

## LECTINAS DE *BORRERIA VERTICILLATA*: AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE INSETICIDA CONTRA GORGULHO DE MILHO *SITOPHILUS ZEAMAI* E SOBRE CUPINS *NASUTITERMES CORNIGER* (TERMITIDAE).

Cláudia Daniely da Silva<sup>1</sup>; Roberto Araújo Sá<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Estudante do Curso de Licenciatura em Química - CAA - UFPE; E-mail: claudiadanielydasilva@gmail.com,

<sup>2</sup>Docente/pesquisador do Núcleo de Formação Docente – CAA - UFPE. E-mail: sa\_araujo@yahoo.com.br.

**Sumário:** O presente trabalho relata a investigação de lectinas nos extratos salinos de folhas de *Borreria verticillata*, objetivando avaliar a atividade inseticida do extrato salino, da fração proteica e da lectina isolada. Lectinas foram detectadas em folhas de *B. Verticillata*, a partir da realização de atividades hemaglutinantes (AH) com o extrato das mesmas. Foram produzidos vários extratos, com diferentes horas de extração, sendo o extrato ES<sub>4</sub>, selecionado por que apresentou melhor AHE (541). Eritrócitos de coelho foram selecionados para as AH devido à facilidade de obtenção e menor risco em sua manipulação. O extrato salino (ES<sub>4</sub>) foi submetido ao fracionamento com diferentes saturações de sulfato de amônio, visando à purificação parcial das proteínas presentes. Foi selecionada a melhor fração, que neste caso corresponde a 20-40% (denominada PF<sub>2</sub>) por apresentar maior AHE (3.561). Em seguida a PF<sub>2</sub> foi submetido a dialise branda para a retirada do sal. A AH de PF<sub>2</sub> foi parcialmente inibida por N-acetilglicosamina e pelas glicoproteínas fetuína, ovoalbumina, tireoglobulina e azocaseína. A inibição com N-acetilglicosamina é um indicativo para purificação da lectina através de cromatografia de afinidade em colunas de quitina e de Agarose-N-acetilglicosamina o que estimulou a purificação da lectina através de cromatografia de afinidade em colunas de quitina. Extrato salino, PF<sub>2</sub> e PII (lectina isolada), apresentaram atividade antifúngica, reduzindo o crescimento de espécies de *Fusarium* e efeito antibacteriano sobre a maioria das bactérias testadas (Gram-positivas e Gram-negativas). O contato com o ES<sub>4</sub>, a PF<sub>2</sub> e a lectina da *B. verticillata* em todas as concentrações testadas induziram 100% de mortalidade dos operários e soldados de *Nasutitermes corniger*, depois de um determinado intervalo de tempo, antes do controle negativo.

**Palavras-chave:** *Aedes Aegypti*; purificação; lectinas; *Borreria Verticillata*;

### INTRODUÇÃO

A atividade inseticida de lectinas é geralmente avaliada através de bioensaios que incorporam a lectina em dietas artificiais oferecidas aos insetos, os quais morrem por privação nutricional. Os mecanismos exatos envolvidos no efeito entomotóxico ainda não são totalmente conhecidos. Tem sido demonstrado que as lectinas inseticidas são resistentes a proteases presentes no trato digestivo do inseto. No entanto, estudos apontam possíveis interações envolvidas: ligação da lectina a gliconjugados expostos nas células superficiais do epitélio intestinal; ligação da lectina à quitina presente na membrana peritrocica, e interação com enzimas glicosiladas no trato digestivo (PEUMANS e VAN DAMME, 1995; SÁ et al., 2009). Lectinas podem cruzar a barreira do epitélio intestinal

