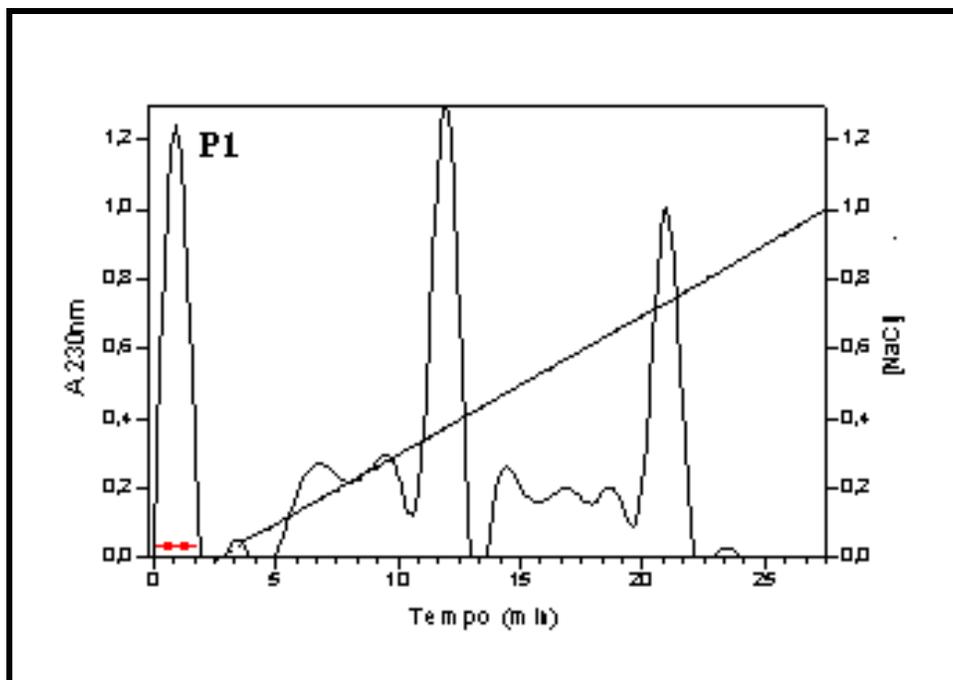


Figura 7: Cromatografia de troca iônica em coluna Source 15Q. A coluna (2 ml de leite) foi submetida a um fluxo de 45 ml/hora, usando tampão tris/HCl 0,05 M, pH 8,0 e foram coletadas frações de 3 ml/tubo. A absorbância foi monitorada a 230 nm. Amostra aplicada: 20 mg da fração SIII proveniente da coluna de exclusão molecular. Atividade hemaglutinante (\leftrightarrow).

1.3- Cromatografia de troca iônica em coluna HiTrap SP

A fração P1, proveniente da Source 15Q, foi submetida à cromatografia em coluna HiTrap SP. A Figura 8 mostra apenas um pico com atividade hemaglutinante eluído antes do gradiente, denominado PtLec.

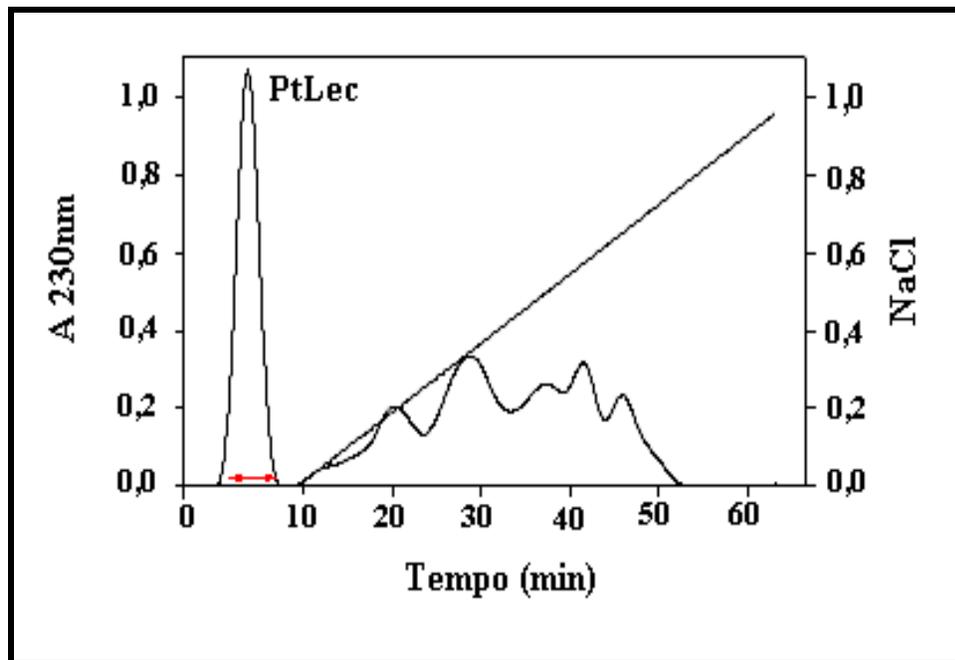


Figura 8: Cromatografia de troca iônica em coluna HiTrap SP. A coluna (5 ml de leito) foi submetida a um fluxo de 45 ml/hora, usando tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 8,0, foram coletadas frações de 3 ml/tubo. A absorbância foi monitorada a 230 nm. Amostra aplicada: 40 mg da fração P1 proveniente da coluna Source 15Q. Atividade hemaglutinante (↔).

1.4- Cromatografia de afinidade em coluna de glicose-agarose

PtLec foi submetida a uma cromatografia de afinidade em coluna de glicose-agarose. Observou-se que a lectina ficou retida, mostrando assim uma grande afinidade desta pela matriz (Figura 9).

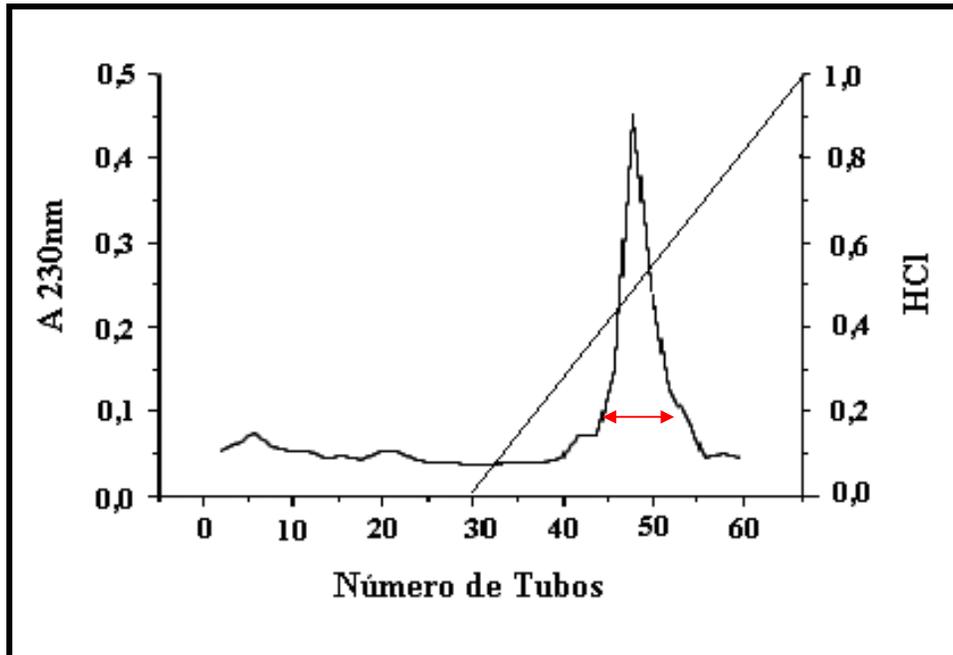


Figura 9: Cromatografia de afinidade em coluna de glicose-agarose. A coluna (0,5 x 6,0 cm) foi submetida a um fluxo de 10 ml/hora, eluída inicialmente com tampão fosfato 0,1 M, NaCl 0,1 M, pH 7,6, seguido de HCl 0,1 M, foram coletadas 2 ml por tubo. A absorbância monitorada a 230 nm. Atividade Hemaglutinante (\longleftrightarrow).

1.5- Cromatografia de afinidade em coluna de manose-agarose

PtLec foi submetida a uma cromatografia de afinidade em coluna de manose-agarose. Observou-se que a lectina ficou retida, mostrando assim uma grande afinidade desta pela matriz (Figura 10).

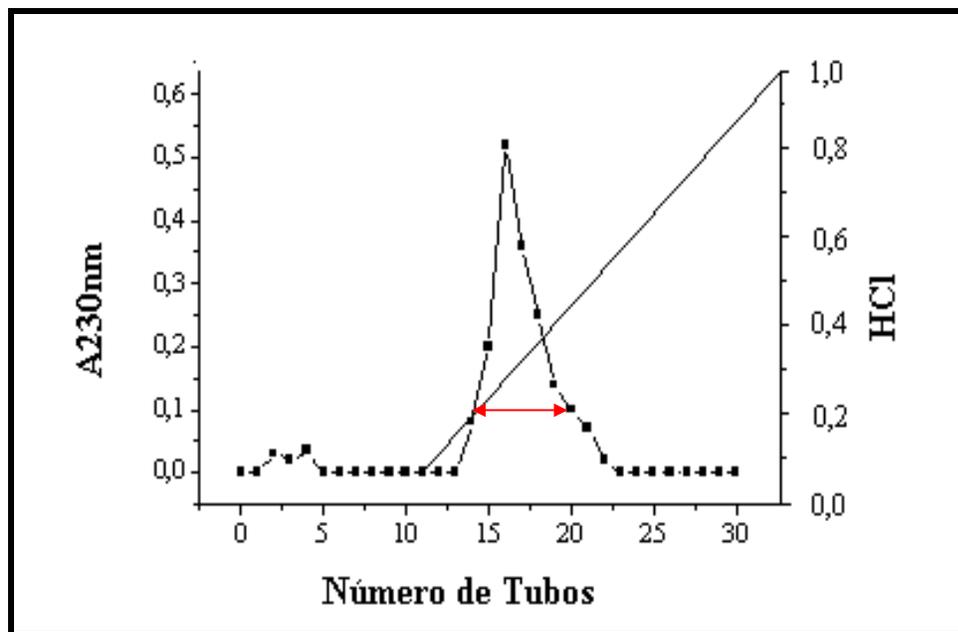


Figura 10: Cromatografia de afinidade em coluna de manose-agarose. A coluna (2,0 x 1,0 cm) foi eluída inicialmente com tampão fosfato 0,1 M, 0,1 M NaCl, pH 7,6, seguido de HCl 0,1 M, foram coletadas 0,5 ml/tubo. A absorbância monitorada a 230 nm. Atividade hemaglutinante (↔).

2- Estudo da Atividade Hemaglutinante

2- Atividade hemaglutinante de PtLec

A atividade hemaglutinante de PtLec (18,4 µg) foi determinada utilizando eritrócitos humanos (sistema ABO) e eritrócitos de animais (rato, coelho e bovino) padronizados a 2%. Os resultados, conforme a Tabela 3, mostraram que PtLec aglutina todos os tipos de eritrócitos em títulos variáveis e apresenta uma discreta seletividade para os grupos sanguíneos A e AB. Nos animais, a seletividade foi maior para os eritrócitos de bovino e de rato.

Tabela 3: Atividade hemaglutinante de PtLec

<i>Eritrócitos</i>	<i>Hemaglutinação (Título*)</i>
A	4
B	3
AB	4
O	3
Bovino	5
Coelho	3
Rato	5

***Título:** corresponde ao inverso da diluição a qual causou 50 % de aglutinação total dos eritrócitos.

3- Caracterização Físico-Química da lectina de *P. torta*

3.1- Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS

Eletroforese de poliacrilamida na presença de SDS 15 % (PAGE-SDS) foi realizada para verificar as etapas de purificação de PtLec. A Figura 11 mostra que PtLec apresenta (**Linha 5**) uma única banda principal com massa relativa de 10 kDa, tanto na ausência como na presença do agente redutor DTT (**Linha 6**).

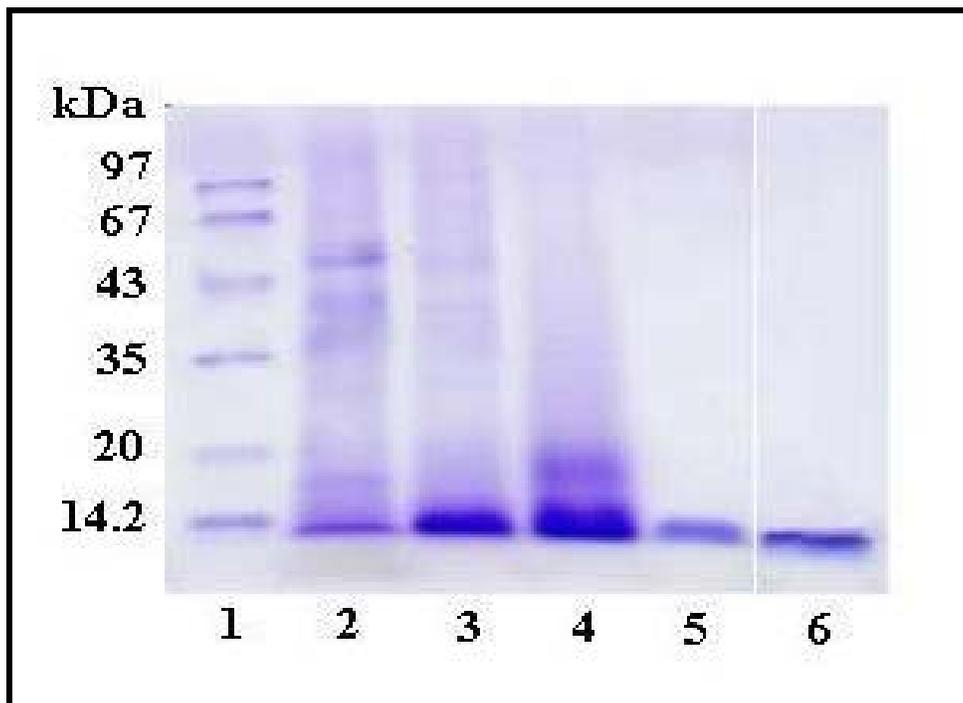


Figura 11: PAGE-SDS (15 %) das etapas de purificação da lectina de sementes de *P. torta*. 1- Marcador de peso molecular (kDa); 2- EB; 3-SIII; 4- P1; 5- PtLec e 6- PtLec + DTT.

