



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS
CURSO: BIOTECNOLOGIA

JOÃO RONIelly CAMPÊLO ARAÚJO

**OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE AMOSTRAS LECTÍNICAS
DE *Cassia fistula* L. NO CONTROLE *IN VITRO* DE *Fusarium solani* e *Colletotrichum* sp.**

MOSSORÓ-RN

2014

JOÃO RONIALLY CAMPÊLO ARAÚJO

**OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE AMOSTRAS LECTÍNICAS
DE *Cassia fistula* L. NO CONTROLE *IN VITRO* DE *Fusarium solani* e *Colletotrichum* sp.**

**Monografia apresentada à Universidade
Federal Rural do Semi-Árido - UFERSA,
para obtenção do título de Bacharel em
Biotecnologia.**

**Orientadora: Profa. Dra. Michele Dalvina
Correia da Silva – UFERSA.**

MOSSORÓ-RN

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Biblioteca Central Orlando Teixeira (BCOT)

Setor de Informação e Referência

A658o Araújo, João Ronielly Campêlo.

Obtenção, caracterização e avaliação de amostras lectínicas de *Cassia fistula* L. no controle *in vitro* de *Fusarium solani* e *Colletotrichum* sp. / João Ronielly Campêlo Araújo. -- Mossoró, 2014.

56f.: il.

Orientadora: Prof^a. Dra. Michele Dalvina Correia da Silva.

Monografia (Graduação em Biotecnologia) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Pró-Reitoria de Graduação.

1. Fitopatogênicos. 2. Leguminosas. 3. Proteínas. I. Título.

RN/UFERSA/BCOT/750-14

CDD: 632.3

Bibliotecária: Vanessa Christiane Alves de Souza Borba

JOÃO RONIALLY CAMPÊLO ARAÚJO

**OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE AMOSTRAS LECTÍNICAS
DE *Cassia fistula* L. NO CONTROLE *IN VITRO* DE *Fusarium solani* e *Colletotrichum* sp.**

**Monografia apresentada à Universidade
Federal Rural do Semi-Árido - UFERSA, para
obtenção do título de Bacharel em
Biotecnologia.**

APROVADA EM: 25/ 07 /2014

BANCA EXAMINADORA

—
Prof.^a. Dra. Michele Dalvina Correia da Silva – UFERSA

Presidente

Prof. Dr. Maurício Sekiguchi de Godoy – UFERSA

Primeiro Membro

(Bacharel em Biotecnologia José Carlos da Silveira Pereira)

Segundo Membro

Dedico este trabalho, assim como todas as minhas conquistas, aos meus pais **Sebastião Alves de Araújo** e **Jeanne Maria Campelo de Matos Araújo**, que sempre se dedicaram ao máximo para que eu pudesse realizar meus sonhos e me dão forças na conquista de todos os meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

À Deus, criador de todas as coisas, por sempre estar ao meu lado e me amparar nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais, Sebastião Alves de Araújo e Jeanne Maria Campêlo de Matos Araújo, por estarem me apoiando em todas as minhas escolhas e fazendo o possível para que eu esteja realizando os meus sonhos.

À minha família, por acreditar que tudo daria certo nessa etapa da minha vida. Em especial, à minha irmã Camilla, meus avós e à Mãe Zefinha (que hoje está com Deus).

À professora Dra. Michele Dalvina Correia da Silva, que tanto me apoiou, ensinou e acreditou que daria certo. É um grande exemplo em minha vida, não só como professora e orientadora, mas também como pessoa.

Ao professor Dr. Maurício Sekiguchi de Godoy, pelo apoio e exemplo na minha graduação e por participar das bancas avaliadoras do projeto.

À professora Dra. Márcia Michelle de Queiroz Ambrósio, pelo apoio no desenvolver do projeto, e à todos do Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia que contribuíram de alguma forma.

Ao Biotecnologista José Carlos da Silveira Pereira, que ajudou muito na minha graduação e por participar das bancas avaliadoras do projeto.

À minha namorada Ana Costa, pelo apoio, cuidado e paciência nos momentos que mais precisei.

À minha amiga e irmã Alanna Cortez, que foi minha companheira em todos os momentos, todas as disciplinas, todos os dias na UFRSA, sem ela minha vida acadêmica e pessoal não seria a mesma.

À minha amiga e irmã Alana Azevedo, que muito acreditou em meu potencial, por ter acompanhado minha trajetória, mesmo passando um período longe foi presente em todos os momentos e foi essencial em minha vida.

À minha amiga e irmã Gillianne Vidal, que acompanhou toda a minha graduação, me apoiou em todos os momentos, esteve presente em minha vida e foi exemplo de amizade e cuidado.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Celular e Molecular, pelo apoio e ajuda nos momentos que precisei e aos meus amigos e companheiros Biotecnologistas, pelos momentos e histórias vivenciadas durante esses 4 anos.

“Nem olhos viram, nem ouvidos ouviram, nem
jamais penetrou em coração humano o que Deus
tem preparado para aqueles que o amam.”

(1Coríntios 2: 9)

RESUMO

Cassia fistula, popularmente conhecida como chuva-de-ouro, pertence à família das leguminosas e tem mostrado grandes potenciais biológicos, como atividade antimicrobiana. Lectinas são proteínas de origem não imune que se ligam reversivelmente a carboidratos. Estas proteínas podem ser encontradas em diversos organismos como vegetais, nos quais são detectadas em sementes, folhas, flores e outros tecidos. As lectinas podem assumir vários papéis biológicos, dentre eles ação contra microorganismos fitopatogênicos. Neste trabalho, foi realizada a purificação parcial e caracterização de amostras lectínicas obtidas de sementes, folhas e flores de *Cassia fistula*; foi realizada também a avaliação do potencial efeito antifúngico de amostras obtidas de folhas e flores contra os fungos fitopatogênicos *Fusarium solani* e *Colletotrichum* sp. Foram obtidos extratos e frações proteicas; as amostras foram avaliadas quanto à concentração proteica, atividade hemaglutinante (AH) e tiveram a AH específica (AHE) determinada. A amostras FF4d (fração 0-80% dialisada da folha) apresentou a mais elevada AHE, sendo escolhida para análise pelos métodos de caracterização (ensaio de inibição da AH e eletroforese). FF4d foi parcialmente inibida com os carboidratos manose e galactose. A eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) revelou em FF4d diversas bandas proteicas bem definidas que possuem, na maioria, acima de 20 kDa. As amostras com mais elevada AHE e elevada concentração proteica, FF4d, FF2d (fração 30-60% dialisada da folha) e FL3d (fração 60-90% dialisada da flor), respectivamente, foram submetidas a cromatografias de bioafinidade; foram detectados picos cromatográficos de material adsorvido e eluído de cromatografias com Quitina, um polímero de N-acetilglicosamina. Extratos brutos, frações proteicas e picos cromatográficos de folhas e flores de *Cassia fistula* foram avaliados *in vitro* quanto à potencial ação antifúngica contra os fungos fitopatogênicos *Fusarium solani* e *Colletotrichum* sp., microrganismos muito emergentes em doenças pós-colheita; FF2d (fração 30-60% dialisada da folha) apresentou atividade estatisticamente significativa de inibição sobre o crescimento de *Colletotrichum* sp.

Palavras-chave: leguminosas; proteínas; fitopatogênicos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Características morfológicas de <i>Cassia fistula</i>	17
Figura 2 – Representação esquemática da aglutinação de eritrócitos por lectinas.....	19
Figura 3 - SDS-PAGE (12 %) da FF4d (fração 0-80% dialisada da folha) obtidas de <i>Cassia fistula</i>	35
Figura 4 - Análise cromatográfica da FF4d (fração 0-80% dialisada da folha) obtida de <i>Cassia fistula</i> em gel de Guar.....	36
Figura 5 – Análise cromatográfica da FF4d (fração 0-80% dialisada da folha) obtida de <i>Cassia fistula</i> em Sephadex G50.....	37
Figura 6 – Análise cromatográfica da FF2d (fração 30-60% dialisada da folha) obtida de <i>Cassia fistula</i> em Quitina	38
Figura 7 – Análise cromatográfica da FL3d (fração 60-90% dialisada da flor) obtida de <i>Cassia fistula</i> em Quitina.....	38
Figura 8 - Atividade antifúngica <i>in vitro</i> de amostras lectínicas obtidas de folhas de <i>Cassia fistula</i> (extrato bruto, EBF; fração 30-60% dialisada, FF2d) sobre <i>Colletotrichum</i> sp.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Atividade hemaglutinante (AH) dos extratos brutos (EB) em solução salina dos tecidos de <i>Cassia fistula</i>	31
Tabela 2 – Atividade hemaglutinante (AH) dos extratos brutos (EB) de folhas de <i>Cassia fistula</i> em diferentes tampões.....	31
Tabela 3 – Atividade hemaglutinante (AH) das frações proteicas dialisadas e não dialisadas de sementes, folhas e flores de <i>Cassia fistula</i>	32
Tabela 4 – Estimativa proteica das frações dialisadas e não dialisadas das sementes, folhas e flores de <i>Cassia fistula</i> ; e atividade hemaglutinante específica (AHE) com eritrócitos de coelho.....	33
Tabela 5 – Inibição da atividade hemaglutinante utilizando eritrócitos humanos tipo A.....	35
Tabela 6 – Atividade hemaglutinante, dosagem proteica e atividade hemaglutinante específica dos picos cromatográficos dialisados, obtidos a partir de fração 30-60% dialisada da folha (FF2d) e fração 60-90% dialisada da flor (FL3d).....	39
Tabela 7 – Ensaio antifúngico com amostras obtidas de folhas e flores de <i>Cassia fistula</i> . Média das quintuplicatas, desvio padrão e porcentagem de inibição do crescimento de <i>Colletotrichum</i> sp.....	40

LISTA DE SIGLAS

AH	Atividade hemaglutinante
AHE	Atividade hemaglutinante específica
BDA	Batata-Dextrose-Ágar
BSA	Albumina sérica bovina
EB	Extrato bruto
EBF	Extrato bruto folha
EBL	Extrato bruto flor
FF1	Fração 0-30% da folha
FL1	Fração 0-30% da flor
FS1	Fração 0-30% da semente
FF2	Fração 30-60% da folha
FL2	Fração 30-60% da flor
FS2	Fração 30-60% da semente
FF3	Fração 60-90% da folha
FL3	Fração 60-90% da flor
FS3	Fração 60-90% da semente
FF4	Fração 0-80% da folha
FF1d	Fração 0-30% dialisada da folha
FL1d	Fração 0-30% dialisada da flor
FS1d	Fração 0-30% dialisada da semente
FF2d	Fração 30-60% dialisada da folha
FL2d	Fração 30-60% dialisada da flor
FS2d	Fração 30-60% dialisada da semente
FF3d	Fração 60-90% dialisada da folha
FL3d	Fração 60-90% dialisada da flor
FS3d	Fração 60-90% dialisada da semente
FF4d	Fração 0-80% dialisada da folha
IAH	Inibição da atividade hemaglutinante
kDa	Quilodalton
ml/h	Mililitros/hora
p/v	Peso/volume

PF1	Primeiro pico cromatográfico da fração 30-60% dialisada da folha
PF2	Segundo pico cromatográfico da fração 30-60% dialisada da folha
PIC	Porcentagem de inibição de crescimento
PL	Pico cromatográfico da fração 60-90% dialisada da flor
rpm	Rotação por minuto
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo sulfato sódico de dodecila
Test.	Testemunha
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	15
2.1. DIVERSIDADE VEGETAL E PLANTAS COM POTENCIAL ANTIFÚNGICO.....	15
2.1.1. Família Leguminosae e <i>Cassia fistula</i> L.....	16
2.2. LECTINAS.....	18
2.3. DOENÇAS EM PÓS-COLHEITA E FUNGOS FITOPATOGÊNICOS.....	21
2.3.1 <i>Colletotrichum</i> sp.....	23
2.3.2 <i>Fusarium solani</i>	23
3. OBJETIVOS.....	25
3.1. OBJETIVO GERAL.....	25
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
4.1. COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO.....	26
4.2. EXTRAÇÃO E PRECIPITAÇÃO PROTEICA.....	26
4.3. ENSAIOS DE ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE.....	27
4.4. ESTIMATIVA PROTEICA.....	27
4.5. ESPECIFICIDADE LECTÍNICA: ENSAIOS DE INIBIÇÃO DA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE	27
4.6. POTENCIAL PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ATRAVÉS DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS.....	28
4.7. CARACTERIZAÇÃO ATRAVÉS DE ELETROFORESES EM GEL DE POLIACRILAMIDA – PAGE.....	28
4.8. ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIFÚNGICA.....	29
4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
5.1 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE AMOSTRAS LECTÍNICAS.....	31
5.2 ENSAIO ANTIFÚNGICO.....	40
6. CONCLUSÕES.....	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é detentor da maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55 mil espécies catalogadas, de um total estimado entre 350 mil e 550 mil (FORZZA et al., 2012). Sendo o Brasil um país rico em biodiversidade vegetal, inúmeras plantas são utilizadas por grande parte de nossa população, na forma de fitoterápicos, nutracêuticos ou alimentos (BLUMENTHAL et al., 2000). O isolamento de substâncias ativas a partir de fontes naturais, como extratos de plantas, vem crescendo com o objetivo de aplicar moléculas, constituintes dos extratos, como ferramentas biotecnológicas (GARCIA, 1995).

