

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM

Programa Integrado de Pós-graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais

Programa de Pós-graduação em Ciências de Florestas Tropicais

**PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS E BIOLÓGICAS DE PROTEÍNAS
DE SEMENTES DE LEGUMINOSAS ARBÓREAS DA AMAZÔNIA**

ADRIANA BARIANI

Manaus, Amazonas

Fevereiro, 2008

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM

Programa Integrado de Pós-graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais

Programa de Pós-graduação em Ciências de Florestas Tropicais

**PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS E BIOLÓGICAS DE PROTEÍNAS
DE SEMENTES DE LEGUMINOSAS ARBÓREAS DA AMAZÔNIA**

ADRIANA BARIANI

ORIENTADOR: DR. JOSÉ FRANCISCO DE CARVALHO GONÇALVES

CO-ORIENTADORA: DRA. SILVANA CRISTINA PANDO

Dissertação de Mestrado apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em CIÊNCIAS DE FLORESTAS TROPICAIS.

Manaus, Amazonas

Fevereiro, 2008

Bariani, Adriana

Propriedades bioquímicas e biológicas de proteínas de sementes de leguminosas arbóreas da Amazônia. / Adriana Bariani – Manaus: UFAM/INPA, 2007.

122 p. ilustr.

Dissertação de Mestrado – Área de Concentração Silvicultura Tropical.

1. Inibidor de tripsina 2. Lectinas 3. Fungos fitopatogênicos

CDD xx.ed.xxx.xxx

Sinopse:

A ocorrência de inibidores de tripsina e frações com atividade hemaglutinante em quatro espécies leguminosas da Amazônia (*Caesalpinia ferrea* var. *cearensis*, *Cedrelinga catenaeformis*, *Swartzia polyphylla* e *Peltogyne venosa*), bem como o efeito antifúngico dos extratos totais de *C. ferrea* var. *cearensis*, *C. catenaeformis* e *S. polyphylla* sobre o crescimento micelial e a esporulação de fungos fitopatogênicos (*Colletotrichum guaranicola*, *Corynespora cassicola*, *Fusarium oxysporum* e *Sclerotium rolfsii*), foram estudados com o objetivo de testar a hipótese de que as diferentes espécies apresentam inibidores de tripsina e lectinas em suas sementes que podem atuar na diminuição do crescimento micelial e na esporulação de fungos fitopatogênicos.

Palavras-chave: inibidores de tripsina bovina, lectinas, efeito antifúngico, fungos fitopatogênicos, atividade hemaglutinante.

“A procura da verdade é difícil e é fácil, já que ninguém poderá desvendá-la por completo ou ignorá-la inteiramente. Contudo, cada um de nós poderá acrescentar um pouco do nosso conhecimento sobre a natureza e, disto uma certa grandeza emergirá”.

Aristóteles, 350 aC

Ao meu maravilhoso Deus, por me ter dado a dádiva da vida e sabedoria para terminar mais esta etapa.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao INPA e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências de Florestas Tropicais pela oportunidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pela bolsa de mestrado concedida.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas - FAPEAM por financiar o projeto de pesquisa;

Ao meu orientador Dr. José Francisco, pela orientação, confiança, respeito, amizade, oportunidade e contribuição em minha carreira profissional;

A Dra. Silvana Pando, pela orientação, ensinamento, confiança, amizade, respeito e, principalmente pelo total apoio e dedicação incansável em todas as etapas deste trabalho;

Aos pesquisadores Luiz Augusto Gomes de Souza, Maria Antônia e André Luiz Wendt pela participação em minha banca de qualificação;

Aos meus queridos e amados pais, pela vida, pelo amor, carinho, compreensão, incentivo e total apoio na realização desta dissertação e por me ensinarem os verdadeiros princípios de convivência, honestidade e ética, mostrando que o amor pelo próximo e a fé em Deus são as ferramentas necessárias para atingir qualquer objetivo com sucesso: *“MUITO OBRIGADA: AMO VOCÊS”*;

À minha irmã Alexandra e ao meu cunhado Edmilson pela oportunidade, carinho, convivência e total apoio durante o vestibular, graduação e início do mestrado;

Aos meus irmãos (Alexandra, Andrea, Júnior e Lucas), aos meus cunhados (as) (Edmilson, Marcelo e Juciele) e aos meus amados e maravilhosos sobrinhos (Caroline e Elias) por todo carinho, amor, apoio e convivência;

Aos amigos Larissa, Glaudecy, João Victor e Rennie pela ajuda e colaboração na realização deste trabalho;

A toda equipe do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal: Larissa, Eneida, Geisiane, Glaudecy, João Victor, Renata, Ronaldo, Andréia, Ulysses, Adamir, Eva, Emanuelle, Lissandra, Rennie, Carlos, Cícero, Diogo e Sara, pelo apoio, amizade e convivência;

A Dona Rizonilce e aos técnicos do Biotério do INPA pela coleta do sangue;

A Dra. Jania Lilia Bentes/UFAM e ao Dr. José Renato/UEA pela oportunidade e apoio durante a realização dos Bioensaios;

A toda a equipe dos laboratórios de Tecnologia de Alimentos/INPA V8, Bioquímica/UFAM, Produtos Bioativos de Origem Microbiana/UFAM, Biorgânica da Escola Superior de Ciências da Saúde/UEA, Genética/UFAM e Laboratório de Biodiversidade/FIOCRUZ pela oportunidade de uso durante os experimentos;

Aos colegas das turmas de Mestrado CFT 2005 e 2003 pela amizade, convivência, carinho e pelos momentos de confraternização;

Ao amigo Adriano Nogueira pela amizade, dedicação e ajuda nas análises estatísticas;

As amigas Vilany, Eneida e Larissa por toda amizade, carinho, compreensão e ajuda em todos os momentos bons e ruins que passei durante estes anos, principalmente pela oportunidade de uma amizade sincera e honesta;

Aos amigos Wagner, Lígia e César pela amizade, carinho e por todos os momentos felizes e inesquecíveis que passei com vocês;

Aos amigos de república César, Giuliano, Juliana e Raquel pela convivência e amizade;

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho: *Muito obrigada!*

RESUMO

As sementes de leguminosas apresentam alta concentração de proteínas, incluindo os inibidores de proteinases e as lectinas. Estas proteínas estão envolvidas em vários processos metabólicos nas plantas, incluindo o mecanismo de defesa contra fungos fitopatogênicos. Assim, neste trabalho objetivou-se detectar a presença dessas duas classes protéicas em sementes de quatro espécies de leguminosas arbóreas da Amazônia (*Caesalpinia ferrea* var. *cearensis*, *Cedrelinga catenaeformis*, *Swartzia polyphylla* e *Peltogyne venosa*), bem como caracterizar o efeito dos extratos totais sobre o crescimento micelial e a esporulação de *Colletotrichum guaranicola*, *Corynespora cassiicola*, *Fusarium oxysporum* e *Sclerotium rolfsii*. Os extratos totais das sementes foram utilizados nas etapas de detecção, purificação parcial e caracterização de inibidores de tripsina e AHE e em ensaios *in vitro* sobre fungos fitopatogênicos. Os inibidores parcialmente purificados foram designados CfTI e SpTI, para inibidores de *C. ferrea* var. *cearensis* e *S. polyphylla*, respectivamente. As frações com AHE de *C. catenaeformis* foram designadas CeCL e as de *P. venosa* de PeVL. Na presença de 3,8 µg de CfTI e 12 µg de SpTI, a atividade da enzima foi reduzida em aproximadamente 99 % e 62 %, respectivamente. As frações com AHE de CeCL foram inibidas por glicose, lactose, sacarose, manose, maltose, D-galactosamina, α-methyl-mannopyranosil e juntamente com as frações de PeVL, houve também inibição pelos açúcares maltose e N-acetil-galactosamina. O EDTA, quando foi adicionado em concentrações de 3,1 mM e 50 mM, não inibiu a AHE de CeCL e PeVL. O teor protéico dos extratos foi de aproximadamente 52, 48, 269 e 82 µg.mL⁻¹ para os extratos de *C. ferrea* var. *cearensis*, *C. catenaeformis*, *S. polyphylla* e *P. venosa*, respectivamente. O perfil eletroforético revelou uma única banda em CfTI, oito bandas em SpTI e três bandas em PeVL. Em CeCL as bandas de proteínas ficaram pouco evidentes. A presença do DTT não modificou o padrão de migração das proteínas no gel. Quanto aos bioensaios, os extratos de *C. ferrea* var. *cearensis*, *C. catenaeformis* e *S. polyphylla* tiveram efeito significativo na diminuição da esporulação dos fungos testados, sendo que para *Sclerotium rolfsii* apenas o extrato de *C. ferrea* var. *cearensis* e *C. catenaeformis* tiveram efeito significativo na diminuição da esporulação. Já na diminuição do crescimento micelial das colônias, os três extratos tiveram efeito sobre *F. oxysporum*, enquanto que o efeito sobre *C. guaranicola* foi ocasionado apenas pelo extrato de *S. polyphylla*, em *C. cassiicola* apenas pelo extrato de *C. ferrea* var. *cearensis* e *C. catenaeformis* e em *S. rolfsii* pelos extratos de *C. ferrea* var. *cearensis* e *S. polyphylla*. Portanto, conclui-se que somente *C. ferrea* var. *cearensis* e *S. polyphylla* apresentaram inibidores específicos para tripsina bovina, enquanto que *C. catenaeformis* e *P. venosa* podem apresentar lectinas em suas sementes. Isto evidencia que as subfamílias Caesalpinioideae, Papilionoideae e Mimosoideae podem diferir quanto à presença e especificidade dos inibidores de proteinases e lectinas. Os bioensaios *in vitro* revelaram que nem todos os extratos tiveram efeito na diminuição do crescimento micelial e na esporulação das colônias de *C. guaranicola*, *C. cassiicola*, *F. oxysporum* e *S. rolfsii*.

ABSTRACT

Seeds of leguminous have a high concentration of proteins, including proteinases inhibitors and lectins. Such proteins are involved in several metabolic processes in plants comprising the mechanism of defense against phytopathogenous fungi. The aim of this work was to detect the presence of these two classes of proteins in seeds of four tree species of Amazonian leguminous (*Caesalpinia ferrea* var. *cearensis*, *Cedrelinga catenaeformis*, *Swartzia polyphylla* and *Peltogyne venosa*), as well as to characterize the effect of crude extracts in the mycelial growth and the sporulation of *Colletotrichum guaranicola*, *Corynespora cassiicola*, *Fusarium oxysporum* and *Sclerotium rolfsii*. Crude extracts of the seeds were used in detection, partial purification and characterization of trypsin inhibitors and AHE and in assays *in vitro* of phytopathogenous fungi. The inhibitors partially purified were designated CfTI and SpTI of *C. ferrea* var. *cearensis* and *S. polyphylla*, respectively. *C. catenaeformis* fractions with AHE were designated CeCL and those of *P. venosa* of PeVL. In the presence of 3,8 µg of CfTI and 12 µg of SpTI, the activity of the enzyme was reduced in approximately 99 % and 62 %, respectively. Fractions with AHE of CeCL were inhibited by glucose, lactose, sucrose, manose, maltose, D-galactosamine, α-methyl-mannopyranosil and in contact with fractions of PeVL, there was also inhibition of sugars maltose and N-acetil-galactosamine. When it was added EDTA in concentrations of 3,1 mM and 50 mM, there was not inhibition AHE of CeCL and PeVL, however, when it processed the serial dilution of EDTA an inhibition of AHE was detected. The protein content of the extracts was of approximately 52, 48, 269 and 82 µg.mL⁻¹ for extracts of *C. ferrea* var. *cearensis*, *C. catenaeformis*, *S. polyphylla* and *P. venosa*, respectively. The electrophoretic profile revealed a single band in CfTI, eight bands in SpTI and three bands in PeVL. Proteins bands of CeCL were little evident. The presence of DTT did not modify the pattern of migration of proteins in the gel. Whereas in bio assays crude extracts of *C. ferrea* var. *cearensis*, *C. catenaeformis* and *S. polyphylla* had a significant effect in decreasing the sporulation of the tested fungi, and for *S. rolfsii* just *C. ferrea* var. *cearensis* and *C. catenaeformis* had a significant effect. But decreasing the micelial growth, the three extracts had an effect on *F. oxysporum*, while the effect on *C. guaranicola* was just caused by the extract of *S. polyphylla*, in *C. cassiicola* it was the extract of *C. ferrea* var. *cearensis* and *C. catenaeformis* and in *S. rolfsii* the extract of *C. ferrea* var. *cearensis* and *S. polyphylla*. Therefore it is concluded that only *C. ferrea* var. *cearensis* and *S. polyphylla* have specific inhibitors for bovine trypsin, while *C. catenaeformis* and *P. venosa* can present lectins in their seeds. This evidences that the subfamilies Caesalpinioideae, Papilionoideae and Mimosoideae can differ in the presence and specificity of the proteinases inhibitors and lectins. The *in vitro* bio assays revealed that nor all of these extracts reduced the micelial growth and the sporulation of *C. guaranicola*, *C. cassiicola*, *F. oxysporum* and *S. rolfsii*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Famílias de enzimas proteolíticas.....	14
Tabela 2 – Características gerais de inibidores tipo Bowman-Birk e Kunitz.....	18
Tabela 3 – Relação de trabalhos realizados com inibidores de proteinases e lectinas vegetais apresentando atividade antifúngica.	29
Tabela 4 – Atividade residual da tripsina bovina na presença de extratos totais de sementes de leguminosas.....	44
Tabela 5 – Estudos realizados com inibidores de proteinases presentes em espécies da família Leguminosae.....	47
Tabela 6 – AHE dos extratos totais de <i>C. catenaeformis</i> e <i>P. venosa</i> , sobre diferentes hemácias de animais.....	50
Tabela 7 – Efeito dos açúcares sobre a AHE induzida por CeCL e PeVL.....	55
Tabela 8 – Efeito no EDTA na AHE em CeCL e PeVL utilizando hemácias de rato branco	56
Tabela 9 – Quantificação do teor de proteínas totais nos extratos e nas frações das espécies.....	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – <i>C. ferrea</i> . a) ramo com folhas folhas compostas e flores (www.google.com); b) indivíduo adulto (www.google.com) e c) sementes de <i>C. ferrea</i> var. <i>cearensis</i> (foto: Bariani, A.).....	8
Figura 2 - <i>Cedrelinga catenaeformis</i> . a) ramo com folhas (www.mobot.org); b) árvore (foto: Bariani, A.) e c) sementes (foto: Bariani, A.).....	9
Figura 3 - <i>Peltogyne venosa</i> . a) ramo com folhas e flores (www.mobot.org); b) tronco (www.bio.ub.br) e C) sementes (foto: Bariani, A.).....	10
Figura 4 - <i>Swartzia polyphylla</i> . a) tronco; b) indivíduo adulto e c) sementes. FOTO: Bariani, A.....	11
Figura 5 – Representação esquemática de duas unidades de aminoácidos ligadas entre si por uma ligação peptídica.	12
Figura 6 – Classificação das proteínas quanto ao grau de solubilidade (Osborne, 1924).	12
Figura 7 – Representação esquemática de um dipeptídeo e a liberação dos mesmos após clivagem proteolítica	13
Figura 8 – Mecanismo cinético das serinoproteinases. Fonte: Radisky & Koshland Jr. (2002); Pando (2003)	15
Figura 9 – Mecanismos de inibição de proteinases e interação entre um inibidor de serinoproteinase com sua enzima-alvo, evidenciando a especificidade entre os sítios ativo e reativo (Bode & Huber, 2000).	17
Figura 10 - Representação esquemática do processo de hemaglutinação causado por lectinas (Kennedy <i>et al.</i> , 1995).....	24
Figura 11 – Esquema de uma molécula de lectina, evidenciando sua estrutura e a ligação entre alguns resíduos de aminoácidos da lectina com a porção carboidrato de uma glicoproteína de superfície celular.....	26
Figura 12 - Fluxograma do método para a realização dos bioensaios	42
Figura 13 – Fluxograma do monitoramento dos bioensaios durante a coleta dos dados de crescimento micelial e contagem dos esporos.....	42
Figura 14 – Cromatografia em coluna de Sephadex G-100 (62,5 x 1,5 cm),	

equilibrada com tampão Tris/HCl 0,05M contendo NaCl 0,15M, pH 8,0. Amostra: 200 mg de extrato de <i>C. ferrea</i> var. <i>cearensis</i> . Fluxo de eluição: 0,3mL/min. Frações de 3mL foram coletadas e monitoradas a 280 nm. “●” círculo cheio indica atividade inibitória nos eluatos coletados.	45
Figura 15 – Cromatografia em coluna de Sephadex G-100 (62,5 x 1,5 cm), equilibrada com tampão Tris/HCl 0,05M contendo NaCl 0,15M, pH 8,0. Amostra: 200mg de extrato de <i>S. polyphylla</i> . Fluxo de eluição: 0,3mL/min. Frações de 3mL foram coletadas e monitoradas a 280 nm. “●” círculo cheio indica atividade inibitória nos eluatos coletados.	45
Figura 16 – Curva de inibição da tripsina bovina por CfTI. A atividade inibitória do sítio ativo da tripsina bovina foi determinada pelo ensaio de incubação com DL-BAPNA, na presença de diferentes concentrações do inibidor.....	48
Figura 17 – Curva de inibição da tripsina bovina por SpTI. A atividade inibitória do sítio ativo da tripsina bovina foi determinada pelo ensaio de incubação com DL-BAPNA, na presença de diferentes concentrações do inibidor.....	48
Figura 18 – Ensaio de detecção da AHE nos extratos totais. Legenda: A – controle negativo (hemácias de camundongo); B – controle negativo (hemácias de hamster); C – controle negativo (hemácias de rato branco); D - extrato total de <i>C. catenaeformis</i> + hemácias de camundongo; E - extrato total de <i>C. catenaeformis</i> + hemácias de hamster; F – extrato total de <i>C. catenaeformis</i> + hemácias de rato branco; G - extrato total de <i>P. venosa</i> + hemácias de camundongo; H - extrato total de <i>P. venosa</i> + hemácias de hamster e I - extrato total de <i>P. venosa</i> + hemácias de rato branco.	51
Figura 19 – Cromatografia em coluna de Sephadex G-100 (62,5 x 1,5 cm) equilibrada com tampão Tris/HCl 0,05M contendo NaCl 0,15M, pH 8,0. Amostra: 220mg de extrato liofilizado de <i>C. catenaeformis</i> . Fluxo de eluição: 0,3mL/minuto. Frações de 3mL foram coletadas e monitoradas a 280 nm. “▲” triângulo cheio indica AHE dos eluatos coletados.	53
Figura 20 – Cromatografia em coluna de Sephadex G-100 (62,5 x 1,5 cm) equilibrada com tampão Tris/HCl 0,05M contendo NaCl 0,15M, pH 8,0. Amostra: 220mg de extrato liofilizado de <i>P. venosa</i> . Fluxo de eluição: 0,3mL/minuto. Frações de 3mL foram coletadas e monitoradas a 280 nm. “▲” triângulo cheio indica AHE dos eluatos coletados.	53

Figura 21 - Eletroforese em SDS-PAGE (12,5%). Cf: 30 µg de extrato total de <i>C. ferrea</i> var. <i>cearensis</i> ; Sp: 30 µg de extrato total de <i>S. polyphylla</i> ; Cc: 30 µg de extrato total de <i>C. catenaeformis</i> e Pv: 30 µg de extrato total de <i>P. venosa</i> . M: marcadores de massa molecular: BenchMark Protein Ladder (220 kDa – 10 kDa). kDa: kilodalton. As bandas de proteínas foram coradas com Coomassie brilliant blue R-250.	58
Figura 22 - Eletroforese em SDS-PAGE (12,5 %). CfTI e SpTI: 30 µg de frações com atividade inibitória; CeCL e PeVL: 30µg de frações com AHE. M: marcadores de massa molecular: BenchMark Protein Ladder (220 kDa – 10 kDa). kDa: kilodalton. As bandas de proteínas foram coradas com Coomassie brilliant blue R-250.	59
Figura 23 - Efeito dos extratos de <i>C. ferrea</i> var. <i>cearensis</i> , <i>C. catenaeformis</i> e <i>S. polyphylla</i> sobre o crescimento micelial de <i>C. guaranicola</i> . “0” Controle representado pelo crescimento fúngico em meio batata-dextrose-ágar sólido. As barras representam os desvios padrão (± 1). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % (n=30)..	61
Figura 24 - Efeito dos extratos de <i>C. ferrea</i> var. <i>cearensis</i> , <i>C. catenaeformis</i> e <i>S. polyphylla</i> sobre a esporulação de colônias de <i>C. guaranicola</i> . “0” Controle representado pelo crescimento fúngico em meio batata-dextrose-ágar sólido. As barras representam os desvios padrão (± 1). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % (n=30).....	62
Figura 25 - Efeito dos extratos de <i>C. ferrea</i> var. <i>cearensis</i> , <i>C. catenaeformis</i> e <i>S. polyphylla</i> sobre o crescimento micelial de colônias de <i>C. cassicola</i> . “0” Controle representado pelo crescimento fúngico em meio batata-dextrose-ágar sólido. As barras representam os desvios padrão (± 1). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % (n=30).....	65
Figura 26 - Efeito dos extratos de <i>C. ferrea</i> var. <i>cearensis</i> , <i>C. catenaeformis</i> e <i>S. polyphylla</i> sobre a esporulação de colônias de <i>C. cassicola</i> . “0” Controle representado pelo crescimento fúngico em meio batata-dextrose-ágar sólido. As barras representam os desvios padrão (± 1). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 %; (n=30)	66
Figura 27 - Efeito dos extratos de <i>C. ferrea</i> var. <i>cearensis</i> , <i>C. catenaeformis</i> e <i>S. polyphylla</i> sobre o crescimento micelial de colônias de <i>F. oxysporum</i> . “0” Controle	

representado pelo crescimento fúngico em meio batata-dextrose-ágar sólido. As barras representam os desvios padrão (± 1). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % (n=30)..... 68

Figura 28 - Efeito dos extratos de *C. ferrea* var. *cearensis*, *C. catenaeformis* e *S. polyphylla* sobre a esporulação de colônias de *F. oxysporum*. “0” Controle representado pelo crescimento fúngico em meio batata-dextrose-ágar sólido. As barras representam os desvios padrão (± 1). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % (n=30)..... 69

Figura 29 - Efeito dos extratos de *C. ferrea* var. *cearensis*, *C. catenaeformis* e *S. polyphylla* sobre o crescimento micelial de colônias de *S.rolfissi*. “0” Controle representado pelo crescimento fúngico em meio batata-dextrose-ágar sólido. As barras representam os desvios padrão (± 1). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % (n=30)..... 71

Figura 30 - Efeito dos extratos de *C. ferrea* var. *cearensis*, *C. catenaeformis* e *S. polyphylla* sobre a esporulação de colônias de *S.rolfissi*. “0” Controle representado pelo crescimento fúngico em meio batata-dextrose-ágar sólido. As barras representam os desvios padrão (± 1). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % (n=30)..... 72

LISTA DE ABREVIATURAS

- AHE: atividade hemaglutinante;
- BDA: meio de cultura composto por batata, dextrose e ágar;
- BIS: N, N' - metileno bis acrilamida;
- CeCL: frações com atividade hemaglutinante de *Cedrelinga catenaeformis*;
- CfTI: inibidor de tripsina de *Caesalpinia ferrea* var. *cearensis*;
- DEAE: dietil-aminoetil;
- DL-BAPNA: Benzoyl DL-Arginina p-Nitroanilida;
- DTT: ditioneitol;
- EDTA: Ácido etilenodiamino tetracético;
- kDa: kiloDalton;
- M: molar;
- nm: nanômetro;
- p/v: peso/volume;
- PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida;
- PeVL: frações com atividade hemaglutinante de *Peltogyne venosa*;
- SDS: sódio dodecil sulfato;
- SpTI: inibidor de tripsina de *Swartzia polyphylla*;
- TEMED: N-N'-N'-N'-tetrametilenodiamina;
- Tris: hidroximetil-aminometano;
- v/v: volume/volume;

ABREVIÇÃO PARA AMINOÁCIDOS

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

Nomenclatura IUPAC; Voet *et al.*, 2000.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
3. REFERENCIAL TEÓRICO	5
3.1. Família Leguminosae	5
3.1.1. Subfamília Caesalpinioideae.....	5
3.1.2. Subfamília Mimosoideae	6
3.1.3. Subfamília Papilionoideae.....	7
3.1.4. Caracterização das espécies vegetais	7
<i>Caesalpinia ferrea</i> var. <i>cearensis</i> (jucá; pau-ferro) - Leguminosae: Caesalpinioideae.....	7
<i>Cedrelinga catenaeformis</i> (cedrorana) - Leguminosae: Mimosoideae	8
<i>Peltogyne venosa</i> (pau-roxo, pau-violeta) - Leguminosae: Caesalpinioideae	9
<i>Swartzia polyphylla</i> (paracutaca; arabá) - Leguminosae: Papilionoideae	10
3.2. Proteínas.....	11
3.3. Enzimas Proteolíticas.....	13
3.4. Inibidores de proteinases de plantas.....	16
3.5. Lectinas extraídas de plantas.....	22
3.6. Interação de inibidores de proteinases e lectinas com fitopatógenos.....	28
3.7. Aspectos gerais dos fungos	30
3.8. Biologia dos fungos	31
<i>Colletotrichum guaranicola</i>	31
<i>Corynespora cassiicola</i>	31
<i>Sclerotium rolfsii</i>	32
<i>Fusarium oxysporum</i>	33
4. MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1. Material Vegetal	35
4.2. Coleta de Dados	36
Isolamento e purificação de inibidores de tripsina e frações com AHE de sementes de leguminosas da flora amazônica	36
Caracterização da atividade dos inibidores de tripsina	37

Caracterização da atividade das frações com AHE	37
Dosagem de proteína.....	39
Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE.....	39
Análise do efeito inibitório <i>in vitro</i> dos extratos totais contra os fungos fitopatogênicos	40
4.3. Delineamento experimental e análise estatística	43
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1. Inibidores de tripsina	44
Detecção de inibidor de tripsina nos extratos totais.....	44
Purificação parcial de inibidores.....	44
Curva de Inibição	48
5.2. Lectinas.....	50
Detecção de AHE nos extratos totais.....	50
Purificação parcial de frações com AHE	52
Inibição da AHE de CeCL e PeVL.....	54
Efeito de EDTA na AHE de CeCL e PeVL	56
5.3. Dosagem de proteínas.....	57
5.4. Eletroforese em SDS – PAGE.....	58
5.5. Análise do efeito inibitório <i>in vitro</i> dos extratos totais contra fungos fitopatogênicos	61
Efeito dos extratos sobre o crescimento micelial e a esporulação de <i>Colletotrichum guaranicola</i>	61
Efeito dos extratos sobre o crescimento micelial e a esporulação de <i>Corynespora cassicola</i>	65
Efeito dos extratos sobre o crescimento micelial e a esporulação de <i>Fusarium oxysporum</i>	68
Efeito dos extratos sobre o crescimento micelial e a esporulação de <i>Sclerotium rolfsii</i>	71
6. CONCLUSÃO	74
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
ANEXOS.....	96

1. INTRODUÇÃO

A floresta amazônica tropical brasileira apresenta uma extensão de 3,6 milhões de Km² e abriga cerca de 2500 espécies de árvores existentes no planeta e 30 mil das espécies de plantas ocorrentes na América Latina (Ladeira, 2002), destacando-se como a maior reserva florestal contínua do mundo e por riquezas, como jazidas minerais, óleos e diversidade faunística e florística (Higuchi & Higuchi, 2004).

Essa diversidade vegetal destaca-se no cenário nacional e internacional, pelo seu valor econômico comprovado, como a seringueira (*Hevea brasiliensis*) por fornecer o látex para a produção da borracha e as demais espécies, como o açaí (*Euterpe oleracea* Mart.), a castanha-do-pará (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.), o cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (Willdenow ex Sprengel) Schumann), a copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne), a andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.), a cedrorana (*Cedrelinga catenaeformis* Ducke), o arabá (*Swartzia polyphylla* DC.), o pau-roxo (*Peltogyne venosa* (Vahl) Benth) e o jucá (*Caesalpinia ferrea* Mart. var. *cearensis*), por fornecerem produtos como frutos, sementes e/ou resina, que são utilizados na indústria alimentícia, farmacêutica e de cosméticos, além de madeira para a fabricação de móveis (Ribeiro *et al.*, 1999; Clay *et al.*, 2000).

Independente de todas estas potencialidades, o crescimento da industrialização e da grande demanda por matéria-prima de origem amazônica, para suprir os mercados consumidores mundiais tem levado a sérios impactos ambientais, em consequência de pressões como a explosão demográfica, o avanço da fronteira agrícola e da exploração desordenada, bem como danos aos ecossistemas, tais como extinção da fauna e flora, invasão de espécies exóticas, fragmentação e mudanças climáticas (Pereira, 1998; Mota, 2000; Fearnside, 2003; Dornelas & Rodriguez, 2005).

Esses impactos ocorreram, em grande parte, devido à maioria das espécies da Amazônia ter na madeira o seu principal produto. Porém, espécies como as leguminosas arbóreas, apresentam alto potencial bioeconômico, podendo ser utilizada em plantios de recuperação de áreas degradadas, fornecer germoplasma, fixar nitrogênio em sistemas agroflorestais, e ainda podem ser aproveitadas para

produção de óleo-resina, de fármacos, de fitoterápicos, no processo de fixação de nitrogênio, ornamentos e como fonte de produtos protéicos naturais com potencial biotecnológico (Souza & Silva, 2002a; Gonçalves *et al.*, 2002).

Esta diversidade pode ser associada a metodologias biotecnológicas que viabilizem a prospecção de moléculas vegetais presentes em diferentes partes da planta como folhas, raízes e sementes, podendo exibir elevado potencial de aplicação industrial e representando a alternativa adequada para o uso e a preservação do ambiente florestal, uma vez que reservas estocadas (lipídeos, carboidratos e proteínas) poderão ser utilizadas como princípios ativos na criação de novos produtos para a agroindústria (Gonçalves, *et al.*, 2002).

No caso das proteínas, estas podem atuar tanto no mecanismo de defesa das plantas quanto nos sinais de respostas às condições ambientais. O conteúdo protéico das sementes de leguminosas compreende um percentual elevado de inibidores de proteinases e lectinas (Richardson, 1991) e, apesar do interesse crescente no que concerne às investigações sobre os aspectos estruturais e funcionais dessas proteínas (Tan & Stevens, 1971; Odani & Ikenaka, 1972; Birk & Applebaum, 1985; Sa *et al.*, 2003; Heinrich *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006) ainda há poucas informações sobre sua ocorrência em espécies da flora amazônica.

Adicionalmente, os inibidores de proteinases e as lectinas são metabolicamente importantes em decorrência de suas principais funções na planta: podem atuar de maneira constitutiva ou induzida, no mecanismo de defesa contra o ataque de insetos e patógenos, como fonte de aminoácidos sulfurados, na regulação de proteinases endógenas e como sinais de respostas às condições ambientais (Freire *et al.*, 2002; Macedo *et al.*, 2002; Carlini & Grossi-de-Sá, 2002).