por transcitose, entrando no sistema circulatório e resultando em ação tóxica, interagindo com compostos presentes na hemolinfa (FITCHES et al., 2008). Planta gramínea da espécie *Zea mays* L., o milho, é um cereal de alto teor nutritivo cultivado há muitos séculos (GALLO et al., 2002). A espécie *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae), conhecida como gorgulho do milho, é uma das suas principais pragas (GALLO et al., 2002), o que dificulta muito o seu armazenamento. As madeiras estão entre os produtos naturais de maior importância e têm sido bastante exploradas em países tropicais (PRIMACK & RODRIGUES, 2001). Algumas espécies de cupins, incluindo a *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae), são capazes de invadir o ambiente urbano e atacar madeiras dos mais diversos tipos que ali se encontrem (PAES et al., 2007). Segundo estimativas, o dano causado por cupins chegou a 50 bilhões de dólares em todo o mundo em 2005 (KORB, 2007). As lectinas são proteínas que interagem seletiva e reversivelmente com monossacarídeos e glicoconjugados (LIS & SHARON, 1986), comumente extraídas de folhas, sementes e entrecascas de vegetais. Como afirma Van Damme et al (1998), em função de sua especificidade, as lectinas apresentam várias propriedades biológicas, como inseticidas, antifúngicas, antimicrobianas e antitumorais. Assim como os metabólitos secundários, possui diversas aplicações, como na fitoterapia, na indústria de cosméticos, de alimentos e demais segmentos (PLETSCH, 1998). A *Borreria Verticillata* (Rubiaceae), também conhecida como cordão-de-frade, vassourabotão, vassourinha, etc. é uma Erva de muitos ramos, folhas ovais ou em forma de lança, flores pequenas e brancas (VIEIRA et al., 1999). Esta espécie ocorre em todo território do Brasil e é geralmente usada na medicina tradicional como antipirético e analgésico. Estudos fitoquímicos desta espécie mostraram a presença de alcaloides indólicos e iridóides, substâncias estas, com uma grande gama de atividades biológicas, entre elas antidisentérica, anti-hemorroidária, bactericida, diurético e expectorante (HEITZMAN et al, 2005). O presente trabalho avaliou a hipótese de que o extrato das folhas de *B. Verticillata* e a lectina isolada do mesmo, poderiam apresentar efeito termiticida frente a cupins *Nasutitermes corniger* e inseticida frente a *Sitophilus zeamais*. Tendo em vista a necessidade de contribuir para a determinação do potencial biotecnológico de plantas do agreste pernambucano como fonte de compostos inseticidas.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Foram submetidos 100g de farinha da folha de *B. Verticillata* à extração de proteínas em NaCl 0,15 M, por 4h (ES<sub>4</sub>). A atividade lectínica do ES<sub>4</sub> foi realizada em placas de microtitulação. Foram colocados 50µl de NaCl 0,15M em cada poço; em seguida, foram adicionados ao segundo poço 50 µl da amostra a ser avaliada. Após uma diluição seriada, 50µl de eritrócitos de coelhos foram adicionados em todos os poços e as placas foram incubadas por 45 minutos. A quantificação proteica foi realizada de acordo com Lowry et al. (1951). A purificação inicial foi realizada com o fracionamento das proteínas de ES<sub>4</sub> com (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> segundo GREEN & HUGHES (1955). Em seguida, o precipitado (PF<sub>2</sub>), foi submetido à diálise com H<sub>2</sub>O por 2h horas e NaCl 0,15 M por 2h, e posteriormente avaliado na presença de carboidratos e glicoproteínas. PF<sub>2</sub> foi aplicado em coluna de quitina, equilibrada com NaCl 0,15 M. O pico proteico ativo (PII), denominado Lectina de *B. Verticillata*, foi eluído com Ácido acético 1,0 M, e submetido à, diálise com H<sub>2</sub>O (2h) e NaCl 0,15 M (2h), e liofilização. Em seguida, a PII foi submetida à eletroforese em gel de Poliacrilamida. A atividade termiticida foi avaliada através de bioensaio baseado no método de KANG et al. (1990). Cada unidade experimental consistiu em uma placa de