3.2- Determinação da massa molecular relativa de PtLec

Através da cromatografia em coluna Superdex 75 pode-se determinar a massa molecular relativa de PtLec. A curva de calibração foi realizada com proteínas de massas moleculares conhecidas. O cálculo da massa relativa (Mr) foi realizado através do gráfico de $\log Mr \times Ve/Vo$, onde Ve é o volume de eluição da proteína e Vo é o volume de exclusão da coluna (Figura 12). Assim, o tempo de retenção de PtLec foi correspondente a massa molecular de 10 kDa.

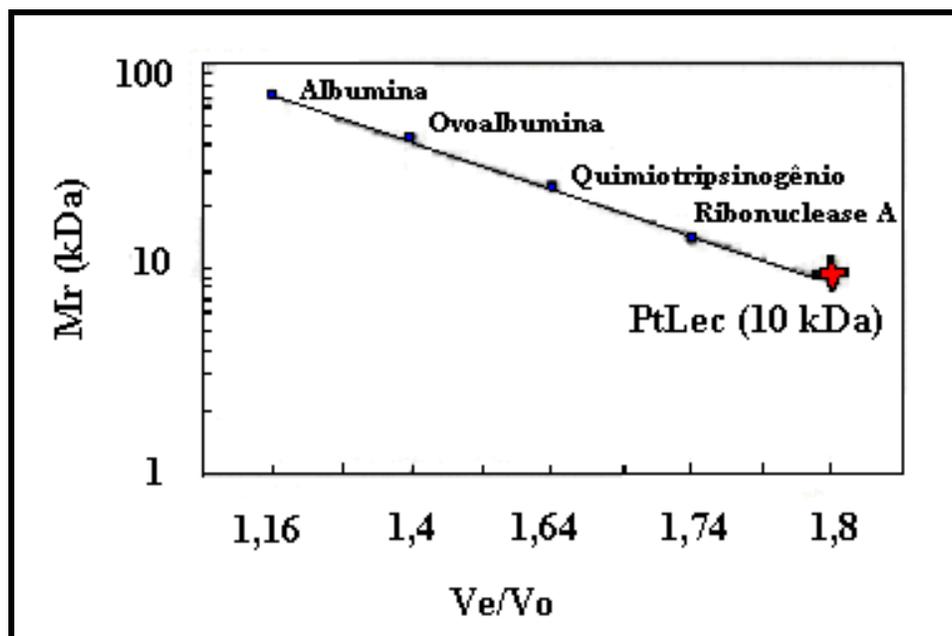


Figura 12: Determinação da massa molecular relativa de PtLec em coluna de exclusão molecular Superdex 75. A coluna Superdex 75 (50,0 x 1,0 cm) foi equilibrada com tampão tris 0,1 M, NaCl 0,1 M, pH 8,0. Fluxo de 0,3 ml/hora. Padrões de massa molecular: albumina (67 kDa), Ovoalbumina (45 kDa), Quimiotripsinogênio (23 kDa) e ribonuclease A (13,7 kDa).

3.3- Determinação da massa molecular de PtLec em coluna Superdex 75 equilibrada com glicose 100 mM

Através da cromatografia em coluna Superdex 75 equilibrada com glicose 100 mM pode-se verificar que o tempo de retenção de PtLec foi de 60 kDa (Figura 13).

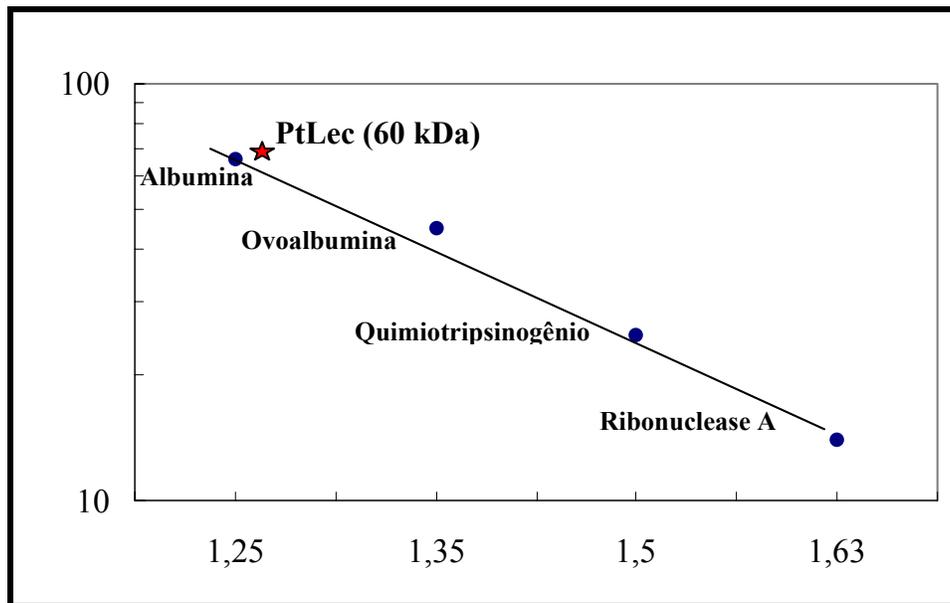


Figura 13: Determinação da massa molecular relativa de PtLec em coluna de exclusão molecular Superdex 75 equilibrada com glicose 0,1 M. A coluna Superdex 75 (50,0 x 1,0 cm) foi equilibrada com glicose 0,1 M. Fluxo de 0,3 ml/hora. Padrões de massa molecular: albumina (67 kDa), Ovoalbumina (45 kDa), Quimiotripsinogênio (23 kDa) e ribonuclease A (13,7 kDa).

3.4- Dosagem de carboidratos totais

A dosagem de carboidratos segundo Dubois *et al.* (1956) foi realizada para PtLec (140 µg). Foi observado que PtLec apresenta 22,8 % de açúcar neutro.

3.5- Ação inibitória de carboidratos sobre a atividade hemaglutinante

A ação inibitória dos carboidratos sobre a atividade hemaglutinante de PtLec foi analisada com dez diferentes açúcares, conforme a Tabela 4. Foi utilizado para os ensaios de hemaglutinação sangue A a 2%. Entre os açúcares testados somente tiveram ação inibitória D-glicose (0,096 mM) e D-manose (0,048 mM).

Tabela 4: Ação inibitória de carboidratos sobre a atividade hemaglutinante de PtLec

Carboidratos	<i>IC</i>₅₀ (mM) *
D-Frutose	ND
D-Galactose	ND
D-Glicose	0,096
D-Lactose	ND
D-Maltose	ND
D-Manose	0,048
N-acetilgalactosamina	ND
N-acetilglicosamina	ND
Sacarose	ND
Rafinose	ND

* **IC**₅₀: concentração necessária para inibir 50 % da atividade hemaglutinante. Em cada ensaio foram utilizadas 5µg de PtLec.

ND: Não detectado

3.6- Efeito da temperatura sobre a atividade hemaglutinante

A avaliação da estabilidade de térmica de PtLec foi realizada em diferentes temperaturas. A Figura 14 mostra o efeito das diferentes temperaturas na atividade hemaglutinante de PtLec. PtLec teve sua atividade hemaglutinante estável na faixa de temperatura de 37 a 60 °C. Nas temperaturas 70, 80 e 90 °C houve uma redução de 22 %, 34 % e 78 % na atividade hemaglutinante, respectivamente. À 100°C não foi detectado atividade hemaglutinante.

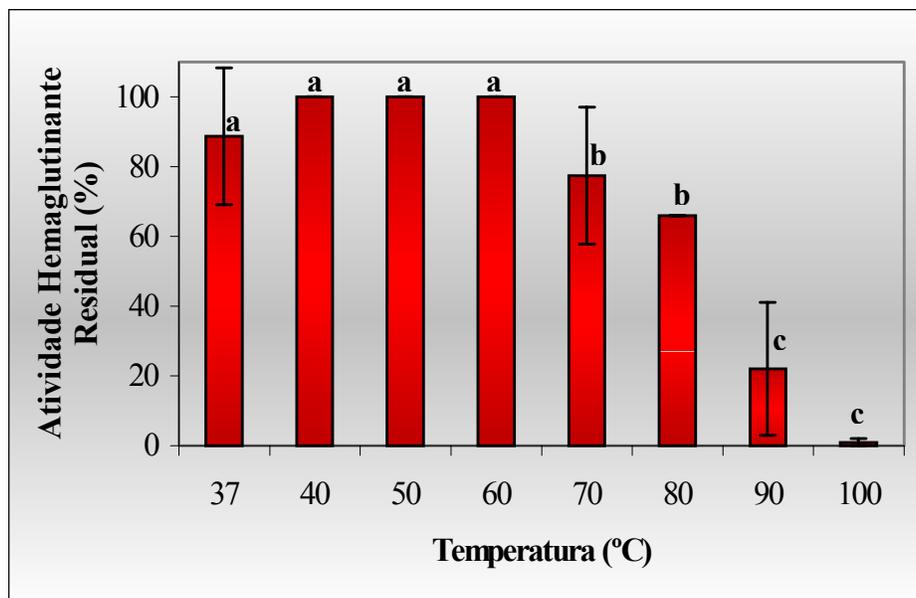


Figura 14: Efeito da temperatura na atividade hemaglutinante de PtLec . A atividade hemaglutinante foi determinada após 30 minutos de incubação nas referidas temperaturas. Cada valor representa a média \pm SD de 3 repetições. Letras diferentes indicam diferença significativa dos valores ($P < 0,05$) de cada temperatura quando comparados entre si. (ANOVA, teste de Tukey).

3.7- Efeito do pH na atividade hemaglutinante

A estabilidade de PtLec nos diferentes pHs (3 a 11) foi analisada. A Figura 15 mostra a atividade das amostras submetidas à variação de pH, sendo observado uma estabilidade na faixa de pH de 5 a 10. No pH 3 a 4 houve uma redução de 45 % na atividade hemaglutinante e a pH 11 houve uma redução de 67 % na atividade hemaglutinante.

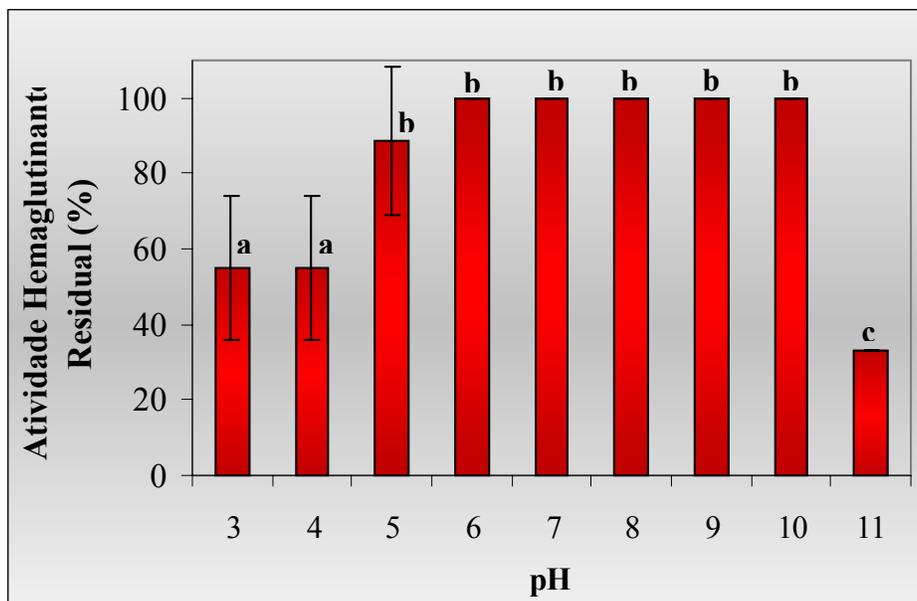


Figura 15: Efeito dos pH na atividade hemaglutinante de PtLec. A atividade hemaglutinante da lectina foi verificada após 30 minutos de incubação em tampões com diferentes pHs. Cada valor representa a média \pm SD de 3 repetições. Letras diferentes indicam diferença significativa dos valores ($P < 0,05$) de cada pH quando comparados entre si. (ANOVA, teste de Tukey).

3.8- Efeito de agentes quelantes sobre a atividade hemaglutinante

PtLec quando incubada com EDTA 0,025 M e EGTA 0,025 M mostrou perda da atividade biológica. A Adição do Ca^{2+} e Mn^{2+} restaurou a atividade hemaglutinante de PtLec (Tabela 5).

Tabela 5: Efeito dos agentes sobre a atividade hemaglutinante

Tratamento	Atividade hemaglutinante detectada
PtLec + EDTA	Não
PtLec + EGTA	Não
PtLec + Ca^{2+}	Não
PtLec + Mn^{2+}	Não
PtLec + Mg^{2+}	Não
PtLec + Ca^{2+} + Mn^{2+}	Sim
PtLec + Ca^{2+} + Mg^{2+}	Não

3.9- Composição de aminoácido

Os resultados da análise de aminoácidos são apresentados na Tabela 6. A análise foi evidenciada pela alta ocorrência de valina (Val), isoleucina (Ile), fenilalanina (Phe), lisina (Lys), arginina (Arg) e histidina (His) em comparação ao outros aminoácidos. Esta análise mostra que cerca de 20 % dos aminoácidos de PtLec são básicos e 7,3 % são ácidos. Os resíduos de triptofano (Trp) não são detectados pelo método.