Dentre as plantas potenciais, existe a *Cassia fistula*, que é uma espécie de importância ornamental, com distribuição em regiões tropicais e subtropicais, incluindo a região Semiárida do Brasil. Conhecida popularmente como chuva de ouro, ela tem sido avaliada quanto às suas propriedades biológicas, e tem apresentado ação antitumoral, antioxidante, cicatrizante, larvívica, antinutricional e antimicrobiana (GUPTA et al., 2000; SIDDHURAJU et al., 2002; MANONMANI et al., 2005; KUMAR et al., 2006; DURAI PANDIYAN e IGNACIMUTHU, 2007; DURAI PANDIYAN et al., 2011; GOVINDARAJAN et al., 2011). Tais propriedades biológicas são possíveis por presença de biomoléculas ativas como enzimas, inibidores de proteases e lectinas (SILVA, 2008).

Lectinas são definidas como proteínas de origem não imunológica, que possuem sítios de interação através dos quais são capazes de ligar de forma reversível e específica, a carboidratos livres ou presentes em glicoconjugados, são conhecidas desde o final do século XIX e podem assumir diversos papéis biológicos devido aos seus sítios de ligação a carboidratos (LIS e SHARON, 1998). As lectinas possuem várias e importantes aplicações por constituírem um dos grupos mais versáteis de proteínas de plantas usadas em pesquisa biomédica e biológica, básica e aplicada (SILVA, 2001). Essas proteínas têm sido estudadas como potentes inibidoras do crescimento de microrganismos, dentre eles os fungos fitopatogênicos (SOUZA et al., 2011), que são os principais causadores de doenças em frutos em pós-colheita (DANTAS et al., 2003).

O presente trabalho propõe detectar atividade lectínica em extratos e frações proteicas obtidas de tecidos de *Cassia fistula*, caracterizar bioquimicamente bem como avaliar o efeito biológico de amostras lectínicas sobre o crescimento dos fungos fitopatogênicos *Fusarium solani* e *Colletotrichum* sp, espécies que causam doenças em frutas em pós-colheita.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. DIVERSIDADE VEGETAL E PLANTAS COM POTENCIAL ANTIFÚNGICO

O Brasil é o país de maior biodiversidade do planeta, aproximadamente 56 mil espécies (FORZZA et al., 2012), que associada a uma rica diversidade étnica e cultural detém um valioso conhecimento tradicional associado ao uso de plantas que tem o potencial necessário para o desenvolvimento de pesquisas resultantes em tecnologias e terapias apropriadas (GIULIETTI et al., 2005). Todavia, até 2003 apenas 17% das plantas foram estudadas de alguma maneira quanto ao potencial biológico e, na maioria dos casos, sem grande aprofundamento nos aspectos fitoquímicos e biotecnológicos (GUERRA E NODARI, 2003).

O Nordeste do Brasil é caracterizado pela região Semiárida e também pelo bioma Caatinga, tais regiões são possuidoras de uma grande diversidade biológica e suas espécies vegetais são alvo de estudos de bioprospecção (CARTAXO et al., 2010), uma vez que muitas espécies de plantas apresentam biomoléculas potenciais de extremo interesse para a agroindústria

Estudos realizados com plantas com potenciais biológicos de interesse agroindustrial têm merecido cada vez mais atenção, é a partir destas plantas que se pode extrair biomoléculas como lectinas, enzimas, inibidores de proteases e outras classes de proteínas detentoras de propriedades biológicas que são alvos de interesse para a agroindústria, biotecnologia e áreas afins (SILVA, 2008).

As proteínas antimicrobianas, entre elas as lectinas, prendem o interesse de muitos pesquisadores por elas poderem servir como ferramentas contra infecções fúngicas e bacterianas em organismos vegetais ou mesmo em patologias humanas (PEUMANS e VAN DAMME, 1995). As lectinas isoladas de leguminosas têm demonstrado atividade contra fungos (YAM et al., 2005; VAZ et al., 2010; CHARUNGCHITRAK et al., 2011), e podem ser utilizadas como defensivos alternativos para controle de fungos fitopatógenos.

2.1.1. Família Leguminosae e *Cassia fistula* L.

A família Leguminosae é a terceira maior família de fanerógamas (perdendo apenas para Asteraceae e Orchidaceae). Apresenta distribuição cosmopolita (LEWIS, 1987), com aproximadamente 727 gêneros e 19.325 espécies, que variam de árvores emergentes até ervas diminutas e efêmeras (LEWIS et al., 2005). No Brasil, ocorrem aproximadamente 188 gêneros e cerca de 2.100 espécies, distribuídas em quase todas as formações de flora (BARROSO et al., 1991; LIMA, 2000). O potencial econômico dessa família é incontestável, pois fornece madeiras, óleos e resinas de boa qualidade, seus frutos e sementes são consumidos como alimento, produzem matéria prima para perfumes, tinturas e fármacos, sendo ainda, muitas espécies utilizadas como ornamentais (LEWIS e OWEN, 1989; LEWIS., 1987).

O gênero *Cassia* (Leguminosae) é constituído por mais de 600 espécies incluindo arbustos, árvores e ervas, distribuídas em regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo. (AGARKAR e JADGE, 1999). Cerca de 30 espécies são muito estudadas e relatadas como fontes ricas em derivados fenólicos, antracênicos e antraquinônicos, como *Cassia fistula* (GUPTA et al., 1989; AGARKAR e JADGE, 1999; KUO et al., 2002), *Cassia torosa* (KITANAKA et al., 1990) e *Cassia sophera* (MALHOTRA e MISRA, 1982; JOSHI et al., 1985); esses derivados são descritos como as substâncias responsáveis pela atividade dos extratos de várias espécies medicinais utilizadas na Índia, Paquistão, Ceilão, Egito e vários outros países, como purgativos, mas que também apresentam atividades antimicrobiana, bactericida, antiulcerogênica, anti-inflamatória (MALHOTRA e MISRA, 1982; JOSHI et al., 1985; GUPTA et al., 1989; KITANAKA et al., 1990; AGARKAR e JADGE, 1999; KUO et al., 2002) entre outras.

Uma das espécies mais representativas do potencial deste gênero é *Cassia fistula*, também conhecida como chuva-de-ouro, originária da Ásia e muito apreciada pela beleza de seus cachos de flores amarelas que medem aproximadamente 30 cm; suas folhas são do tipo pinadas, de coloração verde que variam de 4 a 8 pares de folíolos; e as árvores podem atingir até 15 m de altura e de 4 a 6 m de diâmetro (CORRÊA, 1984) (Figura 1).

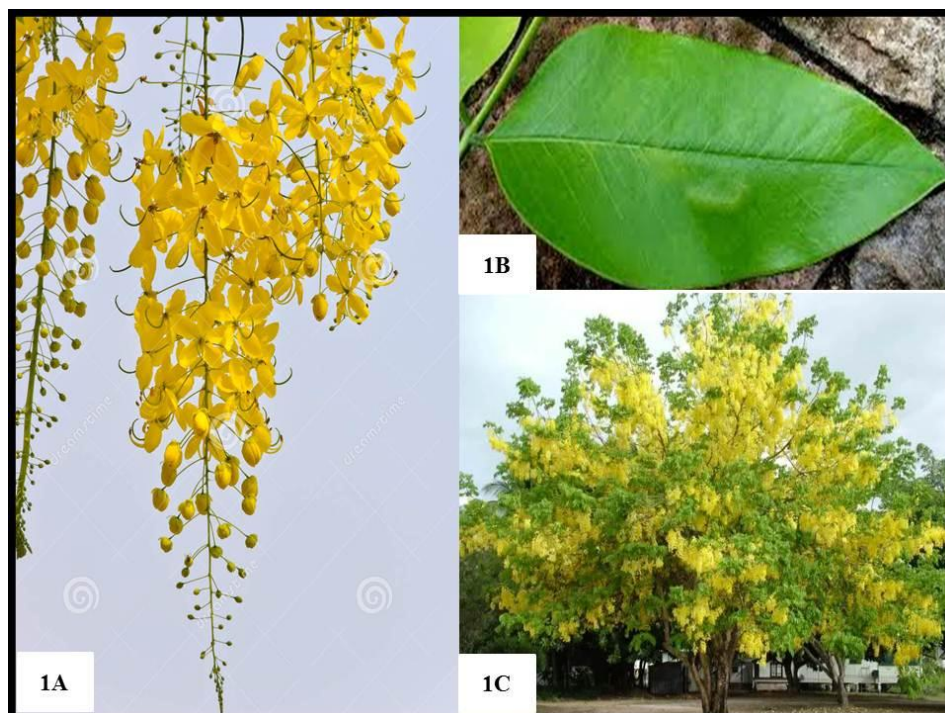


Figura 1 – Características morfológicas de *Cassia fistula* – 1A – Cachos de flores; 1B – Folhas; 1C – Árvore. (Fonte: <http://www.dreamstime.com>)

Estudos com frações de extratos de várias partes de *Cassia fistula* têm demonstrado atividade antibacteriana significativa contra *Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes*, *Proteus vulgares* e *Pseudomonas aeruginosa* (bactérias gram-negativas). Estes dados ressaltam a importância da planta como um potencial antibiótico natural (SAMY e IGNACIMUTHU, 2000). As folhas da *Cassia fistula* apresentam atividades laxativa, purgativa e antirreumática, e o suco das folhas é utilizado em doenças cutâneas (BHAKTA et al., 1999).

No Nepal, *Cassia fistula* é uma espécie endêmica e a medicina tradicional local utiliza seu fruto para tratamento de reumatismo e inflamação. Devido a estas indicações, o extrato metanólico de seus frutos foi avaliado e obteve atividade inibitória de mediadores pró-inflamatórios, como os leucotrienos; também foi capaz de inibir a peroxidação de lipídios em fosfolípidos cerebrais bovinos, o que indicou sua atividade antioxidante (SUNIL e MULLER, 1998). Também demonstrou atividade inibitória de protease associada à atividade antifúngica e repelente de insetos (GUPTA et al., 2000).

Extratos hexânicos obtidos a partir das sementes, folhas e flores de *Cassia fistula* apresentaram atividade antifúngica contra os fungos fitopatógenos *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum* (ANDRADE, 2006). Extratos hidroalcoólicos de folhas de *Cassia fistula* demonstraram ação biológica contra fungos,

ocasionando uma potente inibição do crescimento dos fungos *Aspergillus niger*, *Aspergillus clavatus* e *Candida albicans* (BHALODIA et al., 2011). Ali et al. (2003) purificaram lectinas das sementes de *Cassia fistula*, as quais demonstraram atividade antibacteriana, inibindo o crescimento de *Bacillus megaterium*, *Streptococcus β -haemolyticus* e *Shigella boydii*.

2.2. LECTINAS

Dentre as macromoléculas biológicas, as lectinas correspondem a um importante grupo de proteínas amplamente estudadas desde o início do século XIX (SHARON e LIS, 2004). Goldstein et al. (1980) definiram lectinas como proteínas de origem não imunológica que se ligam de um modo estável a carboidratos, sendo capazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados sem qualquer tipo de atividade enzimática para os que são alvo da sua ligação. Elas existem na forma livre ou associadas às células, podendo ser encontradas na superfície ou no interior dessas (LIS e SHARON, 1998). As lectinas são amplamente distribuídas na natureza, encontradas numa variedade de organismos como plantas, vírus, bactérias, fungos, invertebrados (VIJAYAN e CHANDRA, 1999) e vertebrados (HARRISON, 1991; MAKER et al., 2002).

A história da pesquisa envolvendo lectinas ou “lectinologia” iniciou em 1888, quando Hermann Stillmark descobriu que extratos de *Ricinus communis* causavam aglutinação de eritrócitos; foi demonstrado que o ingrediente ativo era uma proteína, denominada por ele de ricina. A palavra aglutinina foi então largamente usada para descrever moléculas e extratos que causam agrupamento ou aglutinação de eritrócitos e outras células. Foi somente em 1954 que o termo lectina foi introduzido por Boyd e Shapleigh, para enfatizar a habilidade exibida por algumas aglutininas de plantas em discriminar eritrócitos do grupo sanguíneo ABO, devido às reações com os resíduos de açúcar expostos (BIES et al., 2004; HARTLEY et al., 2004) (Figura 2).