Petri (90 x 15 mm) com o fundo coberto com papel filtro. Um disco de papel filtro (4 cm de diâmetro) impregnado com 200  $\mu$ L da amostra avaliada foi colocado em cada placa. No controle negativo, os discos foram impregnados com NaCl 0,15 M. Um total de 20 cupins ativos (16 operários e 4 soldados) foram transferidos para cada placa e o ensaio foi mantido a 28 °C na escuridão. A avaliação do número de insetos mortos foi feita diariamente até a morte de todos os insetos. Os bioensaios foram realizados em quintuplicata para cada concentração avaliada e as taxas de sobrevivência (%) foram obtidas para cada tratamento. Discos de farinha foram preparados de acordo com o método de XIE et al. (1995). Para cada bioensaio, uma alíquota da solução-estoque (extrato, fração e preparação da proteína isolada) foi adicionada a uma mistura constituída por 2,0 g de farinha de trigo e o volume foi completado para 5 mL utilizando água destilada. No tratamento controle, NaCl 0,15 M foi adicionado. Para cada ensaio, os discos de farinha e o grupo de vinte indivíduos da espécie *Sitophilus zeamais* foram pesados antes do início e após 7 dias do ensaio. Após 7 dias, foi também registrada a taxa de mortalidade. Foram calculados os índices nutricionais: 1) taxa de crescimento relativo (TCrR): (biomassa adquirida)/(biomassa inicial dos insetos x dias); 2) taxa de consumo relativo (TCoR): (massa ingerida)/(biomassa inicial dos insetos x dias); 3) eficiência de conversão do alimento ingerido (ECAI): [(biomassa adquirida / massa ingerida) x 100].

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O ES<sub>4</sub> por apresentar a melhor AHE (541) foi selecionado como melhor extrato, A partir dele, pós- purificação parcial das proteínas com sulfato de amônio, foram obtidas 4 frações proteicas. A fração PF<sub>2</sub>, por apresentar a melhor AHE (3,561), foi escolhida para continuação do processo de purificação da lectina das folhas de *B. Verticillata*. Eritrócitos de coelho foram selecionados para os ensaios de hemaglutinação devido à facilidade de obtenção e menor risco em sua manipulação. Os eritrócitos de coelho são rotineiramente utilizados para determinação de AH de lectinas. A AH de PF<sub>2</sub> foi parcialmente inibida por N-acetilglicosamina e pelas glicoproteínas fetuína, ovoalbumina, tireoglobulina e azocaseína. A inibição com N-acetilglicosamina é um indicativo para purificação da lectina através de cromatografia de afinidade em colunas de quitina e de Agarose-N-acetilglicosamina o que estimulou a purificação da lectina através de cromatografia de afinidade em colunas de quitina. Extrato salino, PF<sub>2</sub> e PII (lectina isolada), apresentam atividade antifúngica, reduzindo o crescimento de espécies de *Fusarium* e efeito antibacteriano sobre a maioria das bactérias testadas (Gram-positivas e Gram-negativas). Os gráficos abaixo apresentam os resultados dos testes termicida do ES<sub>4</sub>, a PF<sub>2</sub> e a PII, frente a *N. corniger*. O contato com o ES<sub>4</sub>, a PF<sub>2</sub> e a lectina da *B. verticillata* em todas as concentrações testadas induziram 100% de mortalidade dos operários e soldados, depois de um determinado intervalo de tempo, antes do controle negativo.

