

Atividades biológicas e enzimáticas do extrato aquoso de sementes de *Caesalpinia ferrea* Mart., Leguminosae

Mariana G. Cavaleiro,¹ Davi F. Farias,³ Geórgia Sampaio Fernandes,³
Edson P. Nunes,¹ Francisca S. Cavalcanti,² Ilka M. Vasconcelos,³ Vânia M. M. Melo,¹
Ana F. U. Carvalho*¹

¹Departamento de Biologia, ²Departamento de Química Orgânica e Inorgânica,
³Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará,
Av. Humberto Monte, s/n, Pici, 60455-970 Fortaleza-CE, Brasil

RESUMO: *Caesalpinia ferrea* Mart. (jucá ou pau-ferro) é uma espécie da família Leguminosae cuja ocorrência estende-se da região Nordeste ao Estado do Rio de Janeiro. Trata-se de uma espécie bastante utilizada na medicina popular pelas suas inúmeras propriedades terapêuticas tais como antiinflamatória, analgésica, antimicrobiana e antitérmica as quais indicam a presença de compostos de interesse farmacológico. Contudo, muitos estudos em plantas também investigam a presença de compostos de interesse industrial. Com base nas propriedades terapêuticas e atividades já descritas para essa espécie, esse trabalho objetivou pesquisar atividades biológicas no extrato de sementes de *C. ferrea* na busca por compostos de interesse industrial e farmacológico. Os resultados indicaram a presença das atividades celulásica, amilásica, anticoagulante e larvicida contra *A. aegypti* no extrato aquoso das sementes de *C. ferrea*, entretanto, não foram observadas as atividades tóxica aguda, hemolítica, heparinásica, antibacteriana e antifúngica.

Unitermos: *Caesalpinia ferrea*, Leguminosae, atividades biológicas, atividades enzimáticas, sementes.

ABSTRACT: “Biological and enzymatic activities of aqueous extract of seeds from *Caesalpinia ferrea* Mart., Leguminosae.” *Caesalpinia ferrea* Mart. is a species belonging to Leguminosae family commonly known in Brazil as “jucá” or “pau-ferro”. It occurs in Brazil from the Northeast Region to the State of Rio de Janeiro and it is widely utilized in folk medicine due to its several therapeutic properties such as anti-inflammatory, analgesic, antimicrobial and antithermic, which indicate the presence of compounds of pharmacological interest. Besides, many studies with plants look for the presence of compounds with industrial applications. Based upon the therapeutic and bioactive properties described for this species so far, this work aimed to investigate several biological activities in the water extract of *C. ferrea* seeds. The results indicated the presence of the following activities: cellulase, amylase, anticoagulant and larvicide against *A. aegypti* in the water extract of *C. ferrea* seeds. Nevertheless, the extract did not show the other activities assayed: acute toxic activity, hemolytic, heparinasic, antibacterial and antifungal activities.

Keywords: *Caesalpinia ferrea*, Leguminosae, biological activities, enzymatic activities, seeds.

INTRODUÇÃO

Caesalpinia ferrea Mart., popularmente conhecida como jucá ou pau-ferro, é uma espécie que está inserida na família das Leguminosae, uma das maiores famílias dentre as dicotiledôneas com cerca de 650 gêneros, que reúnem mais de dezoito mil espécies (Cronquist, 1981). A subfamília Caesalpinioideae consiste de aproximadamente 150 gêneros e 2200 espécies, distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais (Cronquist, 1981). *C. ferrea* ocorre em toda a região Nordeste, estendendo-se até o Espírito Santo e o Rio de Janeiro, na Floresta Pluvial Atlântica

(Braga, 1976). É encontrada em quase todo o Ceará, sendo, porém, mais freqüente na Serra do Araripe, Serra do Apodí, parte leste, oeste e sul do estado (Maia, 2004).