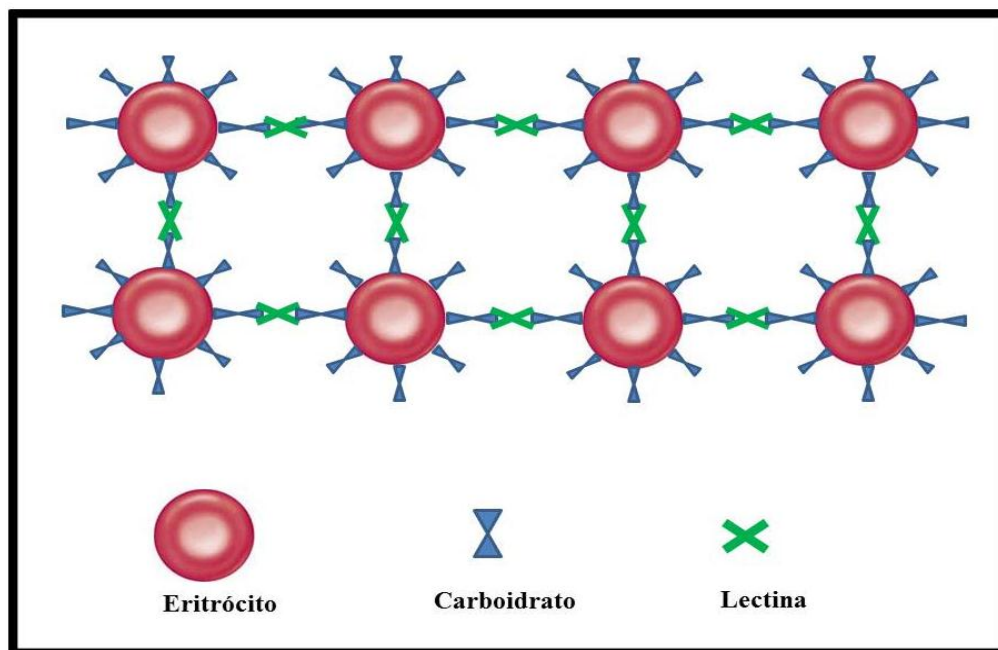


Figura 2 - Representação esquemática da aglutinação de eritrócitos por lectinas. (Fonte: Autor)

A era moderna da lectinologia teve início no começo da década de 60, com duas grandes descobertas realizadas por Nowell (1960); ele estabeleceu que a lectina de *Phaseolus vulgaris*, conhecida como fitohemaglutinina (PHA), é mitogênica, pois possui a capacidade de estimular linfócitos a entrar em mitose; assim como a PHA, a lectina da *Canavalia ensiformes* (ConA) também apresenta a mesma atividade mitogênica, mas diferentemente de PHA, essa atividade podia ser inibida por pequenas concentrações de monossacarídeos, por exemplo a manose (SHARON e LIS, 2004).

O termo lectina foi redefinido com base em critérios funcionais e estruturais, sendo hoje definida como todas as proteínas que possuem pelo menos um domínio não catalítico que se liga reversivelmente a mono ou oligossacarídeos específicos. As lectinas são subdivididas em quatro classes (PEUMANS e VAN DAMME, 1998):

- As merolectinas: proteínas que possuem pelo menos um domínio de ligação a carboidratos e por isso são incapazes de aglutinar células por serem monovalentes.
- As hololectinas: proteínas formadas por dois ou mais domínios de ligação a carboidratos, que são idênticos ou homólogos; elas compreendem a maioria das lectinas de plantas e se comportam como verdadeiras aglutininas.
- As quimerolectinas: proteínas de fusão que possuem pelo menos um domínio de ligação a carboidrato e um domínio não relacionado, com uma atividade catalítica bem

definida ou outras atividades biológicas (que age independentemente do domínio de ligação a carboidratos).

- As superlectinas: são proteínas que possuem ao menos dois domínios ligantes de carboidratos que apresentam diferentes especificidades.

A maioria das lectinas de plantas está presente em cotilédones de sementes, onde podem ser encontradas no citoplasma ou em corpos proteicos, embora elas também tenham sido encontradas em raízes, caules, folhas (MOREIRA et al., 1991) e outros tecidos. Já foi demonstrado que lectinas encontradas nas folhas têm propriedades similares às obtidas de sementes da mesma planta (SPILATRO et al., 1996); portanto, lectinas encontradas em tecidos vegetais distintos podem apresentar propriedades similares. A habilidade das lectinas em formar interações com carboidratos ou glicoproteínas pode ser facilmente detectada por ensaios de aglutinação, em que essas proteínas podem interagir através de ligações reversíveis com resíduos de carboidratos na superfície das células, formando uma malha. O ensaio de hemaglutinação é utilizado frequentemente por possibilitar a fácil visualização desta propriedade aglutinante de eritrócitos por lectinas; eritrócitos utilizados no ensaio podem ser de origem humana ou de outros animais (FLEMMING et al., 1992), frescos, ou tratados enzimaticamente ou quimicamente.

Apesar de lectinas apresentarem comumente uma alta eficiência e estabilidade, existem alguns fatores que influenciam a atividade dessas proteínas, tais como íons, pH e temperatura. Por exemplo, muitas lectinas necessitam de íons para manter a sua atividade (SHARON e LIS, 1990). A estabilidade térmica das lectinas também pode ser bastante variável; lectinas de diversas fontes mostram-se estáveis após serem mantidas congeladas por meses ou anos, após sucessivos congelamentos e descongelamentos (CORREIA e COELHO, 1995) ou depois de mantidas por poucos dias em temperatura ambiente (RAY et al., 1992).

Apesar da grande quantidade de informação sobre sequência de aminoácidos e especificidade de lectinas, a função fisiológica das lectinas de plantas tem sido amplamente estudada e nem sempre definida (SHARON e LIS, 2004). Lectinas encontradas em raízes de leguminosas podem estar envolvidas no reconhecimento e/ou ligação de bactérias fixadoras de nitrogênio, como *Rizhobium* spp., desempenhando papel no estabelecimento da simbiose (DÍAZ et al., 1989; KIJNE et al., 1992; VAN EIJDEN et al., 1995). Várias evidências indicam que as lectinas desempenham um papel de defesa nas plantas, protegendo estas de microrganismos fitopatogênicos (como bactérias e fungos), de animais predadores e de insetos (PEUMANS e VAN DAMME, 1995; SHARON e GOLDSTEIN, 1998).

Lectinas extraídas das folhas de *Phthirusa pyrifolia* mostraram atividades bactericidas eficazes contra bactérias Gram positivas (*Staphylococcus epidermidis* e *Bacillus subtilis*), Gram negativas (*Klebsiella pneumoniae*) e fungos (*Fusarium lateritium* e *Rhizoctonia solani*) (COSTA et al., 2010). Outra lectina, obtida da casca de *Sebastiania jacobinensis* inibiram o crescimento dos fungos *Fusarium moniliforme* e *Fusarium oxysporum* (VAZ et al., 2010).

Alguns exemplos de lectinas extraídas de leguminosas com atividade antifúngica contra fungos dos gêneros e espécies utilizadas nesse trabalho têm sido citados. As lectinas isoladas de *Pisum sativum* (SITOHY et al., 2007) e *Astragalus mongholicus* (YAM et al., 2005) mostraram ser inibidoras do crescimento de *Fusarium oxysporum*. A lectina isolada de raízes secundárias da *Bauhinia monandra* apresentou atividade antifúngica contra espécies fitopatogênicas de *Fusarium*, sendo mais ativa contra *Fusarium solani* (SOUZA et al., 2011). A lectina purificada das sementes de *Archidenron jiringa* mostrou atividade antifúngica contra *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum cassiicola*, mesmo quando avaliada em baixas concentrações (CHARUNGCHITRAK et al., 2011).

2.3. DOENÇAS PÓS-COLHEITA E FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

Os patógenos em pós-colheita, principalmente os quiescentes (infectam a fruta na pré-colheita, mesmo na ausência de ferimentos, permanecendo latentes até a maturação) (BARKAI-GOLAN, 2001), causam grandes transtornos aos atacadistas, varejistas e, principalmente, aos importadores de frutos, uma vez que os sintomas das doenças aparecem durante o armazenamento e transporte, em frutos aparentemente sadios, podendo causar perdas drásticas devido a deteriorações (SOMMER, 1982; BENATO, 1999; MORANDI, 2002). As perdas pós-colheita podem ser definidas como quaisquer mudanças na disponibilidade, valor nutricional, salubridade ou qualidade que impeçam o produto de ser consumido (ÁLVARO e BERDIÉ, 2004). Estima-se que as perdas acumuladas na pós-colheita de frutos tropicais e subtropicais oscilem entre 20% e 80%, na maioria dos países em desenvolvimento (BENATO, 2002; FINGER e VIEIRA, 2002). A redução das perdas em pós-colheita na cadeia produtiva de frutas representa um constante desafio (KADER, 2002).

Alguns microrganismos causadores de podridões secretam substâncias tóxicas denominadas micotoxinas (SYLOS e RODRIGUEZAMAYA, 1999; DRUSCH e RAGAB, 2003), tornando o produto impróprio ao consumo, diminuindo seu valor nutricional e

comercial. Há uma grande preocupação com essas substâncias, que têm sido relatadas como ameaças à saúde humana e de animais, sendo causadoras de mutagênese e carcinogênese em células humanas (YIANNIKOURIS e JOUANY, 2002; RICHARD e PAYNE, 2002). As perdas pós-colheita podem ter causas diversas; uma das causas em destaque são as doenças (CHITARRA e CHITARRA, 1990), onde as ocasionadas por fungos ocorrem com maior frequência e atividade, sendo responsáveis por 80 a 90% do total de perdas causadas por fitopatógenos (DANTAS et al., 2003).

No Brasil, a antracnose e a podridão são as principais doenças que ocorrem em pós-colheita e são os principais fatores que afetam a qualidade dos frutos. A antracnose em frutíferas, causada na maioria dos casos por espécies de *Colletotrichum*, é considerada uma doença de elevada importância econômica no Nordeste do Brasil (SERRA e SILVA, 2004), por ser a principal doença de frutos em pós-colheita, como na banana (*Musa spp.*), no caju (*Anacardium occidentale* L.), na manga (*Mangifera indica* L.), no mamão (*Carica papaya* L.) e no maracujá (*Passiflora edulis f. flavicarpa* Deg.) (BENATO, 1999). O melão, principal fruto produzido no Nordeste (cerca de 94 % da produção nacional) (AGRIANUAL 2013), também tem sofrido incidência e severidade de doenças fúngicas, principalmente provocadas por espécies de *Fusarium*, fitopatógenos que causam podridões (LIMA e COSTA, 2001).

Os patógenos em pós-colheita são controlados, principalmente, pela aplicação massiva de fungicidas (BARKAI-GOLAN, 2001). Existe, portanto, uma demanda crescente por compostos e estratégias alternativas para o controle de doenças fúngicas em frutos, visando diminuir os resíduos químicos (KNIGHT et al, 1997; MARI e GUIZZARDI, 1998). O uso indiscriminado e excessivo de agrotóxicos ao longo dos anos gerou a crescente resistência de pragas, como os microrganismos fitopatogênicos, aos produtos sintéticos, de alto custo econômico e ambiental, tornando insustentável os sistemas de produção de frutíferas (COUTINHO, 1996). Os principais tipos de fungicidas químicos utilizados em pós-colheita são dos grupos de benzimidazóis, cúpricos, chlorotalonil e ditiocarbamatos. Estes fungicidas geram resíduos nos produtos agrícolas e acúmulo no meio ambiente, além de serem prejudiciais à saúde (MARI e GUIZZARDE, 1998).

Diante disso, a busca por novas moléculas que possam substituir os produtos químicos encontra nas plantas uma alternativa de interesse econômico, social e ecológico bastante promissor (PRATES, 2000). Muitas preparações vegetais contendo proteínas têm sido utilizadas contra microrganismos; entre elas, amostras lectínicas têm demonstrado eficiente atividade contra fungos fitopatogênicos (YAM et al., 2005; SITOBY et al., 2007; SOUZA et

al., 2011), o que pode caracterizar o uso de tais preparações lectínicas como uma nova alternativa biológica para o controle de microrganismos que causam grandes prejuízos ao setor agrícola e à economia.

2.3.1 *Colletotrichum* sp.

Os fungos do gênero *Colletotrichum* são pertencentes à ordem Melanconiales (classe Coelomycetes). As espécies de *Colletotrichum* possuem uma ampla distribuição geográfica, apesar de ambientes quentes e úmidos serem ideais para as espécies (JEFFRIES et al., 1990); as quais são muito diversas, pois incluem saprófitas e fitopatógenos. Esses fungos são os causadores de uma diversidade de doenças como a antracnose (BAILEY e JEGGER, 1992), sendo a principal doença de frutos em pós-colheita. O sintoma típico da antracnose é caracterizado por lesões arredondadas, grandes, necróticas, com bordos ligeiramente elevados com o centro dos tecidos deprimidos, onde são produzidas massas de conídios de coloração alaranjada (BAILEY et al., 1992). Como consequência, pode ocorrer uma podridão mole nos frutos, prejudicando a sua comercialização (LIMA FILHO et al., 2003).

Entre as espécies desse gênero, *Colletotrichum gloeosporioides* (RESENDE et al., 2005) e *Colletotrichum musae* (VENTURA e HINZ, 2002) são bastante disseminadas e afetam diversos frutos, como a banana que é a segunda fruta mais consumida no mundo, em torno de 10 kg/habitante/ano (FAOSTAT, 2011). Várias outras espécies de fungos desse gênero também são identificadas causando doenças nas plantas, como o *Colletotrichum acutatum* encontrado no pequi (ANJOS e CHARCHAR, 2002) e o *Colletotrichum fragariae*, encontrado no morangueiro (TANAKA et al., 1997).

2.3.2 *Fusarium solani*

Fusarium solani (Mart) Sacc é uma espécie que pertence à família Nectriaceae que está representada por 32 espécies e 18 variedades (INDEX FUNGORUM, 2011). Essa espécie fitopatogênica causa várias doenças em determinadas culturas de ervilha, soja, feijão e batata (LUGINBUHL, 2010). Também são fungos oportunistas emergentes na espécie humana (VIDOTTO, 2004), já tendo sido isolado a partir de olhos, unhas, pele e cavidades nasais de humanos (LESLIE e SUMMERELL, 2006).