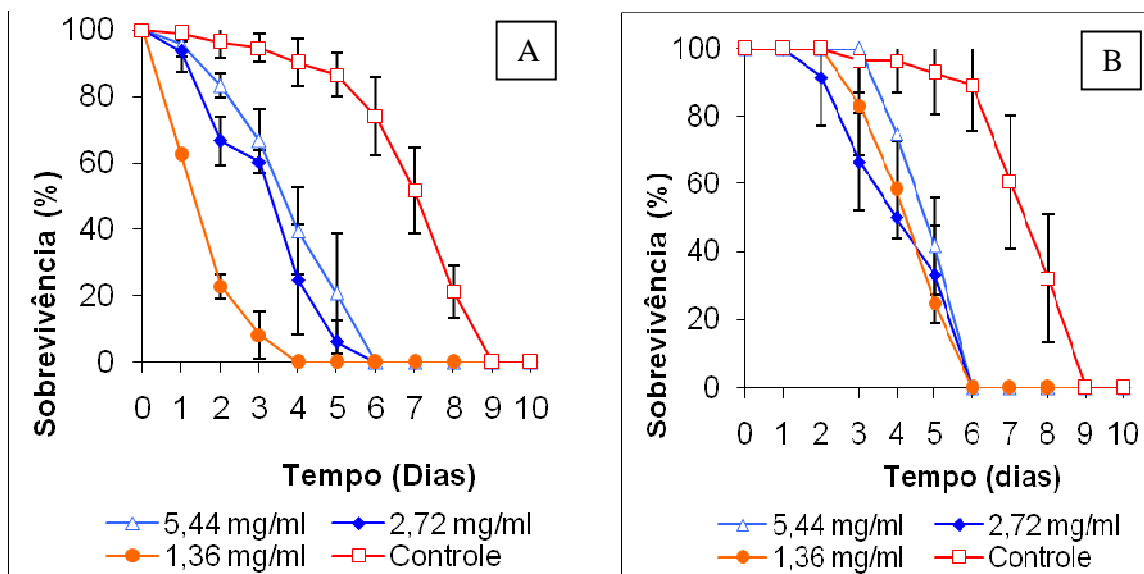


Gráfico 1A e 1B. Efeito do contato com o extrato salino (ES<sub>4</sub>) em Operários (A) e soldados (B) de *N. corniger*. Cada ponto representa a média das triplicatas.

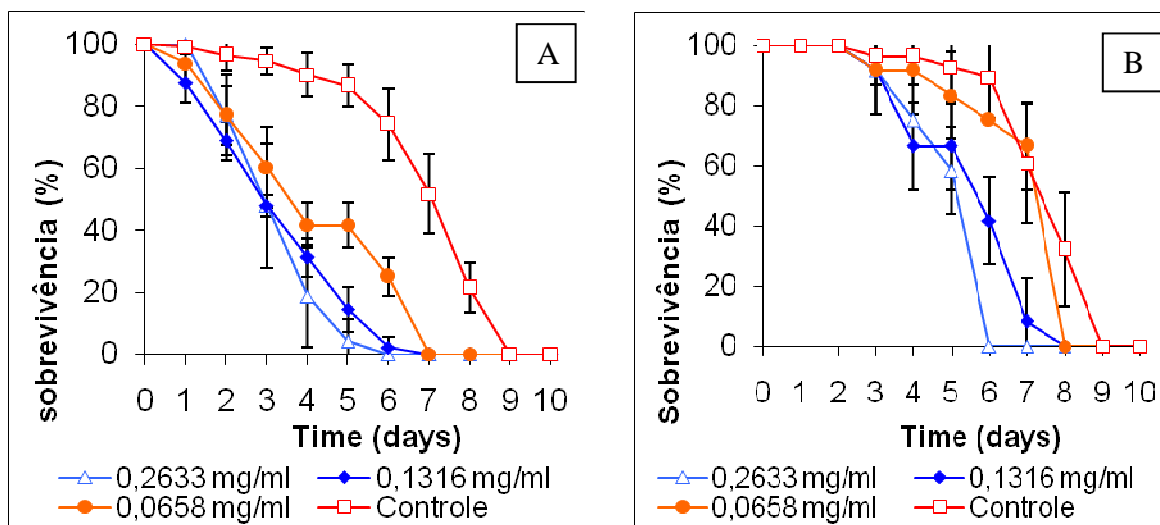


Gráfico 2A e 2B. Efeito do contato com a Fração (PF<sub>2</sub>) em Operários (A) e soldados (B) de *N. corniger*. Cada ponto representa a média das triplicatas.

Observando o gráfico da proteína isolada tem-se que os operários (gráfico 7A), Apresenta 100% da mortalidade após 5 dias (0,6 mg / mL), 6 dias (1,3 mg / mL) e 7dias (0,2 mg / ml). Já em soldados, (gráfico 7B), 100% de mortalidade foi observada após 5dias (0,6 mg / mL) e 7dias (1,3 e 0,2 mg / mL) dias. O controle apresentou 100% da mortalidade das térmitas apenas após o nono dia.