Na medicina popular, são inúmeras as propriedades terapêuticas descritas para *C. ferrea*, que inclui o uso da entrecasca para o tratamento de feridas, contusões, combate à asma e à tosse crônica (Braga, 1976). Os frutos são antiarréicos, anticatarras e cicatrizantes e as raízes são antitérmicas (Maia, 2004). Bacchi & Sertie (1988) descreveram o efeito do extrato aquoso bruto contra úlceras gástricas, além das atividades antiinflamatória e analgésica relatadas por Thomas et al. (1988) e Carvalho

et al. (1996). De *C. ferrea* foram ainda caracterizadas as atividades cardiotônica, antimicrobiana, analgésica e antiinflamatória (Carvalho et al., 1996), antihistamínica, antialérgica, anticoagulante e hepatotóxica (Di Stasi et al., 2002).

Os organismos pertencentes ao reino vegetal são os que têm contribuído de forma mais significativa para o fornecimento de compostos que possuem um largo espectro de propriedades biológicas. Dentre as muitas aplicações dos compostos produzidos pelas plantas, destacam-se as industriais e as farmacológicas. O interesse industrial por tecnologias enzimáticas vem aumentando gradativamente nos últimos anos, principalmente, nas áreas de engenharia de proteínas (Svendsen et al., 1997) e enzimologia (Léon et al., 1998), as quais ampliaram consideravelmente o potencial de aplicação das enzimas como catalisadores em processos industriais (Woolley & Petersen, 1994; Wiseman, 1995). Além disso, tem-se verificado um grande avanço científico envolvendo os estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais que visam obter novos compostos com propriedades terapêuticas (Cechinel Filho & Yunes, 1998).

O objetivo desse trabalho é pesquisar atividades biológicas e enzimáticas no extrato aquoso de sementes de *C. ferrea* na busca por compostos de interesse industrial e farmacológico.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Sementes de *C. ferrea* foram coletadas no município do Crato-CE, Brasil, em janeiro de 2005. A identificação foi realizada no Herbário Prisco Bezerra (EAC), onde foi incorporada exsicata sob o número 39616. As sementes foram trituradas em liquidificador e em moinho. Peneiras convencionais com malha aproximada de 1 mm² foram utilizadas para obtenção de uma farinha homogênea a qual foi acondicionada em potes plásticos para posterior utilização nos ensaios.

Preparação do extrato aquoso bruto

A farinha foi suspensa em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0 com NaCl 0,15M, na proporção de 1:10 (p/v) e deixada sob agitação contínua por 4 h a 4 °C. As suspensões foram filtradas em pano de trama fina e, em seguida, centrifugadas a 20000x g, por 20 min, a 4 °C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante obtido foi utilizado nos ensaios.

Toxicidade aguda

A avaliação da toxicidade aguda foi realizada através da injeção intraperitoneal (0,3 mL.10g⁻¹ de peso corpóreo) do extrato de *C. ferrea* em camundongos

machos Swiss (n=6), seguindo metodologia descrita por Vasconcelos et al. (1994). A atividade tóxica foi definida como a mortalidade observada 24 h após a injeção intraperitoneal e expressa em termos de DL₅₀, que é definida como a quantidade de sólidos solúveis (g sólidos solúveis.kg⁻¹ de peso corpóreo) capaz de causar morte em 50% dos animais testados. O experimento foi conduzido de acordo com as normas de pesquisa científicas com animais e o protocolo experimental foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará.

Atividade hemolítica

A atividade hemolítica foi investigada segundo a metodologia descrita por Merker & Levine (1986) e Bernheimer (1988), com algumas modificações. Foram utilizados eritrócitos de rato e de coelho, tratados com enzimas proteolíticas. Uma unidade hemolítica foi definida como a concentração do extrato capaz de produzir 50% de hemólise em suspensão de células a 1% durante 1 h.