Considerando a importância dessas proteínas para o mecanismo de defesa da planta e que insetos, fungos e nematóides podem resultar em 37% de perda da produção agrícola mundial, convém ressaltar que existem vários estudos sobre a descrição de técnicas que atuem como mecanismo de defesa natural para o manejo integrado de pragas, incluindo o isolamento de compostos naturais (inibidores de proteases e lectinas) e a produção de plantas transgênicas resistentes, minimizando as perdas e o uso indiscriminado de agrotóxicos (Herrera-Estrella, 1999; Paes *et al.*, 2002; Haq *et al.*, 2004; Tremacoldi & Pascholatti, 2004; Ledoigt *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2006; Chumkhunthod *et al.*, 2006; Ngai *et al.*, 2007; Liao *et al.*, 2007).

Neste contexto, este estudo objetivou a detecção, purificação e caracterização

parcial de inibidores de tripsina e de frações com atividade hemaglutinante (AHE) contidas nos tecidos de estocagem de sementes de leguminosas arbóreas da Amazônia, bem como a caracterização do efeito antifúngico dos extratos totais destas sementes, contribuindo com a possibilidade de obtenção de fungicidas naturais e agregando valor econômico à espécies da flora amazônica.

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Caracterizar as propriedades bioquímicas e biológicas de inibidores de tripsina e frações com atividade hemaglutinante em extratos de sementes de leguminosas arbóreas da Amazônia.

Objetivos Específicos

- Detectar a presença de inibidores de tripsina e de AHE em extratos totais de sementes de leguminosas arbóreas;
- Purificar e caracterizar parcialmente os inibidores de tripsina e as frações com AHE;
- Determinar o teor de proteína total e monitorar o perfil protéico dos extratos totais, dos inibidores de tripsina e das frações com AHE;
- Caracterizar o efeito antifúngico dos extratos das sementes de *C. ferrea* var. *cearensis*, *C. catenaeformis* e *S. polyphylla* sobre algumas espécies de fungos fitopatogênicos.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Família Leguminosae

A família Leguminosae representa uma das famílias botânicas de maior importância econômica por apresentar ampla variedade de fontes de alimentos e também por suas espécies serem utilizadas como plantas forrageiras e na produção de madeira em regiões temperadas e tropicais. Estruturalmente seus frutos e sementes aladas se distribuem por toda a zona Neotropical, este fato pode ser confirmado pelos inúmeros fósseis encontrados nos depósitos do Cretáceo e do Terciário (Heywood, 1971; Veloso *et al.*, 1991).

A família Leguminosae apresenta ampla distribuição bio-geográfica, estima-se que em todo o mundo existam cerca de 650 gêneros e até 18000 espécies, as quais são taxonomicamente, subdivididas nas sub-famílias: Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae. Considerando a seqüência geológica das leguminosas, as árvores tropicais de grande porte evoluíram para árvores pequenas, arbustos e cipós, e estes para ervas perenes e anuais. Nos Neotrópicos, um dos centros de distribuição da família é a floresta amazônica. Nos diferentes ecossistemas amazônicos, as leguminosas compõem importante parte da flora na paisagem das matas ribeirinhas, dos igapós, savanas, campinaranas, matas secundárias, cerrados e várzeas, predominando na mata primária de terra firme (Souza *et al.*, 1997; Souza & Lorenzi, 2005).

3.1.1. Subfamília Caesalpinioideae

Compreende cerca de 180 gêneros, 2500 a 3000 espécies, principalmente árvores e arbustos, tropicais e subtropicais, com distribuição cosmopolita. A maioria dos gêneros encontra-se nos trópicos, na África, América e Sudeste da Ásia. A subfamília está bem representada no Brasil, pois na Reserva Florestal Adolpho Ducke, localizada ao norte de Manaus (AM), no Km 27 da rodovia AM 010, são encontrados os representantes de 16 gêneros e aproximadamente 53 espécies

entre árvores, arbustos e lianas. A polinização é feita principalmente por insetos, morcegos e beija-flores (Ribeiro *et al.*, 1999).

Apresentam folhas bipinadas, paripinadas ou bifolioladas, flores diclamídeas ou raramente monoclamídeas, corola com prefloração imbricada ascendente ou carenal (as carenas sobrepõem as alas que sobrepõem o vexilo), dialipétala, estames geralmente em número duplo ao das pétalas, raramente em menor número, geralmente livres entre si e não vistosos; semente com pleurograma (Souza & Lorenzi, 2005).

3.1.2. Subfamília Mimosoideae

Possui mais ou menos 60 gêneros e 3000 espécies em 5 tribos, apresentando distribuição principalmente pantropical e subtropical, com a maior diversidade nos gêneros *Acacia*, *Mimosa* e *Inga*. Na Reserva Ducke ocorrem representantes de 4 tribos, com 16 gêneros e 66 espécies, sendo o gênero *Inga* o maior, com 32 espécies, incluindo árvores, ervas, lianas e arbustos (Ribeiro *et al.*, 1999).

Apresentam folhas geralmente bipinadas; flores actinomorfas, diclamídeas, corola com prefloração valvar, frequentemente gamopétala, estames em número igual ou duplo ao das pétalas, numerosos e vistosos; sementes com pleurograma (Souza & Lorenzi, 2005). As flores são geralmente pequenas e sempre agrupadas em inflorescência relativamente compactas, com o número variando de poucas flores em algumas espécies de *Inga* até mais de 2000 em algumas espécies de *Parkia*. Os frutos são vagens, deiscentes ou não, mas sempre com sementes numerosas. Na maioria dos gêneros, a testa da semente é muito dura e pode permanecer viável por anos, sendo que quase todas as espécies possuem glândulas extraflorais, que produzem uma secreção rica em açúcar, utilizada por formigas como fonte de energia. A presença de formigas nas folhas protege a planta contra o ataque de herbívoros (Ribeiro *et al.*, 1999).

3.1.3. Subfamília Papilionoideae

É a maior das três subfamílias de Leguminosae, com aproximadamente 500 gêneros e mais de 10000 espécies divididas em 31 tribos. Apresenta distribuição bastante ampla, nas zonas tropicais, subtropicais, estendendo-se às regiões temperadas, mas sua maior diversidade encontra-se nos trópicos americanos e africanos. É constituída por representantes de diversos tipos de hábitos, incluindo ervas, lianas e árvores. Na Reserva Ducke ocorrem 68 espécies, sendo que a maior representação é no gênero *Swartzia*. A polinização é feita por beija-flores, morcegos e insetos e, principalmente, por abelhas (Ribeiro *et al.*, 1999).

As folhas são imparipinadas, trifolioladas ou unifolioladas; flores diclamídeas, corola com prefloração imbricada descendente ou vexilar; sementes com pleurograma, mas com hilo bem desenvolvido (Souza & Lorenzi, 2005). O fruto é uma vagem, com uma até muitas sementes dentro; pode ser deiscente ou não, segmentado entre as sementes, inteiro ou circular. O fruto pode ser seco ou carnoso. As sementes sempre têm testas duras. O fruto pode ser espesso ou achatado e às vezes pode ser alado, dependendo do tipo de dispersão. As sementes e frutos de muitos gêneros dessa subfamília são ricos em proteínas, vitaminas, carboidratos e minerais, constituindo importante fonte de alimento. Na Amazônia a subfamília apresenta potencial econômico, pelo fato das plantas serem nutritivas e a madeira de algumas espécies ser utilizada na construção civil, marcenaria, carpintaria e até mesmo na fabricação de instrumentos musicais (Ribeiro *et al.*, 1999).

3.1.4. Caracterização das espécies vegetais

Caesalpinia ferrea Mart. var. *cearensis* (jucá) - Leguminosae: Caesalpinioideae

O jucá é uma árvore pequena ou mediana, que pode atingir até 10 m de altura. Os frutos são vagens de formato irregular, com 7 cm de comprimento por 1,8 cm de largura e espessura de 1 mm. O pericarpo é duro, indeiscente e de cor castanho-avermelhada. As sementes são duras, lisas e não possuem arilo. A floração ocorre entre novembro e abril. É uma espécie nativa da Amazônia, mas tem

ampla distribuição, ocorrendo desde o Ceará até a Bahia. A madeira tem cerne duro, difícil de ser dobrada, porém possui boas propriedades elásticas. A casca em infusão é usada para combater tosse e asma e a folhagem fornece bom alimento para o gado (Prance & Silva, 1975).



Figura 1 - *C. ferrea*. a) ramo com folhas compostas e flores (www.google.com); b) indivíduo adulto (www.google.com) e c) sementes de *Caesalpinia ferrea* var. *carensis* (foto: Bariani, A.).

Cedrelinga catenaeformis (cedrorana) - Leguminosae: Mimosoideae

O gênero *Cedrelinga* é monotípico, tendo a espécie *C. catenaeformis* Ducke como tipo genérico. Esse gênero é restrito à região neotropical e tem a Amazônia como seu centro de distribuição natural (Silva *et al.*, 1992).

A espécie *C. catenaeformis* (cedrorana) apresenta hábito arbóreo emergente, casca grossa e rugosa, tronco circular e base reta, inflorescência terminal ou subterminal, fruto indeiscente com dispersão anemocórica. Apresenta madeira moderadamente pesada (0,60 a 0,70 g/cm³). É uma espécie rara, ocorrendo naturalmente em matas altas de terra firme, de forma mais comum nas nascentes e nos cursos superiores de rios e margens baixas de igarapés em terreno argiloso. Sua distribuição abrange Peru, Colômbia, Amazonas e Pará (Loureiro *et al.*, 1977; Corrêa, 1984; Ribeiro *et al.*, 1999; Clay *et al.*, 2000).

A madeira de cedrorana pode ser utilizada na construção leve (assoalhos, paredes, etc.), marcenaria, carpintaria, construção civil e naval, celulose, papel e movelaria (Loureiro *et al.*, 1977; Ribeiro *et al.*, 1999). Além disso, essa espécie está incluída no grupo das leguminosas fixadoras de N₂ (nitrogênio), podendo ser

recomendada para plantios visando a restauração ecológica ou em sistemas agroflorestais por apresentar bom crescimento em altura, diâmetro e alta percentagem de sobrevivência em plena abertura e sob sombra (Silva *et al.*, 1992; Ribeiro *et al.*, 1999; Clay *et al.*, 2000).

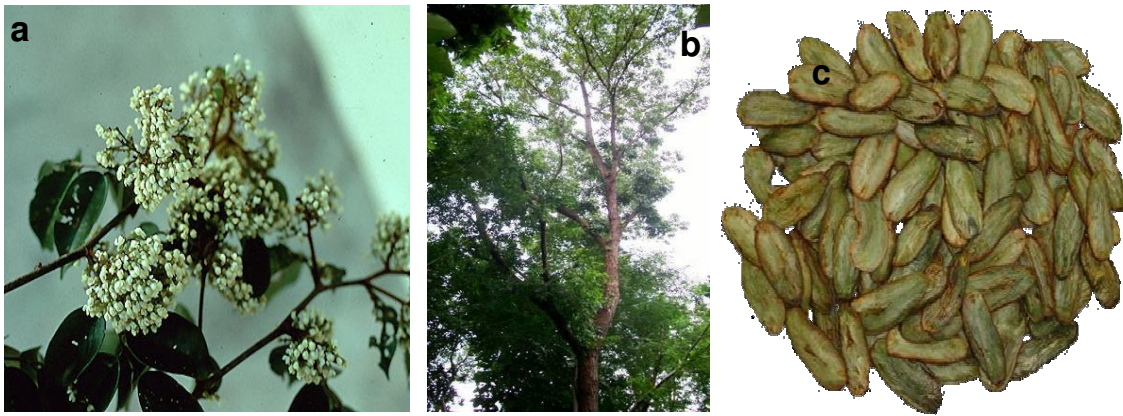


Figura 2 - *Cedrelinga catenaeformis*. a) ramo com folhas e flores (www.mobot.org); b) árvore (foto: Bariani, A.) e c) sementes (foto: Bariani, A.).

Peltogyne venosa (pau-roxo, pau-violeta) - Leguminosae: Caesalpinioideae

Este gênero apresenta 23 espécies, folhas com dois folíolos de textura levemente reticulados e intrincada, flores pequenas de coloração branca, frutos pequenos (de 3 cm ou menos), sementes de formato triangular e margem dorsal levemente estreita e muito expandida quando madura (Gentry, 1993).

O gênero ocupa importante lugar entre as espécies arbóreas amazônicas, devido ao grande número de espécies e de indivíduos que atingem diferentes portes, com madeira de boa qualidade. Apresentam, após o corte, madeira de coloração roxa ou violácea. Várias espécies já foram utilizadas em estudos fitoquímicos, sendo até isolada do cerne de *Peltogyne recifensis* uma substância cristalizada, com propriedades antimicrobianas. Distribui-se desde o México ao longo da América Central, no Panamá, até a região Sudeste da América do Sul. A Amazônia Central evidencia-se como o seu centro de distribuição geográfica. Do ponto de vista fitogeográfico, as espécies do gênero *Peltogyne* ocorrem nos mais diferentes tipos de habitats e do ponto de vista sistemático, este gênero foi descrito por Vogel, Bentham, e Ducke, sendo que este último limitou-se apenas as espécies

amazônicas (Silva, 1975).

A espécie *P. venosa* apresenta como sinonímia *Hymenea venosa*, árvore de dossel com tronco cilíndrico, pouco tortuoso e de base reta; ritidoma castanho e lenticelado; casca viva externa púrpura e a mais interna vermelho-claro. A oxidação ocorre rapidamente, deixando o alborno laranja. As folhas possuem pilosidade hispida (Ribeiro *et al.*, 1999).

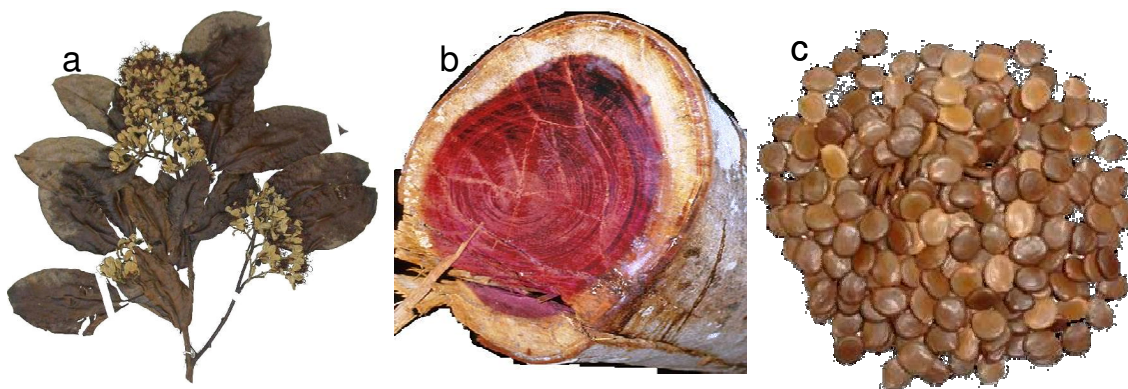


Figura 3 - *Peltogyne venosa*. a) ramo com folhas e flores (www.mobot.org); b) tronco (www.bio.ub.br) e c) sementes (foto: Bariani, A).

Swartzia polyphylla (paracutaca; arabá) - Leguminosae: Papilionoideae

O gênero *Swartzia* Schreber está representado por cerca de 155 espécies, com maior distribuição na América do Sul. Quase todas as espécies ocorrem na América Tropical, tendo a Amazônia como o seu centro de dispersão. A grande maioria possui hábito arbóreo, apresentando poucas espécies arbustivas. Espécies deste gênero apresentam madeira de ótima qualidade e bom aspecto decorativo (Loureiro & Rodrigues, 1975).

S. polyphylla (paracutaca; arabá), pertencente à tribo Swartzieae, possui hábito arbóreo de dossel, copa ampla e meio achatada, tronco característico com sapopemas altas e onduladas e exsudação vermelha, abundante. Os folíolos são também distintos por causa das veias impressas na superfície adaxial. Sua distribuição geográfica abrange da Amazônia Central até Guianas (Ribeiro *et al.*, 1999).

As plantas de *Swartzia* representam fontes de constituintes biológicos ativos com potencial farmacológico e várias substâncias obtidas de frutos, folhas, caule e

sementes, vêm sendo testadas *in vitro* e *in vivo*, especialmente para o controle de fungos, bactérias, insetos e de moluscos causadores de doenças tropicais, evidenciando que o interesse decorrente do emprego industrial destes princípios ativos tem contribuído para o aperfeiçoamento de técnicas, tanto no desenvolvimento de novos bioensaios, como de isolamento e elucidação estrutural de substâncias, visando à otimização e a identificação de novos constituintes (Jesus, 2003).

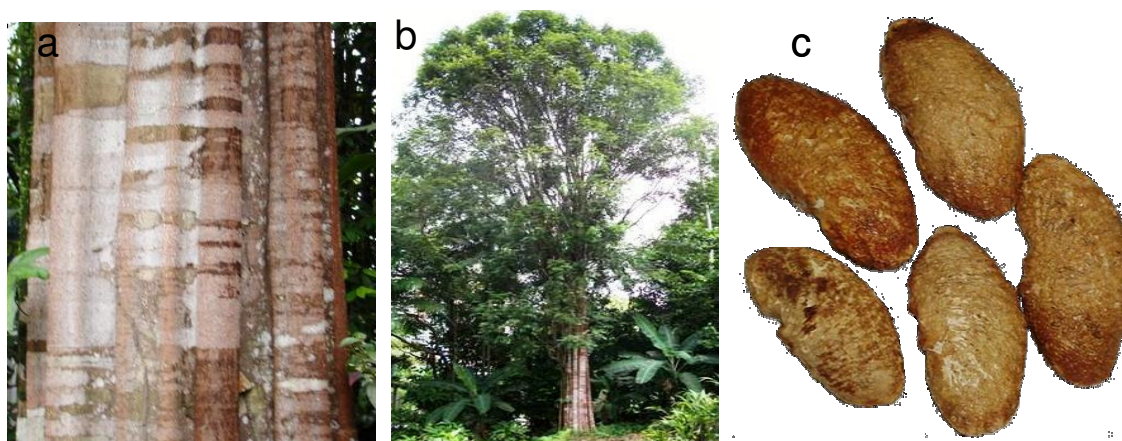


Figura 4 - *Swartzia polyphylla*. A) tronco (foto: Bariani, A.); b) indivíduo adulto (Bariani, A.) e c) sementes (foto: Bariani, A.).

3. 2. Proteínas

As proteínas são os metabólitos primários mais abundantes em todos os seres vivos e desempenham funções essenciais em todos os processos biológicos. Estas biomoléculas são constituídas de aminoácidos, os quais são unidos por ligações peptídicas (figura 5), e diferem quanto à conformação estrutural e funcional, pela composição e seqüência de suas unidades constituintes e/ou outros ligantes não-protéicos como, por exemplo, metais e açúcares (Marcellino, 2002; Berg *et al.*, 2004).

3.3. Enzimas Proteolíticas

As enzimas proteolíticas ou proteinases catalisam a clivagem hidrolítica de ligações peptídicas em outras proteínas (figura 7). O termo proteinase é designado para as enzimas que clivam ligações peptídicas internas em proteínas, com a produção de peptídeos e o termo protease refere-se às enzimas que clivam as ligações nas extremidades, liberando resíduos de aminoácidos C- ou N-terminal de peptídeos ou proteínas (Mikola, 1983; Bode & Huber, 2000; Mosolov & Valueva, 2005). Alguns exemplos dessas proteinases são a tripsina, quimotripsina e pepsina, nos animais e papaína, ficina e bromelaína nos vegetais (White *et al.*, 1986). O papel das enzimas proteolíticas pode ser visto como parte de um processo global de renovação de proteína, visto que essas proteínas adquiriram grau de especialização durante sua evolução biológica, restringindo seu mecanismo de ação sobre ligações peptídicas específicas (Bode & Huber, 2000).

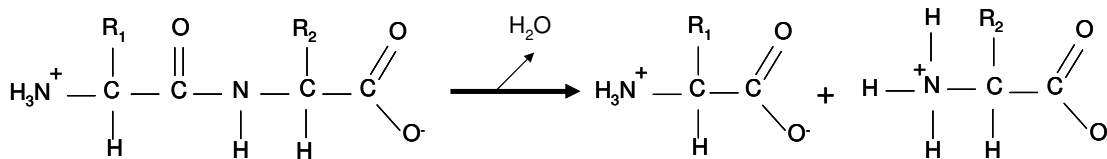


Figura 7 – Representação esquemática de um dipeptídeo e a liberação dos mesmos após clivagem proteolítica (Berg *et al.*, 2004).

Algumas proteinases podem atuar na digestão extra e intracelular de outras proteínas, mas a maioria desempenha outras funções em muitos processos biológicos especializados, tais como a ativação da cascata de zimogênio, liberação de hormônios precursores, liberação de peptídeos fisiologicamente ativos, ativação de receptores ou translocação através de membranas. No processo germinativo de sementes, participam da degradação de proteínas de reserva, fornecendo nitrogênio para as vias de biossíntese, além de atuarem como componentes na interação entre plantas e outros organismos (Bode & Huber, 2000; José, 2002; Lawrence & Koundal, 2002; Balestrazzi *et al.*, 2004).

As enzimas proteolíticas são indispensáveis para os processos fisiológicos em animais, porém se não forem adequadamente controladas, podem representar um

risco em potencial, destruindo componentes protéicos celulares (Neurath, 1984). Existem naturalmente dois mecanismos básicos de regulação para o controle dessas enzimas: a) ativação de precursores de proteinases inativos (zimogênios) por proteólise limitada, que consiste na quebra específica de algumas ligações peptídicas, sendo determinada pela ação da enzima à ligação peptídica alvo na proteína a ser hidrolisada, formando o complexo enzima-substrato (Bode & Huber, 2000) e b) inativação de proteinases pela formação de complexos com inibidores protéicos, com a formação do complexo enzima-inibidor (Laskowski & Cassim, 2000).

As enzimas proteolíticas são classificadas de acordo com o seu mecanismo de catálise e composição de seu sítio ativo, podendo ser divididas em seis grupos principais (tabela 1). Dessa forma, as serinoproteinases, cisteinoproteinases e proteinases aspárticas possuem em seus sítios ativos os aminoácidos serina, cisteína e aspartato, respectivamente. As metaloproteinases, por sua vez, possuem em seu sítio ativo um íon metálico (Zn^{2+} , Ca^{2+} ou Mn^{2+}) (Neurath, 1984; Richardson, 1977; Carlini & Grossi-de-Sá, 2002).

Tabela 1 – Famílias de enzimas proteolíticas.

Família	Proteinases representativas	Componentes característicos dos sítios ativo
Serinoproteinases I	Quimotripsina, tripsina, elastase, calicreínas	Asp (102), Ser (195), His (57)
Serinoproteinases II	Subtilisina, papaína, actinidina	Asp (32), Ser (221), His (64)
Cisteinoproteinases	Catepsinas B e H de fígado de rato	Cys (25), His (159), Asp (158)
Proteinases ácidas	Penicilopepsina, pepsina, <i>Rhisopus chinesis</i> , <i>Endothia parasitica</i> , renina	Asp (33), Asp(213)
Metaloproteinases I	Carboxipeptidase bovina A e B	Zn, Gln (270), Tyr (24)
Metaloproteinases II	Termolisina	Zn, Glu (143), His (23)

* Fonte: Neurath (1993).

Dentre as enzimas proteolíticas, o grupo das serinoproteínases é o mais bem estudado e caracterizado. Estas enzimas são secretadas pelo pâncreas de animais na forma de zimogênios e por modificações proteolíticas são posteriormente ativadas no trato intestinal (Barret, 1986; Neurath, 1989).

Do ponto de vista de atividade, as serinoproteínases clivam proteínas de acordo com o mecanismo cinético mostrado na figura 8 (Radisky & Koshland Jr., 2002).

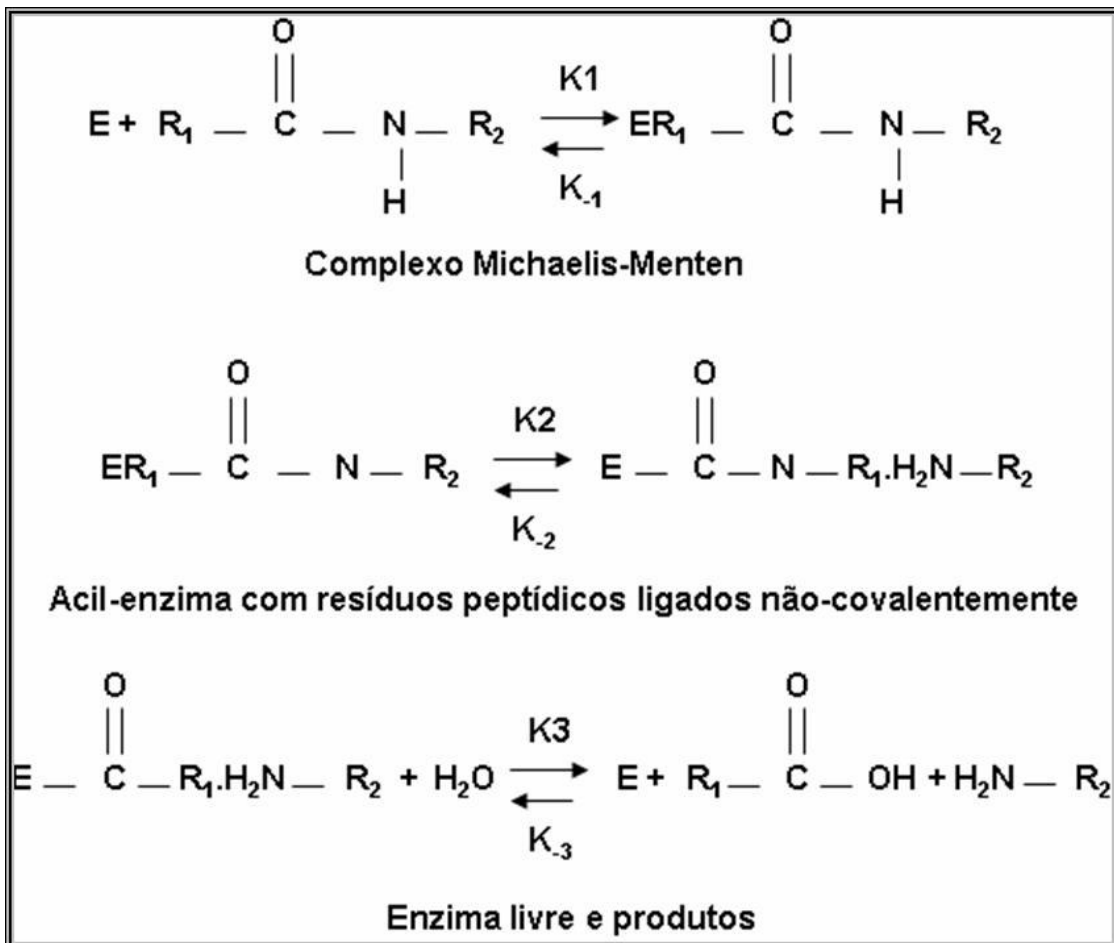


Figura 8 – Mecanismo cinético das serinoproteínases. Fonte: Radisky & Koshland Jr. (2002).

3.4. Inibidores de proteinases de plantas

Os inibidores de proteinases vegetais são peptídeos ou proteínas, cuja massa molecular varia de 8 a 25 kDa, capazes de interagir específica e reversivelmente com diferentes enzimas proteolíticas na razão molar de 1:1 ou 1:2, promovendo a inibição competitiva das mesmas e podendo resultar na redução da digestibilidade protéica. Os inibidores de proteinases são estruturalmente estáveis, resistentes a variações de pH, ao calor e à proteólise por proteinases, sendo que essa estabilidade pode ser atribuída à presença de pontes dissulfeto e a outras interações não covalentes (Belitz & Weder, 1990; Richardson, 1991; Birk, 1994; Udedibie & Carlini, 1998; Datta *et al.*, 2001).

Do ponto de vista da localização, essas proteínas estão presentes nos tecidos reprodutivos e vegetativos, sendo abundantes em sementes e órgãos de reserva e são facilmente encontradas em muitas espécies de plantas, principalmente leguminosas. Além disso, em um único tecido vegetal, podem-se encontrar vários tipos de inibidores, sendo estes específicos para um amplo espectro de proteinases de origem microbiana e animal (Richardson, 1991; Inanaga, *et al.*, 2001).

Apesar de haver diferenças na estrutura primária dos inibidores de proteinases, o mecanismo de ação e a estrutura do sítio de reação destas moléculas são bastante conservados (Pando *et al.*, 2001).

A figura 9 ilustra o mecanismo geral de ação dos inibidores de proteinases. Estas proteínas inibem a ação de proteinases competindo com o substrato pelo sítio ativo da enzima. O sítio reativo consiste em uma região da molécula de inibidor que interage especificamente com o sítio ativo de sua enzima cognata, conferindo aos inibidores uma atividade altamente específica, de forma a possibilitar somente a inibição da proteólise de suas respectivas enzimas-alvo (Mosolov & Valueva, 2005).

Para entender claramente a interação entre inibidores e suas enzimas alvo é de suma importância a determinação das constantes de inibição (Bode & Huber, 1992). Os inibidores ligam-se mais firmemente às suas enzimas-alvo quando comparado com a ligação enzima-substrato específico, visto que a constante de associação pode atingir o valor de 10^{-14} M.

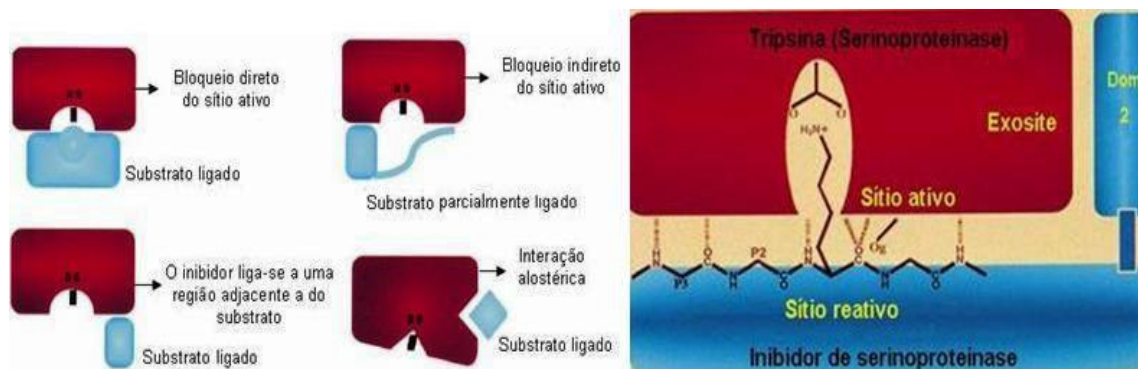


Figura 9 – Mecanismos de inibição de proteinases e interação entre um inibidor de serinoproteinase com sua enzima-alvo, evidenciando a especificidade entre os sítios ativo e reativo (Bode & Huber, 2000).