Tabela 6: Composição de aminoácidos de PtLec

<i>Aminoácidos</i>	<i>Nº de resíduo por molécula (%)</i>
Asp	2,9
Thr	5,2
Asn	2,4
Glu	4,4
Gln	4,5
Pro	4,7
Gly	5,5
Ala	4,5
Val	8,8
Met	2,6
Cys	3,9
Ile	8,5
Leu	4,5
Tyr	5,8
Phe	7,4
Lys	7,0
His	6,0
Arg	7,0
Ser	3,5

3.10- Determinação da Estrutura N-terminal

A Tabela 7 ilustra a seqüência N-terminal de PtLec com 11 resíduos de aminoácidos. A análise do N-terminal revelou a seqüência EPXHLNEQMLQ. De acordo com a pesquisa em banco de dado PtLec não apresenta homologia com outras lectinas vegetais.

Tabela 7: Seqüência N-terminal de PtLec

<i>Lectina</i>	<i>Seqüência</i>
PtLec	EPXHLNEQMLQ

4- Os Papéis Biológicos de PtLec

4.1- Estudo da atividade inseticida

4.1.1- Efeito de PtLec sobre o desenvolvimento larval de *C. maculatus*

O efeito de PtLec sobre o desenvolvimento de *C. maculatus* foi analisado determinando-se o número de indivíduos e o peso médio das larvas de 4º instar em dietas artificiais contendo quantidades crescentes de PtLec. As Figuras 16 A e 16 B e 17 mostram os efeitos causados por PtLec no desenvolvimento e peso médios das larvas de *C. maculatus*. PtLec produziu 100 % de mortalidade quando incorporada a 0,3 (dado não mostrado), alcançando uma LD₅₀ de 0,12 % (Figura 16 A). As figuras 16 B e 17 mostram o efeito de PtLec em relação ao peso médio de *C. maculatus*. PtLec quando incorporada a 0,08 % causa uma redução de 50 % no peso das larvas (WD₅₀).

Análises de regressão mostraram que para cada aumento de 0,01 % na dose de PtLec ocorre um aumento de 4,98 % na mortalidade com um R² igual a 0,95. Nesse mesmo aumento na concentração de PtLec é verificado uma diminuição de 0,61 mg no peso médio (R² = 0,98).

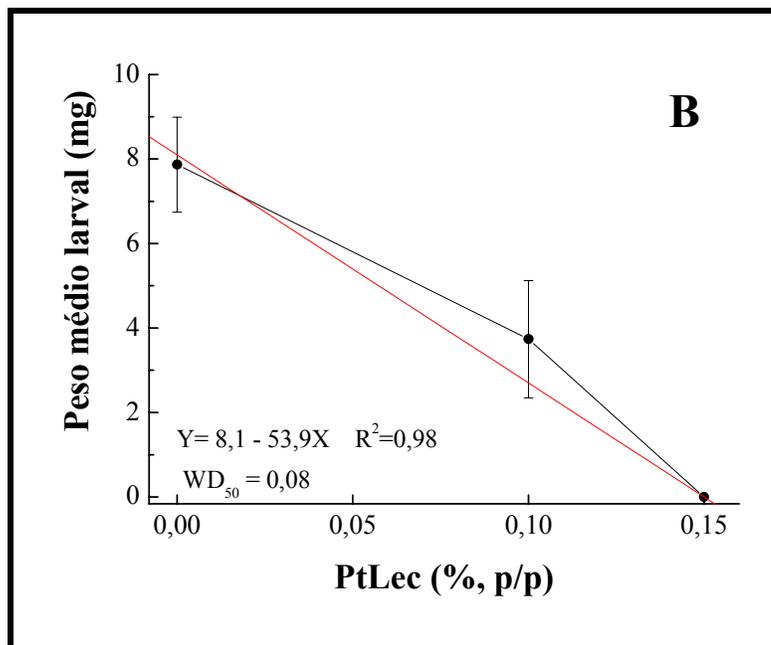
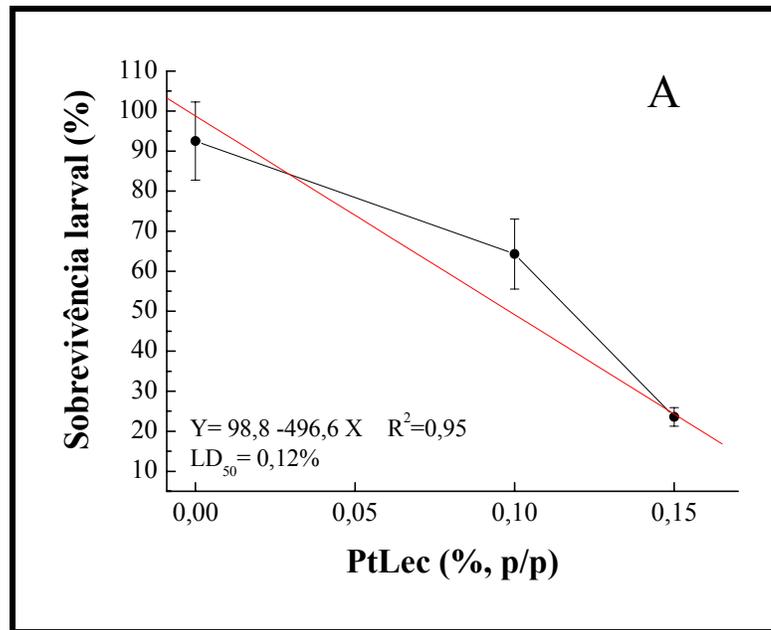


Figura 16: Efeito de PtLec sobre larvas de 20 dias de *C. maculatus* alimentadas com dieta artificial. (A) N° de sobreviventes (B) peso médio. Cada ponto representa $n \geq 100$. As barras indicam erro da média.

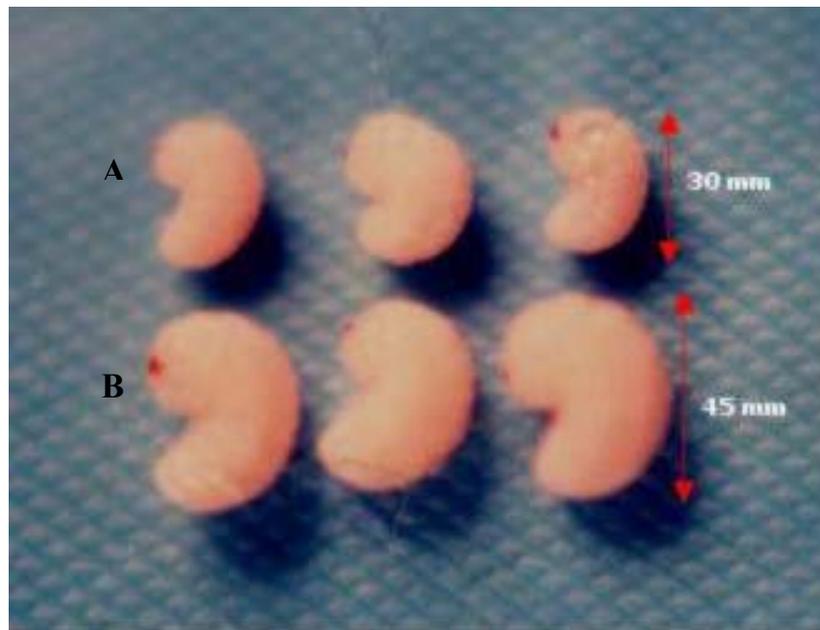


Figura 17 : Variação no tamanho das larvas de 4º instar de *C. maculatus*. (A) larvas alimentadas com PtLec 0,1 % e (B) dietas controles.

4.1.2- Efeito de PtLec sobre o desenvolvimento larval de *A. kuehniella*

O efeito de PtLec sobre o desenvolvimento de *A. kuehniella* foi analisado determinando-se o número de indivíduos e o peso médio das larvas de 4º instar em dietas artificiais contendo quantidades crescentes de PtLec. As Figuras 18 A, 18 B e 19 mostram os efeitos causados por PtLec no desenvolvimento e peso médios das larvas de *A. kuehniella*. PtLec quando incorporada a 1 % causou uma mortalidade larval de 20 % (Figura 18 A) e uma redução no peso médio larval de 71,4 % (Figura 18 B e 19). A dose necessária para causar redução no peso médio larval (WD_{50}) foi de 0,6 % de PtLec.

Análise de regressão mostrou que para cada aumento de 0,1 % na dose de PtLec ocorre um aumento de 0,76 % na mortalidade, com um R^2 igual a 0,94, nesse mesmo aumento da concentração de PtLec é verificado uma diminuição de 0,44 mg no peso das larvas ($R^2 = 0,91$).

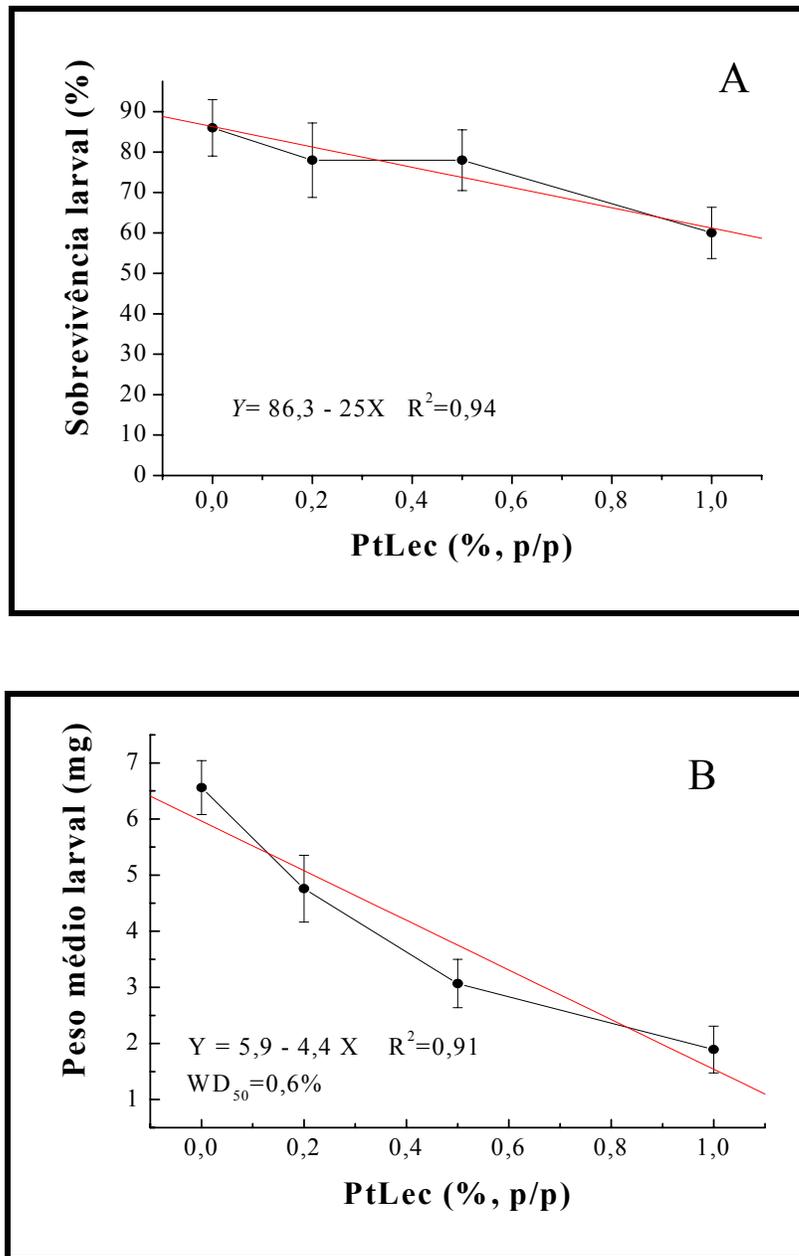


Figura 18: Efeito de PtLec sobre larvas de 24 dias de *A. kuehniella* alimentadas com dieta artificial. (A) N° de sobreviventes (B) peso médio. Cada ponto representa $n \geq 100$. As barras indicam erro da média.

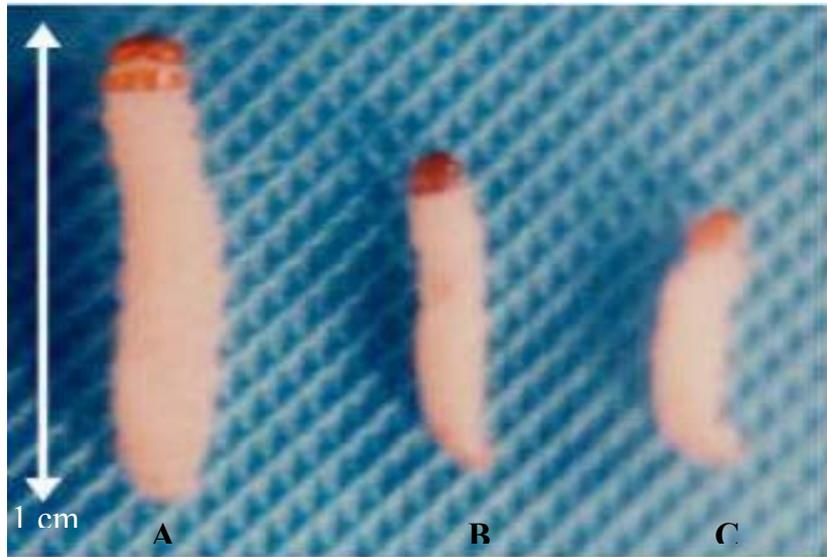


Figura 19: Variação no tamanho das larvas de 4º ínstar de *A. kuehniella*. (A) dieta controle e (B e C) alimentadas com PtLec 0,1 %.

4.1.3- Consumo e utilização de alimentos

O consumo e utilização de alimento foram bastante diferentes em relação às larvas alimentadas com dietas controle com as larvas alimentada com dietas contendo PtLec 0,5%, havendo influência da lectina sobre a digestibilidade aproximada, eficiência de conversão e sobre o metabolismo (Tabela 8).