Atividade celulásica

A atividade celulásica foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Ruegger & Tauk-Tornisielo (2004), com modificações, na qual o extrato bruto de *C. ferrea*, liofilizado e ressuspensão em 30 µL de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0 contendo NaCl 0,15M, foi inoculado em placas de Petri contendo ágar (20 g.L⁻¹) e celulose (10 g.L⁻¹). Como controle positivo foi utilizado celulase de *Aspergillus* sp. (EC 3.2.1.4., Sigma-Aldrich Co. USA). Foi utilizada uma solução corante vermelho congo (2,5 g.L⁻¹ em tampão Tris HCl 0,1 M, pH 8,0) por 30 min, seguida por lavagem com 5 mL de solução de NaCl 0,5 M neste mesmo tampão para revelação da placa. Posteriormente, foi observada a formação de halos claros ao redor dos poços indicativos da degradação da celulose.

Atividade amilásica

A pesquisa de atividade amilásica foi realizada segundo a metodologia descrita por Hankin & Anagnostakis (1975), com modificações. O extrato bruto de *C. ferrea* foi inoculado em poços nas placas de Petri contendo ágar (20 g.L⁻¹) e amido (10 g.L⁻¹). Após incubação a 37 °C por 24 h, as placas foram tratadas com solução de lugol a qual permitiu a visualização de halos claros ao redor dos poços. O controle positivo utilizado foi α-amilase de *Aspergillus oryzae* (EC 3.2.1.1, Sigma-Aldrich Co. USA) na concentração de 60 UI.mL⁻¹ em tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 6,9 contendo NaCl 6 mM.

Atividade heparinásica

A pesquisa de atividade heparinásica no extrato

bruto de *C. ferrea* foi realizada segundo a metodologia descrita por Rajaganapathi & Kathiresan (2002), com algumas modificações. Após a prévia incubação do extrato com heparina sódica (500 UI.mL⁻¹), na proporção 1:1, em temperatura ambiente durante 1 h, a reação foi interrompida por aquecimento a 60 °C por 10 min. Sangue total de rato, 500 µL, foi adicionado e determinado o tempo de coagulação imediatamente após a sua coleta, feita por punção com cânula de vidro no plexo retro-orbital. Solução salina 0,9 % foi utilizada como controle negativo.

Atividade anticoagulante

O ensaio de pesquisa de atividade anticoagulante foi realizado de acordo com a descrição de Rajaganapathi & Kathiresan (2002), com algumas modificações. Sangue total recém-coletado de ratos foi adicionado ao extrato bruto de *C. ferrea* e a ocorrência ou não de coagulação foi verificada e cronometrada. Solução salina 0,15M foi utilizada como controle negativo e heparina como controle positivo.

Atividade larvicida contra *Aedes aegypti* L.

Larvas de *A. aegypti* foram coletadas de uma colônia de mosquitos mantidas no NUVET (Núcleo Controle de Vetores, Secretaria de Saúde do Estado do Ceará). O ensaio foi realizado de acordo com a metodologia descrita pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2005), com modificações. Vinte larvas de *A. aegypti*, em terceiro estágio, foram transferidas para copos plásticos descartáveis de 150 mL contendo 25 mL do extrato bruto de *C. ferrea* (para este ensaio feito em água destilada). O ensaio foi conduzido à temperatura ambiente e fotoperíodo de 12 h. Após 24 h foram registradas as taxas de mortalidade e sobrevivência. Os testes foram realizados em triplicata e água destilada foi usada como controle negativo.

Atividade antibacteriana em meio sólido

A atividade antibacteriana do extrato *C. ferrea* foi determinada de acordo com o método descrito por Bauer et al. (1966). As bactérias Gram-positivas, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), e Gram-negativas, *Enterobacter aerogens* (ATCC 13048), *Salmonella choleraensis* (ATCC 10708), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25619) foram obtidas da American Type Culture Collection (ATCC). Discos de papel de filtro com 15 µL do extrato bruto estéril foram colocados sobre placas de ágar Mueller-Hinton contendo culturas das bactérias na concentração de 10⁷ UFC.mL⁻¹. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. Tetraciclina foi utilizada como controle positivo e o tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0 com NaCl 15 0,15M como controle negativo. A inibição do crescimento microbiano foi avaliada pela formação de

halos de inibição ao redor dos discos.