Classificação dos inibidores de proteinases

Nas plantas, os inibidores vegetais são classificados em famílias por meio de características de homologia na estrutura primária, massa molecular, conteúdo de cisteína e especificidade inibitória, ou seja, esses inibidores são classificados de acordo com a classe de enzimas que inibem, sendo denominados inibidores de serinoproteinases, de metaloproteinases, de cisteinoproteinases e proteinases ácidas ou inibidores multifuncionais, que podem inibir duas ou mais classes distintas de enzimas. Essa especificidade é determinada pelo mecanismo de ação e pela sequência de aminoácidos presentes no sítio catalítico das proteinases alvo (Richardson, 1991; Bode & Huber, 2000). Essas famílias de inibidores são denominadas: Kunitz, Bowman-Birk, batata I, batata II, abóbora, taumatina/PR-proteínas, Ragi I-2; cistatina e superfamília de inibidores de cereal (Richardson, 1991; Frokiaer *et al.*, 1994; Kuroda, *et al.*, 1996; Arai *et al.*, 1998; Haq *et al.*, 2004; Mosolov & Valueva, 2005).

No entanto, de acordo com Rawlings *et al.* (2004), a classificação para os inibidores de peptidases leva em consideração o número de sítios reativos presente no segmento da sequência de aminoácidos que esteja diretamente envolvido na atividade inibitória que também é designado unidade de inibidor, permitindo a descrição de um número maior de famílias quando comparado com a classificação usualmente utilizada para os inibidores de proteinases.

Inibidores de serinoproteinases

São os mais abundantes e facilmente encontrados em várias espécies de plantas e em diferentes tecidos da mesma planta, em particular em sementes de espécies leguminosas, sendo os mais estudados. As famílias de inibidores de serinoproteinases mais bem estudadas são: famílias tipo Bowman-Birk e Kunitz (Birk, 1985; Pando, 2001). Algumas características dessas famílias podem ser observadas na tabela 2.

Tabela 2 – Características gerais de inibidores tipo Bowman-Birk e Kunitz.

Família	Massa Molecular (kDa)	Enzimas inibidas	Distribuição
Bowman-Birk	8 - 10	Tripsina, quimotripsina, elastase	Leguminosae, Gramineae, Compositae, Aliaceae
Kunitz	18 - 22	Tripsina, quimotripsina, elastase, subtilisina, calicreína	Leguminosae, Gramineae, Solanaceae

Fonte: Birk, 1994; Pando, 2001; Mosolov & Valueva, 2005.

Inibidores tipo Bowman-Birk

Os primeiros inibidores de sementes a terem suas seqüências de aminoácidos determinados foram os inibidores de proteinases tipo Bowman-Birk, obtidos de *Phaseolus lunatus* e *Glycine max*. Estes inibidores apresentam ampla distribuição em sementes de leguminosas e cereais, podendo atuar como proteínas de reserva e na defesa contra o ataque de pragas (Richardson, 1991).

Os inibidores de proteinases tipo Bowman-Birk, podem apresentar números variáveis de sítios reativos (três, quatro e até oito), que possibilitam a interação destes com mais de uma molécula de enzima, por exemplo, tripsina e/ou quimotripsina, ressaltando a complexidade da via de sinalização e a importância evolutiva desses inibidores (Taylor *et al.*, 1993; Miller *et al.*, 2000). Apresentam baixa massa molecular e alto conteúdo de cisteína (Birk, 1994; Haq *et al.*, 2004).

Inibidores tipo Kunitz

Esses inibidores ocorrem em batata, em cereais e, principalmente, em sementes de leguminosas (Richardson, 1991). Os inibidores Kunitz apresentam uma ou mais cadeias polipeptídicas, baixo conteúdo de cisteína (normalmente quatro resíduos formando duas pontes dissulfetos) e um único sítio reativo, podendo atuar como proteínas de reserva, no controle de proteinases endógenas de sementes e como mecanismo de defesa contra o ataque de microorganismos, vertebrados e invertebrados (Hartl *et al.*, 1986; Birk, 1994; Jordão, *et al.*, 1996; Haq *et al.*, 2004).

Inibidores de cisteinoproteinases

É a segunda classe de inibidores mais estudada, sendo identificada e caracterizada em várias espécies vegetais. As plantas transgênicas que expressam inibidor de cisteinoproteinase têm apresentado resultados promissores quanto ao efeito inseticida contra insetos fitófagos, o que pode estar relacionado ao fato de que a maioria desses insetos apresentam cisteinoproteinases em seu mecanismo de digestão (Haq *et al.*, 2004).

Inibidores de proteinases aspárticas

Essa classe de inibidores é a menos estudada, provavelmente isto deve estar relacionado à raridade de sua ocorrência. O inibidor catepsina D, encontrado em batatas, apresenta seqüência de aminoácidos similar a do inibidor de tripsina extraído de soja (Mares *et al.*, 1989; Haq *et al.*, 2004).

Inibidores de metaloproteinases

Os inibidores de metaloproteinases em plantas são representados pela metalo-carboxipeptidase na família Solanaceae (tomate e batata) (Graham & Ryan, 1981; Haq *et al.*, 2004).

Funções dos inibidores de proteinases

Os inibidores são ubíquos em todos os organismos vivos e desempenham funções endógenas e exógenas, fundamentais para o bom funcionamento do metabolismo vegetal (Pando *et al.*, 2001).

Nas plantas, os inibidores de proteinases podem atuar como proteínas de reserva, no mecanismo de transdução de sinal, como reguladores endógenos de atividade proteolítica, participando em muitos processos de desenvolvimento, incluindo a morte celular, e como componente associado à resistência da planta contra o ataque de insetos e fungos, retardando o desenvolvimento larval de insetos e reduzindo a proliferação de fungos e bactérias (Ryan, 1990; Lu *et al.*, 1998; Pernas, *et al.*, 1999; Elden, 2000; Giudici *et al.*, 2000; Freire *et al.*, 2002; Ng, 2004; Azzouz *et al.*, 2005).

Embora esses compostos estejam envolvidos em vários processos metabólicos nas plantas, o destaque é para a sua atuação como mecanismo de defesa contra o ataque de insetos e patógenos, mediante a inibição de enzimas proteolíticas atuantes no trato digestivo destes organismos (Lawrence & Koundal, 2002; Balestrazzi *et al.*, 2004). Conforme os resultados de vários estudos, uma dieta rica em inibidores de serino e cisteinoproteinases é capaz de suprimir o crescimento, o desenvolvimento e a reprodução de vários insetos. Os inibidores de serinoproteinases exercem efeito mais pronunciado sobre lepidópteros, nos quais estas enzimas atuam mais ativamente na clivagem de proteínas. Por outro lado, os inibidores de cisteinoproteinases afetam fortemente os coleópteros, que sabidamente possuem estas enzimas ativas em seu intestino (Mosolov & Valueva, 2005).

Segundo Koiwa *et al.* (1997), as etapas de regulação da expressão gênica dos inibidores de proteinases, em resposta ao ataque de insetos herbívoros, são:

- acúmulo dos inibidores e, portanto de proteínas, durante a maturação de sementes e tubérculos;
- indução da germinação da semente;
- expressão dos genes de proteinases das sementes e a inibição da expressão gênica dos inibidores de proteinases pelas giberilinas;

- inibição da germinação da semente por ácido abscísico (ABA) e indução, concomitante, da expressão dos genes dos inibidores de proteinases.

A resposta de defesa da planta, induzida pelo ataque de patógenos herbívoros ou por injúria mecânica, é fundamentada na via de transdução de sinal, que regula a síntese dos inibidores de proteinases. Esta via é iniciada pela interação entre moléculas sinalizadoras locais e sistêmicas bem como por receptores na membrana plasmática. Mediante uma injúria mecânica, a resposta de defesa da planta pode ser expressa através da via de sinalização, no local do ferimento ou de maneira sistêmica, através de todos os tecidos da planta. Estes sinais sistêmicos podem ser transportados através do sistema vascular da planta via xilema e floema. Assim, a resposta de defesa pode incluir a expressão de múltiplos inibidores de proteinases que podem inibir uma ampla faixa das proteinases digestivas dos insetos herbívoros (Koiwa *et al.*, 1997; Casaretto *et al.*, 2004).

Além do efeito inseticida de muitos inibidores, existem vários estudos sobre proteínas vegetais capazes de inibir o crescimento *in vitro* de fungos e, embora o papel dos inibidores de proteinases nas interações planta-microorganismo ainda não seja claro, considera-se que atuam na defesa das plantas retardando a proteólise das paredes celulares e de proteínas da membrana, dificultando a ação dos patógenos (Giudici *et al.*, 2000; Tremacoldi & Pascholati, 2004).

Como a proteólise consiste em um processo metabólico essencial para o processamento e *turnover* de proteínas e é regulada por inibidores endógenos específicos, o complexo formado entre o inibidor e a enzima é estável, reduzindo o processo proteolítico, conseqüentemente, causando deficiência em aminoácidos livres, influenciando o crescimento e o desenvolvimento dos patógenos (Taiz & Zeiger, 2002; Ng, 2004; Azzouz *et al.*, 2005).

Em relação ao efeito tóxico dos inibidores, convém ressaltar ainda que, durante a co-evolução, os patógenos estão em contato com uma variedade de inibidores de proteinases de plantas e, conseqüentemente, desenvolveram estratégias para combater os efeitos desses inibidores. Isso inclui a degradação dos inibidores por proteinases não-alvo destes e pelo desenvolvimento de um sistema proteolítico complexo. Esse sistema supera os efeitos dos inibidores, devido a um regulamento ascendente de outras proteinases que não são inibidas pela proteína vegetal. Logo, para assegurar uma execução bem sucedida de bioinseticidas no

campo, deve-se considerar a habilidade das pragas superarem os efeitos dos inibidores introduzidos, ou os possíveis efeitos negativos destes inibidores contra organismos não-alvos (Carlini & Grossi-de-Sá, 2002).

3.5. Lectinas extraídas de plantas

A ocorrência na natureza de proteínas que aglutinam células foi conhecida no século XIX. Em 1954 a descoberta que a atividade destas aglutininas era eletiva e seletiva, e que essa atividade era inibida por carboidratos, levou Boyd e Shapleigh a nomeá-las de “lectinas”, termo derivado do verbo “Legere” que significa escolher, eleger, selecionar. Embora muitos estudos mostrem a ampla ocorrência dessas proteínas nas plantas e também em invertebrados, até 1970 poucas lectinas tinham sido isoladas e pouca atenção era dada a elas. Isto mudou com a demonstração que lectinas são moléculas extremamente úteis para reconhecer e mapear carboidratos expressos nas superfícies celulares, em particular, e ainda em organelas e fluídos extracelulares e para ocasionar alterações da estrutura de células tumorais, bem como o isolamento e caracterização de glicoproteínas (Sharon & Lis, 2004; Vozári-Hampe, 2006).

A ação de proteínas com AHE, em extratos vegetais, foi descrita pela primeira vez por Hermann Stilmark, em 1888. Este isolou uma proteína altamente tóxica de sementes de *Ricinus communis*, e nomeou-a “Ricin”. Após esse estudo, várias dessas proteínas foram isoladas e caracterizadas com relação à sua estrutura molecular, especificidade por carboidratos e propriedades bioquímicas. Simultaneamente tem sido mostrado que as lectinas funcionam como moléculas de reconhecimento de células e da interação célula-célula em uma variedade de sistemas biológicos (Sharon & Lis, 2004; Nagata *et al.*, 2005; Sadeghi *et al.*, 2006).

As lectinas são amplamente distribuídas na natureza e podem ser encontradas em uma ampla variedade de espécies de plantas, animais, algas, fungos, insetos e microorganismos, estando presente em maior quantidade em grãos de leguminosas e gramíneas. Nas plantas, as lectinas podem ser encontradas em diferentes famílias e diferentes tecidos da mesma planta, representando nas sementes maduras de 2 a 10% das proteínas solúveis (Mancini Filho *et al.*, 1979; Chrispeels & Raikhel, 1991; Silva & Silva, 2000; Silva *et al.*, 2001;).

As lectinas de legume são as proteínas vegetais mais estudadas e centenas destas proteínas já foram isoladas e caracterizadas de acordo com suas propriedades químicas, físico-químicas, estruturais e biológicas (Gatehouse *et al.*, 1995; Mann *et al.*, 2001; Gadelha *et al.*, 2005). Essas lectinas, geralmente, consistem de duas ou quatro subunidades, com massa molecular variando de 25 kDa a 30 kDa, onde cada subunidade possui um sítio de ligação para carboidratos. No entanto, para a maioria das lectinas, esse processo é dependente da presença simultânea de Ca^{2+} e Mn^{2+} (Sharon & Lis, 1990).

As lectinas são proteínas ou glicoproteínas, não pertencentes ao sistema imunológico, podendo ser glicosiladas ou não e possuem pelo menos um sítio de ligação reversível a monossacarídeos ou oligossacarídeos específicos, resultando na aglutinação de células animais e/ou vegetais (Bueno *et al.*, 2004; Jacobson & Doyle, 1996; Goldstein & Poretz, 1986). Isso implica que, a mesma lectina pode agir em receptores de diferentes glicoconjugados, idênticos ou estruturalmente similares, e a presença de no mínimo um domínio não catalítico, o qual se liga reversivelmente a um carboidrato específico, é o único pré-requisito para uma proteína ser considerada lectina (Peumans & Van Damme, 1995).

A figura 10 ilustra o mecanismo geral de ação das lectinas, em que o sítio de ligação a carboidratos da proteína interage com o carboidrato específico na superfície celular. Essa interação resulta em um efeito que é designado como hemaglutinação ou AHE. A especificidade das lectinas é determinada pela conformação dos sítios de ligação e pelos seus aminoácidos constituintes. Desta forma, a substituição de apenas um ou dois aminoácidos nos sítios de ligação a carboidratos, pode resultar em alterações significativas na especificidade da lectina (Kennedy *et al.*, 1995; Sharon & Lis, 1995).

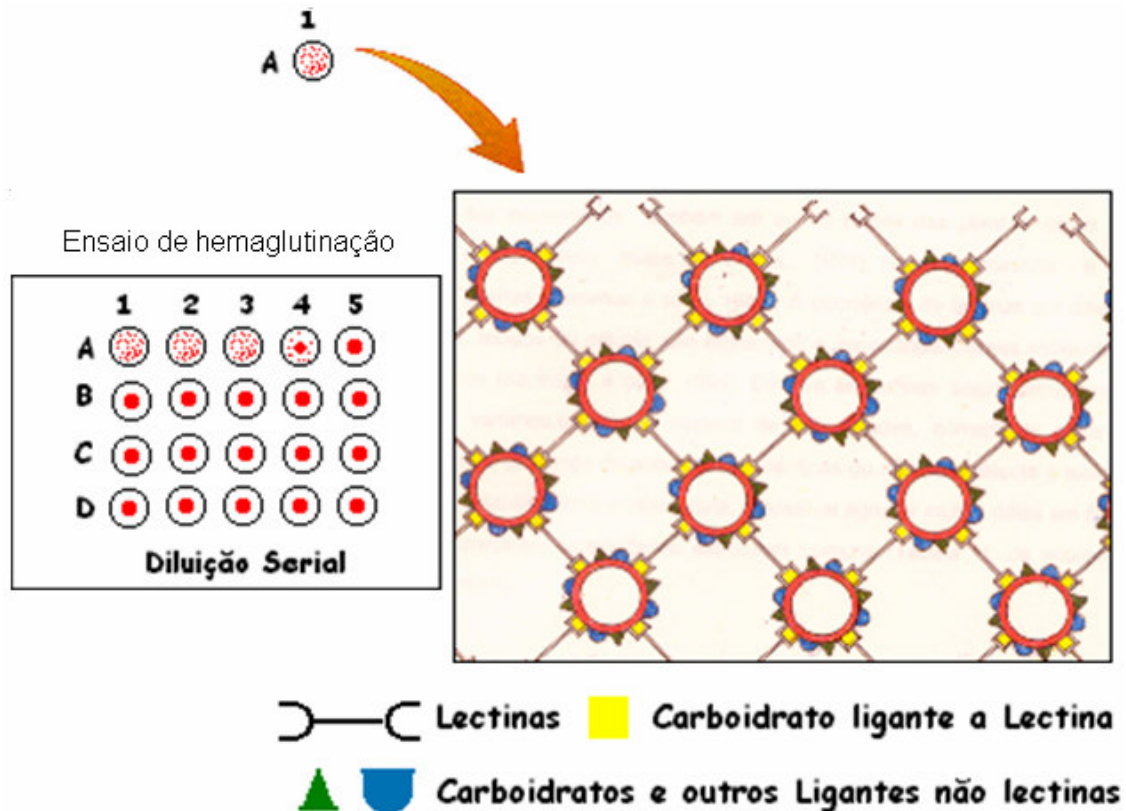


Figura 10 - Representação esquemática do processo de hemaglutinação causado por lectinas (Kennedy *et al.*, 1995).

Classificação das lectinas

Landsteiner & Raubitschek (1908) discutiram pela primeira vez a especificidade das lectinas e observaram que vários extratos de sementes de plantas leguminosas e não-leguminosas apresentavam diferentes propriedades de hemaglutinação quando analisados com diferentes hemácias animais, provavelmente porque as lectinas de diferentes espécies vegetais diferem na sua estrutura molecular e na sua especificidade (Pusztai, 1991).

Segundo Peumans & Van Damme (2001), as lectinas podem ser classificadas em quatro tipos principais, de acordo com sua habilidade para reconhecer e ligar carboidratos:

- Merolectinas: são proteínas que têm somente um domínio de ligação para carboidrato;

- Hololectinas: são proteínas formadas por dois ou mais domínios altamente homólogos ou idênticos.
- Quimerolectinas: são proteínas que possuem um domínio de ligação para açúcares, associado com outro que possui outra atividade biológica ou outra especificidade para ligar carboidrato.

As lectinas podem ser divididas em classes, por meio de sua base e seqüência de aminoácidos e suas propriedades bioquímicas. De acordo com Kennedy *et al.* (1995), a nomenclatura das lectinas é originada da denominação científica das espécies das quais são purificadas, de acordo com o protocolo de purificação, pela designação dos monossacarídeos aos quais têm especificidade ou ainda pela designação do tecido de onde foram extraídas. Por exemplo, a concanavalina A é uma lectina obtida da *Canavalia ensiformis*.

Funções e mecanismos de ação das lectinas vegetais

As lectinas se unem a glicídeos por interações relativamente fracas que asseguram especificidade, podendo desencadear várias alterações biológicas nos organismos. Algumas estão envolvidas no reconhecimento célula-célula, sendo que este reconhecimento é seletivo, visto que na superfície celular há carboidratos distintos. Isso pode ser utilizado para auxiliar o diagnóstico de doenças, uma vez que cada grupo de célula expressa padrões de carboidratos diferenciados onde cada lectina é específica para sítios também distintos (Grangeiro, 1996; Cavada *et al.*, 1996; Isidro *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2002; Berg *et al.*, 2004; Argolo *et al.*, 2005).

Para compreender o potencial biológico das proteínas é fundamental a caracterização físico-química e estrutural dessas moléculas. A ampla ocorrência das lectinas vegetais e a variedade de especificidade por carboidratos, despertaram o interesse pelas investigações de várias funções endógenas e exógenas dessas proteínas nas plantas (Loris, 2002).

Funções endógenas das lectinas: podem atuar como proteínas de reserva; participar da regulação hormonal; ativar fosfatase endógena, atuando como moléculas moduladoras da atividade enzimática na germinação e maturação da semente; na manutenção da dormência da semente; como mitógenos de células

embrionárias vegetais e como receptores que desencadeiam o acúmulo de fitoalexina (Peumans & Van Damme, 1995; Ayoama *et al.*, 2001; Isidro *et al.*, 2001).

Funções exógenas das lectinas: as lectinas desempenham efeito antifúngico para as lectinas ligantes de quitina, um polímero de N-acetilglicosamina, constituinte da parede celular dos fungos; para estudos estruturais de carboidratos e sua distribuição em fungos patogênicos pode-se utilizar lectinas marcadas com digoxigenina; podem atuar ainda no isolamento e análise de carboidratos complexos; como mitógenos de linfócitos; as lectinas podem se fixar à parede celular de bactérias, estabelecendo relações simbióticas, saprofíticas ou patogênicas, podendo atuar no estudo da arquitetura celular e proteção contra bactérias (Freire *et al.*, 2002; Carlini & Grossi-de-Sá, 2002).

A interação das lectinas com receptores glicídios da membrana celular (figura 11) é a base molecular para as várias respostas que essas proteínas são capazes de induzir nos sistemas biológicos. No entanto, em plantas, a atividade inseticida é de grande interesse para a agricultura, com uma grande possibilidade de se obter resultados dos efeitos deletérios e/ou probióticos *in vivo* (Bezerra *et al.*, 2005).

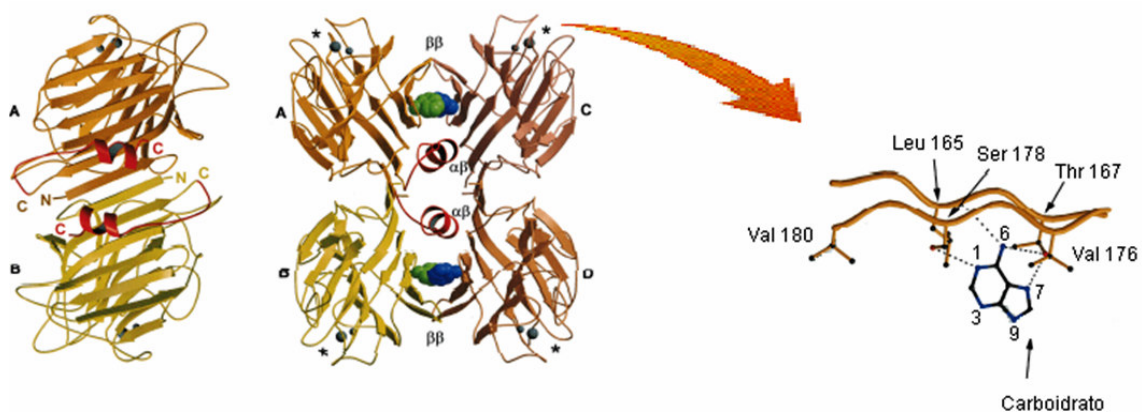


Figura 11 – Esquema de uma molécula de lectina, evidenciando sua estrutura e a ligação entre alguns resíduos de aminoácidos da lectina com a porção carboidrato de uma glicoproteína de superfície celular.

Nos vertebrados, a maioria das superfícies celulares é envolvida por um glicocálix, glicoproteínas, glicolípideos e glicosaminoglicanos que, conjuntamente são designados como glicoconjugados. Os carboidratos de superfície celular, devido à sua complexidade estrutural e variabilidade, atuam como sinais que podem ser

reconhecidos por lectinas e glicoproteínas, podendo atuar como "pontes" pela ligação a carboidratos entre células vizinhas e da matriz extracelular. Como a maioria das lectinas reage especificamente com açúcares não reduzidos de glicoproteínas e glicolipídeos da membrana celular, elas podem ser usadas para caracterizar estes glicoconjugados de superfície com base nos monossacarídeos que inibem a ligação (Vasconcelos & Oliveira, 2004).

Na atuação de mecanismo de defesa das plantas contra o ataque de patógenos, as lectinas, ligam-se a glicoconjugados da parede intestinal de insetos, ocasionando rompimento das microvilosidades (invasão de bactérias), redução na viabilidade das células epiteliais, aumento na produção de muco, desequilíbrio hormonal, hiperplasia e aumento no peso do tecido. Além disso, lectinas com a mesma especificidade para açúcares podem exercer toxicidade diferente em espécies distintas de insetos (Liener, 1994; Peumans & Van Damme, 1995).

Por outro lado, o uso de lectinas vegetais é importante na identificação de espécies, em estudos de infectividade e na composição do glicocálix. Essas proteínas podem ser usadas, em cromatografia de afinidade, para a purificação e caracterização de glicoconjugados de parasitas, para a discriminação entre parasitas patógenos e não-patógenos, e podem ainda contribuir na elucidação dos ciclos de desenvolvimento destes microorganismos (Jacobson & Doyle, 1996).

Segundo Czaplá & Lang (1990), as proteínas mais tóxicas para diferentes espécies de insetos são as lectinas específicas para N-acetilglicosamina, galactose e N-acetilgalactosamina. Adicionalmente, em geral, há quatro mecanismos para explicar o efeito tóxico das lectinas vegetais contra os insetos: a) alteração, próximo ao seu sítio ativo, da função de uma enzima glicosilada necessária para a digestão, b) ligação das lectinas a glicoconjugados expostos nas células epiteliais intestinais ao longo do trato digestório, c) ligação das lectinas à membrana peritrófica do inseto, a qual é rica em quitina, um polímero de N-acetilglicosamina e d) resistência das lectinas à proteólise do intestino médio dos insetos (Fitches & Gatehouse, 1998; Moore *et al.*, 2000; Macedo *et al.*, 2002).

3.6. Interação de inibidores de proteinases e lectinas com fitopatógenos

Os fitopatógenos são responsáveis por perdas drásticas da eficiência e qualidade da produtividade vegetal, e pela aplicação descontrolada de defensivos químicos sintéticos, os quais podem ser tóxicos à saúde humana, animal e ao meio ambiente (Santos, 1999). Por outro lado, na Amazônia, a imensa quantidade e diversidade de fungos tornam-se um dos grandes problemas que acarretam prejuízos significativos ao setor produtivo local.

Na natureza, a doença ocorre na presença de três fatores: patógeno virulento, planta susceptível e um ambiente favorável (Agrios, 1997). No contato planta-patógeno ocorre o reconhecimento do possível patógeno pela planta e a ativação de mecanismos de defesa por parte da planta. Esse reconhecimento normalmente se dá pela interação entre uma molécula elicitora e um receptor presente na membrana plasmática da célula vegetal. A natureza da molécula indutora é variável, sendo mais comum carboidrato, glicoproteínas e lipídeos (Wulff & Pascholati, 1999; Hahn *et al.*, 1993; Hahn, 1996; Umemoto *et al.*, 1997; Métraux, 2001; Labanca, 2002).

A utilização dessas moléculas nas plantas pode ocasionar uma resposta de resistência e uma expressão sincronizada de diversos mecanismos de defesa, resultando na indução da resistência, que consiste na transformação de uma relação originalmente compatível entre planta e patógeno numa relação incompatível. Nesta, a combinação de barreiras químicas e estruturais, pré e pós-formadas, impede o sucesso do patógeno. Desta forma, a planta deve reconhecer o patógeno, emitir um sinal primário e ativar genes ligados à defesa ou aumentar a atividade de enzimas importantes para reações de defesa (Honeé, 1999; Van Loon e Van Striem, 1999).

Uma vez tendo ocorrido a ativação de genes de defesa, inicia-se a produção sincronizada, localizada e/ou sistêmica de produtos que irão deter ou atrasar a colonização pelo agente patogênico. A partir dessa ativação ocorre uma série de alterações bioquímicas, como alteração no fluxo de íons através da membrana citoplasmática, constantes fosforilações e desfosforilações de proteínas reguladoras e a explosão oxidativa. Conseqüentemente, o pH celular e a atividade de algumas enzimas são modificados, resultando na ativação imediata de genes de defesa e na manutenção de outros genes em estado de alerta. Estes, quando do contato

patógeno-planta são ativados, levando a síntese de novos compostos e ao aumento da atividade de importantes proteínas de defesa, retardando a infecção (Moraes, 1998; Conrath *et al.*, 2001).

Nesse contexto, juntamente com o desenvolvimento da resistência de microorganismos aos agentes antimicrobianos, as pesquisas apontam cada vez mais para o isolamento e identificação de biomoléculas vegetais, que possam ser utilizadas no desenvolvimento de novas substâncias ambientalmente seguras, no combate a doenças e pragas (Silva *et al.*, 2005). Logo, a exploração da atividade biológica dessas biomoléculas presentes nos extratos brutos vegetais, juntamente com a indução de resistência, constituem uma forma efetiva de controle de doenças vegetais, envolvendo a ativação de mecanismos de resistência da planta (Dias, 1993).

A busca de novas moléculas que possam ser utilizadas no campo, com capacidade de estimular uma ou mais respostas de defesa, já foram isoladas e caracterizadas, incluindo inibidores de proteinases e lectinas (tabela 3). Estas proteínas possuem estruturas distintas, desempenham função protetora contra o ataque de fungos e são produzidas por uma variedade de organismos, incluindo plantas leguminosas, plantas não leguminosas, gimnospermas, fungos, bactérias, insetos e mamíferos (Giudici *et al.*, 2000; Ng, 2004).

Tabela 3 – Relação de trabalhos realizados com inibidores de proteinases e lectinas vegetais apresentando atividade antifúngica.

Espécie Vegetal	Classe de Proteína	Espécie de fungo inibida	Referência Bibliográfica
<i>Helianthus annuus</i>	Inibidor tripsina (SAP16)	<i>Sclerotinia esclerotiorum</i>	Giudici <i>et al.</i> , 2000
<i>Vicia faba</i>	Inibidor Bowman-Birk	<i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Micosphaerella arachidicola</i>	Ye <i>et al.</i> , 2001
<i>Hordeum vulgare</i> L.	Inibidor Bowman-Birk, inibidores de serinoproteinases alcalinas	<i>Fusarium culmorum</i>	Pekkarinem & Jones, 2003
<i>Talisia esculenta</i>	Lectina	<i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Freire, <i>et al.</i> , 2002
<i>Lyophyllum shimeji</i>	Lectina	<i>Physolepora piricola</i>	Lam & Ng, 2001
<i>apsicum frutescens</i>	Lectina	<i>Fusarium moniliforme</i>	Ngai & Ng, 2007

3.7. Aspectos gerais dos fungos

Os fungos pertencem ao reino *Fungi* e apresentam um conjunto de características que permitem sua diferenciação das plantas: não sintetizam clorofila nem qualquer pigmento fotossintético; não possuem celulose na parede celular e sim substâncias quitinosas, exceto alguns fungos aquáticos, e têm capacidade de armazenar glicogênio. São microorganismos eucarióticos amplamente distribuídos no solo, na água, em alimentos, nos vegetais, nos detritos e em animais. Como não possuem clorofila necessitam viver em estado de saprofitismo e/ou parasitismo para adquirir as substâncias orgânicas necessárias ao seu desenvolvimento. Os fungos se desenvolvem em meios especiais de cultivo formando colônias de dois tipos: leveduriformes e filamentosas. Os organismos filamentosos são constituídos fundamentalmente por elementos multicelulares, em forma de tubos, as hifas. O conjunto de hifas é denominado micélio, que pode se desenvolver no interior do substrato (micélio vegetativo) ou se projetar na superfície e crescer acima do meio de cultivo (micélio aéreo). A nutrição da maioria dos fungos dá-se por absorção, processo no qual enzimas adequadas hidrolisam macromoléculas, tornando-as assimiláveis através de mecanismos de transportes. As principais enzimas encontradas nos fungos são: lipases, invertases, lactases, amilases e proteinases (Trabulsi *et al.*, 2005).