A Figura 20 A e 20 B mostram os efeitos de PtLec no consumo da dieta e na quantidade de fezes produzidas por larva. PtLec causou uma redução de aproximadamente 11,5 mg/larva no consumo da dieta em relação a dieta controle (22,5 mg/larva) (Figura 20 A). PtLec também promoveu uma diminuição de 0,61 mg/larva na quantidade de fezes produzidas em relação a dieta controle (2,9 mg/larva) (Figura 20 B).

Tabela 8: Digestibilidade aparente (AD), eficiência de conversão do alimento ingerido (ECI), eficiência de conversão do alimento digerido (ECD), custo metabólico (CM), das larvas de *A. kuehniella* criadas em dietas na presença de PtLec 0,5% e em dietas controle.

<i>Índices nutricionais</i>	<i>Dieta controle</i>	<i>Dieta contendo PtLec</i>
ECI (%)	31 ± 1,8a	24,4 ± 0,9b
ECD (%)	48 ± 4,2a	25,1 ± 1,1b
AD (%)	65,9 ± 7,2a	15,5 ± 1,4b
CM (%)	52 ± 6,7a	75 ± 8,3b

Médias seguidas de letras diferentes e diferem entre si, pelo teste T, ao nível de 5% de probabilidade.

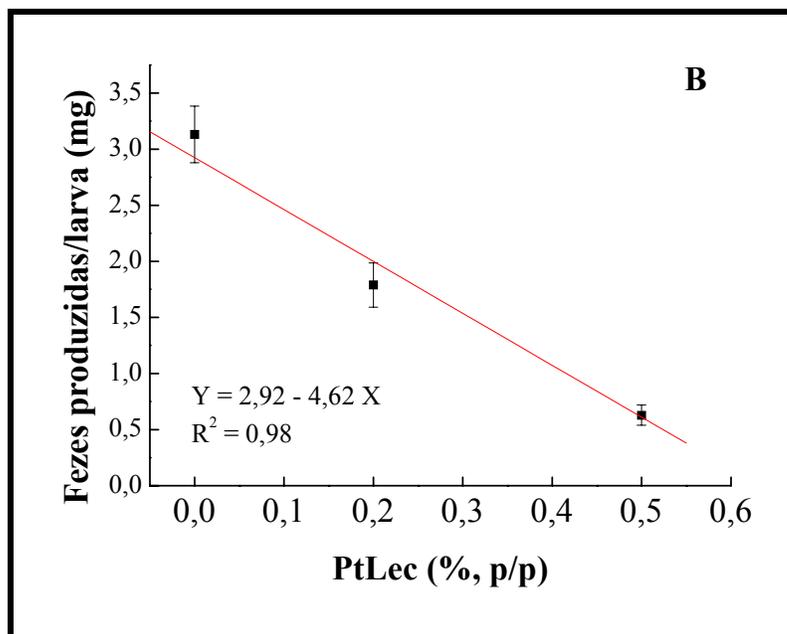
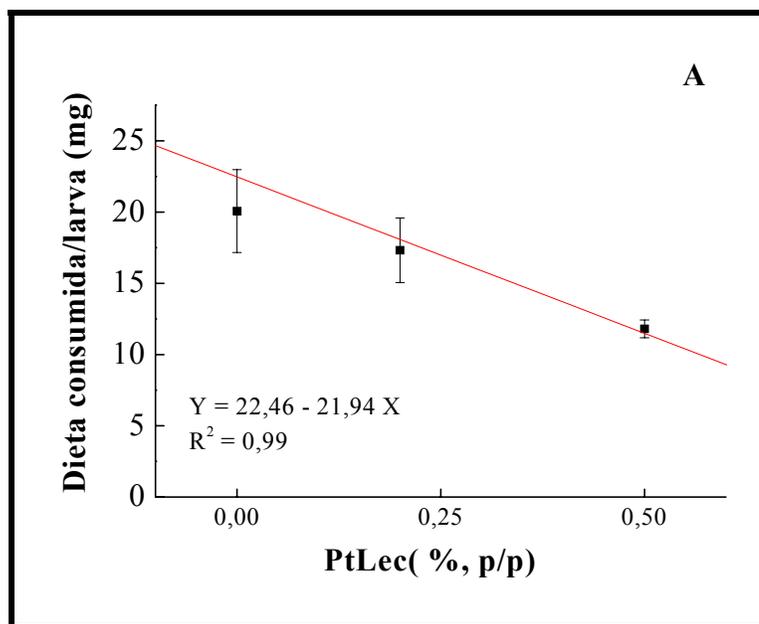


Figura 20: Consumo e utilização de alimentos pelas larvas de *A. kuehniella* alimentadas com PtLec. (A) dieta consumida/larva (B) fezes produzidas/larva. Cada ponto representa $n \geq 100$. As barras indicam erro da média.

4.2- Estudo da Atividade Fungicida

4.2.1- Efeito de PtLec sobre o crescimento dos fungos

PtLec foi testada em relação à inibição do crescimento dos fungos *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum musae* e da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Figuras 21 A, 21 B e 22). Pelos gráficos abaixo, pode-se concluir que PtLec (280 µg/ml) apresentou atividade fungicida sobre os fungos testados, inibindo o crescimento de *F. oxysporum* e *C. musae* a partir de 50 h (Figura 21 A e 21 B) e um forte efeito sobre a levedura *S. cerevisiae* (Figura 22) inibindo em 100 % o seu crescimento.

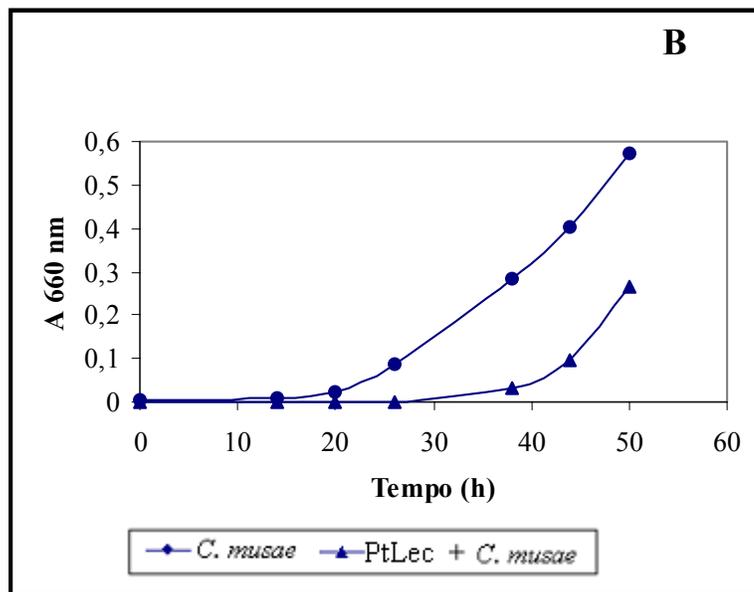
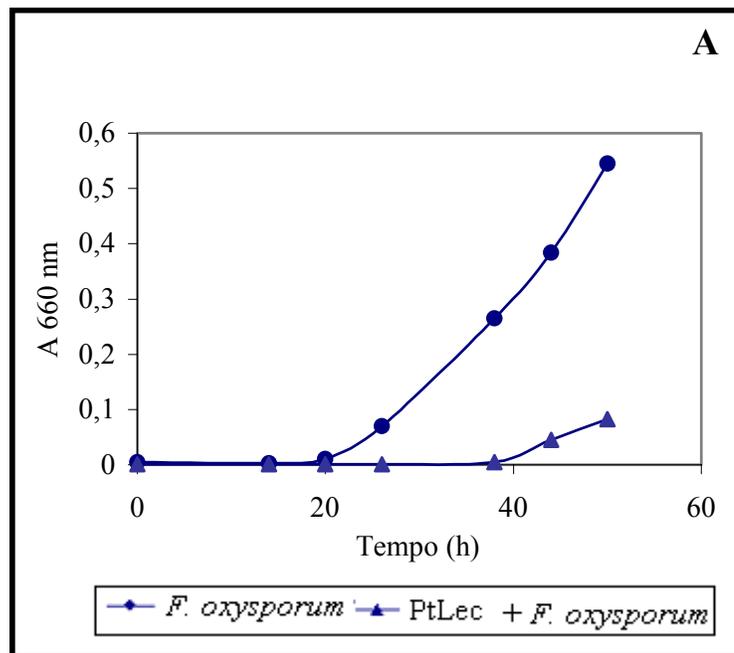


Figura 21: Efeito de PtLec sobre o crescimento de fungos. (A) *F. oxysporum* e (B) *C. musae*. A leitura da absorbância em 660 nm foi utilizada para monitorar o crescimento dos fungos. Os experimentos foram realizados em triplicata.

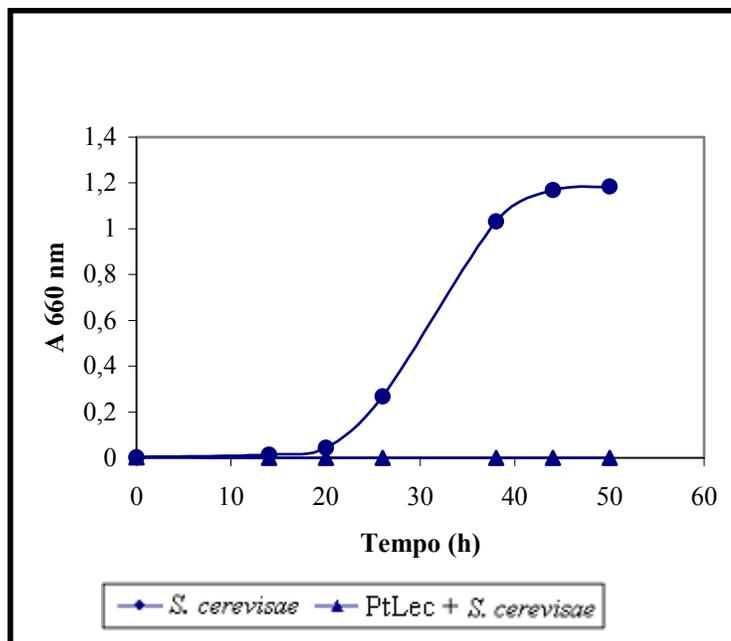


Figura 22: Efeito de PtLec sobre o crescimento da levedura *S. cerevisiae*. A leitura da absorvância em 660 nm foi utilizada para monitorar o crescimento dos fungos. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.2.2- Microscopia óptica mostrando o efeito de PtLec sobre o crescimento dos fungos

Fotos de microscopia óptica dos fungos *F. oxysporum* e *C. musae* depois de 60h de crescimento, mostram o desenvolvimento normal de hifas nos controles (Figura 23 A e 23 B) e uma inibição no desenvolvimento dessas na presença de PtLec (280 µg/ml) (Figuras 23 C e 23 D).

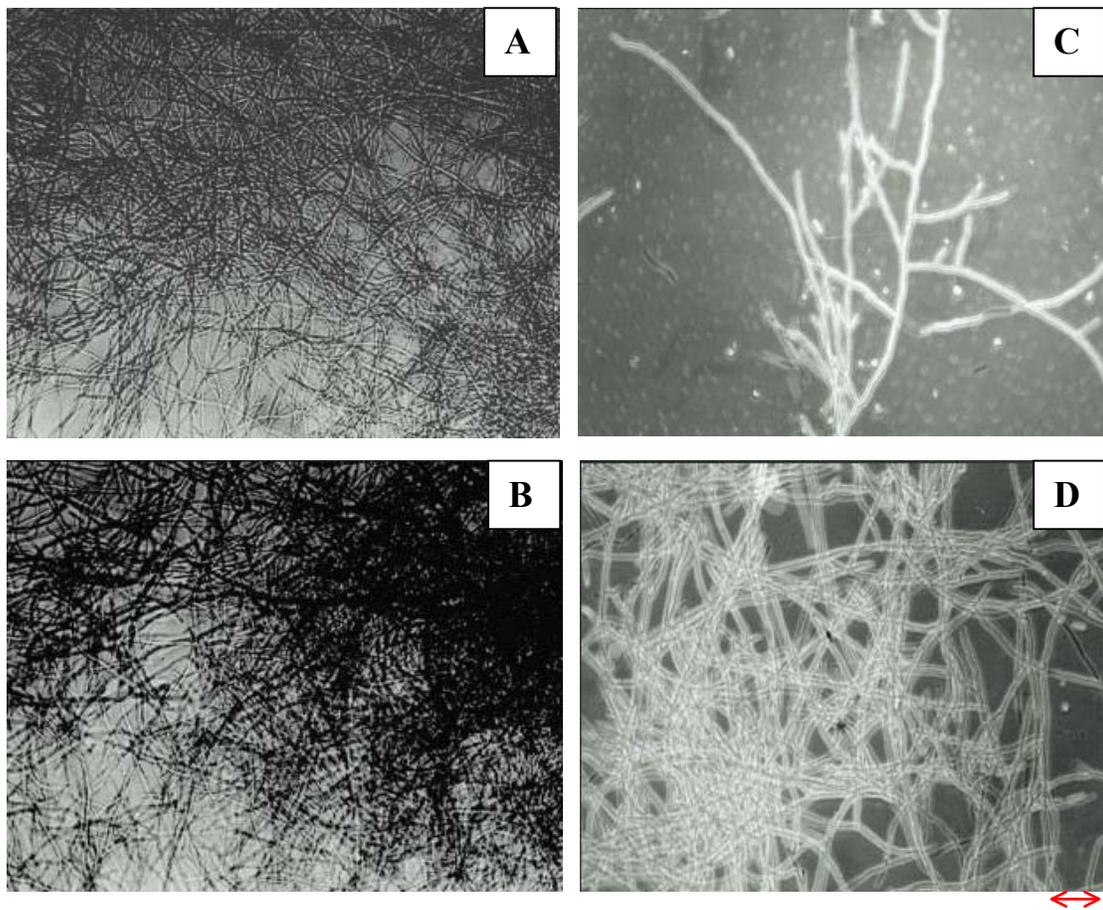


Figura 23: Microscopia óptica de *F. oxysporum* e *C. musae* depois de 60 h de crescimento dos fungos. (A) *F. oxysporum*, (C) *F. oxysporum* + PtLec, (B) *C. musae*, (D) *C. musae* + PtLec. (↔) Amplitude= 20µm.