Atividade antifúngica em meio sólido

O ensaio de atividade antifúngica foi realizado de acordo com o método descrito por Roberts & Selitrennikoff (1990), com modificações. Os fungos *Aspergillus niger*, *Colletotrichium lindemuthianum*, *C. truncatum*, *Fusarium oxysporum*, *F. Solani*, *F. pallidoroseum*, *Mucor sp.*, *Neurospora sp.*, *Penicillium herguei*, *Phomopsis sp.*, *Phytium oligandrum*, *Rhizoctonia solani* e *Thricoderma viridae* foram obtidos no Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Universidade Federal do Ceará. Discos de papel de filtro (2 cm de diâmetro) com 300 µL do extrato estéril de *C. ferrea* foram colocados sobre placas de Petri contendo ágar-batata e o micélio dos fungos recentemente repicados. As placas foram incubadas em câmaras de crescimento com fotoperíodo de 12 h até o crescimento restante dos fungos em presença do extrato. A formação de halos ao redor dos discos indicou inibição do crescimento fúngico. Nistatina (100000 UI.mL⁻¹, EMS, São Paulo) foi utilizada como controle positivo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos para as atividades biológicas e enzimáticas do extrato aquoso de sementes de *C. ferrea* estão sumarizados na Tabela 1.

Tabela 1. Atividades biológicas e enzimáticas do extrato aquoso das sementes de *Caesalpinia ferrea*.

Atividades biológicas e enzimáticas	Presença (+) ou ausência (-) de atividade no extrato aquoso de <i>C. ferrea</i>
Tóxica aguda (0,3 ml.kg ⁻¹ peso corpóreo)	-
Hemolítica	Eritrócitos de coelho - Eritrócitos de rato -
Celulásica	+
Amilásica	+
Heparinásica	Eritrócitos de rato -
Anticoagulante	Eritrócitos de rato +
Larvicida contra <i>A. aegypti</i>	+
Antibacteriana	-
Antifúngica	-

O extrato bruto das sementes *C. ferrea* não apresentou toxicidade aguda em camundongos mesmo quando administrada a dose máxima (0,3 mL.10g⁻¹ de peso corpóreo). Também não foram observados perda de peso, mudanças de comportamento, diarreia ou quaisquer outras alterações. O extrato também não causou hemólise em eritrócitos de rato e coelho embora tenha sido relatada,

para essa espécie, a presença de compostos conhecidos por serem responsáveis pela atividade hemolítica, tais como compostos fenólicos e saponinas. De acordo com Almeida et al. (2005), o extrato etanólico de frutos de *C. ferrea* contém taninos e fenóis, os quais são capazes de promover hemólise por meio da oxidação da hemoglobina (Eyer et al., 1975; Bukowska & Kowalska, 2004). As saponinas são também conhecidas por apresentarem propriedade hemolítica *in vitro* (Cheeke, 1998; Pizarro et al., 1999; Lee et al., 2001) e, segundo Carvalho (1993), as saponinas estão presentes no extrato aquoso bruto dos frutos de *C. ferrea*. Apesar de relatada a presença de compostos fenólicos e saponinas no extrato de frutos, a concentração desses compostos nas sementes não foi suficiente para causar hemólise dos eritrócitos.

A atividade celulásica foi detectada para o extrato de *C. ferrea*. A capacidade do extrato de jucatá de degradar a celulose sugere a presença de microorganismos endofíticos na semente, onde normalmente essas enzimas são encontradas. Segundo Carrim et al. (2006), poucos trabalhos existem enfocando o isolamento de microorganismos endofíticos. Dessa forma, eles podem representar um novo recurso na obtenção de mais enzimas com diferentes potencialidades. Assim, se estudos mais aprofundados com o objetivo de comprovar e isolar microorganismos do interior da semente de *C. ferrea* forem realizados, bem como o isolamento do princípio ativo capaz de degradar a celulose pode-se propor, então, um novo material para aplicação na indústria biotecnológica, uma vez que a enzima celulase é largamente utilizada nas indústrias têxteis, de detergentes e indústrias alimentícias, dentre outras (Nielsen & Oxenbøll 1998).