Normalmente, o corpo dos fungos é constituído de duas partes bem diferenciadas; uma *parte vegetativa*, que é responsável pelo desenvolvimento e absorção dos alimentos e uma *parte reprodutiva* que se encarrega da propagação da espécie. Com poucas exceções, os fungos têm origem dos esporos, corpúsculos que necessitam de condições favoráveis de umidade e temperatura para germinarem. Como resultado da germinação formam-se filamentos finos denominados *tubos germinativos*, os quais crescem em comprimento e muito pouco em diâmetro, ramificando-se em todos os sentidos, formando-se o micélio, que constitui o corpo vegetativo do fungo. Estes filamentos simples ou ramificados que denominam-se hifas, podendo ser septadas ou contínuas (Silveira, 1968; Trabulsi *et al.*, 2005).

3.8. Biologia dos fungos

Colletotrichum guaranicola Albuquerque

Este fungo foi descrito por Albuquerque em 1961 e ocasiona a doença antracnose do guaraná (*Paullinia cupana* Ducke var. *sorbilis*), infectando folhas e caules tenros em todos os estádios da planta e ocorre em todas as regiões da Amazônia, tanto em viveiro quanto no campo (Trindade & Poltronieri, 1997; Bentes & Barreto, 2004;).

A doença causa necrose dos limbos e pecíolos das folhas e das hastes em início de desenvolvimento. As partes necrosadas adquirem a coloração marrom-avermelhada. Os folíolos, à medida que secam, tornam-se quebradiços. Lesões isoladas apresentam formato variável de circular a elíptico. O coalescimento das lesões acarreta a queima de extensas áreas dos folíolos com maior predominância em seus bordos. Quando a lesão afeta as nervuras, provoca deformação e enrolamento dos folíolos, principalmente quando jovens. Quando as condições são muito favoráveis para a doença, tais como umidade elevada e planta debilitada, pode acarretar a queda de um grande número de folhas, seca dos galhos e, conseqüentemente, morte da planta. A colônia do fungo apresenta coloração branca, com abundante produção de micélio, quando cultivado em meio de cultura BDA, formando massa de conídios de cor alaranjada. Os conídios são cilíndricos, hialinos e unicelulares (Trindade & Poltronieri, 1997).

Corynespora cassiicola Berk. & Curtis

Este patógeno apresenta ampla distribuição mundial, principalmente nos trópicos. No Brasil, sua maior incidência ocorre nos estados do Amapá, Amazonas e Pará. *C. cassiicola* é um fungo, que além de várias solanáceas, ataca espécies de cerca de 50 famílias de plantas, inclusive a seringueira. É o agente causal da doença conhecida como mancha-alvo nas folhas e podridão radicular de corinespora, resultando em folhas de coloração marrom-escuras, aproximadamente circulares, variando de 1-8 mm de diâmetro, com a parte central marrom-clara e esbranquiçada e halo marrom-avermelhado. Raízes infectadas apresentam cor

castanho-clara. A disseminação a longa distância ocorre através das sementes de mudas contaminadas e infectadas. A dispersão dos conídios dentro do campo é anemocórica. Apresentam conidióforos eretos, ramificados, 1-20 septos, coloração marrom, 44-350 x 4-11 micra. Os conídios emergidos isolados ou em cadeia de dois a seis, de coloração marrom, alargados na base, retos ou ligeiramente curvos, 3-20 septos, 39-520 x 7-22 micra. As temperaturas entre 16-32° C e umidade relativa acima de 90% por longos períodos favorecem o desenvolvimento da doença (Trindade & Furtado, 1997).

Sclerotium rolfsii Sacc.

Sclerotium rolfsii Sacc. é um fungo mitosporico micélio branco. As hifas têm 6 a 9 µm de diâmetro e apresentam grampos de conexão. Produz escleródios em grande quantidade e arredondados (1-2 mm de diâmetro), os quais são inicialmente brancos e, tornam-se marrom escuro quando maduros (Henz & Lopes, 2000).

Esse fungo é um patógeno de solo, que tem como hospedeiras mais de 200 espécies de plantas, incluindo a cultura do pimentão (*Capsicum annuum* L.), causando a murcha-de-sclerotium e podridão-das-raízes. Estas doenças ocorrem em condições de alta umidade do solo e temperaturas elevadas. O fungo é disseminado sob a forma de micélio e escleródios aderidos aos materiais vegetais ou sob a forma de escleródios no solo. Os sintomas observados em material infectado são: podridão semi-aquosa dos bulbos, com posterior desenvolvimento de pequenos pontos esbranquiçados e a proliferação de um micélio também esbranquiçado, nos quais pode-se observar posteriormente o desenvolvimento de escleródios, que são a principal forma de sobrevivência, podendo apresentar uma longevidade de mais de cinco anos no solo em ambiente seco. Em condições favoráveis, o crescimento micelial é rápido e atinge facilmente outros ramos da planta (Jaccoud Filho & Zambolim, 2000).

É importante salientar que, tanto os escleródios quanto o micélio são fontes de inóculo, pois o fungo pode sobreviver saprofiticamente em restos culturais na forma de micélio, que posteriormente forma os escleródios. Como sintoma reflexo, as plantas murcham, principalmente nas horas mais quentes do dia. A lesão no colo, impedindo o fluxo da seiva, ocasiona amarelecimento e murcha da parte aérea

do ramo ou da planta toda. As folhas adquirem coloração marrom-escuro e podem cair prematuramente. A dispersão dá-se por meio da água de chuva e de irrigação, pelo solo aderido a máquinas e implementos agrícolas e por sementes contaminadas. As temperaturas elevadas entre 25 e 30° C, solos muito úmidos, umidade relativa maior que 90% e pH do solo abaixo de 6,0 são condições favoráveis à ocorrência da doença (Santos, *et al.*, 1997; Barreto, 1997).

Fusarium oxysporum Schlecht.

Este fungo produz numerosos microconídios, e macroconídios nos esporodóquios, além de clamidósporos. A melhor temperatura do solo para crescimento e esporulação do fungo é 30⁰ C. O patógeno é encontrado no solo, onde permanece viável por anos, e nas sementes (interna e externamente). O fungo penetra através dos pêlos radiculares (Wulff & Pascholatti, 1997).

Ocasiona as doenças murcha de fusarium e fusariose, causando prejuízos consideráveis em muitas culturas. O principal sintoma da murcha de fusarium é a murcha das brotações, que nos estádios iniciais podem murchar durante o dia e recuperar a turgescência à noite. A fusariose causa acentuada redução na emergência e no crescimento, morte de raízes e amarelecimento de plântulas, na fase de sementeira. Em plantas adultas reduzem o vigor, a longevidade e a produção. Em estádios bem avançados da doença pode-se observar descoloração no sistema vascular dos brotos. Sob condições de umidade relativa muito alta, ocorre o crescimento do micélio do fungo sobre as escamas do broto e este, posteriormente, torna-se seco e enrugado. É comum observar, no campo, a ocorrência de plantas murchas ou mortas. As raízes e a parte basal do caule, que fica abaixo da superfície do solo, apresentam-se necrosadas e de coloração avermelhada. O rizoma pode apresentar áreas podres e seu tecido vascular escurecido. Os fungos causadores dessas doenças sobrevivem em restos culturais infectados no solo através de sementes, rizomas doentes ou solo infestado aderido aos rizomas, água de escoamento superficial no solo contaminada por estruturas fúngicas, insetos e pelo vento (Iamauti & Salgado, 1997; Maringoni, 1997).

Em meio de cultura, o fungo apresenta micélio cotonoso, com colônias variando em cor, de salmão pálido a violeta, dependendo da temperatura. O ponto ótimo para crescimento está em torno de 25⁰ C. Os microconídios sempre

presentes, são de formato oval a elíptico, hialinos, com tamanho variando de 2,2 a 3,5 μm . Os macroconídios são falcados, septados, hialinos com dimensões de 25-50 x 4-5,5 μm . Os clamidósporos têm diâmetro de 7-11 μm , são intercalares ou terminais no micélio, ocorrendo isolados ou em pares. É através deles que o fungo sobrevive no solo durante anos, podendo ainda permanecer como micélio em restos de cultura. O fungo penetra através das raízes ou de ferimentos, invadindo o xilema. O avanço da hifa no tecido é acompanhado por uma descoloração deste, resultante da ação das toxinas produzidas pelo patógeno. Os vasos do xilema ficam entupidos, causando a murcha e morte da planta (Iamauti & Salgado, 1997).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material Vegetal

Neste trabalho foram utilizadas sementes inteiras e maduras de quatro espécies arbóreas da família Leguminosae da flora amazônica. As espécies selecionadas para o estudo foram *Caesalpinia ferrea* var. *cearensis*, *Cedrelinga catenaeformis*, *Swartzia polyphylla* e *Peltogyne venosa*.

As sementes de *C. ferrea* var. *cearensis*, *S. polyphylla* e *P. venosa* foram coletadas em setembro de 2005, e as sementes de *C. catenaeformis* em janeiro de 2006, sendo provenientes de uma única matriz por espécie.

Caracterização da área de coleta das sementes de C. ferrea var. *cearensis*, *C. catenaeformis* e *S. polyphylla*

As sementes de *C. ferrea* var. *cearensis*, *C. catenaeformis* e *S. polyphylla* foram coletadas em matrizes situadas no INPA V8 (Campus III), na cidade de Manaus/AM. A região possui temperatura média de 27,3 °C, variando entre 21,3 a 33,8 °C, com umidade relativa do ar acima de 76 % em setembro e 87 % em janeiro, com precipitação anual em torno de 2.600 mm. O Campus III do INPA está localizado no município de Manaus/AM (03°08'S a 60°01'W). Em 1986 foi realizado plantio de leguminosas lenhosas arbóreas, designado arboreto, com o objetivo de obtenção de propágulos para estudos agrossilviculturais e para a difusão do plantio de espécies pouco cultivadas. Durante 42 meses, de outubro de 1996 a abril de 2000, foram realizadas observações fenológicas nas árvores que se desenvolveram nesse arboreto (Portela *et al.*, 2001).

Caracterização da área de coleta das sementes de P. venosa

As sementes de *P. venosa* foram coletadas no arquipélago das Anavilhanas (350.000 hectares), localizado no baixo rio Negro, entre os municípios de Manaus e Novo Airão (2°00'-3°02' S e 60°27'-61°07' W). Na área, predomina vegetação de igapó e matas ribeirinhas onde foi efetuado um levantamento das espécies da família Leguminosae, incluindo *P. venosa* (Souza & Silva, 2002b).

4.2. Coleta de dados

As atividades foram realizadas no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal/Núcleo de Proteômica de Plantas (INPA – Campus III), nos Laboratórios de Bioquímica/FCB (UFAM), Laboratório de Produtos Bioativos de Origem Microbiana/FCA (UFAM) e no Laboratório de Biorgânica/Escola Superior de Ciências da Saúde (UEA).

Isolamento e purificação de inibidores de tripsina e frações com AHE de sementes de leguminosas da flora amazônica

Extração salina

As sementes inteiras cedidas pelo laboratório de sementes da Coordenação de Agricultura do Trópico Úmido foram levadas para o Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal-INPA onde foram trituradas em moinho analítico até a obtenção de material finamente pulverizado. A farinha das sementes (30g) foi homogeneizada em 300 mL de NaCl 0,15 M. Em seguida, a suspensão foi mantida sob leve agitação durante duas horas, centrifugada a 5000 x g, durante 20 minutos a 4°C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante, após diálise durante 48 horas contra água destilada e liofilização, foi utilizado nas etapas de purificação e de caracterização bioquímica e biológica.

Cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-100

Os extratos totais obtidos na etapa anterior foram aplicados numa coluna de gel filtração em Sephadex G-100 (62,5 cm x 1,5 cm). A resina foi previamente hidratada e a coluna equilibrada com tampão Tris-HCl 0,05 M/NaCl 0,15 M, pH 8,0, com fluxo de 18 mL.h⁻¹. Nos eluatos, foi estimada a concentração de proteína total ($\lambda = 280$ nm), a AHE utilizando-se hemácias de rato branco e a atividade inibitória utilizando a tripsina bovina (Serva Electrophoresis GmbH) como padrão enzimático. As frações com atividade biológica foram reunidas, dialisadas e liofilizadas.

Caracterização da atividade dos inibidores de tripsina

Medida da inibição sobre tripsina bovina

A mistura de pré-incubação continha tampão Tris/HCl 12,5 mM, pH 8,0, tripsina bovina 50 μ g (dissolvida em HCl 1 mM) e diferentes concentrações dos inibidores, para um volume final de 2 mL. A pré-incubação prosseguiu durante 10 minutos a 37°C. Decorrido o tempo descrito, o substrato cromogênico DL-BAPNA (0,5 mM) foi adicionado e a incubação prosseguiu por mais 30 minutos a 37°C. A reação foi interrompida pela adição de ácido acético 30 % (v/v) e a hidrólise do substrato pela enzima foi acompanhada fotometricamente a 405 nm. O cálculo da atividade inibitória foi feito pela determinação da atividade residual da tripsina no ensaio.

Caracterização da atividade das frações com AHE

Preparo das hemácias de animais

O sangue, coletado de diferentes animais saudáveis (camundongo, hamster e rato branco), foi imediatamente misturado com solução de Alsever contendo glicose 2,05%, citrato de sódio 0,8% e NaCl 0,42%, para evitar a coagulação. O pH desta solução foi ajustado para 6,1 usando ácido cítrico e, após centrifugação a 1000 x g durante 10 minutos a 4°C, as hemácias foram lavadas por quatro vezes em solução

salina gelada (NaCl 0,15M). O precipitado foi ressuspenso na mesma solução de modo a obter uma suspensão final de hemácias 4% (v/v).

Deteção de AHE nos extratos e nos eluatos

A AHE dos extratos totais e dos eluatos, parcialmente purificados por cromatografia de exclusão molecular, foi identificada, utilizando hemácias previamente preparadas como descrito anteriormente. A AHE dos extratos totais e dos eluatos foi analisada em placas de microtitulação contendo 8 fileiras de 12 poços cada, totalizando 96 poços. O volume final do ensaio foi de 150 μ L, contendo 50 μ L de solução salina (NaCl 0,15 M), 50 μ l da suspensão de hemácias (4 %) e 50 μ l dos extratos e/ou eluatos. Na mesma placa foram preparados os respectivos controles, contendo 100 μ l de solução salina e 50 μ l de suspensão de hemácias (4 %). Os resultados foram analisados visualmente, registrando-se precipitação ou não, após incubação “overnight” em geladeira (10 °C).

Inibição da AHE

Inicialmente, 50 μ l de solução salina foram adicionados na placa de microtitulação. Em seguida foram adicionados 50 μ l de soluções 0,1 M dos seguintes açúcares: D-glicose, lactose, galactose, sacarose, fucose, rafinose, manose, maltose, D-galactosamina, α -methyl-mannopyranosil e N-acetilgalactosamina, fazendo-se diluição seriada. Finalmente, 50 μ l de frações com AHE (1 mg.mL⁻¹) foram adicionados em cada poço. Para os testes com cada açúcar e o controle foram considerados 12 poços da placa de microtitulação. O controle continha 100 μ l de solução salina e 50 μ l de solução de hemácias 4 %. A mistura foi mantida durante 20 minutos à temperatura ambiente. Após este período, 50 μ l de uma suspensão de hemácias 4 % foram adicionados em cada poço da placa de microtitulação. As placas foram incubadas “overnight” em geladeira (10 °C). Após este período foi verificada a concentração inibitória mínima de carboidratos que apresentou inibição da atividade dos eluatos.

Efeito do EDTA na AHE

O efeito do EDTA na AHE foi analisado em placas de microtitulação. Para este ensaio, foram preparados os seguintes controles: o controle 1 continha 100 µL de NaCl 0,15 M e 50 µL da suspensão de hemácias (4 %); o controle 2 continha 50 µL de NaCl 0,15 M, 50 µL da suspensão de hemácias (4 %) e 50 µL dos extratos protéicos e/ou dos eluatos com AHE; o controle 3 continha 50 µL de NaCl 0,15 M, 50 µL de EDTA 25 mM e 50 µL da suspensão de hemácias (4 %). O ensaio consistiu em 50 µL de NaCl 0,15 M, 50 µL de EDTA 25 mM diluído serialmente e 50 µL de extratos protéicos e/ou eluatos com AHE. A mistura foi mantida durante 30 minutos à temperatura ambiente. Após este período, 50 µL de uma suspensão de hemácias a 4 % foi adicionada em cada poço da placa de microtitulação. As placas foram incubadas “overnight” em geladeira (10 °C) antes da análise dos resultados. A AHE foi analisada para verificar os possíveis efeitos dos íons divalentes na AHE.

Dosagem de proteína

Durante os procedimentos de purificação parcial, o perfil de eluição das proteínas da coluna de exclusão molecular foi acompanhado em 280 nm, usando um espectrofotômetro Amersham Biosciences Modelo RNA/DNA Calculate Gene Quant Pro.

A quantificação das proteínas totais nos extratos e nos eluatos foi feita de acordo com o método descrito por Lowry *et al.* (1951), utilizando um espectrofotômetro Spectrum UV-VIS SP-2000 UV, tendo a BSA como padrão.

Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE

O gel de poliacrilamida foi feito segundo o método descrito por Laemmli (1970). Os géis de concentração e separação foram obtidos a partir de solução estoque de acrilamida 30 % e bis-acrilamida 0,8 %, preparada com água deionizada e mantida em refrigeração em geladeira (10 °C) em frasco âmbar.

O gel de concentração a 5 % foi preparado em tampão Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8, e o gel de separação 12,5 %, em tampão Tris-HCl 1 M, pH 8,8, sendo acrescentado a ambos SDS 20 %. A polimerização foi conseguida pela adição de

TEMED e PSA 10 %.

As amostras (30 µg) foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,08 M, pH 6,8, contendo 2 % de SDS, 10 % de glicerol e 0,1 % de azul de bromofenol, sendo imersas em água em ebulição durante 5 minutos. Como agente redutor foi utilizado DTT, a concentração final de 0,1 M. A eletroforese foi realizada em tampão de corrida Tris-HCl 0,025 M, glicina 0,192 M e SDS 0,1 %, a 120 volts, 15 mA, durante 10 horas.

Como marcadores de massas moleculares foram utilizados marcadores BenckMark Protein Ladder (220 kDa - 10 kDa).

Os géis, após a retirada das placas foram corados com Coomassie Brilliant Blue com ácido acético 0,1 %, metanol e água deionizada na proporção de 1:4:5 (v/v/v) durante 3 horas e então descorados em solução de ácido acético glacial, metanol e água deionizada na proporção de 1:4:5 (v/v/v).

Análise do efeito inibitório *in vitro* dos extratos totais contra os fungos fitopatogênicos

Os isolados dos fungos *S. rolfsii* e *C. cassicola* foram cedidos pelo Laboratório de Produtos Bioativos de Origem Microbiana da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Amazonas – FCA/UFAM.

Os isolados dos fungos *Colletotrichum guaranicola* e *Fusarium oxysporum* foram cedidos pelo Laboratório de Biorgânica da Escola Superior de Ciências da Saúde da Universidade Estadual do Amazonas – UEA.

Os ensaios foram realizados em placas de Petri esterilizadas (90 mm para os fungos *C. cassicola* e *S. rolfsii* e 80 mm para os fungos *C. guaranicola* e *F. oxysporum*), contendo meio de cultura BDA (200 g de batata, 20 g de dextrose, 20 g de ágar e água deionizada em quantidade suficiente para um volume de 1000 mL de solução). Para testar a atividade antifúngica, os extratos foram diluídos em água deionizada, esterilizados por filtração em filtro Millipore 0,22 µm, acrescentados ao meio BDA e testados em quatro diferentes concentrações de proteína total (10, 20, 40 e 80 µg.mL⁻¹). As proporções foram determinadas após a etapa de dosagem de proteína total nos extratos. O controle foi constituído de meio BDA e água deionizada.

Em todos os tratamentos, foi avaliado cada patógeno, adicionando-se um disco de micélio de 5 mm de diâmetro no centro de cada placa de Petri. As placas ficaram armazenadas em câmara de germinação a 25 °C.

O efeito dos extratos sobre o crescimento micelial foi analisado a cada dois dias, determinando o crescimento radial das colônias em dois eixos ortogonais com auxílio de uma régua milimetrada, sendo posteriormente calculada uma média. Quando, em um dos tratamentos, o crescimento das colônias atingiu todo o diâmetro de uma das placas de Petri, o experimento foi interrompido.

A avaliação da produção de esporos foi realizada imediatamente após o término do ensaio. A esporulação foi avaliada no décimo dia após a repicagem para os fungos *C. cassicola* e *C. guaranicola*, no trigésimo terceiro dia para o fungo *F. oxysporum* e no sétimo dia para o fungo *S. rolfsii*. Os esporos de cada placa foram suspensos em 15 mL de água deionizada e coletados com auxílio de um pincel. Para cada placa uma alíquota de 0,5 mL foi transferida para uma lâmina de hemocitômetro (câmara de Neubauer), onde se procedeu a contagem de esporos com auxílio de microscópio óptico. Para o fungo *S. rolfsii*, foi quantificado o número de escleródios por placa de cada tratamento.

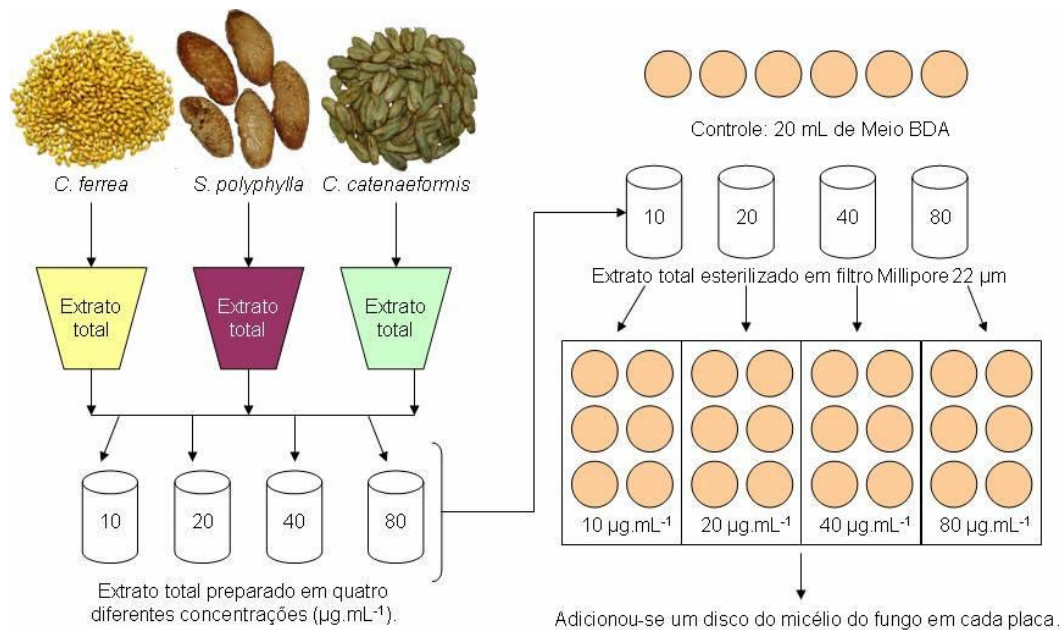


Figura 12 - Fluxograma do método para a realização dos bioensaios.

Após o término do experimento: mensuração do crescimento micelial das colônias.

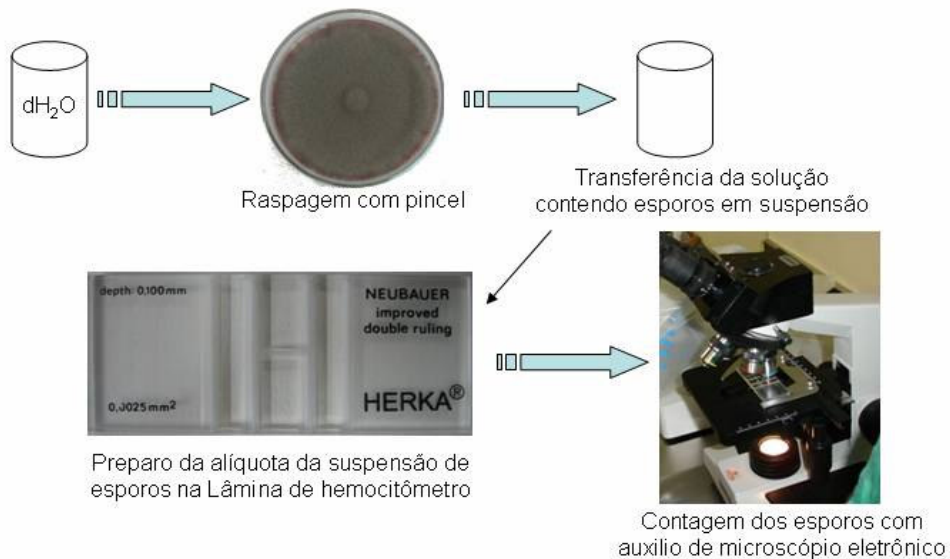
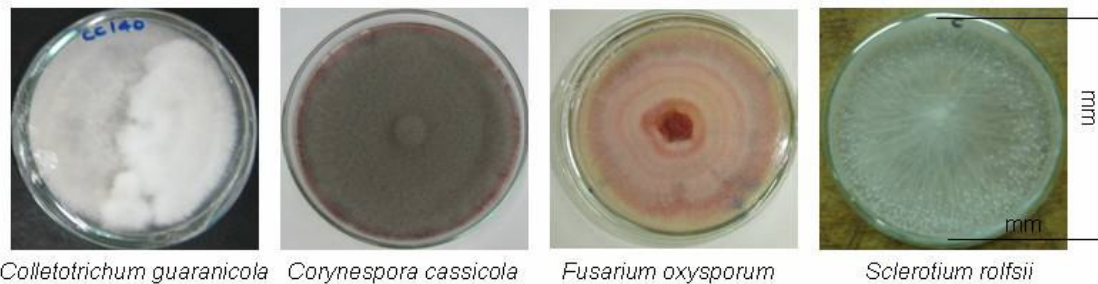


Figura 13 – Fluxograma do monitoramento dos bioensaios durante a coleta dos dados de crescimento micelial e contagem dos esporos.

4.3. Delineamento experimental e análise estatística

Para os bioensaios com fungos, o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado. Cada experimento foi composto por uma espécie de fungo, uma espécie vegetal, um controle e quatro concentrações (10, 20, 40 e 80 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) de proteína total, com seis repetições, totalizando 12 experimentos.

Para a análise estatística dos dados foram realizadas análises de variância simples (ANOVA). Esta análise teve como objetivo verificar se houve diferença estatística significativa, entre os tratamentos, na diminuição do crescimento micelial e da esporulação das colônias dos fungos.

Quando houve diferença estatística significativa, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade. Os programas estatísticos utilizados para a realização das análises foram o Systat 10.0 for Windows Autoplay e o Assistat 7.3 beta.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Inibidores de tripsina

Deteccção de inibidor de tripsina nos extratos totais

Na presença de 7,8 µg, 7,2 µg, 12,2 µg e 40,3 µg de proteínas totais de *C. ferrea* var. *cearensis*, *C. catenaeformis*, *S. polyphylla* e *P. venosa*, a atividade residual da enzima foi de 5 %, 31 %, 57 % e 66 %, respectivamente (tabela 4). Estes resultados evidenciam que dos quatro extratos testados o de *C. ferrea* var. *cearensis* apresentou maior afinidade pela tripsina bovina.

Tabela 4 – Atividade residual da tripsina bovina na presença de extratos totais de sementes de leguminosas.

Extrato Total	Proteína total (µg)	Atividade residual da enzima (%)
<i>C. ferrea</i> var. <i>cearensis</i>	7,84	5,04
<i>C. catenaeformis</i>	7,22	31,30
<i>S. polyphylla</i>	12,22	57,25
<i>P. venosa</i>	40,34	66,21

Purificação parcial de inibidores

Os perfis cromatográficos de extratos totais de *C. ferrea* var. *cearensis* e *S. polyphylla* estão apresentados nas figuras 14 e 15, respectivamente. As frações que apresentaram atividade inibitória foram reunidas em um “pool”, dialisadas, liofilizadas e designadas como CfTI para inibidor de tripsina de *C. ferrea* var. *cearensis* e SpTI para inibidor de tripsina de *S. polyphylla*. Apesar de ter sido detectado inibidor de tripsina bovina nos extratos de *C. catenaeformis* e *P. venosa*, após cromatografia em Sephadex G-100 não foi detectado frações com atividade inibitória nestes extratos.

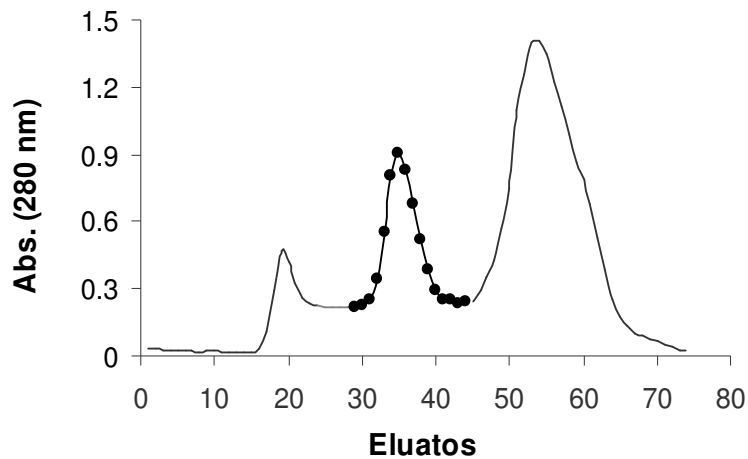


Figura 14 – Cromatografia em coluna de Sephadex G-100 (62,5 x 1,5 cm), equilibrada com tampão Tris/HCl 0,05M contendo NaCl 0,15M, pH 8,0. Amostra: 200 mg de extrato de *C. ferrea var. cearensis*. Fluxo de eluição: 0,3mL/min. Frações de 3mL foram coletadas e monitoradas a 280 nm. “●” círculo cheio indica atividade inibitória dos eluatos coletados.

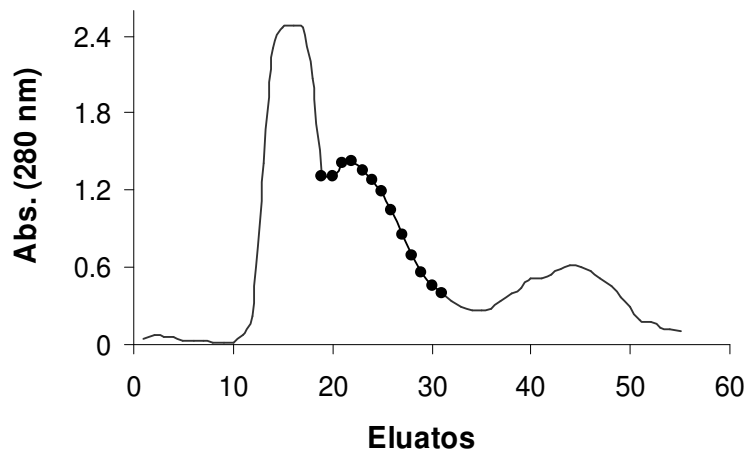


Figura 15 – Cromatografia em coluna de Sephadex G-100 (62,5 x 1,5 cm), equilibrada com tampão Tris/HCl 0,05M contendo NaCl 0,15M, pH 8,0. Amostra: 200mg de extrato de *S. polyphylla*. Fluxo de eluição: 0,3mL/min. Frações de 3mL foram coletadas e monitoradas a 280 nm. “●” círculo cheio indica atividade inibitória dos eluatos coletados.