VI- DISCUSSÃO

Lectinas de plantas constituem uma grande família de proteínas homólogas que se assemelham em suas propriedades físico-químicas. Lectinas vegetais acumulam-se em grande quantidade em sementes maduras e são sintetizadas durante o desenvolvimento da semente e depositadas em vacúolos de armazenamento, denominados corpos protéicos, por um processo secretório intracelular (Ferreira *et al.*, 2003).

Até o momento, o estudo de lectinas tem demonstrado que este é um grupo versátil de proteínas na pesquisa biológica e biomédica. O sucesso das lectinas de plantas está baseado na elevada capacidade dessas proteínas em se ligar a carboidratos específicos e conseqüentemente provocar diversos efeitos biológicos em diferentes organismos. Em conseqüência desses efeitos, muitas lectinas são purificadas e usadas como ferramenta para a biotecnologia e como proteínas bioativas (Peumans *et al.*, 1998).

Em virtude das vastas informações hoje conhecidas, sobre os vários tipos de lectinas encontradas na mais variadas espécies de plantas, e pelo fato de não ter nenhuma outra lectina descrita na literatura pertencente à família Sapotaceae, resolveu-se pesquisar a presença de lectinas nas sementes de *P. torta*.

Os métodos utilizados para a extração e purificação da lectina de *P. torta* foram aqueles comumente usados para proteínas vegetais, que envolvem a extração utilizando soluções salinas e/ou ácidas, precipitação por solventes orgânicos ou por sais e fracionamento por técnicas cromatográficas, tais como exclusão molecular e troca iônica (Belitz *et al.* 1990).

A produção de uma farinha das sementes de *P. torta* foi a primeira etapa realizada. Esta farinha foi submetida a um processo de retirada de gordura por hexano com o objetivo de reduzir a quantidade de lipídeos, pois estes poderiam interferir nas etapas subseqüentes.

A obtenção do extrato bruto (EB) das sementes de *P. torta* foi realizada com solução salina 0,15 M (1:5), segundo os métodos de Cavada *et al.* (1998) e Machuka *et al.* (1999a).

A aglutinação é o resultado da interação dos açúcares de superfície e sítios de ligação para estes açúcares na molécula da lectina (Singh *et al.*, 1999). O estudo da atividade hemaglutinante do extrato bruto permitiu evidenciar que ocorreu a aglutinação de todos os tipos sanguíneos testados em títulos variáveis, apresentando uma discreta seletividade para sangue humano A e AB e sangue de rato e boi (Tabela 3), o que veio confirmar a presença de uma lectina nessa semente.

Três passos cromatográficos foram utilizados para purificar a lectina presente em sementes de *P. torta*: cromatografia em coluna de exclusão molecular (Sephacryl S-200 HR Hi-Prep), cromatografia de troca aniônica (Source 15Q) e cromatografia de troca catiônica (HiTrap SP). Esses processos de purificação são bastante empregados na purificação de lectinas vegetais, sendo por exemplo utilizados para purificar as lectinas de *Phaseolus vulgaris* L. (Kamemura *et al.*, 1996), a lectina de frutos de *Cyphomandra betacea* (Sampietro *et al.*, 2001) e as isolectinas presentes de frutos de *Vitis vinifera* L. (Berthier *et al.*, 1999).

A lectina de *P. torta* foi purificada inicialmente em coluna Sephacryl S-200 HR Hi-Prep, proporcionando três picos com atividade hemaglutinante (Figura 6). Devido ao maior rendimento, a fração SIII foi utilizada nas etapas posteriores. Esta fração foi submetida à coluna de troca aniônica Source 15Q (Figura 7), onde o primeiro pico apresentou atividade hemaglutinante (P1). Para purificação final da lectina *P. torta*, um terceiro passo cromatográfico foi utilizado. P1, proveniente da coluna Source 15Q, foi fracionado em coluna de troca catiônica HiTrap SP (Figura 8), apresentando um único pico com atividade hemaglutinante (PtLec).

Para verificar o grau de pureza de PtLec obtida através dos passos de purificação citados acima, submetemos as frações a uma eletroforese em PAGE-SDS, onde observou-se que a fração oriunda da cromatografia em coluna de HiTrap SP (PtLec)

apresentou uma única banda de proteína de peso molecular aparente de 10 kDa, tanto na ausência como na presença de DTT (Figura 11, linha 5 e 6). Resultados semelhantes foram observados para a lectina monovalente de *Oriza sativa*, que em PAGE-SDS apresentou uma única banda de 15 kDa (Zhang *et al.*, 2000).

A massa molecular aparente (Mr) de PtLec, calculada por filtração em gel foi de 10 kDa (Figura 12), entretanto, quando a Mr da proteína foi determinada na presença de um dos açúcares específicos (glicose 100 mM) observou-se a massa molecular aparente de 60 kDa (Figura 13), sugerindo que PtLec seja composta de seis subunidades de 10 kDa, fato comum entre as lectinas de plantas (Moreira *et al.*, 1997; Moreira *et al.*, 1998). Comportamento semelhante foi observado na lectina isolada de sementes de *Castanea crenata* (CCA), uma manose/glicose que em PAGE-SDS apresentou uma única banda de peso molecular de 37kDa, tanto na ausência quanto na presença de DTT e uma massa molecular aparente (Mr) estimada em coluna de Superose 12 de 257 kDa, sugerindo que CCA é composta de 6 ou 8 subunidades idênticas que estão associadas por interações hidrofóbicas e/ou pontes de hidrogênio (Nomura *et al.*, 1998).

O percentual de açúcar neutro de PtLec foi estimado em aproximadamente 22,8 %, indicando que PtLec é uma glicoproteína. Concentrações semelhantes foram detectados na lectina de *Cyphomandra betacea* (24 %) (Xu *et al.*, 1992) e na lectina de *Talisia esculenta* (18,8 %) (Freire *et al.*, 2002). Valores mais altos do que o determinado para algumas lectinas como *Vatairea macrocarpa* (7,6 %) (Cavada *et al.*, 1998) e lectina de semente de *Erythrina speciosa* (5,5 %) (Konozy *et al.*, 2003).

A determinação da inibição da atividade hemaglutinante por carboidratos utilizando monossacarídeos, dissacarídeos e polissacarídeos são necessários para sabermos qual é a especificidade da lectina (Moreira *et al.*, 1990). A ação inibitória dos carboidratos sobre a atividade hemaglutinante de PtLec foi realizada com diferentes carboidratos (Tabela 4). Entre os vários açúcares testados somente D-manose (0.048 mM) e D-glicose (0.096 mM) apresentaram ação inibitória. Desta forma, podemos concluir que PtLec, pertence ao grupo das lectinas de planta do tipo manose/glicose, de acordo com a

classificação de Peumans *et al.* (1998). Para comprovar a afinidade de PtLec por glicose e manose, esta foi submetida à cromatografias de afinidade em colunas de glicose-agarose e manose-agarose (Figuras 9 e 10). Os resultados confirmaram os testes de inibição por carboidratos, mostrando que PtLec apresenta grande afinidade para os açúcares glicose e manose. Assim como PtLec, as lectinas de sementes de *Parkia platycephala* (Mann *et al.*, 2001), lectinas de sementes de *Canavalia grandiflora* (Ceccato *et al.*, 2002) e lectina de sementes de *Talisia esculenta* (Freire *et al.*, 2002) são ligantes de D-manose e D-glicose.

O efeito da temperatura na atividade hemaglutinante de PtLec (Figura 14) revelou estabilidade entre 37 °C a 60 °C, havendo redução na atividade biológica de 22 %, 34 % e 78 % nas temperaturas 70 °C, 80 °C e 90 °C, perdendo totalmente a atividade a 100 °C. A estabilidade de PtLec submetida a diferentes pHs mostrou que a lectina é estável na faixa de 5 a 10, havendo redução de 45 % nos pHs 3 e 4 e uma redução de 67 % no pH 11 (Figura 15). Comportamento semelhante em relação à temperatura e pH foram observados para a lectina de sementes de *Erythrina speciosa* que teve a sua atividade hemaglutinante estável até 65 °C e permaneceu inalterada em pH de 6,5 a 9,6 (Konozy *et al.*, 2003). A lectina de frutos de *Cyphomandra betacea* também apresentou comportamento semelhante a PtLec, sendo estável até 60 °C, perdendo completamente a sua atividade a partir dos 80 °C e estável aos pHs de 5 a 9 (Sampietro *et al.*, 2001).

Algumas lectinas requerem para sua atividade hemaglutinante a presença de íons Ca^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+} , para estabilizar os sítios de ligação dos açúcares (Weis *et al.*, 1996). Quanto PtLec foi submetida à ensaio de hemaglutinação na presença de dos agentes quelantes de cátions divalentes, como o EDTA e EGTA, a lectina perdeu completamente sua atividade. PtLec demonstrou ser uma metaloproteína dependente de Ca^{2+} e Mn^{2+} , recuperando sua atividade em quando o Ca^{2+} (12,5 mM) e o Mn^{2+} (12,5 mM) foram adicionados ao ensaio (Tabela 5). Da mesma forma que PtLec a lectina de *Erythrina speciosa* recuperou sua atividade quando o Ca^{2+} e o Mn^{2+} foram adicionados ao ensaio, a adição separadamente do Ca^{2+} ou Mn^{2+} não restaurou a atividade hemaglutinante desta lectina (Konozy *et al.*, 2003).

A composição de aminoácidos de PtLec (Tabela 6) revelou uma proteína hidrofóbica, com alto conteúdo de Gly, Val, Ile e Phe e baixo conteúdo de Met e Cys, o que é comum nas proteínas de origem vegetal (Ryan, 1981). Coelho *et al.* (2003) mostraram que a lectina de *Annona coriacea* contém grande quantidade de aminoácidos hidrofóbicos e baixa quantidade de resíduos de Met e Cys. A composição de aminoácidos de PtLec também revelou uma proteína com caráter básico, com conteúdo considerável de Lys, His e Arg e baixo conteúdo de aminoácidos ácidos (Asp e Glu). Similar a PtLec a lectina de *Sambucus nigra*, a nigrina b, apresentou caráter básico (Benito *et al.*, 1997). Além disso, podemos observar que PtLec apresenta alto conteúdo de valina (Val), isoleucina (Ile), fenilalanina (Phe), lisina (Lys), histidina (His) e arginina (Arg) e baixo conteúdo de ácido aspártico (Asp), asparagina (Asn), metionina (Met), cisteína (Cys) e serina (Ser). Esta composição quando comparada com outras lectinas vegetais, usando o banco de dados ExPasy, apresentou similaridade com as lectinas: manose/glicose de *Parkia platycephala* (Mann *et al.*, 2001); lectina da subtribo Diocleinae (Calvete *et al.*, 1999) e lectina de *Ricinus communis* (Roberts *et al.*, 1985).

O sequenciamento N-terminal de PtLec mostrou que esta lectina não apresenta homologia com nenhuma lectina de origem vegetal, talvez por se tratar de uma família de lectina nunca estudada (Tabela 7). Resultado semelhante foi observado na lectina de sementes de *Talisia esculenta*, família Sapindaceae, que também não apresentou homologia com outras lectinas vegetais (Freire *et al.*, 2001).

Sementes de plantas contribuem significativamente para a dieta humana e de animais. O feijão é um legume, e suas sementes são uma fonte importante de proteínas nos trópicos. Grãos tal como os feijões caupi (*Vigna unguiculata*) são fontes importantes de proteínas e carboidratos em muitos países, especialmente na África e em outras partes dos trópicos. O feijão caupi é também uma renda para muitas famílias pobres (Latunde-Data, 1990). Uma das mais importantes pragas de insetos do feijão caupi é o bruquideo *Callosobruchus maculatus*, que ataca as sementes durante o armazenamento e afeta severamente a qualidade e a estocagem da produção. Em períodos de infestação severa,

perdas de sementes causadas por *C. maculatus* pode alcançar a 100 % dentro de um período de 6 meses (Hall *et al.*, 1997). PtLec foi efetiva sobre o desenvolvimento deste coleóptero. A mortalidade larval foi de 100 % na concentração de 0,3 % da lectina (Figura 16 A, dado não mostrado). Além de a lectina reduzir o peso médio das larvas em 50 %, na concentração de 0,08 % (Figura 16 B). Semelhante a ação de PtLec, a lectina de *Talisia esculenta* (TEL), uma manose/glicose, produziu 90 % de mortalidade na concentração de 2 % aos bruquídeos *Callosobruchus maculatus* e *Zabrotes subfasciatus* e uma WD_{50} na concentração de 1 % em ambos os insetos (Macedo *et al.*, 2002).

Anagasta kuehniella é encontrado em todo mundo, particularmente em grãos estocados, frutas, e farinhas. Dependendo da temperatura e umidade, uma única fêmea pode colocar 600 ovos. Poucos produtos vegetais estão seguros a voracidade deste inseto: frutas, chocolates, biscoitos, bolos, geléias e doces tem sido consumido também (Ebeling *et al.*, 1996). PtLec também afetou o desenvolvimento deste lepidóptero, reduzindo em 20 % a mortalidade de *A. kuehniella* na concentração de 1 % da lectina (Figura 18 A). Além de a lectina diminuir o peso médio larval em 50 % na concentração de 0,6 % da lectina (Figura 18 B). Efeito semelhante foi observado na lectina de sementes de *Koelreuteria paniculata* (KpLec), que causou em dietas artificiais, uma redução de aproximadamente 84 % no peso médio das larvas de *A. kuehniella* na concentração de 1 % da lectina contra uma redução de 50 % no peso médio das larvas de *C. maculatus* na mesma concentração (Macedo *et al.*, 2003).