A atividade amilásica foi detectada no extrato da semente de *C. ferrea*. Duas hipóteses poderiam explicar sua capacidade de degradação do amido. A primeira seria a de que a semente possui, em seu interior, enzimas amilolíticas que estejam relacionadas ao processo de mobilização de nutrientes para germinação da semente. Essa hipótese pode ser apoiada por muitos estudos que reportam a presença de alfa-amilase em algumas sementes de leguminosas (Kohn & Nanmori, 1991; Yamamoto, 1995; Mar et al., 2003). Chen et al. (1998) analisaram o acúmulo de carboidratos em sementes de soja avaliando a atividade da alfa-amilase dessas sementes. Minamikawa (1979) também relatou a atividade amilolítica em cotilédones de uma leguminosa do gênero *Vigna*, em processo de germinação, além de obter uma preparação pura de alfa-amilase (Koshiba & Minamikawa, 1981). A outra hipótese seria a presença de microorganismos endofíticos no interior da semente de *C. ferrea* que sejam capazes de degradar o amido. Assim, o jucatá pode ser uma nova alternativa na busca por princípios ativos de interesse da indústria biotecnológica, como citado anteriormente.

O extrato de *C. ferrea* não apresentou atividade heparinásica. Durante um período de aproximadamente 30 min, o extrato apresentou atividade anticoagulante, embora

não tenha persistido. Di Stasi et al. (2002) relataram a presença de atividade anticoagulante para a espécie *C. ferrea*, porém, não foi descrita a parte da planta utilizada para a detecção de tal atividade. Um estudo mais profundo sobre qual substância conferiu a capacidade desse extrato de não permitir a coagulação do sangue por breve tempo pode revelar algum composto de interesse farmacológico relacionado aos estudos de coagulação sanguínea.

Em menos de 24 h, o extrato das sementes de *C. ferrea* apresentou atividade larvicida contra *A. aegypti* com 85% de mortalidade, bem superior à taxa de 10% encontrada com extrato etanólico das folhas de *C. ferrea* (Luna et al., 2005). Assim, o extrato aquoso das sementes desta planta apresenta potencial de utilização no combate ao desenvolvimento do mosquito transmissor da dengue e febre amarela.

Os resultados dos ensaios de atividade antibacteriana em meio sólido mostraram que o extrato de *C. ferrea* não inibiu o crescimento de nenhuma das cepas bacterianas analisadas. Embora tenha sido comprovada a atividade antibacteriana (Saeed & Sabir, 2002; Aqil & Ahmad, 2003; Woldemichael et al., 2003) e antifúngica (Saeed & Sabir, 2002; Aqil & Ahmad, 2003) de sementes de algumas espécies do gênero *Caesalpinia*, para a espécie *C. ferrea*, até o presente momento, só foram relatadas atividade antimicrobiana do extrato e de frações obtidas a partir do caule (Frasson, 2002) e dos frutos (Carvalho et al., 1996). Em relação à atividade antifúngica, o extrato de *C. ferrea* não inibiu o crescimento de nenhum dos fungos estudados. Muitos autores descreveram atividade antifúngica de extratos de várias partes de espécies do gênero *Caesalpinia* (Aqil & Ahmad, 2003; Sudhakar et al., 2006; Cruz et al., 2007), entretanto, até o presente momento, nenhum estudo relata a atividade antifúngica de extratos de sementes de *C. ferrea*.

Os resultados obtidos demonstram que o extrato de sementes de *C. ferrea* não apresenta atividade tóxica aguda, hemolítica, heparinásica, antibacteriana e antifúngica, entretanto, apresenta atividades celulásica, amilásica, anticoagulante e larvicida contra *A. aegypti*, atividades essas indicativas da presença de compostos bioativos de interesse farmacológico e/ou industrial. Estudos posteriores fazem-se necessários para identificação e purificação de tais compostos.