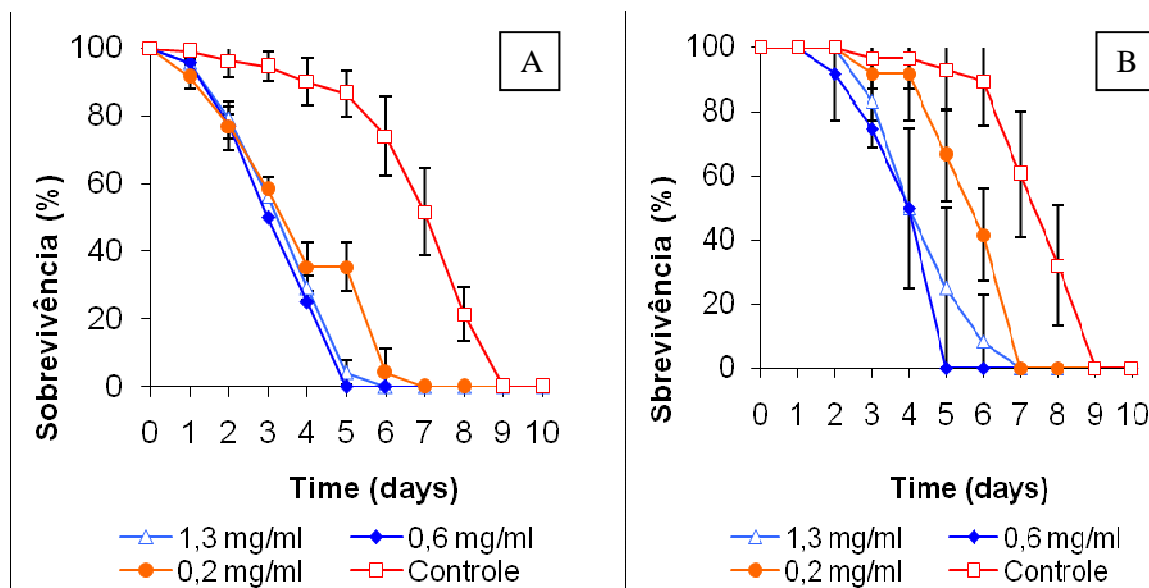


Gráfico 3A e 3B. Efeito do contato com a lectina da *B. Verticillata* ( $P_2$ ) em Operários (A) e soldados (B) de *N. corniger*. Cada ponto representa a média das triplicatas.

Segundo Lerner e Raikhel (1992), a N-acetilglicosamina se faz presente no trato digestivo de muitos insetos. Semelhante aos insetos, os térmitas também possuem a N-acetilglicosamina em seu trato digestivo.

### CONCLUSÕES

Pode-se concluir que o extrato salino feito das folhas da *B. Verticillata*, a  $PF_2$  e a PII apresentaram atividade termiticida contra os cupins *N. corniger*. A proteína isolada (PII), apresenta 100% da mortalidade dos operários após 5 dias (0,6 mg / mL), 6 dias (1,3 mg / mL) e 7 dias (0,2 mg / mL). Já em soldados, 100% de mortalidade foi observada após 5 dias (0,6 mg / mL) e 7 dias (1,3 e 0,2 mg / mL) dias. O controle apresentou 100% da mortalidade das térmitas apenas após o nono dia. A atividade termiticida de um extrato, obtida a partir das folhas de uma erva amplamente distribuída no Brasil, estimula sua avaliação como uma potencial substância natural para controle da população desta espécie de cupim.

### AGRADECIMENTOS

Ao PIBIC-UFPE; Ao CNPq pelo apoio financeiro.

### REFERÊNCIAS

GREEN, A. A.; HUGHES, W. L. Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solutions of salts and organic solvents. In: COLOWICK, S.; KAPLAN, N. Methods in Enzymology, New York: Academic Press, v.1, pp. 67-90, 1995.

HEITZMAN, M.E. et al. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria* (Rubiaceae) *Phytochemistry* (2005) 66, 5–2.

LOWRY, O.H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265–275, 1951.

LIS, H.; SHARON, N. Biological properties of lectins. In: LIENER, I. E.; SHARON, N.; GOLDSTEIN, I. J. (eds). *The Lectins: Properties, Functions, and Applications in Biology and Medicine*, New York: Academic Press. pp. 265-291, 1986.

PLETSCH, M. A aplicação da biotecnologia à produção de compostos naturais biologicamente ativos. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento* 4: 12-15, 1998.

VAN DAMME, J. M.; PEUMANS, W. J.; BARRE, A. J.; ROUGÉ, P. J. Plant Lectins: A Composite of Several Distinct Families of Structurally and Evolutionary Related Proteins with Diverse Biological Roles. *Critical Reviews in Plant Sciences* 17(6): 575-592, 1998.

VIEIRA, I. J. C.; MATHIAS, L.; BRAZ-FILHO, R.; SCHRIPSEMA, J. Iridoids from *Borreria verticillata*, *Organic Letters*. (1999) Vol. 1, No. 8, p. 1169-117.