A quantidade e qualidade do alimento consumido na fase larval afetam a taxa de crescimento, o tempo de desenvolvimento, o peso do corpo, sobrevivência, bem como influenciam a fecundidade, longevidade, movimentação e capacidade de competição dos adultos (Panizzi *et al.*, 1991). O consumo e utilização de alimento foram bastante diferentes em relação às larvas de *A. kuehniella* alimentadas com dietas controle e com as larvas alimentadas com dietas contendo PtLec (0,5 %), havendo influência da lectina na AD, na qual representa a percentagem de alimento ingerido que é efetivamente assimilado pelo inseto. PtLec afetou a ECI, que representa a percentagem de alimento ingerido que é

transformado em biomassa. A lectina também influenciou a ECD, que é a estimativa da conversão de alimento ingerido que é assimilado pelo inseto. PtLec também mostrou efeito sobre o metabolismo (CM), que representa a percentagem de alimento metabolizado em energia para a manutenção da vida do inseto (Tabela 8). PtLec (0,5%) também apresentou efeitos na dieta consumida, causando uma redução de 11,5 mg/larva nas larvas de *A. kuehniella* em relação a dieta controle (22,5 mg/larva) (Figura 20 A). Além disso, a lectina causou uma diminuição de 0,61 mg/larva na quantidade de fezes produzidas em relação à dieta controle (2,9 mg/larva) (Figura 20 B). Estas análises mostraram que PtLec é uma proteína de difícil digestão, na qual as larvas de *A. kuehniella* necessitam de um alto gasto metabólico para sua utilização e que a eficiência de conversão desta proteína é baixa quando comparado ao controle.

Várias lectinas de plantas têm mostrado efeito inseticida a insetos pertencentes às ordens Coleopteras, Lepidopteras e Homopteras (Carlini *et al.*, 2002, Macedo *et al.*, 2002, Macedo *et al.*, 2003), sendo que a sensibilidade das diferentes espécies de insetos as lectinas, é variável (Fitches *et al.*, 2001). A lectina de amendoim (*Arachis hypogaea*), ligante de manose, causou mortalidade nas larvas de *Chilo partellus* (lepidóptera, que causa sérios prejuízos a grãos de milho e sorgo) enquanto que a lectina de *Pisum sativum* (manose) não teve efeito significativo na mortalidade ou crescimento (Law *et al.*, 1997).

Lectinas com especificidades para resíduos de manose se destacam por serem tóxicas para muitos insetos (Foissac *et al.*, 2000). Lectina de *Galanthus nivalis* (GNA), manose específica, promoveu significativa redução no crescimento de *Myzus persicae* (homóptero, conhecido vulgarmente como pulgão-verde) e reduziu significativamente a fecundidade das fêmeas sobreviventes (Sauvion *et al.*, 1996). GNA também apresentou efeito inseticida contra larvas de *Lacanobea oleracea* (lepidóptero conhecido como mosca do tomate) (Gatehouse *et al.*, 1999). Lectinas ligantes de manose de bulbos de *Allium sativum*, túberas de *Colocasia esculenta* e folhas de *Diffenbachia sequina* apresentaram efeito a *Dysdercus koenigii* (homóptero), inibindo o desenvolvimento e crescimento do inseto (Roy *et al.*, 2002).

Proteínas que se ligam à quitina, apresentam efeito inibitório sobre o crescimento de patógenos e pragas que possuem este polissacarídeo em sua estrutura, como é o caso de fungos e insetos (Chrispeels *et al.*, 1991). Como UDA (Van Parijs *et al.*, 1992), WGA (Ciopraga *et al.*, 1999) e GAFF-1 (lectina isolada de *Gastrodia elata*) (Xu *et al.*, 1998). Com o objetivo de verificar se PtLec é capaz de interagir com quitina, essa lectina foi aplicada em uma coluna de quitina, tendo sido verificado que a mesma foi capaz de ligar-se a essa matriz (dado não mostrado). PtLec causou inibição no crescimento dos fungos *F. oxysporum* e *C. musae* (Figura 21 A, 21 B) e inibe totalmente o crescimento de *S. Cerevisae* (Figura 22) na concentração de 280 $\mu\text{g/ml}^{-1}$. Fotos de microscopia óptica dos fungos *F. oxysporum* e *C. musae* mostraram o desenvolvimento normal de hifas nos controles (Figura 23 A e 23 B) e uma inibição no desenvolvimento dessas na presença de PtLec (Figuras 23 C e 23 D). Efeito similar foi observado na lectina GAFF-1, que mostrou forte atividade inibitória *in vitro* contra *Valsa ambiens*, *Rhizoctonia solani*, *Gibberella zeae*, *Ganoderma lucidum* and *Botrytis cinerea*, na concentração de 360 $\mu\text{g/ml}^{-1}$ (Xu *et al.*, 1998).

Broekaert *et al.* (1989) sugeriu que o mecanismo de ação fungicida da UDA deve-se à perturbação na síntese de quitina, por ligar-se diretamente ou por fazer um “crosslinking” entre as cadeias. O pequeno tamanho da cadeia confere a UDA (8,5 kDa) maior capacidade de inibição do crescimento de hifas quando comparada a outras lectinas fungicidas de maior massa molecular, como WGA (36 kDa) e a lectina de tomate (100 kDa). A UDA, por seu tamanho peculiar, pode ter um efeito direto nos sítios ativos de morfogênese da parede celular. A inibição do crescimento dos fungos por PtLec pode estar associada a sua interação com quitina, ou outros açúcares presentes nas paredes celulares dos fungos. Entretanto são necessários a busca de evidências dessas interações com o objetivo de revelar o mecanismo exato de ação desta proteína.

A busca de produtos naturais, que possam ser usados como agentes potencialmente úteis ao combate de pragas e patógenos que causam prejuízos a culturas

socioeconômicas importantes, contribui para amenizar os problemas do uso de inseticidas e fungicidas sintéticos utilizados no combate de pragas e doenças que, além de serem onerosos para a maioria das colheitas, resultam em contaminação ambiental e induzem o surgimento de espécies resistentes (Macedo *et al.*, 2000).

Nossos resultados mostram que a lectina de *P. torta*, a primeira lectina isolada e caracterizada da família Sapotaceae, é uma proteína biologicamente importante. De acordo com as análises de seus efeitos sobre insetos (*C. maculatus* e *A. kuehniella*) e fungos, podemos sugerir que PtLec, após estudos mais aprofundados, poderá tornar-se uma importante ferramenta na biotecnologia de plantas, com intuito de melhorar o mecanismo de defesa vegetal contra o ataque de insetos e patógenos.

VII- CONCLUSÕES

- A lectina presente em sementes de *P. torta* é uma glicoproteína com 22,8 % de açúcar neutro;
- Apresenta apenas uma banda de proteína de 10 kDa;
- Em Superdex 75 equilibrada com glicose apresentou uma massa molecular de 60 kDa;
- É uma lectina estável em uma ampla faixa de pH (5-10) e temperatura (37 °C-60 °C), dependente de íons Ca^{2+} e Mn^{2+} para exercer sua atividade;
- A lectina mostrou afinidade por todos os eritrócitos testados em títulos variáveis, sendo esta lectina inibida por manose e glicose;
- Análise da composição de aminoácidos revelou que PtLec é uma proteína hidrofóbica, apresentando um caráter básico;
- A seqüência N-terminal revelou que PtLec não apresenta homologia com outras lectinas de origem vegetal;
- PtLec revelou atividade inseticida sobre o desenvolvimento larval de *C. maculatus* e *A. kuehniella*, promovendo uma mortalidade de 100 % a *C. maculatus* na concentração de 0,3 %, e uma redução de 20 % na mortalidade de *A. kuehniella* quando incorporada a 1 %. Uma redução de 50 % no peso médio das larvas de *C. maculatus* ao nível de 0,08 % e uma WD a 0,6 % no peso médio das larvas de *A. kuehniella*.

- PtLec promoveu uma redução sobre a digestibilidade aproximada, eficiência de conversão e sobre o metabolismo em larvas de *A. kuehniella* e uma diminuição na produção fecal (0,61 mg) e dieta consumida (11,49 mg);
- PtLec inibiu *in vitro* o crescimento dos fungos *F. oxysporum* e *C. musae*, causando 100 % de inibição no crescimento de *S. cerevisiae*;

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acholo, M., Morse, S., Macnamara, N., Flegg, L., Oliver, R.P. (1997). Aetiology of yam (*Dioscorea rotundata*) tuber roots held in traditional stores in Nigeria: Importance of *Fusarium* spp. And yam beetle. *Microbiol. Res.*, **152** (3): 293-298.
- Ajouba, A., Causse, H., Van Damme, E. J. M., Peumans, W.J., Cambillau, P and Rougé, P. (1994). Interactions of plant lectins with the components of the bacterial cell wall peptidoglycan. *Biochem. Syst. Ecol.*, **22**: 153-159.
- Allen, A.K., Neuberger, A., Sharon, N. (1973). The purification, composition and specificity of wheat-germ agglutinin. *Biochem. J.*, **131**: 155-162.
- Allsopp, P.G., Mcghie, T.K. (1996). Snowdrop and wheatgerm lectin and avidin as antimetabolites for the control of sugarcane whitegrubs. *Entomol. Exp. Appl.*, **80**: 409-414.
- Archer, B.L. (1960). The protein of *Hevea brasiliensis* latex. Isolation and characterization of crystalline hevein. *Biochem. J.*, **75**, 236-240.
- Balzarini, J., Schols, D., Neyts, J., Van Damme, E., Peumans, W & De Clercq, E. (1991) α -(1-3)- and α -(1-6)-D-mannose-specific plant lectin are markedly inhibitory to human immunodeficiency virus and cytomegalovirus infections in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **35**: 410-6.
- Balzarini, J., Neyts, J., Schols, D., Hosoya, M., Van Damme, E., Peumans, W.K., De Clercq, E. (1992) The mannose-specific plant lectin *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.
- Barbieri, L., Batelli, G. B. & Stirpe, F. (1993) Ribosome-inactivating proteins from plants. *Biochim. Biophys. Acta*, **1154**: 237-82.
- Barbosa, T., Arruda, S., Cavada, B., Grangeiro, T.B., Freitas, L.A.R., Netto, M.B. (2001). In vivo lymphocyte activation and apoptosis by lectin of Diocleinae subtribe. *Mem Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. **96** (5): 673-678.

- Barondes, S.H. (1988). Biofunctional properties of lectins: lectins redefined. *Trends Biochem. Sci.*, **13**: 480-482.
- Barre, A., E.J.M., Van Damme, W. J., Peumans, P., Rougé (1996). Structure- function relationship in momocot mannose-binding lectins. *Plant Physiol*, **112**: 1531-1540.
- Bartinicki-Garcia, S. (1968). Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. *Ann. Ver. Microbiol.*, **22**: 87-107.
- Bartnicki-Garcia, S. (1973). Fundamental aspects of hyphal morphogenesis Symp. Soc. *Microbial*, **23**, 245-267.
- Beintema, J.J. (1994). Structural features of plant chitinases and chitin-binding proteins. *FEBS Lett.*, **350**: 159-163.
- Belitz, H.D. and Weder, J.K.P. (1990). Protein inhibitor of hidrolases in plant foodstuffs. *Food Rev. Int.*, **6**: 151-211.
- Benito, F.M., Citores, L., Iglesias, R., Ferreras, J.M., Camafeita, E., Méndez, E., Girbés, T. (1997). Isolation and partial characterization of a novel and uncommon two-chain 64-kDa ribosome-inactivating protein from the bark of Elder (*Sambucus nigra* L.). *FEBS Letters*, **413**: 85-91.
- Berthier, L., Marchal, R., Debray, H., Bonnet, E., Jeandet, P., Maujean, A. (1999). Isolation of Isolectins from *Vitis vinifera* L. Cv. Chardonnay Grape. *J. Agric. Food Chem.*, **47**: 2193-2197.
- Birch, A.N.E., Geoghegan, I.E., Majerus, M.E.N., McNicol, J.W., Hackett, C., Gatehouse, A.M.R., and Gatehouse, J.A. (1999). Tri-trophic interactions involving pest aphids predatory 2-spot labybirds and transgenic potatoes expressing snowdrop lectin for aphid resistance. *Mol. Breeding*, **5**: 75-83.
- Boller, T. (1988). Ethylene and the regulation of antifungal hydrolases in plants In: Oxford surveys of plant molecular and cell biology, Minflin, B.J. (ed), Oxford University Press, Oxford, v. **5**, 145-174.
- Boyd, W.C & Shyleigh, E. (1954). Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). *Science*, **119**: 419.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principal of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**: 248-254.

- Broekaert, W.F. & Peumans, W.J. (1986) Lectin release from seeds of *Datura stramonium* lectin with bacterial motility. In *Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry* (edited by Bog-Hansen, T.C. & Van Driessche, E.), Vol. **5**: pp. 57-65. Berlin: Walter de Gruyter & Co.
- Broekaert, W. F., Van Parijs, J., Leyns, F., Joos, H. and Peumans, W. J. (1989). A chitin-binding lectin from stinging nettle rhizomes with antifungal properties. *Science*, **245**: 1100-1102.
- Broekaert, W.F., Marien, W., Terras, F.R.G., De Bolle, M.F.C., Proost, P., Van Damme, J., Dillen, L., Claeys, M., Rees, S.B., Vanderleyden, J. & Cammue, B.P.A. (1992) Antimicrobial peptides from *Amaranthus caudatus* seeds with sequence homology of chitin-binding proteins. *Biochemistry*, **31**: 4308-14.
- Carlini, C.R. & Grossi-de-Sá, M.F. (2002). Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon*, **40**: 1515-1539.
- Cavada, B.S., Santos, C.F., Grangeiro, T.B., Nunes, E.P., Sales, P.V.P., Ramos, R.L. (1998). Purification and characterization of a lectin from seeds of *Vatairea macrocarpa* Duke. *Phytochemistry*, **49**: 675-680.
- Calvete, J.J., Thole, H.H., raida, M., Urbanke, C., Romero, A., Grangeiro, T.B., Ramos, M.V., Rocha, I.M.A., Guimarães, F.N., Cavada, B.S. (1999). Molecular characterization and crystallization of Diocleinae lectins. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1430**: 367-375.
- Ceccatto, V.M., Cavada, B.S., Nunes, E.P., Nogueira, N.A.P., Grangeiro, M.B., Moreno, F.B.M.B., Teixeira, E.H., Sampaio, A.H., Alves, M.A.O., Ramos, M.V., Calvete, J.J. and Grangeiro, T.B. (2002). Purification and partial characterization of lectin from *Canavalia grandiflora* Benth. Seeds. *Protein and Peptide Letters*, **9** (1): 67-73.
- Chapot, M.P., Peumans, W.J., Strosberg, A.D. (1986). Extensive homologies between lectins from non-leguminous plants. *FEBS Lett.*, **195**, 231-234.
- Chrispeels, M.J., Raikhei (1991). Lectins, lectin genes and their role in plant defence. *Plant Cell*, **3**: 1-19.
- Ciopruga, J., Gozia, O., Tudor, R., Brezuica, L., Doyle, R.J., (1999). *Fusarium* sp. Growth inhibition by wheat germ agglutinin. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1428**: 424-432.