REFERÊNCIAS

- Almeida CFCBR, Lima e Silva TC, Amorim ELC, Maia MBS, Albuquerque UP 2005. Life strategy and chemical composition as predictors of the selection of medicinal plants from the caatinga (Northeast Brazil). *J Arid Environ* 62: 127-142.
- Aqil F, Ahmad I 2003. Broad-spectrum antibacterial and antifungal properties of certain traditionally used Indian medicinal plants. *World J Microb Biot* 19: 653-657.
- Bacchi EM, Sertie JAA 1988. Ação anti-úlcer de *Styrax campo-*

- rum Pohl and *Caesalpinia ferrea* Mart. *Tenth Brazilian Symposium in Medicinal Plants*. São Paulo, Brasil.
- Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *Am J Clin Pathol* 45: 149-158.
- Bernheimer AW 1988. Assay of hemolytic toxins. *Methods Enzymol* 165: 213-217.
- Braga R 1976. Plantas do nordeste, especialmente do Ceará. Fortaleza, Escola Superior de Agricultura de Mossoró, 540 p.
- Bukowska B, Kowalska S 2004. Phenol and catechol induce pre-hemolytic and hemolytic changes in human erythrocytes. *Toxicol Lett* 152: 73-84.
- Carrim AJI, Barbosa ED, Vieira JDG 2006. Enzymatic activity of endophytic bacterial isolates of *Jacaranda decurrens* Cham. (Carobinha-do-campo). *Braz Arch Biol Technol* 49: 353-359.
- Carvalho JCT 1993. *Caesalpinia ferrea (Pau-ferro): Avaliação da atividade antiinflamatória e analgésica*. Ribeirão Preto, 125p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
- Carvalho JCT, Teixeira JRM, Souza PJC, Bastos JK, Santos Filho D, Sarti SJ 1996. Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. *J Ethnopharmacol* 53: 175-178.
- Cechinel Filho V, Yunes RA 1998. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Química Nova* 21: 99-103.
- Cheeke PR 1998. *Natural toxicants in feeds, Forages, and Poisonous Plants*. Danville: Interstate Publishers, 479 p.
- Chen Z, Ilarslan H, Palmer RG, Shoemaker RC 1998. Development of protein bodies and accumulation of carbohydrates in a soybean (leguminosae) shriveled seed mutant. *Am J Bot* 85: 492-499.
- Cronquist A 1981. *An integrated system of classification of flowering plants*. New York: Columbia University Press.
- Cruz MCS, Santos PO, Barbosa Jr AM, Melo DLFM, Alviano CS, Antonioli AR, Alviano DS, Trindade RC 2007. Antifungal activity of Brazilian medicinal plants involved in popular treatment of mycoses. *J Ethnopharmacol* 111: 409-412.
- Di Stasi LC, Hiruma-Lima CA, Souza-Brito ARM, Mariot A, Santos CM 2002. *Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica*. São Paulo, UNESP.
- Eyer P, Hestle H, Kiese M, Klein G 1975. Kinetics of ferrihaemoglobin formation by some reducing agents and the role of hydrogen peroxide. *Mol Pharmacol* 11: 326-334.
- Frasson APZ 2002. *Caracterização físico-química e biológica e avaliação da atividade antimicrobiana do extrato do caule de Caesalpinia ferrea Mart.* Rio Grande do Sul, 142 p. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria.
- Hankin L, Anagnostakis SL 1975. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia* 67: 597-607.
- Kohno A, Nanmori T 1991. Changes in α and β -Amylase Activities during Germination of Seeds of Alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Cell Physiol* 32: 459-466.
- Koshiha T, Minamikawa T 1981. Purification by affinity chromatography of α -amylase-a main amylase in cotyledons of germinating *Vigna mungo* seeds. *Plant Cell Physiol* 22: 979-987.
- Lee ST, Stegelmeier BL, Gardner DR, Vogel KP 2001. The isolation and identification of steroidal sapogenins in switchgrass. *Nat Toxins* 10: 273-281.
- Léon R, Fernandes P, Pinheiro HM, Cabral JMS 1998. Whole-cell biocatalysis in organic media - Effect of gel hydrophobicity on diverse conversions of testosterone by gel-entrapped *Nocardia rhodocrous* cells. *Enzyme Microb Technol* 23: 483-500.
- Luna JS, dos Santos AF, de Lima MRF, de Omena MC, de Mendonça, FAC, Bieber, LW, Sant'Ana AEG 2005. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. *J Ethnopharmacol* 97: 199-206
- Maia GN 2004. *Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades*. São Paulo: D&Z Computação Gráfica, Leitura & Arte, 413 p.
- Mar SS, Mori H, Lee J, Fukuda K, Saburi W, Fukuhara A, Okuyama M, Chiba S, Kimura A 2003. Purification, characterization, and sequence analysis of two α -amylase isoforms from azuki bean, *Vigna angularis*, showing different affinity towards β -cyclodextrin sepharose. *Biosci Biotechnol Biochem* 67: 1080-1093.
- Merker MP, Levine L 1986. A protein from the marine mollusc *Aplysia californica* that is hemolytic and stimulates arachidonic acid metabolism in cultured mammalian cells. *Toxicon* 24: 451-65.
- Minamikawa T 1979. Hydrolytic enzyme activities and degradation of storage components in cotyledons of germinating *Phaseolus mungo* seeds. *Bot Mag Tokyo* 92: 1-12
- Nielsen RI, Oxenbøll K 1998. Enzymes from fungi: their technology and uses. *Mycologist* 12: 69-71.
- Pizarro APB, Oliveira Filho AM, Parente JP, Melo MTV, Santos CE, Lima PR 1999. Aproveitamento do resíduo da indústria do sisal no controle de larvas de mosquitos. *Rev. Soc Bras Med Trop* 32: 23-29.
- Rajaganapathi R, Kathiresan K 2002. Heparinase in fluid of the sea hare, *Bursatella leachii*. *Curr Sci* 82: 264-266.
- Roberts WK, Selitrennikoff CP 1990. Zeamantin, an antifungal protein from maize with membrane permeabilizing activity. *J Gen Microbiol* 136: 1771-1778.
- Ruegger MJS, Tauk-Tornisielo SM. 2004. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Jureia-Itatins, São Paulo, Brasil. *Rev Bras Bot* 27: 205-211.
- Saeed MA, Sabir AW 2002. Antibacterial activity of *Caesalpinia bonducella* seeds. *Fitoterapia* 72: 807-809.
- Sudhakar M, Rao CV, Rao PM, Raju DB, Venkateswarlu Y 2006. Antimicrobial activity of *Caesalpinia pulcherrima*, Eu-