O fato de não ter sido detectado inibidores de tripsina em *C. catenaeformis* e *P. venosa*, não significa que estas espécies não apresentem inibidores de serinoproteinase, uma vez que os inibidores vegetais apresentam diferença quanto à especificidade por um amplo espectro de enzimas proteolíticas. Pando *et al.* (2001) e Oliveira *et al.* (2002) observaram somente a presença de inibidor de tripsina em sementes de *Delonix regia* e *Caesalpinia echinata*, respectivamente. Já Macedo *et al.* (2003) encontraram inibidores de tripsina e quimotripsina em sementes de *Peltophorum dubium*.

A especificidade dos inibidores por uma classe particular de proteases é atribuída à composição, a conformação do sítio reativo e à arquitetura global da molécula de inibidor, que por sua vez é essencial para a eficiência e estabilidade da proteína, pois os resíduos de aminoácidos específicos do sítio reativo, geralmente, correspondem aos resíduos do sítio ativo da enzima alvo, permitindo a formação de um complexo específico e reversível entre enzima e inibidor (Bode & Huber, 2000; Krauchenco *et al.*, 2003).

A região do sítio reativo, após formação do complexo com a enzima, adquire um grupo carboxílico terminal designado por P1 e um amino terminal designado por P'1. O sítio P1, geralmente determina a especificidade pela enzima alvo. Assim, inibidores com os resíduos de aminoácidos Lys ou Arg no sítio P1, tendem a inibir a tripsina e aqueles inibidores com os resíduos Ala e Ser, inibem elastase, enquanto que a presença dos resíduos Tyr, Phe, Trp, Leu e Met na região P'1 inibem quimotripsina (Cavalcanti *et al.*, 2002; Haq *et al.*, 2004).

Os extratos totais (200 mg) foram submetidos à cromatografia de exclusão molecular, sendo que o CfTI apresentou um rendimento de 23,5 % e SpTI de 0,6 %. Do ponto de vista metodológico, estes resultados refletem o grande problema do baixo rendimento quando se utiliza apenas cromatografia em Sephadex G-100.

Para se obter um inibidor purificado e isolado é necessário a realização de duas ou mais técnicas cromatográficas diferentes. Haq *et al.*, 2005, após utilizarem cromatografia de DEAE-cellulose e de afinidade, isolaram e caracterizaram um inibidor de tripsina, quimotripsina e α -amilase, a partir de sementes de *Phaseolus aureus* Roxb. Kim *et al.* (2006), também isolaram um peptídeo (potide-G: 10 kDa) de tubérculos de batata (*Solanum tuberosum* L. var. Golden Valley) por DEAE-cellulose e HPLC (C₁₈), que apresentou atividade inibitória contra tripsina, quimotripsina e

papaína. Já Bhattacharyya *et al.* (2006), isolaram um inibidor de tripsina (AeTI) de sementes de *Archidendrom ellipticum*, por cromatografia de troca iônica, exclusão molecular e cromatografia de fase reversa em HPLC, apresentando um grau de pureza final de 90 %.

Outros trabalhos que apresentam a purificação de inibidores presentes em sementes de leguminosas são apresentados na tabela 5.

Tabela 5 – Estudos realizados com inibidores de proteinases presentes em espécies da família Leguminosae.

Espécie	Sigla	(kDa)	Especificidade	Referência
<i>Psoralea corylifolia</i>	Psc-AFP	18	Tripsina	Yang <i>et al.</i> , 2006
<i>Dimorphandra mollis</i>	DMTI	20	Tripsina	Mello <i>et al.</i> , 2006
	DMTI-II	23		
<i>Soya bean</i>	SKTI	20	Tripsina	Franco <i>et al.</i> , 2004
<i>Peltophorum dubium</i>	PDTI	20	Tripsina, Quimotripsina	Macedo <i>et al.</i> , 2003a
<i>Delandia umbellata</i>	Delandin	28	Quitinase, transcriptase	Ye & Ng, 2002 (a)
<i>Phaseolus vulgaris</i> cv. Pinto	Phasein A	28	Transcriptase reversa HIV-1	Ye & Ng, 2002 (b)
	Phasein B	32		
<i>Dolichos lablab</i>	Dolichin	28	α -glicosidase, β - glicosidade, Transcriptase	Ye, X. Y.; Wang, H. X.; Ng, T. B., 2000
<i>Vicia faba</i>	Peptídeo	7,5	Tripsina, Quimotripsina	Ye, X. Y.; Ng, T. B.; Rao, P. F., 2001
<i>Phaseolus acutifolius</i>			Tripsina, Quimotripsina	Campos <i>et al.</i> , 1997

Curva de Inibição

A atividade residual da tripsina atingiu os valores mínimos de 0,4 % e 38 %, na presença de 3,8 μg de CfTI (figura 16) e 12 μg de SpTI (figura 17).

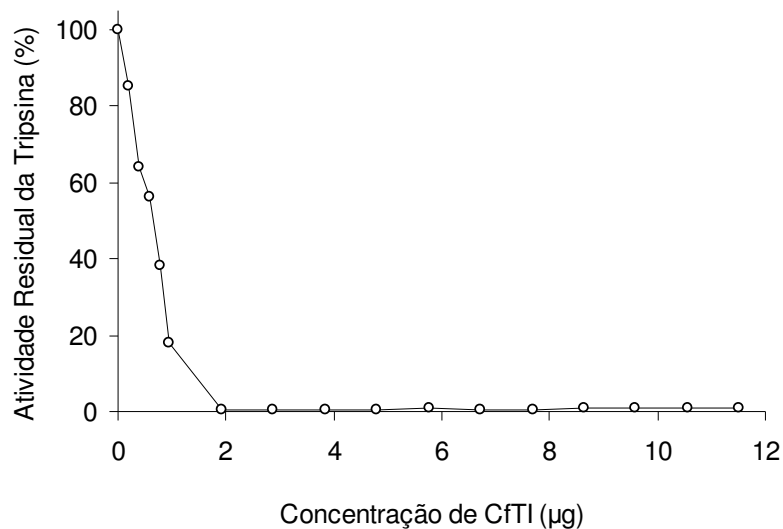


Figura 16 – Curva de inibição da tripsina bovina por CfTI. A atividade inibitória do sítio ativo da tripsina bovina foi determinada pelo ensaio de incubação com DL-BAPNA, na presença de diferentes concentrações do inibidor.

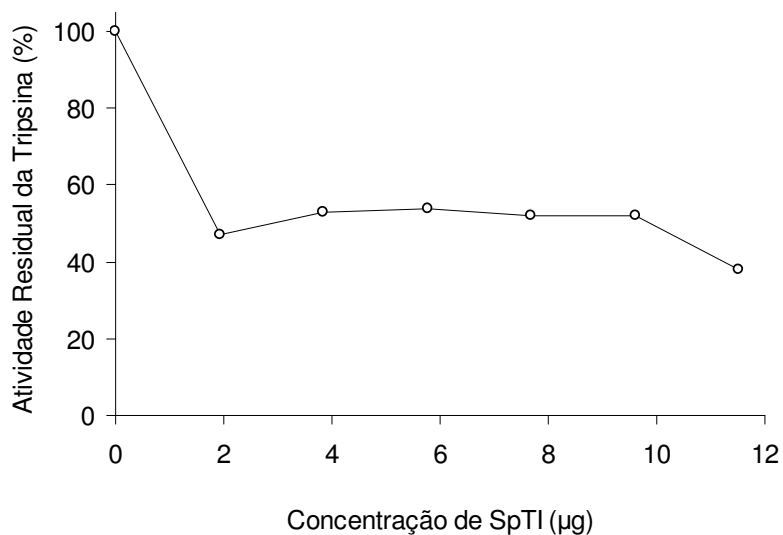


Figura 17 – Curva de inibição da tripsina bovina por SpTI. A atividade inibitória do sítio ativo da tripsina bovina foi determinada pelo ensaio de incubação com DL-BAPNA, na presença de diferentes concentrações do inibidor.

A atividade inibitória exercida por CfTI sobre a tripsina, não diferiu significativamente entre as concentrações 1,9 e 12 µg, apresentando uma atividade residual da enzima de aproximadamente 0,8 %. Isso significa que, nas condições experimentais testadas neste trabalho, a concentração 1,9 µg já apresenta quantidade de inibidor suficiente para ligar-se ao sítio ativo da enzima, não diferindo a ação do mesmo com as concentrações crescentes aplicadas no meio. Quanto a SpTI, entre as concentrações 4 e 10 µg a atividade residual média da enzima foi de 70 %, não apresentando diferença significativa na atividade exercida até a concentração 10 µg.

Esses resultados mostram que a análise da curva de inibição nos permite avaliar qual a melhor concentração necessária para que ocorra a ligação entre enzima e inibidor. Nesse sentido, é válido destacar que o complexo enzima-inibidor pode ser considerado semelhante ao complexo formado entre enzima-substrato, uma vez que o inibidor possui características estruturais semelhantes ao substrato. Assim, a especificidade de cada inibidor para sua enzima alvo resulta no tipo de inibição exercida e da conformação e estrutura do sítio reativo. Logo, a caracterização físico-química do complexo enzima-inibidor é de suma importância para explicar essa especificidade, constatando que todas as famílias de inibidor de serino de plantas são inibidores competitivos (Vieira, 1999; Haq *et al.*, 2004).

Com relação aos estudos de inibidores de proteinases em sementes de leguminosas da região amazônica, constatou-se que pesquisas envolvendo bioquímica destas proteínas são escassas. De acordo com a literatura consultada foi encontrado apenas um artigo, onde os autores demonstraram presença de inibidores de tripsina e quimotripsina em extratos de nove espécies da flora amazônica (*Cassia brasselari*, *Cassia grandis*, *Cassia occidentalis*, *Dialium guianense*, *Inga fagifolia*, *Inga rubiginosa*, *Inga umbratica*, *Inga velutina* e *Mimosa guilandinae*), exceto em *I. fagifolia* e *C. grandis*, que apresentaram apenas inibidor de tripsina. Dessas espécies, *I. umbratica* apresentou inibição de 85,8 % para tripsina e de 99,1 % para quimotripsina (Calderon *et al.*, 2001).

5.2. Lectinas

Detecção de AHE nos extratos totais

Para a detecção da AHE nos extratos totais das espécies em estudo, utilizaram-se hemácias provenientes de camundongo, hamster e rato branco, com o objetivo de selecionar aquela com maior suscetibilidade a hemaglutinação. Os resultados do ensaio de hemaglutinação com extratos de *C. catenaeformis* e *P. venosa* estão apresentados na tabela 6. Para os extratos de *C. ferrea* var. *cearensis* e *S. polyphylla* não detectou-se AHE sobre as hemácias testadas. Estes resultados mostram a especificidade das lectinas, uma vez que o efeito hemaglutinante ocasionado por essas proteínas é dependente da estrutura molecular e estrutural de cada lectina, individualmente (Sharon & Lis, 1995; Chandra *et al.*, 2006).

Tabela 6 – AHE dos extratos totais de *C. catenaeformis* e *P. venosa*, sobre diferentes hemácias de animais.

Hemácias (2%)	Concentração mínima hemaglutinante ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	
	<i>C. catenaeformis</i>	<i>P. venosa</i>
Camundongo	Não houve	0,25
Hamster	0,6	0,25
Rato branco	0,6	0,13

Como a AHE é a propriedade mais conhecida das lectinas, o ensaio de hemaglutinação é o método mais utilizado para detecção dessas proteínas. Porém, esse ensaio pode apresentar resultado falso se a lectina coexistir com inibidores, com substâncias presentes no sangue, glicoproteínas contendo ácido siálico, aminas heterocíclicas, carboidratos e certos íons metálicos, ou ainda, se os receptores para carboidratos presentes nas células não existirem em número suficiente ou estiverem inacessíveis (Toms, 1981).

A ocorrência de hemaglutinação ocorreu na presença de 2,4 μg de proteína total de *C. catenaeformis* e de 4,1 μg de proteína total de *P. venosa*. Este resultado sugere que proteínas da classe das lectinas possam estar presentes nos extratos totais destas espécies (figura 18). Após diluição serial desses extratos foi possível observar que a amostra do extrato total de *C. catenaeformis* ocasionou

hemaglutinação das hemácias de hamster e de rato branco, na presença da concentração mínima de proteína total de 0,6 µg, não tendo ocasionado hemaglutinação nas hemácias de camundongo. Quanto ao extrato total de *P. venosa*, a concentração mínima de proteína total para promover a AHE nas hemácias de camundongo e rato branco foi de 0,25 µg e de 0,13 µg para hemácias de hamster. Estes resultados mostram a especificidade de lectinas por diferentes hemácias.

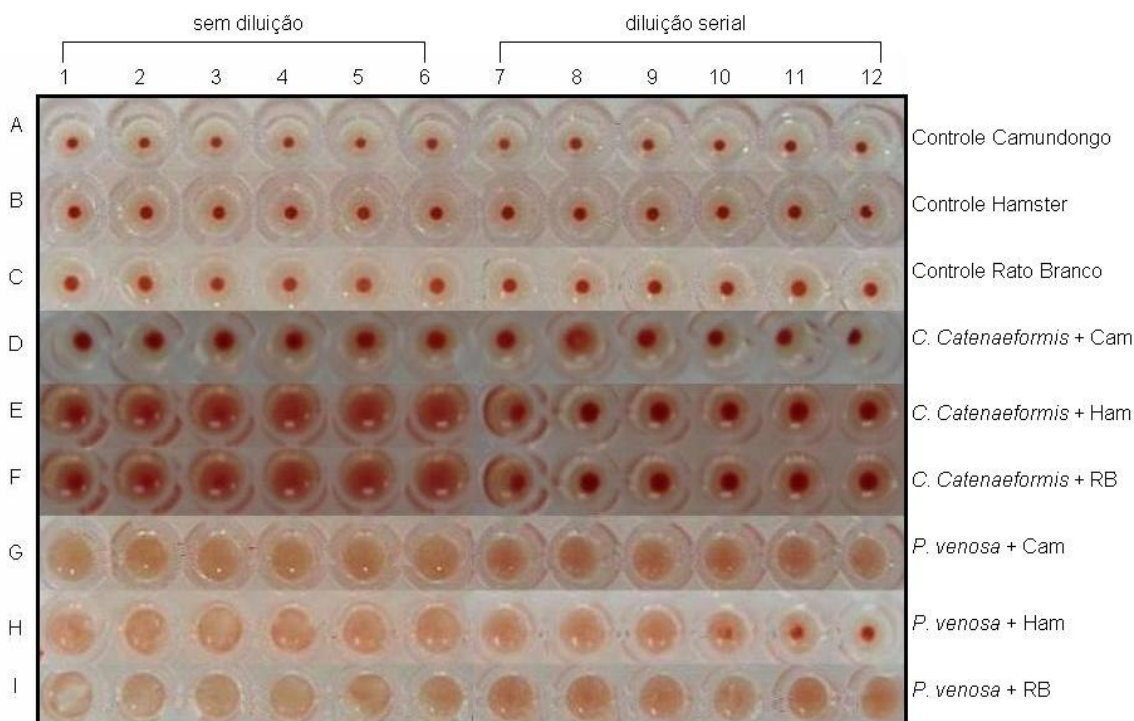


Figura 18 – Ensaio de detecção da AHE nos extratos totais. Legenda: A – controle negativo (hemácias de camundongo); B – controle negativo (hemácias de hamster); C – controle negativo (hemácias de rato branco); D - extrato total de *C. catenaeformis* + hemácias de camundongo; E - extrato total de *C. catenaeformis* + hemácias de hamster; F – extrato total de *C. catenaeformis* + hemácias de rato branco; G - extrato total de *P. venosa* + hemácias de camundongo; H - extrato total de *P. venosa* + hemácias de hamster e I - extrato total de *P. venosa* + hemácias de rato branco.

A presença de AHE em extratos de sementes de leguminosas arbóreas da Amazônia também foi observada por Chevreuil (2007), onde a concentração mínima hemaglutinante de proteína total, após diluição serial, sobre hemácias de camundongo, hamster e rato branco, foi de 5,3 µg para *Sesbania exasperata* e de 1,6 µg para *Tachigali plumbea*.

O estudo da especificidade hemaglutinante sobre diferentes hemácias é demonstrado em muitos estudos envolvendo lectinas de sementes, como a lectina de *Cymbosema roseum* (CRL), que hemaglutinou hemácias de coelho na concentração de 2 µg.mL⁻¹ (Cavada *et al.*, 2006) e a lectina de *Machaerium acutifolium*, que além de hemaglutinar hemácias de coelho também exerceu AHE sobre hemácias do sistema humano ABO (Bezerra *et al.*, 2005). Resultados similares foram encontrados por Leite *et al.* (2002), utilizando extratos de sementes de *Indigofera suffruticosa*.

Apesar do estudo considerado sobre o isolamento de lectinas presente em sementes de leguminosas, ainda existe uma grande lacuna na literatura sobre a presença dessas proteínas em espécies da Amazônia. Desta forma, a detecção, purificação parcial e caracterização de frações com AHE, provenientes de sementes da flora amazônica, poderá contribuir significativamente em estudos posteriores e, conseqüentemente em sua aplicabilidade industrial.

Purificação parcial de frações com AHE

Os perfis cromatográficos das frações com AHE a partir de extratos totais de *C. catenaeformis* e *P. venosa* estão apresentados nas figuras 19 e 20, respectivamente. Após ensaios de detecção da AHE, as frações foram reunidas em um “pool”, dialisadas, liofilizadas e designadas como CeCL e PeVL para lectina de *C. catenaeformis* e de *P. venosa*, respectivamente.

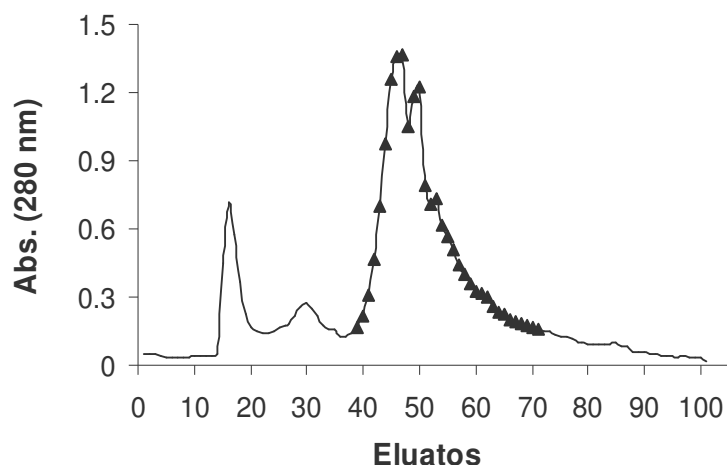


Figura 19 – Cromatografia em coluna de Sephadex G-100 (62,5 x 1,5 cm) equilibrada com tampão Tris/HCl 0,05M contendo NaCl 0,15M, pH 8,0. Amostra: 220mg de extrato liofilizado de *C. catenaeformis*. Fluxo de eluição: 0,3mL/minuto. Frações de 3mL foram coletadas e monitoradas a 280 nm. “▲” triângulo cheio indica AHE dos eluatos coletados.

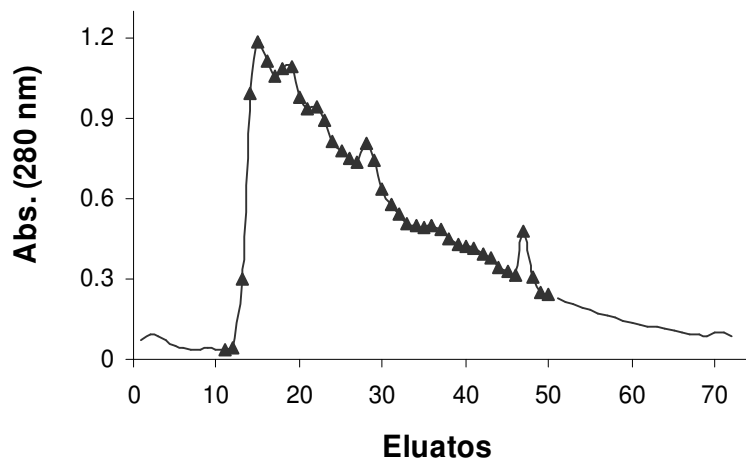


Figura 20 – Cromatografia em coluna de Sephadex G-100 (62,5 x 1,5 cm) equilibrada com tampão Tris/HCl 0,05M contendo NaCl 0,15M, pH 8,0. Amostra: 220mg de extrato liofilizado de *P. venosa*. Fluxo de eluição: 0,3mL/minuto. Frações de 3mL foram coletadas e monitoradas a 280 nm. “▲” triângulo cheio indica AHE dos eluatos coletados.

Nesta etapa cromatográfica foi possível separar apenas frações com AHE, pois para purificar uma lectina torna-se necessário utilizar mais de uma etapa de purificação, como por exemplo a lectina de sementes de *Pouteria torta* (Boleti, 2003) e de frutos de *Cyphomandra betacea* (Sampietro et al., 2001), que foram purificadas por coluna de gel filtração e colunas de troca iônica.

Inibição da AHE de CeCL e PeVL

De acordo com os resultados de inibição da AHE de CeCL, foi possível observar que a hemaglutinação foi inibida na presença de glicose, lactose, sacarose, N-acetilgalactosamina, manose, maltose, galactosamina e α -methyl-mannopyranosil. A lectina isolada de *Parkia discolor* também apresentou especificidade para manose (Cavada et al., 2000).

Quanto a PeVL observou-se que a AHE foi inibida apenas por maltose e N-acetilgalactosamina, e não foi inibida por glicose, lactose, galactose, sacarose, fucose, rafinose, manose, D-galactosamina e α -methyl-mannopyranosil. Extrato de sementes de *T. plumbea* demonstrou o mesmo comportamento para glicose, lactose, sacarose e frutose (Chevreuil, 2007).

Os resultados estão apresentados na tabela 7 e confirmam a especificidade das lectinas por açúcares, o que está diretamente relacionado à sua composição química e estrutural, bem como ao processo de síntese da molécula de proteína (Moreira et al., 1990). Essa síntese resulta no tipo de molécula da lectina, podendo apresentar-se glicosilada ou não. No caso das lectinas de leguminosas, sua síntese geralmente é realizada na forma de precursor, que posteriormente é convertido na proteína madura (Loris, et al., 1998), enquanto que nas não glicosiladas, o processamento pós-traducional, envolve a remoção do grupo glicídico, embora algumas não sejam produzidas na forma de precursor glicosilado (Pusztai, 1991).

Tabela 7 – Efeito dos açúcares sobre a AHE induzida por CeCL e PeVL.

Açúcares	Concentração Mínima Inibitória (CMI)	
	CeCL (mM)	PeVL (mM)
D-glicose	0,024	NI
D-lactose	0,024	NI
D-galactose	NI	NI
D-sacarose	0,024	NI
L-fucose	NI	NI
D-rafinose	NI	NI
D-manose	50	NI
Maltose	25	6,25
D-galactosamina	50	NI
α -methyl-mannopyranosil	50	NI
N-acetil-galactosamina	0,024	0,024

NI: não foi observada inibição da AHE pelo açúcar até a concentração de 100 mM.

O açúcar N-acetil-D-galactosamina, apresentou atividade inibitória para CeCL e PeVL. Resultados similares foram observados para lectinas de *Crotalaria paulina* (Pando, 2001) e para a lectina de *Crotalaria striata*, que também apresentou especificidade por D-galactose e D-galactosamina (Khang *et al.*, 1990). Já a lectina de sementes de *Annona coriacea* apresentou afinidade por manose (Coelho *et al.*, 2006).

Latha *et al.* (2006), mostraram que a AHE exercida pela lectina de sementes de *Dolichos lablab* foi inibida por galactose, galactosamina, lactose, Me β Gal, Me α Gal, GalNAc, 2-DeoxyGal, pNP α Gal, pNP β Gal, lactulose e melibiose. A lectina de *Annona muricata* teve a AHE inibida por N-acetilglicosamina, galactose, glicosamina, glicose e manose (Damico *et al.*, 2003).

Efeito de EDTA na AHE de CeCL e PeVL

Analisando o resultado do efeito de EDTA na AHE de CeCL e PeVL (tabela 8), observou-se que na presença de 50 mM, 25 mM, 12,5 mM e 3,125 mM do agente quelante, houve hemaglutinação, constatando-se que essa AHE não é dependente de cátions divalentes, como Ca^{2+} , Mn^{2+} ou Mg^{2+} , uma vez que não foi inibida por EDTA. No entanto, à medida que o EDTA foi diluído serialmente observou-se inibição da AHE. Estes resultados divergem daqueles encontrados para a maioria das lectinas de leguminosas, que dependem da presença de Ca^{2+} , ou metais de transição para exercerem sua AHE, uma vez que estes íons são necessários para estabilizar os sítios de ligação dos açúcares (Pando *et al.*, 2002; Weis *et al.*, 1996).

Tabela 8 – Efeito do EDTA na AHE em CeCL e PeVL utilizando hemácias de rato branco

EDTA (mM)	Concentração Mínima Inibitória	
	CeCL (mM)	PeVL (mM)
50	NI	NI
25	NI	NI
12,5	NI	NI
6,25	NI	NI
3,125	NI	NI
1.56	I	I

NI: não foi observada inibição da AHE pelo EDTA até a concentração de 50 mM.

I: houve inibição da AHE pelo EDTA

5.3. Dosagem de proteínas

Pode-se verificar maior concentração protéica no extrato das sementes de *S. polyphylla* (tabela 9). Por outro lado, após a etapa cromatográfica o teor de proteína das frações foi menor que o dos seus respectivos extratos, ao contrário do CfTI que apresentou teor de proteínas bem maior que o do extrato de *C. ferrea* var. *cearensis*. Isso pode ser explicado pelo perfil cromatográfico de *C. ferrea* var. *cearensis*, uma vez que foi o que apresentou melhor separação das frações com atividade inibitória.

Tabela 9 – Quantificação do teor de proteínas totais nos extratos e nas frações das espécies.

Amostra	Proteína total ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
<i>C. ferrea</i> var. <i>cearensis</i> (extrato total)	52,3
CfTI	192
<i>S. polyphylla</i> (extrato total)	269
SpTI	96
<i>C. catenaeformis</i> (extrato total)	48
CeCL	19,4
<i>P. venosa</i> (extrato total)	81,5
PeVL	6,7

5.4. Eletroforese em SDS – PAGE

A análise do perfil protéico dos extratos totais (figura 21) mostra que as quatro espécies apresentaram bandas de proteínas com valores de massas moleculares aparentes acima de 10 kDa e abaixo de 80 kDa, as quais foram melhor evidenciadas nos extratos de *C. ferrea* var. *cearensis*, *C. catenaeformis* e *P. venosa*. Entretanto, é válido ressaltar que o extrato de *C. catenaeformis* apresentou apenas uma banda de aproximadamente 50 kDa.

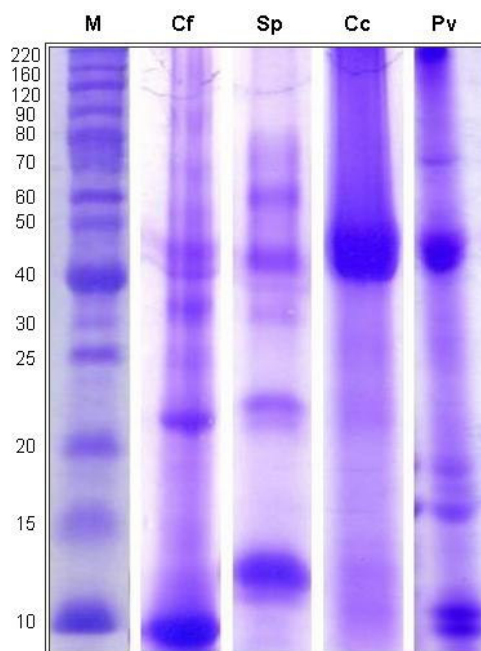


Figura 21 - Eletroforese em SDS-PAGE (12,5%). Cf: 30 µg de extrato total de *C. ferrea* var. *cearensis*; Sp: 30 µg de extrato total de *S. polyphylla*; Cc: 30 µg de extrato total de *C. catenaeformis* e Pv: 30 µg de extrato total de *P. venosa*. M: marcadores de massa molecular: BenchMark Protein Ladder (220 kDa – 10 kDa). kDa: kilodalton. As bandas de proteínas foram coradas com Coomassie brilliant blue R-250.

Considerando o perfil eletroforético das frações parcialmente purificadas (figura 22), observou-se que o CfTI apresentou uma banda protéica principal com massa molecular de aproximadamente 10 kDa, enquanto que em SpTI verificou-se o mesmo perfil protéico que do extrato total, mesmo após cromatografia de exclusão molecular. Isto mostra a necessidade de outras técnicas cromatográficas para

purificar as proteínas de interesse das outras bandas visualizadas. Estes resultados comprovam a presença de inibidores de proteinases em *C. ferrea* var. *cearensis* e *S. polyphylla*, pois os inibidores tipo Kunitz e Bowman-Birk geralmente, apresentam em sementes de leguminosas massas moleculares entre 18-22 kDa e 8-10 kDa, respectivamente (Carlini & Grossi-de-Sá, 2002; Park *et al.*, 2004).

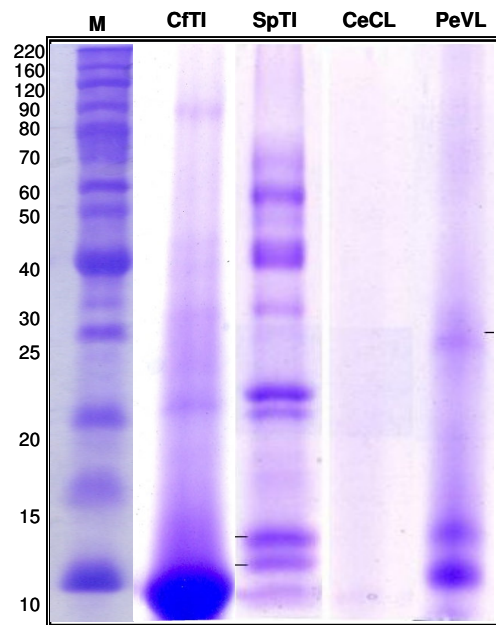


Figura 22 - Eletroforese em SDS-PAGE (12,5 %). CfTI e SpTI: 30 µg de frações com atividade inibitória; CeCL e PeVL: 30 µg de frações com AHE. M: marcadores de massa molecular: BenchMark Protein Ladder (220 kDa – 10 kDa). kDa: kilodalton. As bandas de proteínas foram coradas com Coomassie brilliant blue R-250.

No que se refere às proteínas de CeCL pode-se observar que, nas condições do ensaio, não foi possível estimar a presença de bandas protéicas no gel. Isto pode ter ocorrido por perda de atividade das proteínas após liofilização ou até mesmo pelo baixo rendimento. Por outro lado, PeVL apresentou uma banda de aproximadamente 26 kDa, o que confirma a possível presença de lectinas.