- Coelho, M.B., Freire, M.G.M., Toyama, M.H., Marangoni, S., Novello, J.C. and Macedo, M.L.R. (2003). Purification and characterization of a lectin from *Annona coriacea* seeds. *Protein and Peptide Letters*, vol **10** (2): 1-9.
- Collinge, D.B., Kragh, K.M., Mikkelsen, J.D., Nielsen, K.K., Rasmussen, U. & Vad, K. (1993) Plant chitinases. *Plant J.*, **3**: 31-40.
- Cornelissen, B. J. & Melchers, L.S. (1993) Strategies for control of fungal diseases with transgenic plant. *Plant Physiol.*, **101**: 709-12.
- Diáz, C.L., L.S., Melchers, P.J.J., Hooykaas, B.J.J., Lugtenberg, J.W., Kijne (1989). Root lectin as a determinant of host-plant specificity in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Nature*, **338**: 579-581.
- Does, M.P., Houterman, P.M., Dekker, H.L. and Cornelissen, B.J.C. (1999). Processing, targeting, and antifungal activity of stinging nettle agglutinin in transgenic tobacco. *Plant Physiology*, **120**: 421-431.
- Dubois, M., Giles, K.A., Hamilton, J.K. and Rebers, P.A. (1956). Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, **28**: 350-6.
- Dunkel, F., Lung, P.Z., Chuan, L., Yin, H.F. (1982). Insect and fungal response to sorbic acid-treated wheat during storage in South-China. *J. Econ. Entomol.*, **75** (6), 1083-1088.
- Ebeling, W. (1996). Urban entomology. In *Military Pest Management Handbook*, 2nd ed. University of California, Division of Agricultural Sciences: Berkeley, CA.
- Ferreira, R.B., Freitas, R.L., Teixeira, A.R. (2003). Self-aggregation of legume seed storage proteins inside the protein storage vacuoles is electrostatic in nature, rather than lectin-mediated. *FEBS letters*, **534**: 106-110.
- Firmino, F., Fernandes, K.V.S., Sales, M.P., Gomes, V.M., Miranda, M.R.A., Domingues, S.J.S., Xavier-Filho, J. (1996). Cowpea (*Vigna unguiculata*) vicilins associate with putative chitinous structure in the midgut and feces of the of the bruchid beetles *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus*. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **29**: 749-756.
- Fitches, E., Gatehouse, A.M.R., Gatehouse, J.A. (1997). Effects of snowdrop lectin (GNA) delivered via artificial diet and transgenic plant on the development of tomato moth (*Lacanobia oleracea*) larvae in laboratory and glasshouse trials. *Journal of Insect Physiology*, **43**: 727-739.

- Fitches, E., Gatehouse, J.A. (1998). A comparison of the short and long term effects of insecticidal lectins on the activities of soluble and brush border enzymes of tomato moth larvae (*Lacanobia oleracea*). *Journal of Insect Physiology*, **44**: 1213-1224.
- Fitches, E.; Woodhouse, S.D.; Edwards, J.P.; Gatehouse, J.A. (2001). In vitro and in vivo binding of snowdrop (*Galanthus nivalis*-GNA) and jackbean (*Canavalia ensiformis*-Con A) lectins within tomato moth (*Lacanobia oleracea*) larval; mechanisms of insecticidal action. *J. Insec. Physiol.*, **47**: 777-787.
- Foissac, X., Loc Thi, N., Christou, P., Gatehouse, A.M. and Gatehouse, J.A. (2000). Resistance to green leafhopper (*Nephotettix virescens*) and brown planthopper (*Nilaparvata lugens*) in transgenic rice expressing snowdrop lectin (*Galanthus nivalis* agglutinin, GNA). *J. Insect Physiol.*, **46**: 573-583.
- Freire, M. G. M., Gomes, V. M., Corsini, R. E., Machado, O. L. T., De Simone, S. G., Novello, J. C., Marangoni, S. and Macedo, M. L. R. (2002). Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth. *Plant Physiol. Biochem.*, **40**: 61-68.
- Gaidamashvili, M., van Staden, J. (2002). Lectin-like proteins from South African plant species used in traditional medicine. *South African J. Botany*, **68**: 36-40.
- Gatehouse, A.M.R., Howe, D.S., Flemming, J.E., Hilder, V.A. & Gatehouse, J.A., (1991). Biochemical basis of insect resistance in winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus*) seeds. *J. Sci. Food and Agric.*, **55**: 63-74.
- Gatehouse, A.M.R., K.S., Powell, W.J., Peumans, E.J.M. Van Damme, J.A., Gatehouse (1995). Insecticidal properties of plant lectins. Their potential in plant protection: in Pusztai, A., Bardocz (eds). *Lectins: Biochemical Perspectives*. London, Francis & Taylor, pp. 35-57.
- Gatehouse, A.M.R., Davison, G.M., Newell, C.A., Merryweather, A., Hamilton, W.D.O., Burgess, E.P.J., Gilbert, R.J.C., Gatehouse, J.A., (1997). Transgenic potato plants with enhanced resistance to the tomato moth *Lacanobia oleraceae* growth room trials. *Molecular Breeding*, **3**: 49-3.
- Gatehouse, A.M.R.; Gatehouse, J.A. (1998). Identifying proteins with insecticidal activity: use of encoding genes to produce insect resistant transgenic crop. *Pesticide Science*, **52**: 165-175.
- Gatehouse, A.M.R., Davison, G.M., Stewart, J.N., Gatehouse, L.N., Kumar, A., Geoghegan, I.E., Birch, N., Gatehouse, J.A., (1999). Concanavalin A inhibits

- development of tomato moth (*Lacanobia oleraceae*) and peach-potato aphid (*Myzus persicae*) when expressed in transgenic potato plants. *Molecular Breeding*, **5**: 153-165.
- Gullan, P.J., Cranston, P.S. (1994). The insects: an outline of entomology. Chapman & hall, pp. 2-491.
- Habibi, J., Backus, E.A., Huesing, J.E., (2000). Effects of phytohemagglutinin (PHA) on the structure of midgut epithelial cells and localisation of its binding sites in western tarnished plant bug *Lygus hesperus* knight. *Journal of Insect Physiology*, **46**: 611-619.
- Hall, A.E., Singh, B.B, Ehlers, J.D. (1997). Cowpea breeding. *Plant Breed. Rev.*, **15**: 217-274.
- Harper, M.S., Hopkins, T.L. & Czapla, T.H., (1998). Effect of wheat germ agglutinin on formation and structure of the peritrophic membrane in European corn borer (*Ostrinia nubilalis*) larvae. *Tissue & Cell*, **30**: 166-176.
- Hilder, V.A., Geteouse, A.M.R., Sheerman, S.S., Barker, R.S., Boulter, D.A. (1987). A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. *Nature*, **330**: 160-163.
- Huang, X., Xie, W.J., Gong, Z.Z. (2000). Characteristics and antifungal activity of a chitin binding protein from *Ginkgo biloba*. *FEBS Letters*, **478**: 123-126.
- Huensing, J.E., Shade, R.E., Chrispeel, M.J. & Murdock, L.L. (1991a) α -amylase inhibitor, not phytohemagglutinin, explains resistance of common bean seeds to cowpea weevil. *Plant Physiol.*, **96**: 993-6.
- Jansen, D.H., Juster, H.B. & Liener, I.E. (1976) Insecticidal action of the phytohemagglutinin in black beans on a bruchid beetle. *Science*, **192**: 795-6.
- Jouanin, L., Bottino, M.B., Girard, C., Morrot, G., Giband, M. (1998). Transgenic plants for insect resistance. *Plant Science*, **131**: 1-11.
- Kamemura, K., Furuichi, Y., Umekawa, H., Takahashi, T. (1996). Purification and characterization of a pod lectin from Great Northern bean, *Phaseolus vulgaris* L. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1289**: 87-94.
- Kanrar, S., Venkateswari, J.C., Kirti, P.B. and Chopra, V.L. (2002). Transgenic expression of hevein, the rubber tree lectin, in Indian mustard confers protection against *Alternaria brassicae*. *Plant Science*, **162**: 441-448.

- Konami, Y., Uno, T., Fujii, M., Yamamoto, K., Osawa, T. And Trimura, T. (1995). A high degree of sequence homology in the putative carbohydrate recognition domain of pokeweed mitogen and wheat germ agglutinin: poly-N-acetyllactosamine-binding lectins from different species. *Glycobiology*, **5**: 665-670.
- Koo, J.C., Lee, S.Y., Cheen, H.J., Cheong, Y.H., Choi, J.S., Kawabata, S., Miyagi, M., Tsunasawa, S., Ha, K.S., Bae, D.W., Han, C., Lee, B.L., Cho, M.J., (1998). Two hevein homologs isolated from the seed of *Pharbitis nil* L. exhibit potent antifungal activity. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1383**: 80-90.
- Konozy, E.H.E., Bernardes, E.S., Rosa, C., Faca, V., Greene, L.J., Ward, R.J. (2003). Isolation, purification, and physicochemical characterization of a D-galactose-binding lectin from seeds of *Erythrina speciosa*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **410**: 222-229.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685.
- Latunde-Data, A.O. (1990). Genetic manipulation of the cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) for enhanced resistance to fungal pathogens and insect pests. *Adv. Agron.*, **44**: 133-154.
- Law, I.J., Kfir, R. (1997). Effect of mannose-binding lectin from peanut and pea on the stem borer *Chilo partellus*. *Entomol. Experiment Appl.*, **82**: 261-265.
- Lee, H.I., Broekaert, W.F. and Raaikhel, N.V. (1991). Co and post-translational processing of hevein preprotein of latex of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Journal of Biological Chemistry*, **266**: 15944-48
- Lienard, V., Seck, D., (1994). Review of control methods against *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae), a pest of grains of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) in tropical Africa. *Insect Sci. Appl.*, **15** (3): 301-311.
- Lorenzi, H. (1992). Árvores Brasileiras-Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Harri Lorenzi (Ed), Editora Plantarum LTDA, **1**: 325.
- Loris, R., Hamelryck, T., Bouckaert, J., Wyns, L. (1998). Legume lectin structure. *Biochem. Biophys. Acta*, Vol. **1383**: 9-36.
- Macedo, M.L.R., Fernandes, K.V., Sales, M.P., Xavier-Filho, J. (1995). Purification and properties of storage proteins (vicilins) from cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds which

- are susceptible or resistant to the bruchid beetle *Callosobruchus maculatus*. *Braz. J. Med. Bio. Res.*, **28**: 183-190.
- Macedo, M.L.R., Coelho, M.B., Freire, M.G.M., Machado, O.L.T., Marangoni, S., Novello, J.C. (2000). Effect of a toxin protein isolated from *Zea mays* seeds on the development and survival of the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus*. *Prot. Pep. Lett.*, **7** (4): 225-231.
- Macedo, M.L.R.; Freire, M.G.M.; Novello, J.C.; Marangoni, S. (2002). *Talisia esculenta* lectin and larval development of *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- General subjects*, **1571** (2): 83-88.
- Macedo, M.L.R., Damico, D.C.S., Freire, M.G.M., Toyama, M.H., Marangoni, S., Novello, J.C. (2003). Purification and characterization of an N-acetylglucosamine-binding lectin from *Koeleria paniculata* seeds and its effect on the larval development of *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) and *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**: 2980-2986.
- Machuka, J.S., Okeola, O.G., Van Damme, E.J.M., Chrispeels, M.J., Van Leuven, F., Peumans, W.J. (1999a). Isolation and partial characterization of galactose-specific lectins from African yam beans, *Sphenostyles stenocarpa* Harms. *Phytochemistry*, **51**: 721-728.
- Machuka, J., Van Damme, E.J.M., Peumans, W.J. & Jackai, L.E.N., (1999b). Effect of plant lectins on larval development of the legume pod borer, *Maruca vitrata*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **93**: 179-187.
- Mann, K., Farias, C.M.S.A., Del Sol, F.G., Santos, C.F., Grangeiro, T.B., Nagano, C.S., Cavada, B.S., Calvete, J.J. (2001). The amino-acid sequence of the glucose/manose-specific lectin isolated from *Parkia platycephala* seeds reveal three tandemly arranged jacalin-related domains. *Eur. J. Biochem.*, **268**: 4414-4422.
- Mirelman, D., Galun, E., Sharon, N. & Lotan, R. (1975) Inhibition of fungal growth by wheat germ agglutinin. *Nature*, **256**: 414-6.
- Moreira, R.A., Cavada, B.S., De Oliveira, J.T.A., Ainouz, I.L. (1990). Plant Lectins. *Proceeding of the first Brazilian congress on proteins-COBRAP*, **90**: 73-96.