Fusarium solani f. sp. *cucurbitae* pertence à classe dos Sordariomycetes ou fungos mitospóricos (AGRIOS, 2005), e possui especialização fisiológica às Cucurbitáceas. Dois tipos são descritos, sendo que o tipo 1 infecta raízes, colo e fruto, e o tipo 2 infecta apenas frutos (ZITTER, 1998). O efeito patogênico de *Fusarium solani* ocorre devido à secreção de uma ampla gama de enzimas hidrolíticas envolvidas na penetração e colonização nos tecidos da planta hospedeira, durante a infecção e as enzimas de degradação da parede celular podem provocar diferentes reações patogênicas em cada interação planta-micróbio; também foi proposto que depolimerases presentes na parede celular podem funcionar como sinais ativadores de vários processos fisiológicos da planta, como a indução de respostas de defesa vegetal (AYED et al., 2007).

Fitopatologias causadas por essa espécie de fungo foram relatadas, como podridões pendiculares após colheita de mamão (CORDEIRO e MATOS, 2000; NERY-SILVA et al., 2001) e podridão-do-colo em melão (MARINHO et al., 2002; ANDRADE et al., 2005). Segundo esses mesmo autores, no Nordeste Brasileiro, *Fusarium solani* encontra-se disseminado em quase todos os campos de produção do meloeiro dos estados do Rio Grande do Norte e Ceará, demonstrando a participação deste fungo como importante nos processos de infecção dos frutos, causando podridão.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

- Obter amostras lectínicas parcialmente purificadas a partir da espécie *Cassia fistula*, caracterizar e avaliar quanto a potencial atividade antifúngica *in vitro* contra os fungos fitopatogênicos *Colletotrichum* sp. e *Fusarium solani*.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter extratos proteicos a partir de sementes, folhas e flores de *Cassia fistula*;
- Obter frações proteicas parcialmente purificadas;
- Detectar atividade lectínica em extratos brutos e em frações proteicas;
- Caracterizar a atividade lectínica frente à variação de pH e presença de carboidratos;
- Caracterizar proteínas quanto ao perfil eletroforético;
- Potencialmente purificar e caracterizar proteínas quanto ao perfil cromatográfico;
- Avaliar as amostras lectínicas quanto a potencial atividade antifúngica *in vitro* contra *Colletotrichum* sp e *Fusarium solani*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO

Os tecidos vegetais da espécie *Cassia fistula* utilizados no estudo foram folhas, flores e sementes. Os tecidos foram coletados pela manhã em área privada situada na cidade de Mossoró-RN e conduzidos para secar em temperatura ambiente. Um espécime da planta coletada foi destinado à identificação taxonômica baseada na comparação com as coleções pertencentes ao acervo do Herbário Dárdano de Andrade-Lima, do Departamento de Ciências Vegetais da UFERSA.

4.2. EXTRAÇÃO E PRECIPITAÇÃO PROTEICA

Após coleta e limpeza, as sementes, folhas e flores da espécie *Cassia fistula* foram trituradas e as farinhas submetidas aos processos de extração proteica (*overnight*, em temperatura ambiente, sob agitação constante) em solução salina (NaCl 0,15M) ou em soluções tampão com valores de pH 2, 5, 7, 8 e 10 (10% p/v); em seguida, os extratos foram filtrados em gaze e centrifugados (4 °C, 8000 rpm, 20 min). Os extratos brutos (EB) obtidos após centrifugação foram submetidos à purificação proteica parcial, através de precipitação fracionada utilizando sulfato de amônio em saturações de 0-30%, 30-60% e 60-90% (com EB de sementes e flores) e de 0-30%, 30-60%, 60-90% e 0-80% (com o EB de folhas). Após cada fracionamento (agitação por 4 h, em temperatura ambiente), as amostras foram centrifugadas (a 4 °C, 8000 rpm, 20 min), os sobrenadantes foram separados e utilizados para um novo fracionamento; as frações precipitadas foram ressuspensas em NaCl 0,15 M de maneira uniforme entre as amostras (1mL de NaCl 0,15M/10g de farinha utilizada para extração). As frações proteicas obtidas foram submetidas a processos de diálise exaustiva em membrana semipermeável (a 4°C, por 5h) para separação do sulfato de amônio (LEHNINGER et al.,1999).

4.3. ENSAIOS DE ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE

Para detectar a possível atividade lectínica, as amostras proteicas foram submetidas a ensaios de atividade hemaglutinante (AH) em placas de microtitulação (CORREIA e COELHO, 1995). Foram feitas diluições seriadas das amostras em NaCl 0,15 M, seguidas da adição de eritrócitos de animais (coelho, carneiro, bezerro) ou humanos (sistema ABO) em suspensão de 2,5 %, tratados com glutaraldeído de acordo com o método de Bing et al. (1967); o título da AH foi determinado como o inverso da maior diluição com total aglutinação, após 45 min de repouso. Atividade hemaglutinante específica (AHE) foi determinada como a razão entre a AH e a concentração proteica (AH/ mg/mL).

4.4. ESTIMATIVA PROTEICA

A quantificação proteica das amostras lectínicas foi determinada de acordo com o método de Lowry et al. (1951), sendo utilizada uma curva padrão de albumina sérica bovina (BSA), com valores compreendidos entre 0 e 500 µg.

4.5. ESPECIFICIDADE LECTÍNICA: ENSAIOS DE INIBIÇÃO DA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE

Foram feitas diluições seriadas (em placas de microtitulação) da fração 0-80% dialisada da folha (FF4d), em soluções contendo os carboidratos (glicose, manose, galactose ou fucose) com concentrações entre 25 e 200 mM em NaCl 0,15 M. Após repouso (15 min), foram adicionados eritrócitos glutarizados de coelho ou humanos. O título de AH foi determinado após repouso (45 min) (BING et al., 1967); a leitura da inibição da AH foi determinada como o inverso da maior diluição com aglutinação total. O título de AH observado no ensaio de inibição foi comparado com o título do ensaio de atividade hemaglutinante, para determinar se houve inibição parcial, total ou se não houve inibição da AH.

4.6. POTENCIAL PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ATRAVÉS DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

Foram realizadas cromatografias de bioafinidade com as amostras parcialmente purificadas e dialisadas que apresentaram atividade lectínica, além de apresentar elevada AHE ou concentração proteica (LEHNINGER et al., 1999). A fração 0-80% dialisada da folha (FF4d) foi submetida a cromatografias utilizando gel de Guar (polímero de galactose) num fluxo de 20 mL/h ou Sephadex G-50 (polímero de glicose) num fluxo de 30 mL/h; o não adsorvido foi coletado em NaCl 0,15 M e, em seguida, uma solução de NaCl 1 M (na cromatografia em gel de Guar) ou de glicina 1 M (na cromatografia em Sephadex G-50) foi aplicada para eluição de potenciais proteínas adsorvidas. A fração 30-60% dialisada da folha (FF2d) e a fração 60-90% dialisada da flor (FL3d) foram também submetidas a processos cromatográficos, utilizando suporte de Quitina (polímero de N-acetilglicosamina) num fluxo de 20 mL/h; o não adsorvido foi coletado em NaCl 0,15 M, em seguida solução de NaCl 1 M (1º eluente) e depois solução de ácido acético 1 M (2º eluente) foram sequencialmente aplicadas para eluição de potenciais proteínas adsorvidas. Em todos os processos cromatográficos, foram recolhidas frações de volume determinado, as quais foram monitoradas por absorbância UV 280 nm e AH após diálise.

4.7. CARACTERIZAÇÃO ATRAVÉS DE ELETROFORESES EM GEL DE POLIACRILAMIDA – PAGE

Foram realizadas técnicas eletroforéticas em gel de poliacrilamida contendo sulfato sódico de dodecila, SDS-PAGE 12% (LAEMMLI, 1970), para caracterização do perfil proteico, na qual a fração escolhida foi FF4d por apresentar alto teor proteico; volumes de 2, 4 e 6 µL de FF4d e marcadores de peso molecular (pesos 14.4, 20.1, 30, 45, 66 e 97 kDa) foram aplicados no gel. A amostra aplicada foi previamente tratada com β-mercaptoetanol. A corrida eletroforética foi realizada em corrente constante, em temperatura ambiente. As bandas proteicas nos géis foram detectadas com a utilização do corante Azul de *Coomassie*. A descoloração do excesso do corante foi realizada através de lavagens sucessivas do gel com ácido acético a 10 %.

4.8. ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

A potencial atividade antifúngica das preparações lectínicas foi avaliada contra isolados, através de uma metodologia (WONG, 2005) modificada. Amostras obtidas das folhas (EB; frações 30-60% e 60-90% dialisadas; e picos cromatográficos dialisados da fração 30-60% dialisada) e das flores (EB; frações 30-60% e 60-90% dialisadas; e picos cromatográficos dialisados da fração 60-90% dialisada) foram avaliadas quanto ao potencial antimicrobiano contra os fitopatógenos *Colletotrichum* sp. (isolado direto de banana no Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia, UFERSA) e *Fusarium solani* (isolados de melão obtidos do estoque no Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia, UFERSA). Em placas de Petri (90 x 15 mm) contendo 10 ml de meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar), amostras proteicas (filtradas em filtros de seringa estéreis com poros de 0,20 µm) ou solução de NaCl 0,15M (testemunha) foram uniformemente aplicadas por espalhamento (100 µl, com concentração definida) na superfície do meio de cultura; um disco do micélio fúngico em teste (6 mm de diâmetro) foi posto sobre o meio de cultura, no centro de cada placa. Após incubação a 28 °C, por 120 h (5 dias), foi avaliado o crescimento fúngico. O efeito das amostras lectínicas sobre os isolados foi definido pela comparação entre o crescimento fúngico nas placas que receberam a amostra em teste e o crescimento fúngico nas placas que receberam solução de NaCl 0,15M (testemunhas); o efeito antifúngico foi verificado pela redução nos halos de crescimento. O teste foi realizado em quintuplicatas.

4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizado o cálculo de porcentagem de inibição de crescimento micelial (PIC), comparando-se o diâmetro médio, em cm, do crescimento dos fungos nas placas dos tratamentos com as mostras lectínicas e nas placas testemunhas (EDGINGTON et al., 1971):

$$PIC = \frac{\text{crescimento da testemunha} - \text{crescimento do tratamento}}{\text{crescimento da testemunha}} \times 100$$

A análise estatística e a construção do gráfico foram realizadas por meio dos softwares *Past* (HAMMER, 2001) e Excel. Os dados foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) e a diferença de médias calculada pelo teste conservador de *Tukey* ($p \leq 0,05$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE AMOSTRAS LECTÍNICAS

Os processos de extração das proteínas utilizando 20g de farinha das sementes e 40g de farinha de folhas e flores resultaram em extrato bruto (EB) de sementes, folhas e flores que renderam 130 mL, 304mL e 282 mL, respectivamente.

Também foram realizadas extrações da farinha de folhas em tampões com diferentes valores de pH; houve estabilidade quanto à atividade hemaglutinante (AH) das amostras frente à variação de pH entre 5 e 10, a qual não foi aumentada, em comparação com o EB em NaCl ,15M. Por isso, para o processo seguinte de fracionamento proteico, foram utilizados EB obtidos em solução de NaCl 0,15M. O ensaio de AH revelou atividade lectínica em todos os EB obtidos a partir dos tecidos investigados (Tabelas 1 e 2); a AH foi obtida com eritrócitos glutarizados de coelho e humanos tipo A.

Tabela 1 – Atividade hemaglutinante (AH) dos extratos brutos (EB) em solução salina dos tecidos de *Cassia fistula*.

Extratos Brutos (EB) obtidos em solução salina	AH com eritrócitos de coelho	AH com eritrócitos humanos (sangue A)
Folhas	64 ⁻¹	8 ⁻¹
Sementes	32 ⁻¹	2 ⁻¹
Flores	32 ⁻¹	2 ⁻¹

Tabela 2 – Atividade hemaglutinante (AH) de extratos brutos (EB) de folhas de *Cassia fistula* em diferentes tampões.

EB de folhas obtidos com tampões com diferentes pH's	AH com eritrócitos humanos (sangue A)
pH 2	0
pH 5	4 ⁻¹
pH 7	8 ⁻¹
pH 8	8 ⁻¹
pH 10	4 ⁻¹

Os processos de purificação parcial de frações proteicas renderam, a partir de cada EB, três frações proteicas. Todas as frações proteicas obtidas apresentaram AH, revelando diferentes títulos de acordo com o tipo de eritrócitos utilizados (eritrócitos glutarizados de

coelho, carneiro, bezerro e humano tipo A), e revelando também maior afinidade por eritrócitos de coelho (Tabela 3); a maioria das amostras mantiveram ou aumentaram os títulos de AH, após o processo de diálise.

Tabela 3 – Atividade hemaglutinante (AH) das frações proteicas dialisadas e não dialisadas de sementes, folhas e flores de *Cassia fistula*.