- phorbia hirta* and *Asystasia gangeticum*. *Fitoterapia* 77: 378-380
- Svendsen A, Clausen IG, Patkar SA, Borch K, Thellersen M 1997. Protein engineering of microbial lipases of industrial interest. *Method Enzymol* 284: 317-340.
- Thomas G, Araújo CC, Souza OS 1988. Avaliação das atividades antiinflamatória, analgésica e antipirética dos extratos aquosos de *Caesalpinia ferrea*, *Plantago major*, *Polygonum acre* e *Pterodon polygaeflorus*. *Tenth Brazilian Symposium in Medicinal Plants*. São Paulo, Brasil.
- Vasconcelos IM, Trentin A, Guimarães JA, Carlini CR 1994. Purification and physicochemical characterization of soya-toxin, a novel toxic protein isolated from soybeans (*Glycine max*). *Arch Biochem Biophys* 312: 357-366.
- WHO – World Health Organization 2005. *Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides*. Geneva, World Health Organization.
- Wiseman A 1995. *Handbook of Enzyme Biotechnology*. London, Ellis Horwood Publication.
- Woldemichael GM, Singh MP, Maiese WM, Timmermann BN 2003. Constituents of antibacterial extracts of *Caesalpinia paraguayensis* Burk. *Z Naturforsch* 58: 70-75.
- Woolley P, Petersen SB. 1994. *Lipases: Their Structure, Biochemistry and Application*. Great Britain: Cambridge University Press
- Yamamoto T 1995. *Enzyme Chemistry and Molecular Biology of Amylases and Related Enzymes*. Amylase Research Society of Japan, CRC Press, 206 p.