A massa molecular das subunidades da maioria das lectinas de legume está em torno de 30 kDa, com a lectina completamente ativa, formando dímeros ou

tetrâmeros com múltiplos sítios de ligação para carboidrato. A associação das subunidades da lectina pode ser estabelecida por pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e pontes dissulfeto (Rudiger, 1998).

Adicionalmente, na presença de DTT, agente redutor utilizado para clivar as ligações dissulfeto entre as subunidades das proteínas, não houve diferença no padrão de migração das proteínas no gel. Coelho *et al.* (2003) verificaram que, mesmo após purificação, o perfil eletroforético da lectina estudada revelou massa molecular aparente de 14 kDa, na presença e na ausência de um agente redutor.

5.5. Análise do efeito inibitório *in vitro* dos extratos totais contra fungos fitopatogênicos

Efeito dos extratos sobre o crescimento micelial e a esporulação de Colletotrichum guaranicola

Os efeitos dos extratos de *C. ferrea* var. *cearensis* e *C. catenaeformis* sobre o crescimento micelial do fungo não foram significativos, ao contrário do efeito sobre a esporulação (figuras 23 e 24). Esses resultados sugerem que a atividade antifúngica *in vitro* destes extratos sobre *C. guaranicola* pode estar concentrada fundamentalmente sobre a inibição da esporulação, uma vez que a diminuição do número de conídios das colônias foi crescente como resposta ao aumento nas concentrações de proteínas totais testadas.

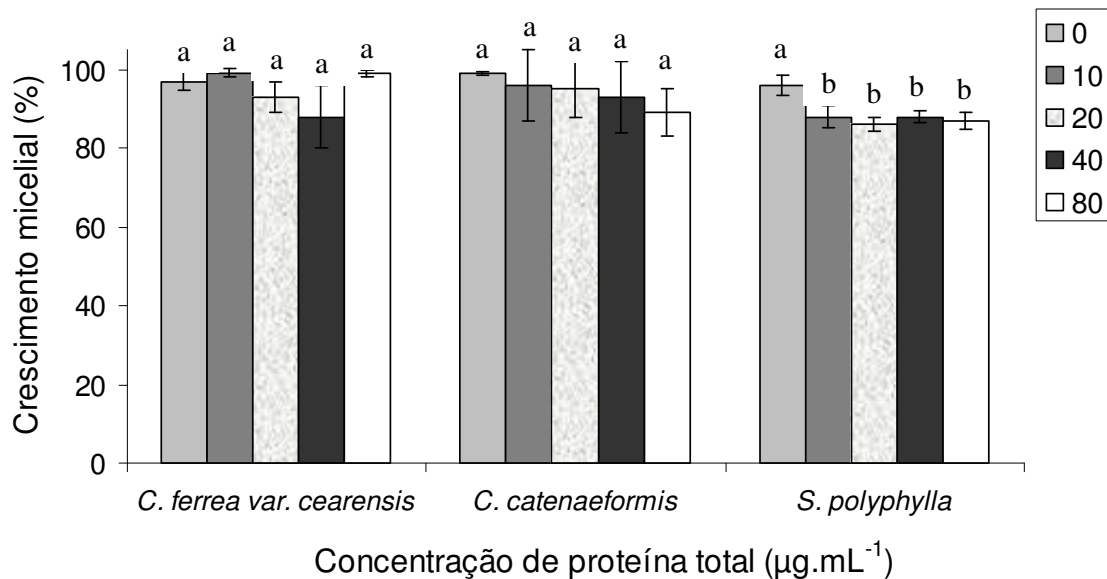


Figura 23 - Efeito dos extratos de *C. ferrea* var. *cearensis*, *C. catenaeformis* e *S. polyphylla* sobre o crescimento micelial de *C. guaranicola*. "0" Controle representado pelo crescimento fúngico em meio batata-dextrose-ágar sólido; As barras representam os desvios padrão (± 1). Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% (n=30).

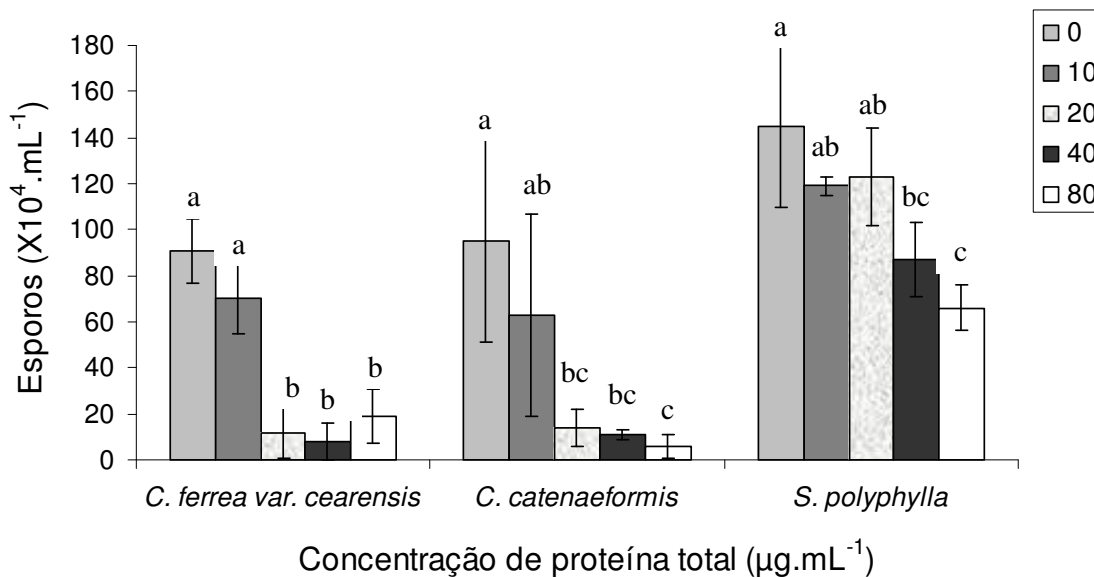


Figura 24 - Efeito dos extratos de *C. ferrea var. cearensis*, *C. catenaeformis* e *S. polyphylla* sobre a esporulação de colônias de *C. guaranicola*. “0” Controle representado pelo crescimento fúngico em meio batata-dextrose-ágar sólido; As barras representam os desvios padrão (± 1). Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% (n=30).

Adicionalmente, os resultados indicam que, apesar dos extratos não terem ocasionado efeito sobre o crescimento da colônia, os mesmos podem exercer algum efeito na morfologia do fungo, uma vez que diminuiu significativamente a produção de esporos. Assim, a utilização destes extratos para o controle de *C. guaranicola* não impede que o fungo inicie o processo de infecção nas plantas, mas atuam no metabolismo deste fungo, particularmente na estrutura reprodutiva, resultando na diminuição da proliferação da doença. Já o efeito do extrato de *S. polyphylla* foi significativo tanto na diminuição do crescimento micelial quanto da esporulação.

O extrato de *C. ferrea var. cearensis* apresentou o máximo de inibição da esporulação (91 %) com o tratamento 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, embora já tenha ocorrido uma inibição média (54 %) com as menores concentrações. Com relação ao extrato de *C. catenaeformis* a diminuição média do número de conídios das colônias foi crescente de acordo com as concentrações de proteína total, apresentando inibição aproximada da esporulação de 34 % (10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), 85 % (20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), 89 % (40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e 95 % (80 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Estes resultados indicam a especificidade de extratos vegetais no efeito antifúngico de fitopatógenos.

Ribeiro & Bedendo (1999) ao estudarem o efeito de extratos vegetais sobre *Colletotrichum gloeosporioides*, verificaram que todos os extratos testados apresentam propriedade antifúngica, diminuindo o crescimento micelial e a esporulação do fungo. Bonaldo *et al.* (2004), observaram que a germinação máxima de conídios de *Colletotrichum lagenaria* foi de 75 % na presença de extratos de *Eucalyptus citriodora* e Balbi-Peña *et al.* (2006), ao avaliarem o efeito de extratos brutos de *Curcuma longa*, verificaram inibição máxima de 38,2 % no crescimento micelial e de 87 % na esporulação de *Alternaria solani*.

Quando comparado ao controle, em todas as concentrações de proteína total do extrato de *S. polyphylla*, pode-se verificar uma diminuição no número de conídios das colônias do fungo, porém esta inibição não foi superior a 45 % ($80 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Por outro lado, quando comparado à concentração $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$, que inibiu apenas 15 %, ocorreu uma diferença significativa. Isso indica que, caso esse efeito ocasionado seja devido a inibidores presentes nesse extrato, a aplicação desses possíveis inibidores purificados poderá exercer um efeito bem mais significativo e em concentrações também bem menores que as testadas neste trabalho. Como mostra Yang *et al.* (2006), em que Psc-AFP, inibidor de tripsina isolado de sementes de *Psoralea corylifolia*, na concentração de 10 mM inibiu o crescimento micelial de *Alternaria brassicae*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* e *Rhizoctonia cerealis*.

Muitos estudos demonstraram que inibidores de proteinases e lectinas apresentaram efeito contra fungos fitopatogênicos, seja na inibição do crescimento micelial, na esporulação, na morfologia e/ou germinação de esporos, como o estudo realizado por Pando (2001), em que inibidores de tripsina de *Crotalaria juncea* (CjTI), de *Crotalaria spectables* (CsTI), de *Bauhinia variegata var. candida* (BvcTI) e de *Phaseolus vulgaris* (PvTI) apresentaram efeito sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum graminicola* do sorgo.

O efeito das concentrações de proteína na esporulação do fungo mostrou que em $80 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de proteína total, o extrato de *C. ferrea* var. *cearensis* apresentou uma menor inibição comparada com as outras concentrações, sendo ainda assim menor que o controle, bem como o extrato de *S. polyphylla* também apresentou menor inibição no crescimento da colônia em 40 e $80 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e da esporulação na concentração $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Resultados similares foram encontrados por Motoyoma *et al.* (2003) que ao avaliarem o efeito de extratos cítricos sobre *Colletotrichum*

lagenarium, observaram que em 10 ppm houve uma menor inibição do fungo comparado à inibição apresentada em 1 ppm e nas demais concentrações houve uma inibição crescente do fungo, chegando a 70 %. Esse comportamento pode ocorrer, devido ao fator genético das colônias, visto que cada colônia apresenta características genotípicas diferenciadas, podendo resultar na produção de hifas e esporos em quantidades distintas.

Efeito dos extratos sobre o crescimento micelial e a esporulação de Corynespora cassiicola

Os resultados dos extratos sobre o crescimento micelial e sobre a esporulação de *C. cassiicola* são apresentados nas figuras 25 e 26. Pode-se observar que houve diferença entre os tratamentos, porém sobre o crescimento micelial, apenas o extrato de *S. polyphylla* não apresentou efeito significativo. Por outro lado, a diminuição do crescimento micelial ocasionada pelos extratos de *C. ferrea* var. *cearensis* e *C. catenaeformis* só foi significativa a partir da concentração 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, não diferindo de 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 80 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

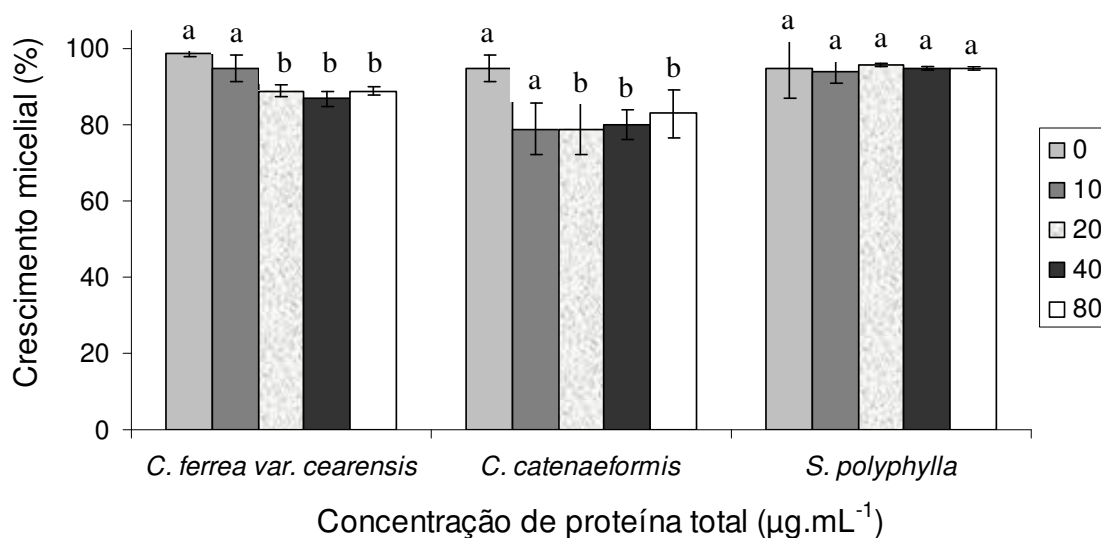


Figura 25 - Efeito dos extratos de *C. ferrea* var. *cearensis*, *C. catenaeformis* e *S. polyphylla* sobre o crescimento micelial de colônias de *C. cassiicola*. “0” Controle representado pelo crescimento fúngico em meio batata-dextrose-ágar sólido para crescimento micelial; As barras representam os desvios padrão (± 1). Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% (n=30).

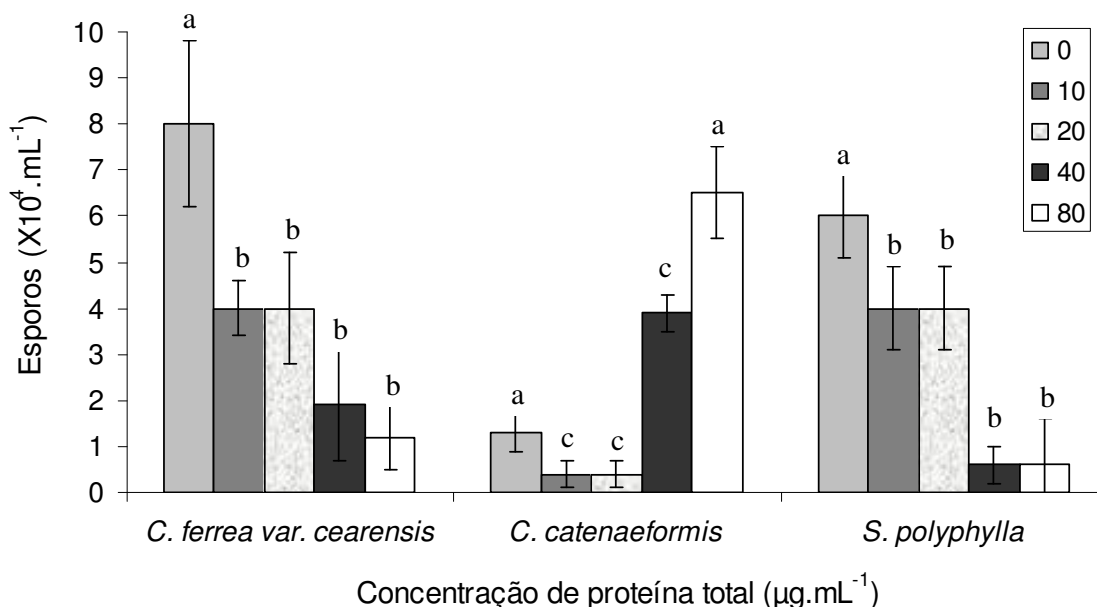


Figura 26 - Efeito dos extratos de *C. ferrea var. cearensis*, *C. catenaeformis* e *S. polyphylla* sobre a esporulação de colônias de *C. cassiicola*. “0” Controle representado pelo crescimento fúngico em meio batata-dextrose-ágar sólido para esporulação; As barras representam os desvios padrão (± 1). Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% ($n=30$).

Quando comparado com o controle, o efeito dos extratos sobre a esporulação mostrou resultados satisfatórios, uma vez que a inibição máxima ocasionada pelos extratos de *C. ferrea var. cearensis*, *C. catenaeformis* e *S. polyphylla*, no número de esporos produzidos, foi em torno de 74 %, 68 % e 47 %, respectivamente. Porém entre os tratamentos com os extratos de *C. ferrea var. cearensis* e *S. polyphylla* não foi verificada diferença estatística.

Pode-se verificar ainda que a diminuição da esporulação do fungo foi crescente nas concentrações menores do extrato de *C. catenaeformis*, porém, a concentração $80 \mu\text{g.mL}^{-1}$ não diferiu estatisticamente do controle. Provavelmente, nas condições experimentais do ensaio, fatores como a solubilidade e presença de espuma nas soluções do extrato quando acrescentados ao meio de cultura podem ter interferido no desenvolvimento da colônia.

Os extratos de *C. catenaeformis* e *C. ferrea var. cearensis* ocasionaram diminuição máxima do crescimento micelial do fungo de aproximadamente 20 % e

12 %, respectivamente. Estes resultados evidenciam a especificidade do efeito de cada extrato, uma vez que a curva de crescimento é um parâmetro que possibilita verificar os diferentes comportamentos miceliais dos fungos, representando os valores indicativos para o desenvolvimento micelial de cada espécie fúngica sob o efeito de cada concentração do extrato, como também outros fatores como meio de cultura, características do extrato e solventes, dentre outros fatores que possivelmente possam interferir na atividade antifúngica do extrato, como mostra o trabalho realizado por Aqil & Ahmad (2003), em que extratos de *Caesalpinia bonducella* inibiram o crescimento micelial de *Fusarium chlamydosporum*, *Rhizoctonia bataticola*, *Aspergillus niger* e *Alternaria alternata*.

Efeito dos extratos sobre o crescimento micelial e a esporulação de Fusarium oxysporum

A análise de variância do efeito dos extratos sobre o crescimento micelial e a esporulação de colônias de *F. oxysporum* apresentou diferença estatística entre os tratamentos. Estes resultados indicam que os três extratos testados apresentam efeito sobre o fungo, tanto sobre a estrutura vegetativa quanto reprodutiva (figuras 27 e 28).

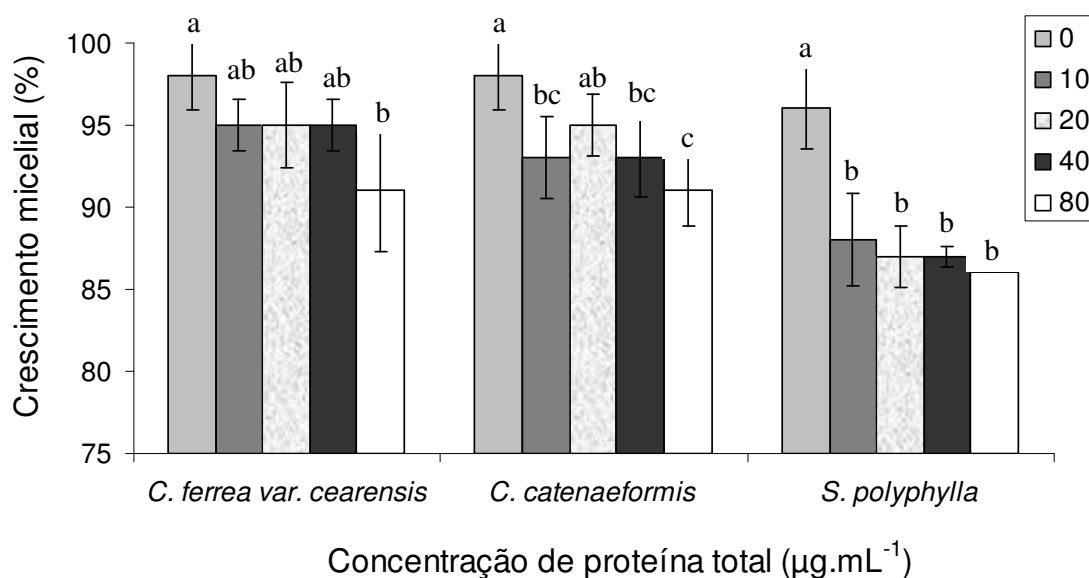


Figura 27 - Efeito dos extratos de *C. ferrea var. cearensis*, *C. catenaeformis* e *S. polyphylla* sobre o crescimento micelial de colônias de *F. oxysporum*. “0” Controle representado pelo crescimento fúngico em meio batata-dextrose-ágar sólido para crescimento micelial; As barras representam os desvios padrão (± 1). Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% (n=30).

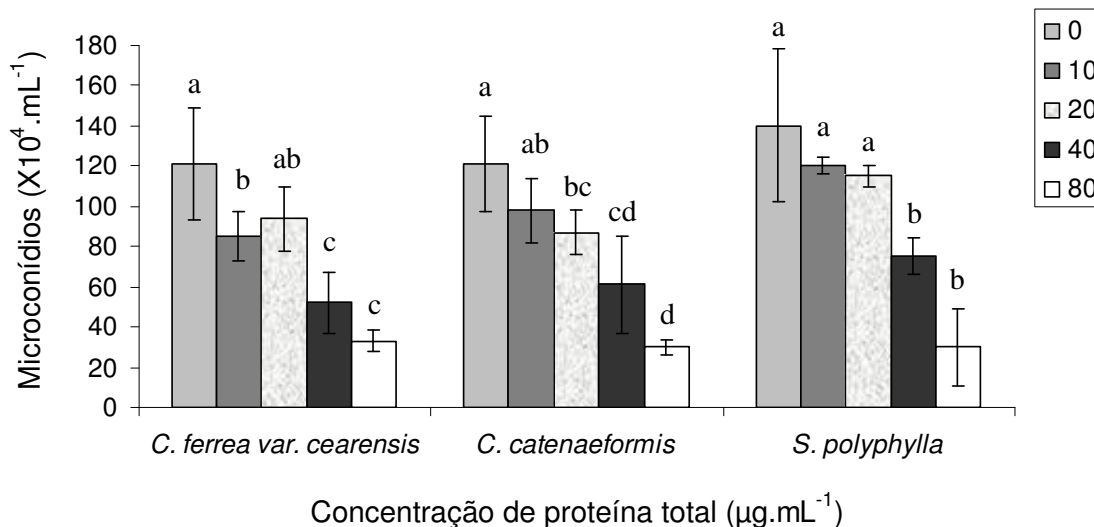


Figura 28 - Efeito dos extratos de *C. ferrea var. cearensis* , *C. catenaeformis* e *S. polyphylla* sobre a esporulação de colônias de *F. oxysporum*. “0” Controle representado pelo crescimento fúngico em meio batata-dextrose-ágar sólido para esporulação; As barras representam os desvios padrão (± 1). Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% (n=30).

O efeito das concentrações de extrato de *C. ferrea var. cearensis* sobre o crescimento micelial do fungo, quando comparados com o controle, mostram que apenas a concentração 80 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ apresentou diferença, o que não ocorreu entre os tratamentos, indicando com isso que as concentrações de proteína total testadas não diferem quanto ao efeito sobre o crescimento das colônias. Apesar dessa concentração ter apresentado diferença significativa em relação ao controle, não se pode afirmar que a mesma seja melhor que as menores concentrações testadas, uma vez que inibiu apenas 7,4 % do crescimento da colônia.

Quanto ao efeito do extrato de *C. ferrea var. cearensis* sobre a esporulação, as concentrações 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 80 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foram as que apresentaram melhor efeito na diminuição do número de microconídios do fungo, apresentando inibição aproximada de 57 % e 73 %, respectivamente.

De acordo com os resultados do efeito do extrato de *C. catenaeformis* sobre *F. oxysporum*, apesar de significativo, a inibição máxima do crescimento micelial foi

de aproximadamente 7,5 %, enquanto que o efeito sobre a esporulação apresentou uma inibição da produção de microconídios de 18 %, 28 %, 50 % e 75 % para as concentrações 10, 20, 40 e 80 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente.

Por outro lado, o efeito do extrato de *S. polyphylla* sobre o crescimento da colônia foi de no máximo 10 % e a melhor concentração que ocasionou diminuição do número de microconídios das colônias em relação ao controle foi a 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, com diminuição de aproximadamente 47 %.

O inibidor de tripsina do milho, na concentração de 7,1 mM, inibiu o crescimento micelial e a esporulação de *Fusarium oxysporum* (Chen *et al.*, 1999). Um inibidor de feijão lima (lunatisin) apresentou inibição de 50 % em *F. oxysporum* na concentração de 1,9 mM (Wong & Ng, 2005). O inibidor de tripsina isolado da batata (Potamin-1) e o inibidor AFP-J inibiram o crescimento micelial de alguns fitopatógenos na concentração de 100 mM (Kim *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2005).

Pando (2001) avaliou o efeito de inibidores de tripsina sobre *Fusarium sp* da cana-de-açúcar, demonstrando que CpTI e PvTI não apresentaram efeito no crescimento micelial das colônias, enquanto que CjTI e BvcTI além de diminuir o crescimento da colônia, também ocasionaram mudança sobre a morfologia do fungo, que apresentou diferença no arranjo e diminuição da concentração das hifas, quando comparado com o controle. Este estudo ainda mostrou que o inibidor de tripsina de soja estimulou o crescimento de hifas aéreas.

Fortes *et al.* (1999), realizaram um experimento em que avaliaram o efeito de Ecolife e *Allium sativum* nas concentrações de 500, 1.000, 5.000 e 10.000 ppm sobre o desenvolvimento de *Colletotrichum lindemuthianum* e *Fusarium oxysporum*. Os resultados mostraram que Ecolife na concentração de 10.000 ppm inibiu o crescimento micelial de *C. lindemuthianum* em 74 % e de *F. oxysporum* em 56 %.

Silva *et al.* (2005), ao avaliarem o efeito do extrato de *Pterodon emarginatus* sobre o desenvolvimento de fungos fitopatogênicos, demonstram que o crescimento micelial de *Alternaria brassicae*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* e *Ceratocystis fimbriata* foi reduzido significativamente na presença do extrato, apresentando uma inibição de 70 %, 74 %, 62 % e 82 %, respectivamente.

Uma glicoproteína (EcV) isolada de *Enterolobium contortisiliquum* exerceu efeito inibitório sobre o crescimento e a germinação de esporos de *Fusarium solani* nas concentrações 10 e 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Moura *et al.*, 2007).

Efeito dos extratos sobre o crescimento micelial e a esporulação de Sclerotium rolfsii

Os efeitos dos extratos sobre o crescimento micelial (figura 29) de *S. rolfsii* diferiram estatisticamente entre si ao nível de 5 % de probabilidade, exceto o extrato de *C. catenaeformis*. Em relação ao efeito na esporulação (figura 30) as concentrações de proteína dos extratos de *C. ferrea* var. *cearensis* e *C. catenaeformis* apresentaram efeito significativo, ao contrário de *S. polyphylla*, que não apresentou efeito.

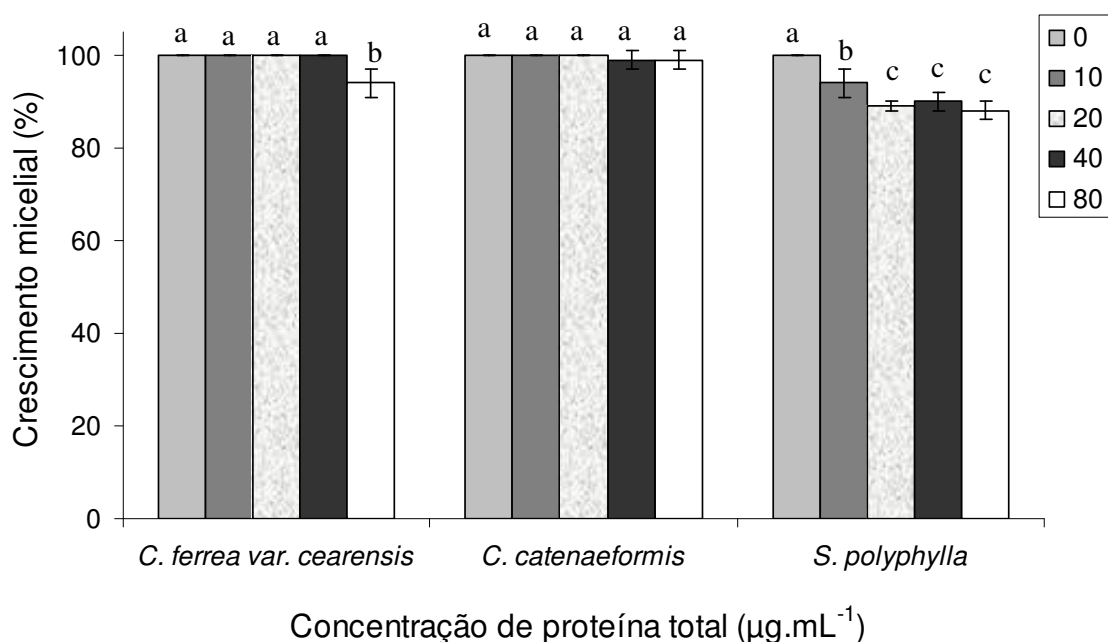


Figura 29 - Efeito dos extratos de *C. ferrea* var. *cearensis*, *C. catenaeformis* e *S. polyphylla* sobre o crescimento micelial de colônias de *S.rolfsii*. "0" Controle representado pelo crescimento fúngico em meio batata-dextrose-ágar sólido para crescimento micelial; As barras representam os desvios padrão (± 1). Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% (n=30).

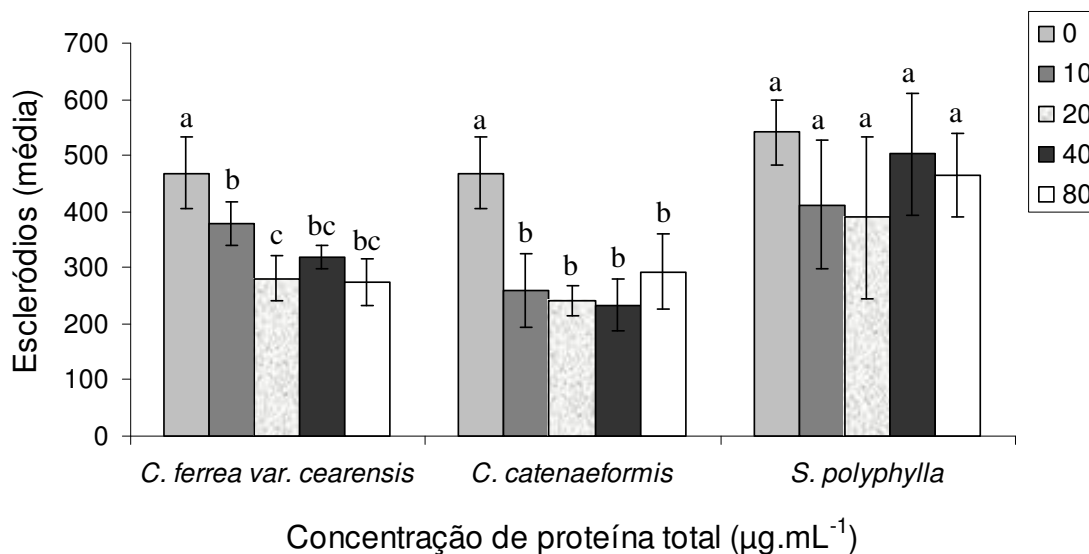


Figura 30 - Efeito dos extratos de *C. ferrea var. cearensis*, *C. catenaeformis* e *S. polyphylla* sobre a produção de escleródios de colônias de *S.rolfissii*. “0” Controle representado pelo crescimento fúngico em meio batata-dextrose-ágar sólido para esporulação; As barras representam os desvios padrão (± 1). Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% (n=30).