Frações	AH com Eritrócitos humanos tipo A	AH com Eritrócitos de coelho	AH com Eritrócitos de carneiro	AH com Eritrócitos de bezerro
FS1	2 ⁻¹	32 ⁻¹	16 ⁻¹	32 ⁻¹
FS2	2 ⁻¹	32 ⁻¹	32 ⁻¹	32 ⁻¹
FS3	2 ⁻¹	4 ⁻¹	32 ⁻¹	32 ⁻¹
FS1d	4 ⁻¹	16 ⁻¹	-	-
FS2d	4 ⁻¹	32 ⁻¹	-	-
FS3d	4 ⁻¹	8 ⁻¹	-	-
FF1	2 ⁻¹	16 ⁻¹	4 ⁻¹	32 ⁻¹
FF2	4 ⁻¹	64 ⁻¹	2 ⁻¹	4 ⁻¹
FF3	4 ⁻¹	64 ⁻¹	8 ⁻¹	16 ⁻¹
FF4	4 ⁻¹	64 ⁻¹	16 ⁻¹	32 ⁻¹
FF1d	2 ⁻¹	64 ⁻¹	8 ⁻¹	16 ⁻¹
FF2d	4 ⁻¹	256 ⁻¹	16 ⁻¹	8 ⁻¹
FF3d	4 ⁻¹	256 ⁻¹	16 ⁻¹	32 ⁻¹
FF4d	8 ⁻¹	512 ⁻¹	32 ⁻¹	32 ⁻¹
FL1	2 ⁻¹	16 ⁻¹	-	-
FL2	4 ⁻¹	16 ⁻¹	-	-
FL3	4 ⁻¹	32 ⁻¹	-	-
FL1d	4 ⁻¹	16 ⁻¹	-	-
FL2d	8 ⁻¹	32 ⁻¹	-	-
FL3d	16 ⁻¹	128 ⁻¹	-	-

FS1: fração 0-30% da semente; FS2: fração 30-60% da semente; FS3: fração 60-90% da semente; FS1d: fração 0-30% dialisada da semente; FS2d: fração 30-60% dialisada da semente; FS3d: fração 60-90% dialisada da semente; FF1: fração 0-30% da folha; FF2: fração 30-60% da folha; FF3: fração

60-90% da folha; FF4: fração 0-80% da folha; FF1d: fração 0-30% dialisada da folha; FF2d: fração 30-60% dialisada da folha; FF3d: fração 60-90% dialisada da folha; FF4d: fração 0-80% dialisada da folha; FL1: fração 0-30% da flor; FL2: fração 30-60% da flor; FL3: fração 60-90% da flor; FL1d: fração 0-30% dialisada da flor; FL2d: fração 30-60% dialisada da flor; FL3d: fração 60-90% dialisada da flor.

Foi realizada a estimativa proteica das frações dialisadas e não dialisadas de todos os tecidos assim como também foi determinada a atividade hemaglutinante específica (AHE) (Tabela 4). As amostras dialisadas com maior concentração de proteína foram fração 30-60% dialisada da folha (FF2d), fração 0-80% dialisada da folha (FF4d) e fração 60-90% dialisada da flor (FL3d). Após diálise, todas as amostras apresentaram aumento substancial da AHE, especialmente todas as frações dialisadas obtidas das folhas (FF1d, FF2d, FF3d e FF4d) e a FL3d obtida das flores, o que é muito importantes, pois amostras lectínicas podem perder AH após processo de diálise.

Tabela 4 – Estimativa proteica das frações dialisadas e não dialisadas das sementes, folhas e flores de *Cassia fistula*; e atividade hemaglutinante específica (AHE) com eritrócitos de coelho.

Frações	Proteínas (mg/ml)	AHE com eritrócitos de coelho (AH/ mg/mL)
FS1	5,4	5,93
FS2	7,4	4,33
FS3	2,1	1,90
FS1d	1,4	11,4
FS2d	7,0	4,57
FS3d	2,0	4
FF1	5,42	2,95
FF2	10,78	5,93
FF3	8,48	7,54
FF4	19,1	3,35
FF1d	5,06	12,64
FF2d	4,62	55,41
FF3d	5,53	46,29

FF4d	6,24	82,05
FL1	3,1	5,1
FL2	7,5	2,1
FL3	15,2	2,1
FL1d	1,7	9,41
FL2d	3,1	10,3
FL3d	10,6	12,07

FS1: fração 0-30% da semente; FS2: fração 30-60% da semente; FS3: fração 60-90% da semente; FS1d: fração 0-30% dialisada da semente; FS2d: fração 30-60% dialisada da semente; FS3d: fração 60-90% dialisada da semente; FF1: fração 0-30% da folha; FF2: fração 30-60% da folha; FF3: fração 60-90% da folha; FF4: fração 0-80% da folha; FF1d: fração 0-30% dialisada da folha; FF2d: fração 30-60% dialisada da folha; FF3d: fração 60-90% dialisada da folha; FF4d: fração 0-80% dialisada da folha; FL1: fração 0-30% da flor; FL2: fração 30-60% da flor; FL3: fração 60-90% da flor; FL1d: fração 0-30% dialisada da flor; FL2d: fração 30-60% dialisada da flor; FL3d: fração 60-90% dialisada da flor.

As frações obtidas das folhas, após diálise, apresentaram as maiores AH e AHE (Tabela 3 e 4); esses dados permitem sugerir que o tecido das folhas constitui uma excelente fonte de obtenção de preparações com atividade lectínica para um potencial isolamento. Leite et al. (2002) estudaram a presença de lectinas na leguminosa *Indigofera suffruticosa*, onde a fração obtida por saturação salina a 60%, F0-60 dialisada de suas folhas, apresentou AH de 2048^{-1} e o teor proteico da amostra foi de 9,1 mg/ml, demonstrando que as leguminosas são espécies importantes em estudos visando o isolamento de lectinas, o que respalda o objetivo do presente estudo.

A fração FF4d, com elevada AH e teor proteico, foi selecionada para ensaios de caracterização. Ensaios de inibição dessa amostra foram realizados utilizando eritrócitos humanos tipo A em presença de diferentes concentrações de glicose, manose, galactose ou fucose (Tabela 5). Nas condições do ensaio (em placas de microtitulação), não houve inibição total de AH da FF4d; no entanto, foi determinada a inibição parcial por D-Manose e D-(+)-Galactose. Ali et al. (2004) mostrou que lectinas purificadas de sementes de *Cassia fistula* possuíram afinidade de ligação por galactose, glicose e manose, estes carboidratos inibiram a AH destas lectinas, mostrando similaridade de carboidratos que inibiram parcialmente a AH da fração FF4d no presente estudo.

Tabela 5 – Inibição da atividade hemaglutinante utilizando eritrócitos humanos tipo A.

Amostra	Carboidrato	IAH			
		25 mM	50 mM	100mM	200mM
FF4d	D-(+)-glicose	8 ⁻¹	8 ⁻¹	8 ⁻¹	8 ⁻¹
	D-Manose	4 ⁻¹	4 ⁻¹	4 ⁻¹	4 ⁻¹
	D-(+)-Galactose	4 ⁻¹	4 ⁻¹	4 ⁻¹	4 ⁻¹
	D-Fucose	8 ⁻¹	8 ⁻¹	8 ⁻¹	8 ⁻¹

A atividade hemaglutinante de FF4d (fração 0-80% dialisada da folha) com título de 8⁻¹. AH – atividade hemaglutinante; IAH – inibição da atividade hemaglutinante.

Em eletroforese SDS-PAGE 12 %, FF4d foi revelada contendo várias bandas proteicas bem definidas, a maioria apresentando acima de 20 kDa (Figura 3). No estudo de Ali et al. (2004), lectinas purificadas de sementes de *Cassia fistula* tiveram pesos moleculares entre 37 e 46.5 em SDS-PAGE.

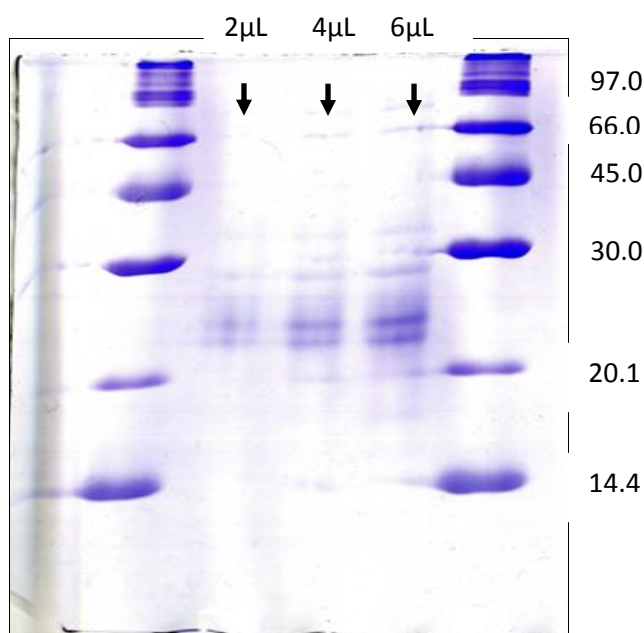


Figura 3 – SDS-PAGE (12 %) da FF4d (fração 0-80% dialisada da folha) obtidas de *Cassia fistula*. As setas em sentido vertical indicam as linhas de corrida de FF4d; as linhas de corrida das extremidades correspondem aos marcadores de peso molecular utilizados (pesos 14.4, 20.1, 30.0, 45.0, 66.0, 97.0 kDa).

As frações FF4d, FF2d (obtidas de folhas) e FL3d (obtida de flores) foram submetidas a cromatografias de afinidade. Em cromatografias de FF4d em gel de Guar (Figura 4) e em Sephadex G-50 (Figura 5), proteínas não adsorveram em nenhuma das matrizes de afinidade. Apesar de FF4d ter tido a AH inibida parcialmente por galactose, o suporte gel de Guar não foi eficiente para o isolamento de uma lectina de FF4d por bioafinidade. É possível observar os picos residuais com devidos intervalos (Figuras 4 e 5). Os picos residuais foram submetidos a ensaio de AH e não mostraram atividade.

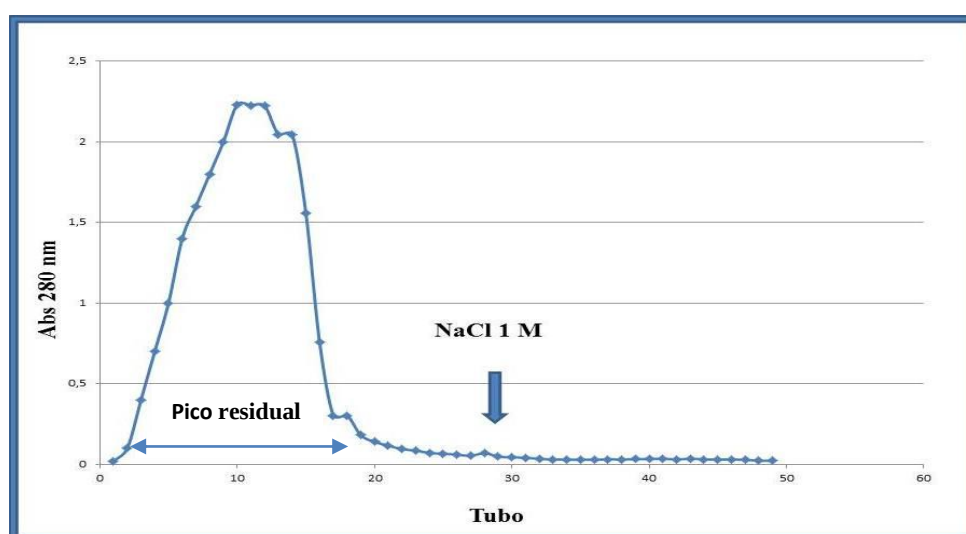


Figura 4 – Análise cromatográfica da FF4d (fração 0-80% dialisada da folha) obtida de *Cassia fistula* em gel de Guar. Pico residual com intervalos entre tubo 1 e 19. A seta indica a adição da solução de eluição (NaCl 1 M).

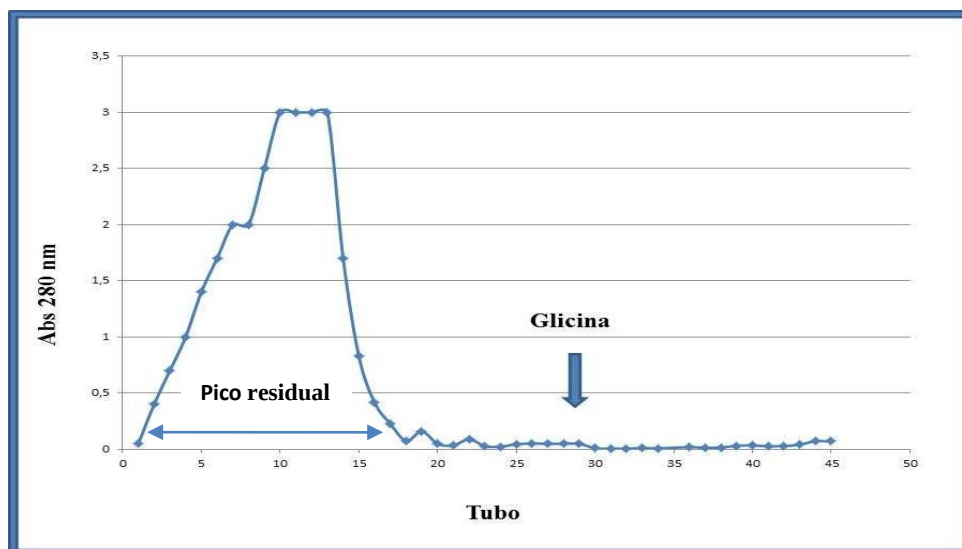


Figura 5 – Análise cromatográfica da FF4d (fração 0-80% dialisada da folha) obtida de *Cassia fistula* em Sephadex G50. Pico residual com intervalo entre tubo 1 e 18. A seta indica a adição da solução de eluição (glicina).