- Moreira, R.A., Monteiro, A.C.O., Horta, A.C.G., Oliveira, J.T.A., Cavada, O. (1997). Isolation and characterization of *Dioclea altissima* var. Megacarpa seed lectin. *Phytochemistry*, **46**: 139-144.
- Moreira, R.A., Castelo-Branco, C.C., Monteiro, A.C.O., Tavares, R.O., Beltramini, L.M. (1998). Purification and partial characterization of a lectin from *Artocarpus incisa* L. seeds. *Phytochemistry*, **47**: 1183-1188.
- Murdock, L.L., Huensig, J.E., Nielsen, S.S., Pratt, R.C. & Shade, R.E. (1990) Biological effects of plant lectins on the cowpea weevil. *Phytochemistry*, **29**: 85-9.
- Murdock, L.L. and Shade, R.E. (2002). Lectins and Protease Inhibitors as Plant Defenses against Insects. *J. Agric. Food Chem.*, **50**: 6605-6611.
- Nomura, K., Ashida, H., Uemura, N., Kushibe, S., Ozaki, T. And Yoshida, M. (1998). Purification and characterization of a mannose/glucose-specific lectin from *Castanea crenata*. *Phytochemistry*, **49** (3): 667-673.
- Panizzi, A .R., Parra, J.R.P. (1991). Ecologia nutricional de insetos e suas aplicações no manejo de pragas. São Paulo: Editora Manole LTDA, Cap. II, p. 9-65: Consumo e utilização de alimentos por insetos.
- Peters, W., (1992). Peritrophic membranes. Springer-Verlag, Berlin.
- Peumans, W.J. & Van Damme, E. (1995). The role of lectins in plant defense. *Histochemical J.*, **27**: 253-71.
- Peumans, W.J. & Van Damme, E. (1995). Lectins as plant defense proteins. In *Plant Physiol.*, **109**: 347-352.
- Peumans, W.J., H.C., Winter, V., Bemer, F., Van Leuven, I.J., Goldstein, P., Truffa-Bachi, E.J.M., Van Damme (1997). Isolation of a novel plant lectin with and unusual specificity from *Calystegia sepium*. *Glycoconj. J.*, **14**: 259-265.
- Peumans, W.J. and Van Damme, E.J.M. (1998). Plant Lectins: Versatile proteins with important perspectives in biotechnology. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, **15**: 199-227.
- Powell, K S., Spence, J., Barathi, M., Gatehouse, J.A., Gatehouse, A.M.R. (1998). Immunohistochemical and development studies to elucidate the mechanism of action of the snowdrop lectin on the rice brown planthopper *Nilaparvata lugens*. *J. Insect Physiol.*, **44**: 529-539.

- Pratt, R.C., Singh, N.K., Shade, R.E., Murdock, L.L. & Bressan, R.A. (1990). Isolation and partial characterization of a seed lectin from therapy bean that delays bruchid beetle development. *Plant Physiol.*, **93**: 1453-9.
- Prakashkumar, R., Pushpangadan, P., Vijaya Kumar, T. (1998). Search for lectins in seeds of tropical trees of Kerela, India. *Biologia Plantarum*, **40**: 155-58.
- Pusztai, A., Ewen, S.W.B., Grant, G., Peumans, W.J., Van Damme, E.J.M., Rubio, L., Bardocz, S. (1990). Relationship between survival and binding of plant lectins during small intestinal passage and their effectiveness as growth factors. *Digestion*, **46**: 308-316.
- Raikhel, N.V. & Broekaert, W.F. (1993). Structure and function of chitin-binding proteins, *In Annu. Ver. Plant Phisiol. Plant Mol. Biol.*, **44**: 591-615.
- Raina, A. and Datta, A. (1992). Molecular cloning of a gene encoding a seed-specific protein with nutritionally balanced amino acid composition from *Amaranthus*. *Proceeding of the National Academy of Sciences, USA* **89**: 11774-11778.
- Ratanapo, S., Ngamjunyaporn, W., Chulavatnatol, M., (2001). Interaction of a mulberry leaf lectin with a phytopathogenic bacterium, *P. syringae pv mori*. *Plant Science*, **160**: 739-744.
- Rao, K.V., Rathore, K.S., Hodges, T.K., Fu, X., Stoger, E., Sudhakar, D., Willians, S., Christou, P., Bharathi, M., Bown, D.P., Powell, K.S., Spence, J., Gatehouse, A.M.R., Gatehouse, J.A. (1998). Expression of snowdrop lectin (GNA) in transgenic rice plant confers resistance to rice brown planthopper. *Plan J.*, **15**: 469-477.
- Richards, A.G and Rcards, P.A., (1977). The peritrophic membranes o insects. *Annu. Rev. Entomol.*, **24**: 219-240.
- Roberts, L.M., Lamb, F.I., Pappins, D.J.C., Lord, J.M. (1985). The primary sequence of *Ricinus comunis* Agglutinin. *The Journal of Biological Chemistry*, **260**: 15682-86.
- Roy, A., Barerjee, S., Majumder, P., and Das, S. (2002). Efficiency of mannose-binding plant lectins in controlling a homopteran insect, the Red Cotton Bug. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**: 6775-6779.
- Rüdiger, H. (1998). Plant Lectins-more than just tools for glycoscientists: occurrence, structure and possible functions of plant lectins. *Acta Anat.*, **161**: 130-152.

- Ryan, C.A. (1981). Plant proteinases. In: The biochemistry of plants. (Marcus, E. ed.). Academic Press, New York.
- Sallam, M.N. (2000). Insect Damage: Damage on Post-harvest In: Mejia, D., Lewis, B., Bothe, C., (Eds), Compendium on Post-harvest Operations, AGSI/FAO (Internet).
- Sampietro, A.R., Islã, M.I., Quiroga, E.N., Vattuone, M.A. (2001). An N-acetylglucosamine oligomer binding agglutinin (lectin) from ripe *Cyphomandra betacea* Sendt. Fruits. *Plant Science*, **160**: 659-667.
- Santoso, T., Sunjaya, Dharmaputra, O.S., Halid, H., Hodges, R.J.(1996). Pest management of psocids in milled rice stores in the humid tropics. *Int. J. Pest Man.*, **42** (3): 189-197.
- Sauvion, N., Rahbe, Y., Peumans, W.J., Van Damme, E.J.M., Gatehouse, J.A., Gatehouse, A.M.R. (1996). Effects of GNA and other mannose binding lectins on development and fecundity of the peach-potato aphid *Mysus persicae*. *Entomol. Appl.*, **79**: 285-293.
- Sequeira, L. & Graham, T.L. (1977) Agglutination of avirulent strains of *Pseudomonas solanacearum* by potato lectin. *Physiol. Plant Pathol.*, **11**: 43-54.
- Sétamou, M., Bernal, J.S., Legaspi, J.C., Mirkov, T.E. and Legaspi, B.C. (2002). Evaluation of lectin-expressing transgenic sugarcane against stalborers (Lepidoptera: Pyralidae): Effects on life history parameters. *J. Econ. Entomol.*, **95** (2): 469-477
- Singh, B.B.; Singh, S.R. and Adjadi, O. (1985) Bruchid resistance in cowpea. *Crop Sci.*, **25**: 736-739.
- Singh, R.S., Tiwary, A.K., Kennedy, J.F. (1999). Lectins: Sources, Activities, and Applications. *Crit. Rev. Biotechnol.*, **19** (2): 145-178.
- Siqueira, J.O., Franco, A.A. (1988). Biotecnologia do solo: fundamentos e perspectivas. Nagy Ltda, São Paulo, 236 p.
- Shah, D.M., Rommens, C.M.T. and Beachy, R. (1995). Resistance to diseases and insects in transgenic plants: progress and applications to agriculture. *Tib. Tech.*, **13**: 362-368.
- Sharon, N. & Lis, H. (1990). Legume Lectins – A large family of homologous proteins. In *FASEB J.*, **4**: 3198-3208.

- Sharon, N. (1993). Lectins- carbohydrates complexes of plants and animals. *Na atomic. Trends Biochem. Sci.*, Vol. **18**: 221-6.
- Spence, K.D., (1991). Structure and physiology of the peritrophic membrane. *In: Physiology of the insect epidermis* (eds K. Binnington and A. Retnakaran). CSIRO, Melbourne, 213-239.
- Stillmark, H. (1888). Über ricin ein giftiges ferment aus den samen von *Ricinus communis* L. und einige andiren Euphorbiaceae. Inaugural Dissertation Dorpat, Tartu.
- Stoger, E., Williams, S., Christou, P., Down, R.E., Gatehouse, J.A. (1999). Expression of the insecticidal lectin from snowdrop (*Galanthus nivalis* agglutinin, GNA) in transgenic wheat plant: effects on predation by the grain aphid *Sitobion avenae*. *Mol. Breed.*, **5**: 65-73.
- Shewry, P.R. and Lucas, J.A. (1997). Plant protein that confer resistance to pest an pathogens. *In: Advances in Botanical Research*, **26**: 135-192.
- Suseelan, K.N., Mitra, R., Pandey, R., Sainis, K.B., and Krishna, T.G. (2002). Purification and characterization of a lectin from wild sunflower (*Helianthus tuberosus* L.) tubers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **407**: 241-247.
- Terra, W.R.; Ferreira, C. (1991). A digestão dos insetos. *Ciência Hoje*, **12**: 31
- Terra, W.R. and Ferreira, C. (1994). Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol.*, **109 B** (1): 1-62.
- Terra, W.R. (2001). The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. *Archives of insect Biochemistry and Physiology*, **47**: 47-61.
- Tortora, G.J., Funke, B.R., Case, C.L. (2000). *Microbiologia* 6^a ed., Porto Alegre, Artes Gráficas, 827 p.
- Transue, T.R., Smith, A.K., Mo, H., Goldstein, I.J. and Saper, M.A. (1997). Structure of benzyl T-antigen disaccharide bound to *Amaranthus caudatus* lectin. *Nature Structural Biology*, **10**: 779-783.
- Van Damme, E.J.M., Allen, A.K. and Peumans, W.J. (1987). Isolation and characterization of a lectin with exclusive specificit towards mannose from snowdrop (*Galanthus nivalis*) bulbs. *FEBS Letters*, **215**: 140-144.

- Van Damme, E.J.M., Barre, A., Bemer, V., Rougé, P., Van Leuven, F. & Peumans, W.J (1995b). A lectin and a lectin- related protein an the most prominent proteins in the bark of yellow wood (*Cladrastis lutea*). *Plant Mol. Biol.*, **29**: 579-598.
- Van Damme, E.J.M., Barre, A., Rougé, P., Van Leuven, F. & Peumans, W.J. (1996a). The NeuAc α -2,6-gal/galNAc binding lectin from Elderberry (*Sambucus nigra*) bark: A type 2 Ribosome Inactivating Protein with na unusual specificity and structure? *In Eur. J. Biochem.*, **235**: 128-137.
- Van Damme, E.J.M., Briké, F., Winter, H.C., Van Leuven, F., Goldstein, I.J. and peumans, W.J. (1996f). Molecular cloning of two different mannose-binding lectins from tulip bulbs. *Eur. J. Of Biochem.*, **236**: 419-427.
- Van Damme, E.J.M., S., Goussaert, D., Charels, I.J., Goldstein, W.J., Peumans (1997a). The mannose/maltose-specific Convolvulaceae lectins. *Eur. J. Cell biol.*, **74** (suppl 46): 7.
- Van Damme, E.J.M., Peumans, W.J., Barre, A. and Rougé, P. (1998). Plant Lectin: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **17** (6): 575-692.
- Van Parijs, J., Broekaert, W.F., Goldstein, I.J., Peumans, W.J. (1991). Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. *Plant.*, **183**: 258-262.
- Van Parijs, J., Joosen, H.M., Peumans, W.J., Geuns, J.M. and Van Laere, A.J. (1992). Effects of the lectin UDA (*Urtica dioica* agglutinin) on germination and cell wall formation of *Phycomyces blakesleeanus* Burgeff. *Archives in microbiology*, **158**: 19-25.
- Xu, C, Moore, C.H., Fountain, D. w., Yu, P.L. (1992). Purification and characterization of a new lectin from tamarillo fruit (*Cynhomandra tetacea*). *Plant Sc.*, Vol., **81**: 183.
- Xu, Q., Liu, Y., Wang, X., Gu, H., Chen, Z. (1998). Purification and characterization of a novel anti-fungal protein from *Gastrodia elata*. *Plant Physiol. Biochem.*, **36**: 899-905.
- Zhang, W., Peumans, W.J., Barre, A., Astoul, C.H., Rovira, P., Rougé, P., Proost, P., Bachi, P.T., Jalali, A.A.H., Van Damme, EIJ.M. (2000) isolation and characterization of a jacalin-related mannose-binding lectin from salt-stressed rice (*Oryza sativa*) seeds. *Planta*, **210**: 970-978.
- Zhu-Salzman, K; Shade, R.E.; Koiwa, H.; Salzman, R.A., Narasimhan, M.; Bressan, R.A.; Hasegawa, P.M. and Murdock, L.L. (1998). Carbohydrate binding and

- resistance to proteolysis control insecticidal activity of *Griffonia simplicifolia* lectin II. *Proc. Natl. Sci. USA*, **95**: 15123-15128.
- Waljuno, K., Scholma, R.A., Beintema, J., Mariono, A., Hahn, A.N. (1975). Amino acid sequence of hevein. *Proc. Int. Rubber Conf. Kuala Lumpur*, **2**: 518-531.
- Wang, M.B., Boulter, D. and Gatehouse, J. (1994). Characterization and sequencing of cDNA clone encoding the phloem protein PP2 of *Cucurbita pepo*. *Plant Molecular Biology*, **24**: 159-170.
- Weis, W.I. and Drickamer, K. (1996). Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. *Annu. Rev. Biochem.*, **65**: 441-473.
- Wright, H.T., Brooks, D.M., Wright, C.S. (1985). Evolution on the multidomain protein wheat germ agglutinin. *J. Mol. Evol.*, **21**, 133-138.
- Youle, R.J., Huang, A.H.C. (1976). Protein bodies from the endosperm of castor bean subfraction protein components, lectins and changes during germination. *Plant Physiol.*, **58**: 703-709.
- Young, M.N., Johnston, R.A.Z., Szabo, A.G. and Watson, D.C. (1989). Homology of the D-galactose-specific lectin from *Artocarpus integrifolia* and *Maclura pomifera* and the role of an unusual small polypeptide subunit. *Biochimica et Biophysica Acta*, **270**: 596-603.