Esses resultados evidenciam que cada extrato apresenta característica distinta diretamente associada à sua especificidade. Especificidade esta que pode ser relacionada às características próprias de cada subfamília, de cada gênero e de cada espécie, como em estudo realizado por Jesus (2003), em que diferentes concentrações (0, 1, 0,01 e 0,001 mg/ μ L) de extratos do ritidoma, da casca, do caule, dos frutos e das sementes de diferentes espécies de *Swartzia* (*S. argentea*, *S. laevicarpa*, *S. panacoco*, *S. polyphylla* e *S. sericea*) apresentaram diferença significativa entre as médias do crescimento micelial de fungos degradadores de madeira (*Pycnoporus sanguineus*, *Trametes villosa* e *Lenzites trabea*), sendo que *L. trabea* demonstrou ser mais sensível aos extratos testados, principalmente nas concentrações menores.

Exsteen *et al.* (2001) também realizaram um estudo em que extratos vegetais de onze espécies apresentaram efeito antifúngico contra sete fungos fitopatogênicos (*Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani*, *Verticillium dahliae*, *Botryosphaeria dothidea* e *Pythium ultimum*), diminuindo o crescimento micelial em aproximadamente 40 %, porém o extrato de *Eucomis*

autumnalis foi o mais efetivo, apresentando um efeito semelhante ao ocasionado por um fungicida sintético.

Cunico *et al.* (2003), demonstraram que extrato de *Ottonia martiana* exerceu inibição do crescimento micelial acima de 40 % de *Cylindrocladium spathulatum* em folhas de *Ilex paraguariensis* (erva-mate) e Fiori *et al.* (2000) observaram que as lectinas de *Dioclea violacea* foram mais eficientes em inibir a germinação de esporos de *Fusarium sp.*, *Puccinia sp.*, *Fusarium semitectum* e *Colletotrichum lagenarium*, enquanto que as lectinas de *Cratylia floribunda* proporcionaram maior inibição de *C. lagenarium*. Já Giudici *et al.* (2000), isolou uma proteína de flores de *Helianthus annuus* que apresentou completa inibição da germinação de ascósporos de *Sclerotinia sclerotiorum* na concentração de 5 µg.mL⁻¹ da proteína.

Vale ressaltar ainda que extratos vegetais podem atuar na redução de doenças e pragas ocasionadas nas plantas, a exemplo do LONLIFE, um produto natural à base de extratos cítricos, que na menor concentração testada, ocasionou redução significativa do diâmetro das colônias de *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium solani*, *Alternaria solani* e *Rhizoctonia solani* (Fortes *et al.*, 1997). Desta forma, *C. ferrea* var. *cearensis*, *C. catenaeformis* e *S. polyphylla* são espécies promissoras para a produção de produtos naturais que tenham o objetivo de controlar *S. rolfsii*, desde que outros ensaios comprovem a sua eficiência no controle deste patógeno.

6. CONCLUSÃO

Apenas os extratos de *C. ferrea* var. *cearensis* e *S. polyphylla* apresentaram inibidores específicos para tripsina bovina, podendo ser caracterizados como inibidores de serinoproteinases. Por outro lado, nos extratos de *C. catenaeformis* e *P. venosa* algumas frações apresentaram AHE, indicando que estas espécies podem conter lectinas em suas sementes, o que evidencia que as subfamílias Caesalpinoideae, Mimosoideae e Papilionoideae podem diferir quanto à presença e especificidade de inibidores de proteinases e lectinas.

Os extratos de *C. ferrea* var. *cearensis*, *C. catenaeformis* e *S. polyphylla* são promissores para futuros estudos relacionados a prospecção de fungicidas naturais, uma vez que diminuíram o crescimento micelial e a esporulação de *C. guaranicola*, *C. cassicola*, *F. oxysporum* e *S. rolfssi*.

Investimentos na purificação, isolamento, caracterização físico-química e biológica das frações parcialmente purificadas neste trabalho, podem contribuir para identificar as substâncias ativas responsáveis pela diminuição do crescimento micelial e da esporulação de *C. guaranicola*, *C. cassicola*, *F. oxysporum* e *S. rolfssi*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aqil, F.; Ahmad, I. 2003. Broad-spectrum antibacterial and antifungal properties of certain traditionally used Indian medicinal plants. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 19(6): 653-657.
- Arai, S.; Matsumoto, I.; Abe, K. 1998. Phytocystatins and their target enzymes: From molecular biology to practical application: A review. *Journal of Food Biochemistry*, 22(4): 287-299.
- Argôlo, A.C.C.; Coelho, L.C.B.B.; Pletsch, M. 2005. Produção de Lectinas por culturas de raízes de *Bauhinia monandra* (Sabaceae). *Sociedade Brasileira de Química: Resumos*, (23): 786.
- Ayoama, H.; Cavagis, A.D.M.; Taga, E.M.; Ferreira, C.V. 2001. Endogenous lectin as possible regulator of the hydrolysis of physiological substrates by soybean seed acid phosphatase. *Phytochemistry*, 58(2): 221-225.
- Azzouz, H.; Cherqui, A.; Campan, E.D.M.; Rahbé, Y.; Duport, G.; Jouanin, L.; Kaiser, L.; Giordanengo, P. 2005. Effects of plant proteinase inhibitors, oryzacystatin I and soybean Bowman-Birk inhibitor, on the aphid *Macrosiphum euphorbiae* (Homoptera, Aphididae), and its parasitoid *Aphelinus abdominalis* (Hymenoptera, Aphelinidae). *Journal of Insect Physiology*, (51): 75-86.
- Balbi-Peña, M.I.; Becker, A.; Stangarlin, G.F.; Lopes, M.C.; Schwan-Estrada, K.R.F. 2006. Controle de *Alternaria solani* em tomateiro por extratos de *Curcuma longa* e curcumina – I. Avaliação in vitro. *Fitopatologia Brasileira*, 31(3): 310-314.
- Balestrazzi, A.; Confalonieri, M.; Odoardi M.; Ressegotti, V.; Allegro G.; Tava A.; Carbonera D. 2004. A trypsin inhibitor cDNA from a novel source, snail medic (*Medicago scutellata* L.): cloning and functional expression in response to wounding, herbivore, jasmonic and salicylic acid. *Plant Science*, 167: 337-346.
- Barreto, M. 1997. Doenças do amendoim (*Arachis hypogaea* L.). In: Kimati, H.; Amorim, L.; Bergamin Filho, A.; Camargo, L. E. A.; Rezende, J. A. M. (Eds). *Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas*, v.2. Universidade de

- São Paulo/Escola Superior de agricultura "Luiz de Queiroz, São Paulo, SP. p. 65-77.
- Barrett, A.J. 1986. The classes of proteolytic enzymes. *In: Dalling, M.J., (ed.). Plant Proteolytic Enzymes*, v. 1, Florida: CRC Press, p. 1-6.
- Belitz, H.D.; Weder, J.K.P. 1990. Protein inhibitor of hydrolases in plant foodstuffs. *Food Reviews International*, 6(2): 151-211.
- Bentes, J.L.S.; Barreto, R.W. 2004. Reavaliação taxonômica de *Colletotrichum guaranicola* Albuq. agente causal da antracnose do guaranazeiro. *Acta Amazônica*, 34(1): 129-131.
- Berg, J.M.; Tymoczko, J.L.; Stryer, L. 2004. *Bioquímica*. 5a edição. Guanabara Koogan S. A. p. 43-118.
- Bezerra, D.P.; Leite, K.B.; Aragão, K.S.; Nagano, C.S.; Nascimento, K.S.; Goersch, G.V.; Gadelha, C.A.A.; Nunes, E.P.N.; Cavada, B.S. 2005. Caracterização bioquímica de uma lectina presente em sementes de *Machaerium acutifolium* (Leguminosae, Papilionoideae-Dalbergaceae). *54º Congresso Nacional de Botânica e 3º reunião amazônica de Botânica*, Belém/ PA, (1): R0062.
- Bhattacharyya, A.; Mazumdar, S.; Leighton, S.M.; Babu, C.. 2006. A Kunitz proteinase inhibitor from *Archidendron ellipticum* seeds: purification, characterization, and kinetic properties. *Phytochemistry*, 67: 232-241.
- Birk, Y. 1985. The Bowman-Birk inhibitor Trypsin-and and chymotrypsin-inhibitor from soybeans. *International Journal of Peptide and Protein Research*, 25(2): 113-131.
- Birk, Y. 1996. Protein proteinase inhibitors in legume seeds-overview. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 44(4): 26S-30S.
- Bode, W.; Huber, R. 1992. Proteinase-protein inhibitor interaction. *Biomedica Biochimica Acta*, 50:437-446.
- Bode, W.; Huber, R. 2000. Structural basis of the endoproteinase-protein inhibitor interaction. *Biochimica et Biophysica Acta*, (1477): 241-252.
- Boleti, A.P.A. 2003. Isolamento, caracterização físico-química e estudo da atividade inseticida e fungicida da lectina de sementes de *Pouteria torta* (Mart.) Radlk. Tese

- de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas/Instituto de Biologia, Campinas, São Paulo. 117p.
- Bonaldo, S.M.; Schwan-Estrada, K.R.F.; Stangarlin, J.R.; Tessmann, D.J.; Scapim, C.A. 2004. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de pepino contra *Colletotrichum lagenaria* pelo extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora*. *Fitopatologia Brasileira*, 29: 128-134.
- Bueno, F.; Lucca, L.L.; Collaziol, D.; Farias, F.M.; Vozári-Hampe, M.M. 2004. Propriedades biológicas da lectina de *Mikania laevigata*. *XVI Salão de Iniciação Científica e XIII Feira de Iniciação Científica: Sessões temáticas - Ciências Biológicas*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul., RESUMO 1:338.
- Calderon, L.A.; Teles, R.C.L.; Leite, J.R.S.A.; Block, C.Jr.; Astolfi-Filho, S.; Freitas, S.M. 2001. Serine protease inhibitors from Amazon Leguminosae seeds: purification and preliminary characterization of two chymotrypsin inhibitors from *Inga umbratica*. *Protein and Peptide Letters*. 8(6): 485-493.
- Campos, J.E.; Martinez-Gallardo, N.; Mendiola-Olaya, E.; Blanco-Labra, A. 1997. Purification and partial characterization of a proteinase inhibitor from therapy bean (*Phaseolus acutifolius*) seeds. *Journal of Food Biochemistry*, 21: 203-218.
- Capobianco, J.P.R; Veríssimo, A.; Moreira, A.; Santos, I.; Pinto, L.P. & Sawyer. D. 2001. *Biodiversidade na Amazônia Brasileira*. Manaus, AM. Editora Estação Liberdade, 544p.
- Carlini, C.R.; Grossi-de-Sá, M.F. 2002. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon*, 40: 1515-1539.
- Casaretto, J.A.; Zuniga, G.E.; Corcuera, L.J. 2004. Abscisic acid and jasmonic acid affect proteinase inhibitor activities in barley leaves. *Journal of Plant Physiology*, 161(4): 389-396.
- Cavada, B.S.; Madeira, S.V.F.; Calvete, J.J.; Souza, L.A.G.; Bonfim, L.R.; Dantas, A.R.; Lopes, M.C.; Grangeiro, T.B.; Freitas, B.T.; Pinto, V.P.T.; Leite, K.B.; Ramos, M.V. 2000. Purification, chemical, and immunochemical properties of a new lectin from Mimosoideae (*Parkia discolor*). *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 30(4): 271-280.

- Cavada, B.S.; Marinho, E.S.; Souza, E.P.; Benevides, R.G.; Delatorre, P.; Souza, L.A.G.; Nascimento, K.S.; Sampaio, A.H.; Moreno, F.B.M.B.; Rustiguel, J.K.R.; Canduri, F.; Azevedo Jr., W.F. de.; Debray, H. 2006. Purification, partial characterization and preliminary X-ray diffraction analysis of a mannose-specific lectin from *Cymbosema roseum* seeds. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, F62: 235-237.
- Cavada, B.S.; Santi, T.; Gadelha, C.A.A.; Grangeiro, T.B.; Neto, M.A.; Nunes, E.P.; Galvani, F.R. 1996. Bases quimiotaxonômicas para diferenciação dos taxónes *Acacia caven* (Mol.) Mol. e *Acacia farnesiana* (L.) Willdenow (Leguminosae, Mimosoideae). *Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia*, 2/3(1): 78-83.
- Cavalcanti, M.S.M.; Oliva, M.L.V.; Fritz, H.; Jochum, M.; Mentele, R.; Sampaio, M.; Coelho, L.; Batista, I.F.C.; Sampaio, C.A.M. 2002. Characterization of a Kunitz trypsin inhibitor with one disulfide bridge purified from *Swartzia pickellii*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 291: 635-639.
- Chandra, N.R.; Kumar, N.; Jeyakani, J.; Singh, D.D.; Gowda, S.B.; Prathima, M.N. 2006. Lectindb: a plant lectin database. *Glycobiology*, 16 (10): 938-946.
- Chen, Z.Y.; Brown, R.L.; Russin, J.S.; Lax, A.R.; Cleveland, T.E. 1999. A corn trypsin inhibitor with antifungal act inhibits *Aspergillus flavus* alpha-amylase. *Phytopathology*, 89(10): 902-907.
- Chevreuril, L.R. 2007. *Caracterização de proteínas com AHE em sementes de Sesbania exasperata H. B. K. e de Tachigali plumbea Ducke*. Monografia, Universidade Estadual do Amazonas/Escola Superior de Tecnologia/Curso de Engenharia Florestal, Manaus, Amazonas. 38p.
- Chrispeels, M.J.; Raikhei, N.V. 1991. Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. *The Plant Cell*, 3: 1-9.
- Chumkhunthod, P.; Rodtong, S.; Lambert, S.J.; Fordham-Skelton, A.P.; Rizkallah, P.J.; Wilkinson, M.C.; Reynolds, C.D. 2006. Purification and characterization of an N-acetyl-D-galactosamine-specific lectin from the edible mushroom *Schizophyllum commune*. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects*, 1760(3): 326-332.
- Clay, J.W.; Sampaio, P.T.B.; Clement, C.R. 2000. *Biodiversidade Amazônica:*

- exemplos e estratégias de utilização*. 1 ed. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Programa de Desenvolvimento Empresarial e Tecnológico. Manaus, Amazonas. 409p.
- Coelho, M.B.; De Souza, I.A.; Freire, M.G.; Marangoni, S.; Antunes, E.; Macedo, M.L. 2006. Neutrophil migration in mice induced by a mannose-binding lectin isolated from *Annona coriacea* seeds. *Toxicon*, 48: 529-535.
- Coelho, M.B.; Freire, M.G.M.; Toyama, M.H.; Marangoni, S.; Novello, J.C.; Macedo, M.L.R. 2003. Purification and characterization of a lectin from *Annona coriacea* seeds. *Protein and Peptide Letters*, 10: 154-173.
- Conrath, U.; Thulke, O.; Schwindling, S.; Kohler, A. 2001. Priming as a mechanism in induced systemic resistance of plants. *European Journal of Plant Pathology*, 107(1): 113-119.
- Corrêa, M. P. 1984. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*, v. II. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, RJ, 707 p.
- Cunico, M.M.; Miguel, O.G.; Miguel, M.D.; Carvalho, J.L.S.; Peitz, C.; Auer, C.G.; Grigoletti Júnior, A. 2003. Efeito da atividade antifúngica de *Ottonia martiana* Miq., Piperaceae: um teste *in vivo*. *Visão Acadêmica*, 4(2): 77-82.
- Czapla, T.H.; Lang, B.A. 1990. Effect of pant-lectins on the larval development of European corn-borer (Lepidoptera, Pyralidae) and southern corn-rootworm (Coleoptera, Chrysomelidae). *Journal of Economic Entomology*, 83(6): 2480-2485.
- Damico, D.C.S.; Freire, M.G.M.; Gomes, V.M.; Toyama, M.H.; Marangoni, S.; Novello, J.C.; Macedo, M.L.R. 2003. Isolation and characterization of a lectin from *Annona muricata* seeds. *Journal of Protein Chemistry*, 22(7-8): 655-661.
- Datta, K.; Usha, R.; Dutta, S.K.; Singh, M. 2001. A comparative study of the winged bean protease inhibitors and their interaction with proteases. *Plant Physiology and Biochemistry*, 39: 949-959.
- Dias, F.L. 1993. Estudo da genotoxicidade *in vivo* e *in vitro* dos cercaricidas naturais óleo de sucupira e cremantina em células de mamíferos. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, São Paulo, 105p.
- Dornelas, M.C.; Rodriguez, A.P.M. 2005. The rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell.

- Arg.) homologue of the Leafy/Floricaula gene is preferentially expressed in both male and female floral meristems. *Journal of Experimental Botany*, 56(417):1965-1974.
- Elden, T.C. 2000. Influence of a cysteine proteinase inhibitor on alfalfa weevil (Coleoptera: Curculionidae) growth and development over successive generations. *Journal of Entomological Science*, 35(1): 70-76.
- Exsteen, B.D.; Pretorius, J.C.; Nieuwoudt, T.D.; Zietsman, P.C. 2001. Mycelial growth inhibition of plant pathogenic fungi by extracts of South African plant species. *Ann. Appl. Biol*, 139: 243-249.
- Fearnside, P.M. 2003. *A Floresta Amazônica nas Mudanças Globais*. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas, 134p.
- Fiori, A.C.G. 2000. Atividade de lectinas sobre a germinação de esporos e indução de fitoalexinas. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, 25: 374. Resumo n. 266.
- Fitches, E.; Gatehouse, J.A. 1998. A comparison of the short and long term effects of insecticidal lectins on the activities of soluble and brush border enzymes of tomato moth larvae (*Lacanobia oleracea*). *Journal Insect Physiology*. 44: 1213-1224.
- Fortes, N.L.P. 1997. O efeito de Lonlife sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium solani*, *Alternaria solani* e *Rhizoctonia solani*. *XXX Congresso Brasileiro de Fitopatologia*, Poços de Caldas, Minas Gerais, v.1. p.39-40.
- Fortes, N.L.P. 1999. Ação de extratos vegetais no controle *in vitro* de *Colletotrichum lindemuthianum* e *Fusarium oxysporum*. *XXXII Congresso Brasileiro de Fitopatologia*, v. 24: p. 211-380.
- Franco, O.L.; Dias, S.C.; Magalhães, C.P.; Monteiro, A.C.S.; Bloch Jr., C.; Melo, F.R.; Oliveira-Neto, O.B.; Monnerat, R.G.; Grossi-de-Sá, M.F. 2004. Effects of soybean Kunitz trypsin inhibitor on the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). *Phytochemistry*, 65: 81-89.
- Freire, M.G.M.; Gomes, V.M.; Corsini, R.E.; Machado, O.L.T.; De Simone, S.G.; Novello, J.C.; Marangoni, S.; Macedo, M.L.R. 2002. Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with

- fungal growth. *Plant Physiology Biochemistry*, 40: 61-68.
- Frokiaer, H.; Horlyck, L.; Sorensen, S.; Sorensen, H. 1994. Immunoaffinity chromatography purification and characterization of pea trypsin-inhibitors. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 66(1): 61-69.
- Gadelha, C.A.A.; Moreno, F.B.M.B.; Santi-Gadelha, T.; Cajazeiras, J.B.; Rocha, B.A. M.; Assreuy, A.M.S.; Mota, M.R.L.; Pinto, N.V.; Meireles, A.V.P.; Borges, J.C.; Freitas, B.T.; Canduri, F.; Souza, E.P.; Delatorre, P.; Criddle, D.N.; Azevedo Jr., W.F.; Cavada, B.S. 2005. Native crystal structure of a nitric oxide-releasing lectin from the seeds of *Canavalia maritima*. *Journal of Structural Biology*, 152: 185-194.
- Gatehouse, A.M.R.; Powell, K.S.; Peumans, W.J.; Van Damme, E.J.M.; Gatehouse, J.A. 1995. Insecticidal properties of plant lectins: their potential in plant protection. *In: Pusztai, A.; Bardocz, S. Lectins: Biomedical Perspectives*. London: Francis & Taylor, p. 35-57.
- Gentry, A.H. 1993. To the families and genera of woody plants of Northwest South America (Colombia, Ecuador, Peru) with supplementary notes on herbaceous taxa. The University of Chicago Press, 508-509p.
- Giudici, A.M.; Regente, M.C.; La Canal, L. de. 2000. A potent antifungal protein from *Helianthus annuus* flowers is a trypsin inhibitor. *Plant Physiology Biochemistry*, 38: 881-888.
- Goldstein, I.J.; Poretz, R.D. 1986. Isolation, physicochemical characterization and carbohydrate-binding specificity of lectins. *In: Sharon, N. and Goldstein, I. J. The lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine*. Liemer, Orlando, Florida: Academic Press, 33-248.
- Gonçalves, J.F.C.; Fernandes, A.V.; Oliveira, A.F.M.; Rodrigues, L.F.; Marengo, R.A. 2002. Primary metabolism components of seeds from Brazilia Amazon tree species. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 14: 139-142.
- Graham, J.S.; Ryan, C.A. 1981. Accumulation of a metallo-carboxypeptidase inhibitor in leaves of wounded potato plants. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 101(4): 1164-1170.
- Grangeiro, T.B.; Cavada, B.S. 1996. *Clonagem, sequenciamento e expressão do gen da lectina (Com Br) de sementes de Canavalia brasiliensis*. Tese de

- Doutorado em Bioquímica e Biologia Molecular. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, 133p.
- Hahn, M.G. 1996. Microbial elicitors and their receptors in plants. *Annual Review of Phytopathology*, 34: 387-412.
- Hahn, M.G.; Cheong, J.J.; Alba, R.; Enkerli, J.; Côté, F. 1993. Oligossacharide elicitors: structure and recognition. *In: International Conference of European Foundation for Plant Pathology. 2., Strasbourg. Proceedings.* Dordrecht: Kluwer Academic, 99-116p.
- Haq, S.K.; Atif, S.M.; Khan, R.H. 2004. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 431: 145-159.
- Haq, S.K.; Atif, S.M.; Khan, R.H. 2005. Biochemical characterization, stability studies and N-terminal sequence of a bi-functional inhibitor from *Phaseolus aureus* Roxb. (Mung bean). *Biochimie*, 87: 1127-1136.
- Hartl, P.M.; Tan-Wilson, A.L.; Wilson, K.A. 1986. Proteolysis of Kunitz soybean trypsin inhibitor during germination. *Phytochemistry*, 25: 23-26.
- Heinrich, E.L.; Welty, L.A.Y.; Banner, L.R.; Oppenheimer, S.B. 2005. Direct targeting of cancer cells: A multiparameter approach. *Acta Histochemica*, 107: 335-344.
- Henz, G.P.; Lopes, C.A. 2000. Doenças das apiáceas. *In: Zambolim, L.; Jaccoud Filho, D. S. (Eds). Controle de doenças de plantas hortaliças, v.2.* Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, p. 483-485.
- Herrera-Estrella, L. 1999. Transgenic plants for tropical regions: some considerations about their development and their transfer to the small farmer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 96: 5978-5981.
- Heywood, V.H. 1971. The Leguminosae – a systematic purview. *In: Harbone, J. B.; Bouter, D. and Turner B. L. (eds.). Chemotaxonomy of the Leguminosae, v.1-29.* Academic Press, London and New York.
- Higuchi, M.I.G.; Higuchi, N. 2004. *A Floresta Amazônica e suas múltiplas dimensões: uma proposta de educação ambiental.* Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Brasília: CNPq, Manaus, Amazonas, 146p.

- Honée, G. 1999. Engineered resistance against fungal plant pathogens. *European Journal of Plant Pathology*, 105: 319-326.
- Iamauti, M.T.; Salgado, C.L. 1997. Doenças da alfafa (*Medicago sativa* L.). In: Kimati, H., Amorim, L.; Bergamin Filho, A.; Camargo, L. E. A.; Rezende, J. A. M. (Eds). *Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivada*, v.2. Universidade de São Paulo/Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, São Paulo, SP, p. 26-32.
- Inanaga, H.; Kobayasi, D.; Kouzuma, Y.; Aoki-Yasunaga, C.; Iiyama, K.; Kimura, M. 2001. Protein engineering of novel proteinase inhibitors and their effects on the growth of *Spodoptera exigua* larvae. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 10: 2259-2264.
- Isidro, R.; Sales, F.J.M.; Cavada, B.S.; Grangeiro, T.B.; Moreira, R.A. 2001. Ação de lectina de sementes de *Canavalia* *brasiliensis* Mart. sobre o comportamento da saúva do Nordeste (*Atta opaciceps* Borgmeier). *Revista da Faculdade de Agronomia*, 27: 77-86.
- IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry. 2007. *Nomenclature and Symbolism for Amino Acids and Peptides*. Disponível em <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/AminoAcid/>. Acesso em 10/05/2007.
- Jaccoud Filho, D.S.; Zambolim, L. 2000. Doenças de pós-colheita em alho e cebola. In: Zambolim, L.; Jaccoud Filho, D. S. (Eds). *Controle de doenças de plantas hortaliças*, v.1. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, p. 131-150.
- Jacobson, R. L.; Doyle, R. J. 1996. Lectin-parasite interactions. *Parasitology*, 12: 55-61.
- Jesus, M.A. 2003. Efeito dos extratos obtidos de *Swartzia argentea* Spruce ex Benth., *S. laevicarpa* Amshoff, *S. panococo* (Aublet) Cowan, *S. polyphylla* DC. e de *S. sericea* Vogel da Amazônia Central sobre fungos degradadores de madeira. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Rio Claro, São Paulo. 97 p.
- Jordão, B.P. ; Lehane, M.J. ; Terra, W.R. ; Ribeiro, A.F. ; Ferreira, C. 1996. An immunocytochemical investigation of trypsin secretion in the midgut of the

- stablefly, *Stomoxys calcitrans*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 26(5) : 445-453.
- José, M.O.M.A. 2002. Inibidores de proteinase do tipo Bowman-Birk: evolução molecular, expressão na superfície de fagos filamentosos e seu papel na interação planta-inseto. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, São Paulo, 108p.
- Kennedy, J.F.; Palva, P.M.G.; Corella, M.T.S.; Cavalcanti, M.S.M.; Coelho, L.C.B.B. 1995. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. *Carbohydrate Polymers*, 26(3): 219-230.
- Khang, N. Q. ; Jean-Luc, G. ; Johan, H. 1990. A blood group A specific lectin from the seeds of *Crotalaria striata*. *Biochemical Biophysical Acta*, 1033 : 210-213.
- Kim, J-Y.; Park, S-C.; Kim, M-H.; Lim, H-T.; Park, Y.; Hahm, K-S. 2005. Antimicrobial activity studies on a trypsin-chymotrypsin protease inhibitor obtained from potato. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 330: 921-927.
- Kim, M-H.; Park, S.C.; Kim, J-Y.; Lee, S.Y.; Lim, H-T.; Cheong, H.; Hahm, K-S.; Park, Y. 2006. Purification and characterization of a heat-stable serine protease inhibitor from the tubers of new potato variety "Golden Valley". *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 346: 681-686.
- Koiwa, H.; Bressan, R.A.; Hasegawa, P. M. 1997. Regulation of proteinase inhibitors and plant defense. *Trends in plant Science: Review*, 2(10): 379-384.
- Krauchenco, S.; Pando, S.C.; Marangoni, S.; Polikarpov, I. 2003. Crystal structure of the Kunitz (STI)-type inhibitor from *Delonix regia* seeds. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 312: 1303-1308.
- Kuroda, M.; Ishimoto, M.; Suzuki, K.; Kondo, H.; Abe, K.; Kitamura, K.; Arai, S. 1996. Oryzacystatins exhibit growth-inhibitor and lethal effects on different species of bean insect pests, *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera) and *Riptortus clavatus* (Hemiptera). *Bioscience biotechnology and biochemistry*, 60 (2):209-212.
- Labanca, E.R.G. 2002. *Purificação parcial de elicitores presentes em Saccharomyces cerevisiae: atividade como indutores de resistência em pepino (Cucumis sativus) contra Colletotrichum lagenarium e da síntese de gliceolinas em soja (Glycine max)*. Dissertação de Mestrado, Universidade de São

- Paulo/Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, São Paulo, 107p.
- Ladeira, H.P. 2002. *Quatro décadas de Engenharia Florestal no Brasil*. Sociedade de Investigações Florestais, Universidade Federal de Viçosa. Suprema Gráfica Editora Ltda. Viçosa, Minas Gerais, 207p.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Lam, S.K.; Ng, T.B. 2001. First simultaneous isolation of a ribosome inactivating protein and an antifungal protein from a mushroom (*Lyophyllum shimeji*) Together with evidence for synergism of their antifungal effects. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 393:271-280.
- Laskowski, M.; Qasim, M.A. 2000. What can the structures of enzyme-inhibitor complexes tell us about the structures of enzyme substrate complexes? *Biochemical et Biophysica Acta-protein Structure and Molecular Enzymology*, 1477(1-2): 324-337.
- Latha, V.L.; Rao, R.N.; Nadimpalli, S.K. 2006. Affinity purification, physicochemical and immunological characterization of a galactose-specific lectin from the seeds of a *Dolichos lablab* (Indian lablab beans). *Protein Expression and Purification*, 45: 296-306.
- Lawrence, P.K.; Koundal, K.R. 2002. Review: Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. *EJB Electronic Journal of Biotechnology*, 5(1): 1-17.
- Ledoigt, G.; Griffaut, B.; Debiton, E.; Vian, C.; Mustel, A.; Evray, G.; Maurizis, J-C.; Madelmont, J-C. 2006. Analysis of secreted protease inhibitors after water stress in potato tubers. *International Journal of Biological Macromolecules*, 38: 268-271.
- 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. 2002. *Atividade lectínica em folhas de Indigofera suffruticosa*. Universidade Federal do Ceará, p. 1-4.
- Liao, H.; Ren, W.; Kang, Z.; Jiang, J-H.; Zhao, X-J.; Du, F. 2007. A trypsin inhibitor from *Cássia obtusifolia* seeds: isolation, characterization and activity against *Pieris rapae*. *Biotechnology Letters*, 29(4): 653-658.
- Liener, I.E. 1994. Implications of antinutritional components in soybean foods.

- Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 34(1): 31-67.
- Loris, R. 2002. Principles of structures of animal and plant lectins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1572: 198-208.
- Loris, R.; Hamelryck, T.; Bouckaert, J.; Wyns, L. 1998. Legume lectin structure. *Biochemical Biophysical Acta*, 1838: 9-36.
- Loureiro, A.A.; Rodrigues, W.A. 1975. Estudo anatômico da madeira do gênero *Swartzia* (Leguminosae) da Amazônia - I. *Acta Amazônica*, 5(1): 79-86.
- Loureiro, A.A.; Silva, M.F.; Alencar, J.C. 1977. *Essências Madeireiras da Amazônia*. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Manaus, Amazonas, v. 1, 313p.
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1): 265-275.
- Lu, X.F.; Xia, Y.X.; Pei, Y. 1998. Roles of plant proteinase inhibitors in the resistance of plant against insects and pathogens. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 25(4): 328-333.
- Macedo, M.L.R.; Damico, D.C.S.; Freire, M.G.M.; Toyama, M.H.; Marangoni, S.; Novello, J.C. 2003. Purification and characterization of an N-Acetylglucosamine-binding lectin from *Koelerutera paniculata* seeds and its effect on the larval development of *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) and *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 2980-2986.
- Macedo, M.L.R.; Freire, M.G.M.; Cabrini, E.C.; Toyama, M.H.; Novello, J.C. Marangoni, S. 2003. A trypsin inhibitor from *Peltophorum dubium* seeds active against pest proteases and its effect on the survival of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Biochimica et Biophysica Acta (Elsevier)*, 1621:170-182.
- Macedo, M.L.R.; Freire, M.G.M.; Novello, J.C.; Marangoni, S. 2002. *Talisia esculenta* lectin and larval development of *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Biochimica et Biophysica Acta (Elsevier)*, 1571(2): 83-88.
- Mancini Filho, J.; Lajolo, F.M.; Vizeu, D.M. 1979. Lectins from red Kidney beans: radiation effect on agglutinating and mitogenic activity. *Journal of Food Science*,

44(4): 1194-1196.