Em cromatografias de FF2d (Figura 6) em suporte de Quitina, foi realizada eluição com solução de NaCl 1 M em primeiro momento e depois com ácido acético 1 M. Em cromatografias de FL3d (Figura 7) em suporte de Quitina, foi realizada eluição apenas com ácido acético 1 M. Proteínas presentes nas duas amostras adsorveram à Quitina, e foram eluídas do suporte com ácido acético, constituindo os picos cromatográficos (PF e, PF2 da fração da folha e PF da fração da flor) (Figuras 6 e 7). Um pequeno pico foi obtido da cromatografia de FF2d, quando foi realizada eluição com NaCl 1 M (PF1). É possível observar os picos residuais e seus intervalos, assim como os picos cromatográficos e seus intervalos (Figuras 6 e 7). Os picos residuais não mostraram AH, o que nos permite dizer que lectinas foram ligadas na coluna cromatográfica e eluídas após adição de solução de eluição.

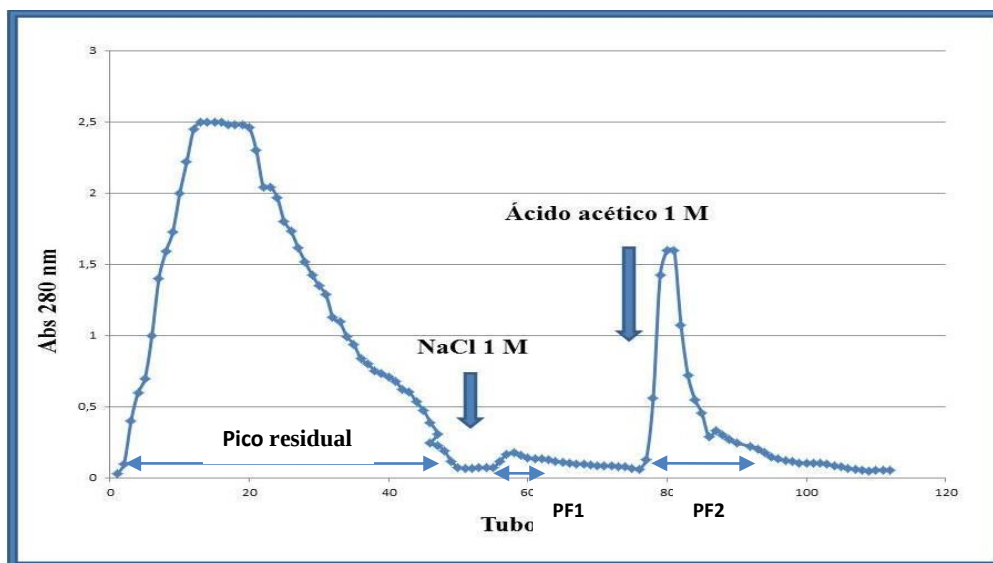


Figura 6 – Análise cromatográfica da FF2d (fração 30-60% dialisada da folha) obtida de *Cassia fistula* em Quitina. As setas indicam a adição das soluções de eluição (NaCl 1 M e ácido acético 1 M).

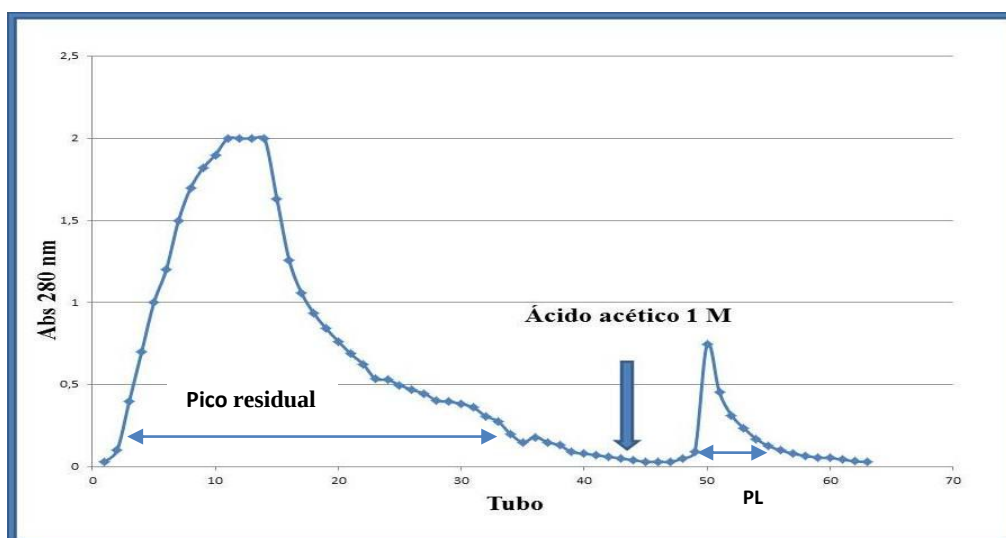


Figura 7 – Análise cromatográfica da FL3d (fração 60-90% dialisada da flor) obtida de *Cassia fistula* em Quitina. A seta indica a adição da solução de eluição (ácido acético 1 M).

Ali et al. (2004) purificaram as lectinas CSL – 1, CSL – 2 e CSL – 3 das sementes de *Cassia fistula*. A fração da semente precipitada numa saturação de 100% foi submetida a cromatografias sequenciais: cromatografia em gel de filtração (Sephadex G-50), cromatografia de troca iônica (DEAE-celulose) e cromatografia de bioafinidade (coluna Sepharose 4B). Este trabalho fortaleceu a ideia de que podem ser extraídas e isoladas novas

lectinas de outros tecidos de *Cassia fistula*, como folhas e flores, utilizando metodologias de purificação que culminam em processos cromatográficos, como os realizados no presente trabalho.

Os picos cromatográficos obtidos por cromatografia de FF2d (resultantes da eluição com NaCl 1 M e com ácido acético 1 M, chamados de PF1 e PF2, respectivamente) e da FL3d (resultante da eluição com ácido acético 1 M, chamado de PL1) foram dialisados (5 horas, 4 °C); em seguida foram submetidos a ensaios de AH e dosagem proteica, apresentando atividade lectínica e conteúdo proteico (Tabela 6). Após cromatografia, estas amostras apresentaram um aumento significativo de atividade hemaglutinante específica (AHE). A FF2d que obteve 46,29 de AHE, após cromatografia e diálise, aumentou para 13.427,6 de AHE. A FL3d também aumentou AHE de 12,07 para 9.142,8. Esses dados demonstram que lectinas podem realmente terem sido purificadas nos processos cromatográficos utilizados.

Tabela 6 – Atividade hemaglutinante, dosagem proteica e atividade hemaglutinante específica dos picos cromatográficos dialisados, obtidos a partir de fração 30-60% dialisada da folha (FF2d) e fração 60-90% dialisada da flor (FL3d).

Picos	AH com eritrócitos de coelho	AH com eritrócitos tipo O	Proteínas (mg/ml)	AHE com eritrócitos de coelho (AH/mg)
PF1	0	0	-	-
PF2	512 ⁻¹	512 ⁻¹	0,038	13.437, 6
PL	64 ⁻¹	128 ⁻¹	0,014	9.142, 8

FF2d – fração 30-60% dialisada da folha; FL3d – fração 60-90% dialisada da flor; PF1 – primeiro pico cromatográfico da FF2d; PF2 – segundo pico cromatográfico da FF2d; PL – pico cromatográfico da FL3d; AH – atividade hemaglutinante; AHE – atividade hemaglutinante específica.

5.1 ENSAIO ANTIFÚNGICO

Amostras obtidas de folhas e flores (EB, EBF, FF2d, FF3d, PF2, EBL, FL2d, FL3d e PL) foram avaliadas quanto ao potencial antifúngico de acordo com a metodologia descrita. Não houveram diferenças significativas em relação ao controle (testemunha) nos ensaios com *Fusarium solani* (dados não apresentados). As amostras apresentaram resultados significantes de inibição nos ensaios com *Colletotrichum* sp.. O EBF e FF2d apresentaram 23,55% e 32% de inibição do crescimento fúngico, respectivamente (Tabela 7). Também é possível observar o nível de significância dos ensaios; FF2d apresentou o melhor resultado significativo ($p < 0,05$), seguido de EBF ($p = 0,17$) que foi considerado biologicamente significativo (Figura 8).

Tabela 7 – Ensaio antifúngico com amostras obtidas de folhas e flores de *Cassia fistula*. Média das quintuplicatas, desvio padrão e porcentagem de inibição do crescimento de *Colletotrichum* sp.

	Test. (NaCl 0,15 M)	EBF	FF2d	FF3d	PF2	EBL	FL2d	FL3d	PL
Média(cm)	9	6,88	6,12	7,5	7,4	8,3	8,88	8,44	8,3
DesvioPadrão	0	2,75	12,14	2,61	4,40	1,26	0,04	0,40	0,46
(PIC) (%)	-	23,55	32	16,66	17,77	7,77	1,33	6,22	7,77

Test. – testemunha; EBF – extrato bruto da folha; FF2d – fração 30-60% dialisada da folha; FF3d – fração 60-90% dialisada da folha; PF2 – segundo pico cromatográfico da folha; EBL - extrato bruto da flor; FL2d - fração 30-60% dialisada da flor; FL3d - fração 60-90% dialisada da flor; PL – pico cromatográfico da flor; (PIC) – porcentagem de inibição de crescimento.

Na figura 8, observa-se o efeito inibitório de crescimento de *Colletotrichum* sp. *in vitro* causado pelas amostras EBF e FF2d.

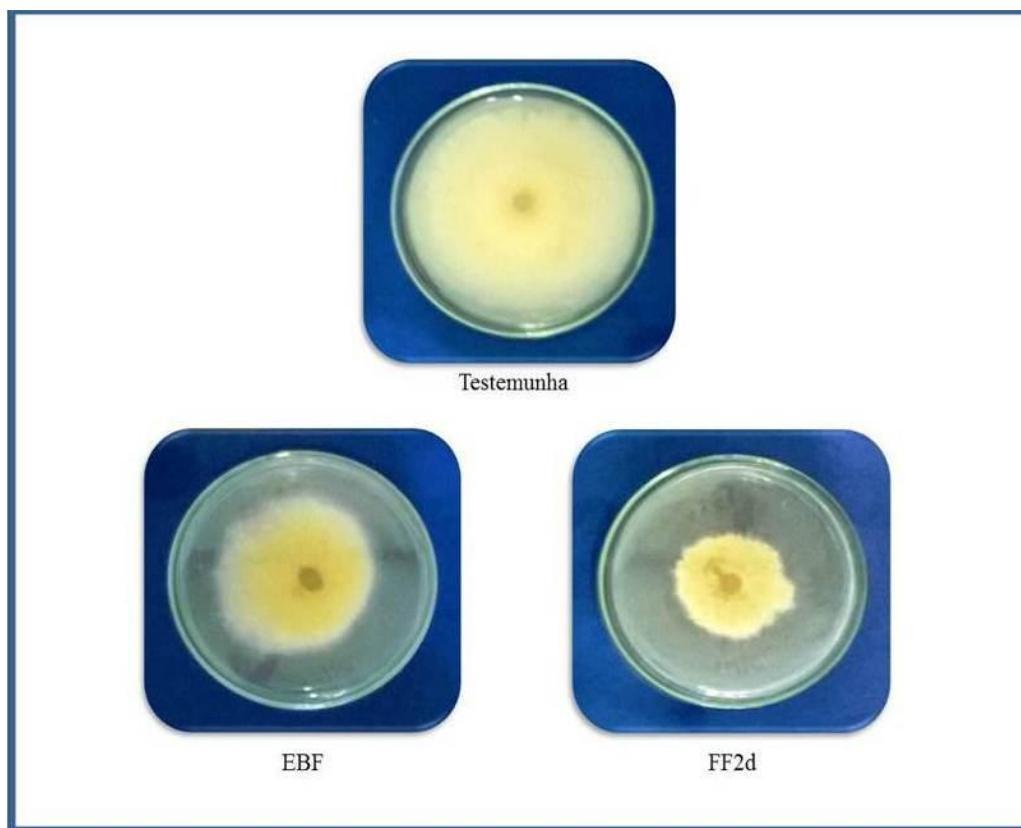


Figura 8 - Atividade antifúngica *in vitro* de amostras lectínicas obtidas de folhas de *Cassia fistula* (extrato bruto, EBF; fração 30-60% dialisada, FF2d) sobre *Colletotrichum* sp.

Charungchitrak et al. (2011) obteve resultados similares aos resultados deste estudo; em seu trabalho foram purificadas lectinas das sementes da leguminosa *Archidenron jiringa* Nielsen e estas lectinas mostraram atividade de inibição do crescimento de *Colletotrichum cassiicola*, fungo fitopatogênico pertencente ao mesmo gênero do fungo utilizado neste estudo.

A interação específica das lectinas com glicoconjugados, seja em solução ou em superfície celular, é o mecanismo pelo qual essas proteínas estão envolvidas em uma variedade de atividades biológicas, como: adesão celular, interações célula-matriz, apoptose e citotoxicidade em células e organismos (DANGUY et al., 2002).

Algumas lectinas que já foram descritas como antifúngicas pertencem à classe de quitinases e a atividade fungicida se deve à sua ação catalítica sobre a quitina (componente da parede celular de fungos), provocando alterações na morfologia, crescimento anormal, encurtamento de hifas e até lise celular (NIELSEN et al., 1997; KAWASE et al., 2006; WONG et al., 2010).

Também tem sido relatado que a ligação das lectinas às células pode resultar em ativação de vias de sinalização o que está associado com uma variedade de processos, como modificação em vias metabólicas causando problemas no interior do organismo (PEREIRA, 2005).

Algumas amostras lectínicas obtidas nesse trabalho apresentaram afinidade de ligação à quitina; é possível que o mecanismo de ação da FF2d (com afinidade à quitina e com atividade antifúngica) na inibição do crescimento de *Colletotrichum* sp. tem relação com mecanismo de ligação à quitina (ou outro carboidrato) da parede celular desse fitopatógeno.

6. CONCLUSÕES

- A planta *Cassia fistula* revelou ser uma fonte de lectinas, extratos brutos, frações e picos cromatográficos apresentaram elevados títulos de atividade hemaglutinante e valores de atividade hemaglutinante específica.
- As amostras apresentaram capacidade para aglutinar diferentes eritrócitos, revelando maior afinidade por eritrócitos glutarizados de coelho.
- Inibições parciais de atividade hemaglutinante por diferentes carboidratos, obtidas para fração 0-80% dialisada da folha (FF4d) revelaram ausência de especificidade lectínica a um ligante, na amostra;
- Todas as amostras revelaram teor proteico e frações dialisadas da folha apresentou elevada atividade hemaglutinante específica.
- Fração 0-80% dialisada da folha (FF4d) revelou conter bandas proteicas, com pesos moleculares acima de 20 kDa, confirmando que a fração obtida de folhas de *Cassia fistula* é uma fonte lectínica.
- Fração 30-60% dialisada da folha (FF2d) e fração 60-90% dialisada da flor (FL3d) em cromatografia de Quitina, apresentaram picos cromatográficos com AH; esses dados permitem sugerir que os picos cromatográficos contêm lectinas que possuem afinidade por N-acetil-glicosamina ou interagem com as cargas presentes na quitina.
- Extrato bruto da folha (EBF) e fração 30-60% dialisada da folha (FF2d) possuem atividade antifúngica contra o fitopatógeno *Colletotrichum* sp. Essas preparações proteicas podem ser melhor avaliadas e otimizadas para seu potencial uso como um antifúngico natural, no futuro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARKAR, S. V.; JADGE, D. R. Phytochemical and pharmacological investigations of genus *Cassia*: a review, **Asian Journal Chemical**, v. 11, p. 295-299, 1999.

AGRIANUAL 2013: Anuário da agricultura brasileira. São Paulo: FNP, Consultoria e Comércio, 2013. 313- 360p.

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5 ed. San Diego: Academic Press, p. 392-397, 2005.

ALI, M. A.; SAYEED, M. A.; ABSAR, N. Antibacterial Activity and Cytotoxicity of Three Lectins Purified from *Cassia fistula* Linn. Seeds. **Journal of Medical Sciences**, v. 3, n. 3, p. 240-244, 2003.

ALI, M. A.; SAYEED, M. A.; ABSAR, N. Purification and Characterization of Three Lectins Extracted from *Cassia fistula* Seeds and Effect of Various Physical and Chemical Agents on Their Stability. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 51, p. 647-654, 2004.

ÁLVARO, A. H.; BERDIÉ, J. M. Frutus. Manual de reconocimiento de alteraciones de la fruta de pepita en postcosecha. **Editorial Milenio**, Lleida, p.10, 2004.

ANDRADE, D. E. G. T.; MICHEREFFI, S. J.; BIONDI, C. M.; NASCIMENTO, C. W. A.; SALES Jr, R. Frequência de fungos associados ao colapso do meloeiro e relação com características físicas químicas e microbiológicas dos solos. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.31, n.4, p. 327-333, 2005.

ANDRADE, S. P. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de *Cassia fistula* (Leguminosae). **Revista PIBIC, Osasco**, v. 3, n. 2, p. 151-158, 2006.

ANJOS, J. R. N.; CHARCHAR, M. J. A. Ocorrência da antracnose causada por *Colletotrichum acutatum* em pequi no Distrito Federal. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, p. 96-98, 2002.

AYED, F.; DAAMI-REMADI, M.; JEBARI, H.; JABNOUN-KHIAREDDINE, H.; MAHJOUB, M. E. Effect of some Tunisian *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* isolates on muskmelon growth and on crown and root rot severity. **International Journal of Agricultural Research**, v. 2, n. 2, p. 719-724, 2007.

BAILEY, J. A.; JEGER, J. M. *Colletotrichum*: biology, pathology and control. **British Society for Plant Pathology**. C. A. B. Internacional, p. 388, 1992.

BAILEY, J. A.; O'CONNELL, R. J.; PRING, R.J.; NASH, C. Infection strategies of *Colletotrichum* species. In: **Bailey, A. J. & Jeger, J. M. *Colletotrichum*: biology, pathology and control**. British Society for Plant Pathology. C.A.B. International, p. 88-120, 1992.

BARKAI-GOLAN, R. Postharvest diseases of fruits and vegetables: **Development and control**. Amsterdam: Elsevier, p. 418, 2001.

BARROSO, G. M.; PEIXOTO, A. L.; COSTA, C. G.; ICHASO, C. L. F.; GUIMARÃES, E. F., LIMA, H. C. **Sistemática das angiospermas do Brasil**, v. 2, p. 15-100, 1991.

BENATO, E. A. A indução de resistência no controle de doenças pós-colheita de doenças pós-colheita: frutas e hortaliças. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS CONTRA FITOPATÓGENOS, São Paulo: **Palestras**. Piracicaba: ESALQ.USP, p. 29-31, 2002.

BENATO, E. A. Controle de doenças pós-colheita em frutas tropicais. **Summa Phytopathologica**, v. 25, p. 90-92, 1999.

BHAKTA, T.; MUKHERJEE, P. K.; BANERJEE, S.; MANDAL, S. C.; MAITY, T. K.; PAL, M.; SAHA, B. P. Evaluation of hepatoprotective activity of *Cassia fistula* leaf extract. **Journal Ethnopharmacol**, v. 66, p. 277-282, 1999.

BHALODIA, N. R.; ACHARYA, R. N.; SHUKLA, V. J. Evaluation of *in vitro* Antioxidant Activity of hydroalcoholic seed extratcs of *Cassia fistula* linn. **Free Radicals and Antioxidants**, v. 1, p. 68-76, 2011.

BIES, C.; LEHR, C-H.; WOODLEY, J. F. Lectin-mediated drug targeting: history and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 425-435, 2004.

BING, D. H.; WEYAND, J. G. M.; STAVINSKY, A. B. Hemagglutination with aldehyde fixed erythrocytes for assay of antigens and antibodies. **Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 124, p. 1166-1170, 1967.

BLUMENTHAL, M.; GOLDBERG, A.; BRINCKMAANN, J. Integrative Medicine Communications. **Herbal medicine**, 1. ed. p. 404-407, 2000.

BOYD, W. C.; SHAPLEIGH, E. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). **Science**, v. 119, p. 419, 1954.

CARTAXO, S. L.; SOUZA, M. M. A.; ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, p. 326–342, 2010.

CHARUNGCHITRAK, S.; PETSOM, A.; SANGVANICH, P.; HARNCHANATAT, A. Antifungal and antibacterial activities of lectin from the seeds of *Archidendron jiringa* Nielsen. **Food Chemistry**, v. 126, p. 1025–1032, 2011.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio. Lavras: **ESAL.FAEPE**, p. 320, 1990.

CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. P. Doenças fúngicas e bacterianas. In: (Org.). **Banana: fitossanidade**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura/Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000.

CORRÊA, M. P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e exóticas cultivadas**. Vol. 1. Rio de Janeiro: MA/IBDF, p. 747, 1984.

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

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

COUTINHO, H. L. C. **Diversidade microbiana e agricultura sustentável** [online].

CNPS/EMBRAPA, 1996. Disponível em:

<<http://www.bdt.org.br/~marinez/padct.bio/cap9/1/heitor.html>>. Arquivo capturado em 10 de dezembro de 1999.

DANGUY, A.; CAMBY, I.; KISS, R. Galectins and cancer. **Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects**, v. 1572, n. 2-3, p. 285-293, 2002.

DANTAS, S. A. F.; OLIVEIRA, S. M. A.; MICHEREFF, S. J.; NASCIMENTO, L. C.; GURGEL, L. M. S.; PESSOA, W. R. L. S. Doenças fúngicas pós-colheita em mamões e laranjas comercializados na Central de Abastecimento do Recife. **Fitopatologia Brasileira**, vol. 28, n. 5, p. 528-533, 2003.

DÍAZ, C. L.; MELCHERS, L. S.; HOOYKASS, P. J. J.; LUGTENBERG, B. J. J.; KINJNE, J. W. Root lectins a determinant of host-plant specificity in the Rhizobiun-legume symbiosis. **Nature**, v. 338, p. 579-581, 1989.

DRUSCH, S.; RAGAB, W. Mycotoxins in fruits, fruit juices, and dried fruits. **Journal Food Protection**. v. 66, p. 1514–1527, 2003.

DURAI PANDIVAN, V.; IGNACIMUTHU, S. Antibacterial and antifungal activity of *Cassia fistula* L.: An ethnomedicinal plant. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 590-594, 2007.

DURAIPANDIVAN, V.; IGNACIMUTHU, S.; PAULRAJ, M. G. Antifeedant and larvicidal activities of Rhein isolated from the flowers of *Cassia fistula* L. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 18, p. 129-133, 2011.

EDGINGTON, L. V.; KNEW, K. L.; BARRON, G. L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phytopathology**, St. Paul, v. 61, n.1, p. 42-44, 1971.

FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Top production:** Brasil, 2011. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site>>. Acesso em: 2 ago. 2013.

FINGER, F.; VIEIRA, G. Fisiologia pós-colheita de frutos tropicais e subtropicais. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Manejo integrado: fruteiras tropicais – doenças e pragas**. Viçosa: UFV, cap. 1, p. 1-30, 2002.

FLEMING, C.; ULRICH, M. S. G.; SCHRODER, H. C.; MULLER, W. E. G. W. Determination of lectin characteristics by a novel agglutination technique. **Analytical Biochemistry**, v. 205, p. 251-256, 1992.

FORZZA, R. C.; BAUMGRATZ, J. F. A.; BICUDO, C. E. M.; CANHOS, D. A. L.; CARVALHO, A. A. J.; COELHO, M. A. N.; COSTA, A. F.; COSTA, D. P.; HOPKINS, M. G.; LEITMAN, P. M.; LOHMANN, L. G.; LUGHADHA, E. N.; MAIA, L. C.; MARTINELLI, G.; MENEZES, M.; MORIM, M. P.; PEIXOTO, A. L.; PIRANI, J. R.; PRADO, J.; QUEIROZ, L. P.; SOUZA, S.; SOUZA, V. C.; STEHMANN, J. R.; SYLVESTRE, L. S.; WALTER, B. M. T.; ZAPPI, D. C. New Brazilian Floristic List Highlights Conservation Challenges. **BioScience**, v. 62, n.1, p. 39-45, 2012.

GARCIA, E. S. Biodiversidade, Biotecnologia e Saúde. **Cadernos de Saúde Pública**. Rio de Janeiro, v. 11, n. 3, p. 491-494, 1995.

GIULIETTI, A. M.; HARLEY, R. M.; QUEIROZ, L. P.; WANDERLEY, M. G. L.; BERG, C. V. D. Biodiversidade e Conservação de Plantas no Brasil. **Megadiversidade**, v.1, n.1, 2005.

GOLDSTEIN, I. J.; HUGHES, R. C.; MONSIGNY, M.; OSAWA, T; SHARON, N. What should be called a lectin? **Nature**, v. 285, p. 66, 1980.

GOVINDARAJAN, M.; SIVAKUMARI, R.; RAJESWARI, M. Larvicidal efficacy of *Cassia fistula* Linn. leaf extract against *Culex tritaeniorhynchus* Giles and *Anopheles subpictus* Grassi (Diptera:Culicidae). **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v.1, p. 295-298, 2011.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos In: SIMÕES, C. M. O (ORG) et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFRGS, 5 ed. p. 14-28, 2003.

GUPTA, V.; AGAEWAL, A.; TIWARI, H. P. Isolation and Characterisation of two flavonol and a xanthone glycosides from the stem bark of *Cassia fistula* Linn. **Indian Journal of Chemistry B**, v. 28, p. 282–284, 1989.

GUPTA, M.; MAZUMDER, UK.; RATH, N.; MUKHOPADHYAY, D. K. Antitumor activity of methanolic extract of *Cassia fistula* L. seed against Ehrlich Ascites Carcinoma. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, p. 151-156, 2000.

HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica** 4(1): 9pp. http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm

HARRISON, F. L. Soluble vertebrate lectins: ubiquitous but inscrutable protein. **Journal of Cell Science**, v. 100, p. 9-14, 1991.

HARTLEY, M. R.; LORD, L. M. Cytotoxic ribosome-inactivating lectins from plants. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1701, p. 1-14, 2004.

INDEX FUNGORUM. disponível em: <<http://www.indexfungorum.org/names/namesrecord.asp?RecordID=418895>> Acessado em: 21 de julho de 2014.

JEFFRIES, P.; DODD J.; JEGUER, M. J.; PLUMBLEY, R. A. The biology and control of *Colletotrichum* species on tropical fruit crops. **Plant Pathology**, v. 39, n. 03, p. 343-366, 1990.

JOSHI, T.; DASS, A.; PANDEY, S.; SHUKLA, S. An anthraquinone 3 neohesperidoside from *Cassia sophera* root bark. **Phytochemistry**, v. 24, p. 3073-3074, 1985.

KADER, A. (Ed.). Postharvest technology of horticultural crops. **Reviside**: UCRegents, 3. Ed, p. 535, 2002.

KAWASE, T.; YOKOHAWA, S.; SAITO, A.; FUJII, T.; NICAIDOU, N.; MIYASCHTA, K.; WATANABE, T. Comparison of enzymatic and antifungal properties between family 18 and 19 chitinases from *S. coelicolor* A3(2). **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 70, p. 988-998, 2006.

KIJNE, J.; DÍAZ, C.; DE PATER, S.; LUGTENBERG, B. Lectins in the symbiosis between *Rhizobia* and leguminous plants. **Advance Lectin Research**, v. 5, p. 15-50, 1992.

KNIGHT, S. C.; ANTHONY, U. M.; BRADY, A. M.; GREELAND, A. J.; HEAMY, S. P.; MURRAY, D. C.; POWEL, K. A.; SCHULZ, M. A.; SPINKS, C. A.; WORTHINGTON, P. A.; YOULE, D. Rationale and perspectives in the development of fungicides. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 35, p. 349-372, 1997.

KITANAKA, S.; TAHASHI, M.; TAKITO, M. Dihydroeleutherinol, a dihydronaphthopyran derivative from unripe seeds of *Cassia torosa* . Phytochemistry , v. 29, p. 350-351, 1990.

KUMAR, M. S.; SRIPRIVA, R.; RAGHAVAN, H. V.; SEHGAL, P. K. Wound Healing Potential of *Cassia fistula* on Infected Albino Rat Model. **Journal of Surgical Research**, v. 131, p. 283-289, 2006.

KUO, Y. H.; LEE, P. H.; WEIN, Y. S. Four new compounds from the seeds of *Cassia fistula*. **Journal Natural Products**, v. 65, p. 1165–1167, 2002.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. Savier, 4^o Ed. New York. v.1, cap. 3, p.89-93, 1999.

LEITE, S. P.; LEITE, A. C. R.; SILVA, M. B. R.; PAIVA, P. M. G.; LIMA, E. E. O.; COELHO, L. C. B. B.; LIMA, V. L. M. Atividade lectínica em folhas de *Indigofera suffruticosa*. Universidade Federal do Ceará, p, 1-4, 2002.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. The Fusarium Laboratory **Manual – Blackwell Publishing**, Oxford, UK; 2006.

LEWIS, G. P. Legumes of Bahia Kew. **Royal Botanic Gardens**, p. 369, 1987.

LEWIS, G. P.; SCHRIRE, B.D.; MACKINDER, B.; LOCK, M. Legumes of the World. **The Royal Botanic Gardens**, Kew, p. 577. 2005.

LEWIS, G.; OWEN, P. E. Legumes of the Ilha de Maracá Kew. **Royal Botanic Gardens**, p. 95, 1989.

LIMA FILHO, R. M.; OLIVEIRA, S. M. A.; MENEZES, M. Caracterização Enzimática e Patogenicidade Cruzada de *Colletotrichum* spp. Associados a Doenças de Pós-Colheita. **Fitopatologia Brasileira**, vol. 28, n. 6, p. 620-625, 2003.

LIMA, H. C. Leguminosas da Flora Fluminensis – J.M. Da C. Vellozo – Lista atualizada das espécies arbóreas. **Acta Botânica Brasilica**, v. 9, n. 1, p. 123–146, 2000.

LIMA, M. F.; COSTA, N. D. Doenças detectadas em cucurbitáceas no submédio do Vale São Francisco no período de 1998 a 2000. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 19, suplemento CD-ROM, 2001.

LIS, H.; SHARON, N. Lectins: carbohydrate specific proteins that mediate cellular recognition. **Chemical Reviews**, v. 98, p. 637-674, 1998.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

LUGINBUHL, S. A class Project for PP728 Soil borne Pathogens, Fall 2010.
<http://www.cals.ncsu.edu/course/pp728/Fusarium%20solani/Fusarium_solani.htm>.
Acessado em 11/08/2011.

MAKER, N.P.; CONLIN, J.; HOGAN, V.; RAZ, A. Carbohydrate-binding proteins in cancer, and their ligands as therapeutic agents. **Trends in Molecular medicine**, v. 8, p. 187-192, 2002.

MALHOTRA, S.; MISRA, K. A New Anthraquinone from *Cassia sophera* Heartwood. **Panta Med**, v. 46, p. 197-249, 1982.

MANONMANI, G.; BHAVAPRIYA, V.; KALPANA, S.; GOVINDASAMY, S.; APPARANANTHAM, T. Antioxidant activity of *Cassia fistula* (Linn.) flowers in alloxan induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 39-42, 2005.

MARI, M.; GUIZZARDI, M. The postharvest phase: emerging technologies for the control of fungal diseases. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 26, p. 59-66, 1998.

MARINHO, R. E. M.; SALES Jr., R.; SILVA, G. F.; COSTA, F. M.; SILVA, E. C. Identificação da microflora associada a raízes de meloeiro nos estados do Rio Grande do Norte e Ceará. **Caatinga**, Mossoró, v.15, n.1/2, p.25-28, 2002.

MORANDI, M. M. B. Avanços no controle biológico de doenças em pós-colheita. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS, 2. Lavras: **Anais** Lavras: UFLA, p. 71-78, 2002.

MOREIRA, R. A.; AINOUS, I. L.; DE OLIVEIRA, J. T.; CAVADA, B. S. Plant lectins, chemical and biological aspects. **Memorias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, p. 211-218, 1991.

NERY-SILVA, F.A.; MACHADO, J. da C.; LIMA, L.C. de O.; RESENDE, M.L.V. de. Controle da podridão peduncular de mamão causada por *Colletotrichum gloeosporioides*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 3, p. 519-24, 2001.

NIELSEN, K. K.; NIELSEN, J. E.; MADRID, S. M.; MIKKELSEN, J. D. Characterization of a new antifungal chitin-binding peptide sugar beet leaves. **Plant Physiology**, v. 13, p. 83-91, 1997.

NOWELL, P. C. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leucocytes. **Cancer Research**, v. 20, p. 426-426, 1960.

PEREIRA, S. F; **CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS BIOLÓGICOS DAS LECTINAS DE *Canavalia brasiliensis* (ConBr) E DE *Canavalia ensiformes* (ConA) EM PREPARAÇÕES DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL E EM CÉLULAS TUMORAIS**. 2005. 112f. Dissertação (Mestrado em Neurociências), Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2005.

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

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Plant Lectins: Versatile Proteins with Important Perspectives in Biotechnology. **Biotechnology and Genetic engineering Reviews**, v. 15, 1998.

PRATES, H. T.; SANTOS, J. P. Produtos naturais que ajudam o agricultor. **Cultivar**. Ano 2, n. 18, p. 38 – 41. 2000.

RAY, S.; AHMED, H.; BASU, S.; CHATTERJEE, B.P. Purification, characterization, and carbohydrate specificity of the lectin of *Ficus cunia*. **Carbohydrate Research**, v. 242, p. 247-63, 1992.

RESENDE, M. L. V; NOJOSA, G. B. A; RESENDE, A. V; Uso de Fosfolitos e Silicatos na Indução de Resistência. In: Cavalcante LS (Ed.) **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, pp. 139-153, 2005.

RICHARD, J. L.; PAYNE, G.A. Mycotoxins: risks in plants, animal and humans systems. Ames: **Council for Agricultural Science and Technology**, p. 199, 2002.

SAMY, R. P.; IGNACIMUTHU, S. Antibacterial activity of some folklore medicinal plants used by tribals in Western Ghats of India. **Journal Ethnopharmacol**, v. 69, p. 63-71, 2000.

SERRA, I. M. R. de S.; SILVA, G. S. da. Caracterização Morfofisiológica de Isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* Agentes de Antracnose em Frutíferas no Maranhão. **Summa Phytopathologica**, v. 30, n. 4, p. 475-480.2004.

SHARON, N.; GOLDSTEIN, I. J. Lectins: More than insecticides. **Science**, v. 282, p. 1049, 1998.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v. 14, n. 11, p. 53-60, 2004.

SHARON, N.; LIS, H. Legumes lectins – a large Family of homologus proteins. **Federation American Societies Experimental Journal**, Bethesda, v. 4, p. 3198-3208, 1990.

SIDDHURAJU, P.; MOHAN, P. S.; BECKER, K. Studies on the antioxidant activity of Indian Laburnum (*Cassia fistula* L.): a preliminary assessment of crude extracts from stem bark, leaves, flowers and fruit pulp. **Food Chemistry**, v. 79, p. 61-67, 2002.

SILVA, M. D. C. **Aplicações biotecnológicas das lectinas ClaveLL (*Cladonia verticillaris* Lichen Lectins) e BmoLL (*Bauhinia monandra* Leaf Lectin)**. 2008. 211f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2008b.

SILVA, M. D. C. **Purificação e Caracterização de Glicoproteínas do Líquen *Cladonia verticillaris* para Aplicações Biotecnológicas**. Monografia, Universidade Federal do Pernambuco, 2001.

SITOHY, M.; DOHEIN, M.; BADR, H. Isolation and characterization of a lectin with antifungal activity from Egyptian *Pisum sativum* seeds. **Food Chemistry**, v. 104, p. 971-9, 2007.

SOMMER, N. F. Postharvest handling practices and postharvest diseases of fruit. **Plant Disease**, St. Paul, v. 66, p. 357-364, 1982.

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

SPITATRO, S. R.; COCHRAN, G. R.; WALKER, R. E.; CABLISH, K.L.; BITTNER, C. C. Characterization of a new lectin of soybean vegetative tissue. **Plant Physiology**, v. 110, p. 825-834, 1996.

SUNIL, K. K. C.; MULLER, K. Inhibition of leukotriene biosynthesis and lipid peroxidation in biological models by the extract of *Cassia fistula*. **Phytother**, v. 12, p. 526-528, 1998.

SYLOS, C. M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Incidence of patulin in fruits and fruit juices marketed in Campinas, Brazil. **Food Additives and Contaminants**, v. 16, p. 71-74, 1999.

TANAKA, M. A. S.; PASSOS, F. A.; BINOTTI, C. S.; NOVAIS, A. J. Variabilidade patogênica de isolados de *Colletotrichum acutatum* e *Colletotrichum frugariae* em rizomas e pecíolos de morangueiro. **Summa Phytopathologica**, v. 25, p. 303-307, 1997.

VAN EIJSSEN, R. R.; DÍAZ, C. L.; DE PATER B. S.; KIJNE, J. W. Sugar-binding activity of pea (*Pisum sativum*) lectin is essential for heterologous infection of transgenic white clover hairy roots by *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae. **Plant Molecular Biology**, v. 29, p. 431-439, 1995.

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

VENTURA, J. A.; HINZ, R. H. Controle das doenças da bananeira. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R. DO; MONTEIRO, A. J. A.; COSTA, H. (Ed.). **Controle de doenças de plantas fruteiras**. Viçosa-MG: UFV, v. 1, p. 839-938, 2002.

VIDOTTO V. **Manual de Micologia Medica**, Ed.DreampixComunicação. São Paulo, p. 204, 2004.

VIJAYAN, M.C.; CHANDRA, N. Lectins Current Opinion. **Structural Biology**, v. 9, p. 707-714, 1999.

WONG, J. H.; NG, T. B.; CHEUNG, R. C. F.; YE, X. J.; WANG, G. X.; LAM, S. K.; LIN, P.; CHAN, Y. S.; FANG, E. F.; NGAI, P. H. K.; XIA, L. X.; JIANG, Y.; LIU, F. Protein with antifungal properties and other medicinal applications from plants and mushrooms. **Appl. Microbiol Biotechnol**, v. 87, p. 1221-1235, 2010.

WONG, J. H.; NG, T. B. Sesquin, a potent defensin-like antimicrobial peptide from ground beans with inhibitory activities toward tumor cells and HIV-1 reverse transcriptase. **Peptides**, v. 26, p. 1120-1126, 2005.

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

YIANNIKOURIS A.; JOUANY J. Mycotoxins in feed and their fate in animals: a review. – **Animal Research**, v. 51, 2002.

ZITTER, T. A. **Fusarium diseases of cucurbits**. Ithaca: Cornell University, (Vegetable MD online), p. 1-7, 1998.