- Mann, K.; Farias, C.M.S.A.; Del Sol, F.G.; Santos, C.F.; Grangeiros, T. B.; Nagano, C.S.; Cavada, B.S.; Calvete, J.J. 2001. The amino-acid sequence of the glucose/mannose-specific lectin isolated from *Parkia platycephala* seeds reveals three tandemly arranged jacalin-related domains. *European Journal of Biochemistry*, 268: 4414-4422.
- Marcellino, L. H. 2002. Proteínas de reserva de plantas: caracterização e estudos de expressão gênica. Universidade de Brasília/DF. Tese (Doutorado).
- Mares, M.; Meloun, B.; Pavlik, M.; Kostks, V.; Baudys, M. 1989. Primary structure of cathepsin-D inhibitor from potatoes and its structure relationship to soybean trypsin-inhibitor family. *FEBS Letters*, 251(1-2): 94-98.
- Maringoni, A.C. 1997. Doenças do aspargo (*Asparagus officinalis* L.). In: Kimati, H., Amorim, L.; Bergamin Filho, A.; Camargo, L. E. A.; Rezende, J. A. M. (Eds). *Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas*, vol. 2., Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", São Paulo, SP, p.100-104.
- Mello, G.C.; Desouza, I.A.; Marangoni, S.; Novello, J.C.; Antunes, E.; Macedo, M.L.R. 2006. Oedematogenic activity induced by Kunitz-type inhibitors from *Dimorphandra mollia* seeds. *Toxicon*, 47: 150-155.
- Métraux, J.P. 2001. Systemic acquired resistance and salicylic acid: current state of knowledge. *European Journal of Plant Pathology*, 107(1): 13-18.
- Mikola, J. 1983. Proteinases, peptidases and inhibitors of endogenous proteinases. In Germinating seeds. In: Daussant, J.; Mossé, J.; and Vaughan, J. (eds.). *Seeds proteins: Annual proceedings of the phytochemical society of Europe Academic Press*, p.35-51.
- Miller, E.A.; Lee, M.C.S; Atkinson, A.H.; Anderson, M.A. 2000. Identification of a novel four-domain member of the proteinase inhibitor II family from the stigmas of *Nicotiana glauca*. *Plant Molecular Biology*, 42(2): 329-333.
- Moore, J.G.; Fuchs, C.A.; Hata, Y.S.; Hicklin, D.J.; Colucci, G.; Chrispeels, M.J.; Feldman, M. 2000. A new lectin in red kidney beans called PvFRIL stimulates proliferation of NIH3T3 cells expressing the FIT3 receptor. *Biochimica et*

- Biophysica Acta*, 1475: 216-224.
- Moraes, M.G. 1998. Mecanismos de resistência sistêmica adquirida em plantas. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, 6: 261-284.
- Moreira, R.A.; Cavada, B.S.; Oliveira, J.T.A.; Ainouz, I.L. 1990. Plant lectins. *Proceeding of the first Brazilian congress on proteins – COBRAP*, 90: 73-96.
- Mosolov, V.V.; Valueva, T.A. 2005. Proteinase inhibitors and their function in plants: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 41(3): 227-246.
- Mota, C.G. 2000. *Biologia reprodutiva de Virola surinamensis (Rol.) Warb.* Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Agrárias do Pará, Belém, Pará.
- Motoyoma, M.M.; Schuwan-Estrada, K.R.F.; Stargarlin, J.R.; Fiori-Tutida, A.C.G.; Scapim, C.A. 2003. Indução de fitoalexinas em soja e em sorgo e feito fungitoxico de extratos cítricos sobre *Colletotrichum lagenarium* e *Fusarium semicectum*. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 25(2): 491-496.
- Moura, F.T.; Oliveira, A.S.; Macedo, L.L.P.M.; Vianna, A.L.B.R.; Andrade, L.B.S.; Martins-Miranda, A.S.; Oliveira, J.T.A.; Santos, E.A.; Sales, M.P. de. 2007. Effects of a chitin-binding vicilin from *Enterolobium contortisiliquum* seeds on bean bruchid pests (*Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus*) and phytopathogenic fungi (*Fusarium solani* and *Colletotrichum lindemuntianum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 260-266.
- Nagata, Y.; Yamashita, M.; Honda, H.; Akabane, J.; Uehara, K.; Saito, A.; Sumisa, F.; Nishibori, K.; Oodaira, Y. 2005. Characterization, occurrence, and molecular cloning of a lectin from *Grifola frondosa*: jacalin-related lectin of fungal origin. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 69(12): 2374-2380.
- Neurath, H. 1984. Evolution of proteolytic enzymes. *Science*, 224: 350-357.
- Neurath, H. 1989. The diversity of proteolytic enzymes. In: Beynon, R. J. and Bond, J. S. (ed.). *Proteolytic Enzymes*, Oxford, IRL Press, p. 1-13.
- Neurath, H. 1993. The regulation of protease action: an overview. In: *Innovations in proteases and their inhibitors*. Avilés, F. X. (ed). Editora de Gruyter, Berlin.
- Ng, T.B. 2004. Review: antifungal proteins and peptides of leguminous and non-leguminous origins. *Peptides*, 25(7): 1215-1222.

- Ngai, P.H.K.; Ng, T.B. 2007. A lectin with antifungal and mitogenic activities from red cluster pepper (*Capsicum frutescens*) seeds. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(2): 366-371.
- Odani, S.; Ikenaka, T. 1972. Studies on soybean trypsin-inhibitors 4 complete amino-acid sequence and anti-proteinase sites of Bowman-Birk soybean proteinase inhibitor. *Journal of Biochemistry*, 71(5): 839-848.
- Oliveira, S.R.M.; Nascimento, A.E.; Lima, M.E.P.; Leite, Y.F.M.M.; Benevides, N.M.B. 2002. Purification and characterization of a lectin from the red marine alga *Pterocladia capillacea* (S.G. Gmel.) Santel. & Hommers. *Revista Brasileira de Botânica*, 25(4): 397-403.
- Osborne, T.B. 1924. *The vegetable protein*. Monograph in biochemistry. Longmans Green, London. 2. ed.
- Paes, N.S.; Lima, J.N.; Osório, R.; Monteiro, A.C.S.; Grossi-de-Sá, M.F. 2002. Uso de chagasina, um inibidor de cisteíno-proteinase de *Trypanosoma cruzi*, na produção de feijão resistente a caruncho. *Encontro de talento estudantil: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*, 7:48. Brasília, DF.
- Pando, L.A. 2001. Caracterização físico-química e biológica de proteínas isoladas de sementes de leguminosas: lectinas e inibidores de proteinases. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas/Instituto de Biologia, Campinas, São Paulo, 100p.
- Pando, S.C. 2003. Caracterização bioquímica de uma lectina e determinação da estrutura primária de um inibidor de serinoproteinases tipo Kunitz de sementes de *Delonix regia* (Flamboyant): estudo do papel inseticida do inibidor em relação aos insetos *Anagasta kuehniella* e *Corcyra cephalonica* (Lepdoptera-Pyralidae). Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, São Paulo, 192p.
- Pando, S.C.; Macedo, M.L.R.; Freire, M.G.M.; Toyama, M.H.; Novello, J.C.; Marangoni, S. 2002. Biochemical characterization of a lectin from *Delonix regia* seeds. *Journal of Protein Chemistry*, 21(4): 279-285.
- Pando, S.C.; Olíva, M.L.V.; Sampaio, C.A.M.; Di Ciero, L.; Novello, J.C.; Marangoni, S. 2001. Primary sequence determination of a Kunitz inhibitor isolated from

- Delonix regia* seeds. *Phytochemistry*, 57: 625-631.
- Park, E.Y.; Kim, J-A.; Kim, H-W.; Kim, Y.S.; Song, H.K. 2004. Crystal structure of the Bowman-Birk inhibitor from barley seeds in ternary complex with porcine trypsin. *Journal of Molecular Biology*, 343: 173-186.
- Park, Y.; Choi, B.H.; Kwak, J-S.; Kang, C-W.; Lim, H-T.; Cheong, H-S.; Hahm, K-S. 2005. Kunitz-type serine protease inhibitor from potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Jopung). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 6491-6496.
- Pekkarinen, A.I.; Jones, B.L. 2003. Purification and identification of barley (*Horleum vulgare* L.) proteins that inhibit the alkaline serine proteinases of *Fusarium culmorum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 1710-1717.
- Pereira, R.S. 1998. Comportamento ecofisiológico do mogno (*Swietenia macrophylla* King), no município de Miguel Pereira, Rio de Janeiro. *Floresta e Ambiente*, 5(1): 139-145.
- Pernas, M.; Lopez-Solanilla, E.; Sanchez-Monge, R.; Salcedo, G.; Rodriguez-Palenzuela, P. 1999. Antifungal activity of a plant cystatin. *Molecular plant-microbe interactions*, 12(7): 624-627.
- Peumans, W.J.; Van Damme, E.J.M. 1995. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiology*, 109: 347-352.
- Peumans, W.J.; Van Damme, E.J.M.; Barre, A.; Rougé, P. 2001. Classification of plant lectins in families of structurally na evolutionary related proteins. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 491: 27-54.
- Portela, A.C.; Souza, L.A.G.; Lopes, M.C. 2001. Organização do germoplasma de leguminosas arbóreas do INPA/CPCA: fenologia e desenvolvimento inicial das espécies. *Anais: X Jornada de Iniciação Científica do PIBIC/INPA*, 1: 223-226.
- Prance, G.T.; Silva, M.F. 1975. *Árvores de Manaus*. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas, 312p.
- Pusztai, 1991. *Plant Lectin*. Cambridge, U.K.: Cambridge University Press, 263p.
- Radisky, E.S.; Koshland Jr., D.E. 2002. A clogged gutter mechanism for protease inhibitors. *Biochemical*, 99(16): 10316-10321.
- Rawlings, N.D.; Tolle, D.P.; Barrett, A.J. 2004. Evolutionary families of peptidase

- inhibitors. *Biochemistry Journal* A clogged gutter mechanism for protease inhibitors. *Biochem. J.*, 378: 705-716.
- Ribeiro, J.E.L.S.; Hopkins, M.J.G.; Vicentini, A.; Sothers, C.A.; Costa, M.A.S.; Brito, J. M.; Souza, M.A.D.; Martins, L.H.P.; Lohmann, L.G.; Assunção, P.A.C.L.; Pereira, E.C.; Silva, C.F.; Mesquita, M.R.; Procópio, L.C. 1999. *Flora da Reserva Ducke: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central*. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas, 816p.
- Ribeiro, L.F.; Bedendo, I.P. 1999. Efeito inibitório de extratos vegetais sobre *Colletotrichum gloeosporioides* – agente causal da podridão de frutos de mamoeiro. *Scientia Agricola*, 56(4): 1267-1271.
- Richardson, M. 1977. The proteinase inhibitors of plants and microorganisms. *Phytochemistry*, 16: 159-169.
- Richardson, M. 1991. Seed storage proteins: the enzyme inhibitors. *Methods in Plant Biochemistry*, 5: 259-305.
- Rudiger, H. 1998. Plant-lectins – more than just tools glycoscientists: occurrence, structure, and possible functions of plant lectins. *Acta Anatomica*, 161:130-152.
- Ryan, C.A. 1990. Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 28: 425-449.
- Sa, Q.; Wang, Y.; Li, W.; Zhang, L. Sun, Y. 2003. The promoter of an antifungal protein gene from *Gastrodia elata* confers tissue-specific and fungus-inducible expression patterns and responds to both salicylic acid and jasmonic acid. *Plant Cell Reports*, 22(1): 79-84.
- Sadeghi, A.; Van Damme, E.J.M.; Peumans, W.J.; Smagghe, G. 2006. Deterrent activity of plant lectins on cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (F.) oviposition. *Phytochemistry*, 67: 2078-2084.
- Sampietro, A.R.; Islã, M.I.; Ouiroga, E.N.; Vattuone, M.A. 2001. An N-acetylglucosamine oligomer binding agglutinin (lectin) from ripe *Cyphomandra betacea* Sendt. Fruits. *Plant Science*, 160: 659-667.
- Santos, M.M.F.B.; Stangarlin, J.R.; Pascholati, S.F. 1997. Doenças da alcachofra (*Cynara scolymus* L.). In: Kimati, H.; Amorim, L.; Bergamin Filho, A.; Camargo, L.

- E. A.; Rezende, J. A. M. (Eds). *Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas*, vol. 2. Universidade de São Paulo/Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, São Paulo, SP, p. 15-17.
- Santos, S.R. 1999. Dos espirros à morte: agrotóxicos provocam mortes e danos irreversíveis à saúde humana. *Revista CREA/PR*, 1(4): 22-23.
- Sharon, N.; Lis, H. 1990. Legumes lectins - a large family of homologous proteins. *FASEB Journal*, 4: 3198-3208.
- Sharon, N.; Lis, H. 1995. Lectins – proteins with a sweet tooth: functions in cell recognition. *Essays In Biochemistry*, 30: 59-75.
- Sharon, N.; Lis, H. 2004. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*, 14(11): 53R-62R.
- Silva, A.L.C.S.; Horta, A.C.G.; Moreira, R.A.M. 2001. Isolation and partial characterization of a lectin from *Bauhinia pentandra* (Bong) Vog. ex. Steud. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 13(3): 262-268.
- Silva, I.D.; Takatsuka, F.S.; Rocha, M.R.; Cunha, M.G. 2005. Efeito do extrato de sucupira (*Pterodon emarginatus* Vog.) sobre o desenvolvimento de fungos e bactérias fitopatogênicas. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 35(2): 109-115.
- Silva, M.F. 1975. *Dimorphandra* (Caesalpinaceae), *Flora Neotropical*, 44: 1-128.
- Silva, M.F.; Carreira, L.M.M.; Cortês, A.L. 1992. Leguminosas da Amazônia brasileira – II *Cedrelinga* Ducke (Leg. Mimos.). *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, série Botânica*, 8(1):143-156.
- Silva, M.R.; Silva, M.A.A.P. 2000. Fatores antinutricionais: inibidores de proteases e lectinas. *Revista de Nutrição*, 13(1): 3-9.
- Silveira, V. D. 1968. *Lições de Micologia*. 2 ed. Rio de Janeiro/RJ, 301p.
- Souza, L.A.G.; Silva, M.F. 2002a. Bioeconomical potential of Leguminosae from the Lower Negro River, Amazon, Brazil. In: Bussmann, R.W. & Lange, S. (Eds.) *Conservación de Biodiversidad em los Andes y la Amazonia. CD-Room, Proceedings of the International Congress of Biodiversity*. Cusco. Peru. Inka. p. 529-538.
- Souza, L.A.G.; Silva, M.F. 2002b. Levantamento das leguminosas do arquipélago

- das Anavilhanas, baixo Rio Negro, Amazonas. *Boletim Museu Paraense Emílio Goeldi, série Botânica*, 18 (1): 3-35.
- Souza, L.A.G.; Silva, M.F.; Moreira, F.M.S. 1997. Associações rizóbios-arbóreas na Amazônia. *In: Noda, H.; Souza, L.A.G.; Fonseca, O.J.M. (Eds). Duas décadas de contribuições do INPA à pesquisa agrônômica no Trópico Úmido*. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas, p. 193-219.
- Souza, V.C.; Lorenzi, H. 2005. *Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II*, Instituto Plantarum, Nova Odessa, São Paulo, 640p.
- Taiz, L.; Zeiger, E. 2002. *Fisiologia Vegetal*. Editora Artmed. Porto Alegre. 719p.
- Tan, C.G.L.; Stevens, F.C. 1971. Amino acid sequence of lima bean protease inhibitor component-IV.2. Isolation and sequence determination of chymotryptic peptides and complete amino acid sequence. *European Journal of Biochemistry*, 18(4): 515-523.
- Taylor, B.H.; Young, R.J.; Scheuring, C.F. 1993. Induction of proteinase-inhibitor II-class gene by auxin in tomato roots. *Plant Molecular Biology*, 23(5): 1005-1014.
- Toms, G.C. 1981. Lectins in Leguminosae. *In: Polhill, R. M. & Raven, P. H., (Eds.). Advances in Legumes Systematic*. Royal Botanic Garden, Kew.
- Trabulsi, L.R.; Alterthum, F.; Martinez, M.B.; Campos, L.C.; Gompertz, O.F.; Rácz, M.L. 2005. *Microbiologia*. 4 ed. Editora Atheneu. São Paulo, SP. 579p.
- Tremacoldi, C.R.; Pascholati, S.F. 2004. Inibidor de Tripsina em raízes de *Eucalyptus urophylla*. *Fitopatologia Brasileira*, 29(2):135-140.
- Trindade, D.R.; Furtado, E.L. 1997. Doenças da seringueira (*Hevea brasiliensis* (Willd. ex A.D. de Juss.) Muell. & Arg.). *In: Kimati, H., Amorim, L.; Bergamin Filho, A.; Camargo, L. E. A.; Rezende, J. A. M. (Eds). Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas, v. 2*. Universidade de São Paulo/Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", São Paulo, SP, p. 629-641.
- Trindade, D.R.; Poltronieri, L.S. 1997. Doenças do guaraná (*Paullinia cupana* Ducke). *In: Kimati, H.; Amorim, L.; Bergamin Filho, A.; Camargo, L. E. A.; Rezende, J. A. M. (Eds). Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas, vol. 2*. Universidade de São Paulo/Escola Superior de Agricultura "Luiz

- de Queiroz”, São Paulo, SP, p. 459-462.
- Udedibie, A.B.I.; Carlini, C.R. 1998. Questions and answers to edibility problem of the *Canavalia ensiformis* seeds – A review. *Animal Feed Science Technology*, 74: 95-106.
- Unemoto, N.; Kakitani, M.; Iwamatsu, A.; Yoshikawa, M.; Yamaoka, N.; Ishida, I. 1997. The structure and function of a soybean β -glucan-elicitor-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 94: 1029-1034.
- Van Loon, L.C.; Van Strien, E.A. 1999. Then families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 55: 85-97.
- Vasconcelos, I.M.; Oliveira, J.T.A. 2004. Antinutritional properties of plant lectins. *Toxicon*, 44: 385-403.
- Veloso, H.P.; Rangel Filho, A.L.R.; Lima, J.C.A. 1991. *Classificação da vegetação brasileira adaptada a um sistema universal*. Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística/Departamento de Recursos Naturais e Estudos Ambientais, Rio de Janeiro, RJ. 123 p.
- Vieira, E.C. 1999. *Bioquímica Celular e Biologia Molecular*, 2ed.; São Paulo/São Paulo, Editora Atheneu, 360p.
- Voet, D.; Voet, J.G.; Pratt, C.W. 2000. *Fundamentos de Bioquímica*. Ed. Artmed. Porto Alegre. Trad. Arthur Germano Fett Neto “*et al.*”
- Vozári-Hampe, M.M. 2006. Reconhecimento de células transformadas por lectinas vegetais. In: Mariath, J. E. de A.; Santos, R. P. dos. (Orgs.): *Conferências, Plenárias e Simpósios do 57^o Congresso Nacional de Botânica “Os avanços da botânica no início do século XXI: morfologia, fisiologia, taxonomia, ecologia e genética”*, Porto Alegre/Rio Grande do Sul, Sociedade Botânica do Brasil. 752p.
- Weis, W.I.; Drickamer, K. 1996. Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. *Annual Review of Biochemistry*, 65: 441-473.
- White A.; Handler, P.; Smith, E.L. 1986. In: *Princípios de Bioquímica: Enzimas Hidrolíticas*. v. 1, ed. Guanabara Koogan, 183p.
- Wong, J.H.; Ng, T.B. 2005. Lunatusin, a trypsin-stable antimicrobial peptide from

- lima beans (*Phaseolus lunatus* L.). *Peptides*, 26: 2089-92.
- Wulff, N.A.; Pascholati, S.F. 1997. Doenças do gergelim (*Sesamum indicum* L.). In: Kimati, H., Amorim, L.; Bergamin Filho, A.; Camargo, L. E. A.; Rezende, J. A. M. (Eds). *Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas*. Vol. 2. Universidade de São Paulo/Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", São Paulo, São Paulo, p. 427-435.
- Wulff, N.A.; Pascholati, S.F. 1999. Partial characterization of sorghum phytoalexin elicitors isolated from *Saccharomyces cerevisiae*. *Fitopatologia Brasileira*, 24(3): 428-435.
- Yang, X.; Li, J.; Wang, X.; Fang, W.; Bidochka, M.J.; She, R.; Xiao, Y.; Pei, Y. 2006. Psc-AFP, an antifungal protein with trypsin inhibitor activity from *Psoralea corylifolia* seeds. *Peptides*, 27: 1726-1731.
- Ye, X.Y.; Ng, T.B. 2002 (a). Delandin, a chitinase-like protein with antifungal, HIV-1 reverse transcriptase inhibitory and mitogenic activities from the rice bean *Delandia umbellate*. *Protein Expression and Purification*, 24(3): 524-529.
- Ye, X.Y.; Ng, T.B. 2002 (b). A new antifungal protein and achitinase with prominent macrophage-stimulating activity from seeds of *Phaseolus vulgaris* cv. pinto. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 290: 810-819.
- Ye, X.Y.; Ng, T.B.; Rao, P.F. 2001. A Bowman-Birk-Type trypsin-chymotrypsin inhibitor from broad beans. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 289(1): 91-96.
- Ye, X.Y.; Wang, H.X.; Ng, T.B. 2000. Structurally dissimilar proteins with antiviral and antifungal potency from cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds. *Life Sciences* 67: 3199-3207.

ANEXOS

Anexo 1 – Resultados das análises estatísticas dos bioensaios

Análise estatística do bioensaio com os três extratos sobre o crescimento micelial e a esporulação de Colletotrichum guaranicola

Quadro 1 – Estatística básica do Bioensaio com *C. guaranicola* e os extratos das três espécies (*C. ferrea* var. *cearensis*, *C. catenaeformis* e *S. polyphylla*).

Variável	Crescimento micelial (mm)			Nº de conídios x 10 ⁴ .mL ⁻¹		
	Cf	Cc	Sp	Cf	Cc	Sp
N	30	30	30	30	30	30
Valor mínimo	78,57	75	84,29	1,8	1,5	51,25
Valor máximo	100	100	100	107,6	149	216
Mediana	99,29	98,93	87,14	23,60	15	115,5
Média	96,36	94,6	88,97	39,93	37,7	108,31
Erro Padrão	0,99	1,47	0,775	6,691	8,44	6,45
Desvio Padrão	5,47	8,03	4,247	36,65	46,3	35,34
Variância	29,921	64,52	18,04	1343,03	2136,8	1248,64
Limite superior	98,4	97,62	90,56	53,62	54,93	121,51
Limite inferior	94,3	91,62	87,39	26,25	20,41	95,12
Coeficiente de Variação	0,057	0,085	0,048	0,918	1,227	0,326

* Cf, Cc e Sp: extrato total de *Caesalpinia ferrea* var. *cearensis*, *Cedrelinga catenaeformis* e *Swartzia polyphylla*, respectivamente.

Análise de Variância

Tabela 1 – Análise de variância do efeito do extrato de *C. ferrea* var. *cearensis* sobre o crescimento micelial de *C. guaranicola*.

Fator de Variação	SQ	GL	QM	F	P	r	R ²
Tratamento	360,31	4	90,077	4,438	0,008	0,644	0,415
Resíduo	507,39	25	20,296				
Total	867,70	29	110,370				

Tabela 2 – Análise de variância do efeito do extrato de *C. ferrea* var. *cearensis* sobre a esporulação de colônias de *C. guaranicola*.

Fator de Variação	SQ	GL	QM	F	P	r	R ²
Tratamento	34460,507	4	8615,127	47,997	0,000	0,941	0,885
Resíduo	4487,280	25	179,491				
Total	38947,787	29	8794,618				

Tabela 3 – Análise de variância do efeito do extrato de *C. catenaeformis* sobre o crescimento micelial de *C. guaranicola*.

Fator de Variação	SQ	GL	QM	F	P	r	R ²
Tratamento	366,905	4	91,726	1,524	0,225	0,443	0,196
Resíduo	1504,252	25	60,170				
Total	1871,157	29	151,896				

Tabela 4 – Análise de variância do efeito do extrato de *C. catenaeformis* sobre a esporulação de colônias de *C. guaranicola*.

Fator de Variação	SQ	GL	QM	F	P	r	R ²
Tratamento	37617,917	4	9404,479	9,655	0,000	0,779	0,607
Resíduo	24350,125	25	974,005				
Total	61968,042	29	10378,484				

Tabela 5 – Análise de variância do efeito do extrato de *S. polyphylla* sobre o crescimento micelial de *C. guaranicola*.

Fator de Variação	SQ	GL	QM	F	P	r	R ²
Tratamento	373,741	4	93,435	15,635		0,845	0,714
Resíduo	149,405	25	5,976				
Total	523,146	29	99,411				

Tabela 6 – Análise de variância do efeito do extrato de *S. polyphylla* sobre a esporulação de colônias de *C. guaranicola*.

Fator de Variação	SQ	GL	QM	F	P	r	R ²
Tratamento	23857,679	4	5964,420	12,071	0,000	0,812	0,659
Resíduo	12352,813	25	494,113				
Total	36210,492	29	6458,533				

Análise estatística do bioensaio com os três extratos sobre o crescimento micelial e a esporulação de *Corynespora cassiicola*.

Quadro 2 – Estatística básica do Bioensaio com *C. cassiicola* e os extratos das três espécies (*C. ferrea* var. *cearensis*, *C. catenaeformis* e *S. polyphylla*).

Variável	Crescimento micelial (mm)			Nº de conídios x 10 ⁴ .mL ⁻¹		
	Cf	Cc	Sp	Cf	Cc	Sp
N	30	30	30	30	30	30
Valor mínimo	83,333	67,778	77,778	1,25	0	2,250
Valor máximo	100	100	100	10,75	2,75	7,250
Mediana	89,72	81,94	95,28	3,250	0,750	3,750
Média	92,24	83,43	94,94	4,183	0,800	4,125
Erro Padrão	0,905	1,583	0,714	0,440	0,129	0,250
Desvio Padrão	4,955	8,671	3,910	2,409	0,708	1,367
Variância	24,553	75,183	15,291	5,801	0,502	1,870
Limite superior	94,09	86,66	96,40	5,083	1,064	4,636
Limite inferior	90,39	80,19	93,48	3,284	0,536	3,614
Coefficiente de Variação	0,054	0,104	0,041	0,576	0,885	0,331

* Cf, Cc e Sp: extrato total de *Caesalpinia ferrea* var. *cearensis*, *Cedrelinga catenaeformis* e *Swartzia polyphylla*, respectivamente.

Análise de Variância

Tabela 7 – Análise de variância do efeito do extrato de *C. ferrea* var. *cearensis* sobre o crescimento micelial de *C. cassiicola*.

Fator de Variação	SQ	GL	QM	F	P	r	R ²
Tratamento	583,683	4	145,921	28,424	0,000	0,905	0,820
Resíduo	128,344	25	5,134				
Total	712,027	29	151,055				

Tabela 8 – Análise de variância do efeito do extrato de *C. ferrea* var. *cearensis* sobre a esporulação de colônias de *C. cassiicola*.

Fator de Variação	SQ	GL	QM	F	P	r	R ²
Tratamento	124,346	4	31,086	17,705	0,000	0,860	0,739
Resíduo	43,896	25	1,756				
Total	168,242	29	32,842				

Tabela 9 – Análise de variância do efeito do extrato de *C. catenaeformis* sobre o crescimento micelial de *C. cassiicola*.

Fator de Variação	SQ	GL	QM	F	P	r	R ²
Tratamento	1213,374	4	303,344	7,843	0,000	0,746	0,557
Resíduo	966,924	25	38,677				
Total	2180,298	29	342,021				

Tabela 10 – Análise de variância do efeito do extrato de *C. catenaeformis* sobre a esporulação de colônias de *C. cassiicola*.

Fator de Variação	SQ	GL	QM	F	P	r	R ²
Tratamento	4,967	4	1,242	3,239	0,028	0,584	0,341
Resíduo	9,583	25	0,383				
Total	14,550	29	1,625				

Tabela 11 – Análise de variância do efeito do extrato de *S. polyphylla* sobre o crescimento micelial de *C. cassiicola*.

Fator de Variação	SQ	GL	QM	F	P	r	R ²
Tratamento	11,687	4	2,922	0,169	0,952	0,162	0,026
Resíduo	431,739	25	17,270				
Total	443,426	29	20,192				

Tabela 12 – Análise de variância do efeito do extrato de *S. polyphylla* sobre a esporulação de colônias de *C. cassiicola*.

Fator de Variação	SQ	GL	QM	F	P	r	R ²
Tratamento	31,521	4	7,880	8,679	0,000	0,762	0,581
Resíduo	22,698	25	0,908				
Total	54,219	29	8,788				

Análise estatística do bioensaio com os três extratos sobre o crescimento micelial e a esporulação de *Fusarium oxysporum*.

Quadro 3 – Estatística básica do Bioensaio com *F. oxysporum* e os extratos das três espécies (*C. ferrea* var. *cearensis*, *C. catenaeformis* e *S. polyphylla*).

Variável	Crescimento micelial (mm)			Nº de conídios x 10 ⁴ .mL ⁻¹		
	Cf	Cc	Sp	Cf	Cc	Sp
N	30	30	30	30	30	30
Valor mínimo	82,857	88,571	84,286	21,250	22,5	63
Valor máximo	100	100	100	173,250	173,25	216
Mediana	94,286	94,286	86,786	78,500	90,375	114
Média	94,929	94,286	88,905	76,800	79,392	107,35
Erro Padrão	0,627	0,627	0,780	6,574	6,727	5,711
Desvio Padrão	3,435	3,433	4,272	36,009	36,843	31,281
Variância	11,800	11,787	18,252	1296,65	1357,39	978,528
Limite superior	96,211	95,568	90,500	90,246	93,149	119,031
Limite inferior	93,646	93,004	87,309	63,354	65,634	95,669
Coeficiente de Variação	0,036	0,036	0,048	0,469	0,464	0,291

* Cf, Cc e Sp: extrato total de *Caesalpinia ferrea* var. *cearensis*, *Cedrelinga catenaeformis* e *Swartzia polyphylla*, respectivamente.

Análise de Variância

Tabela 13 – Análise de variância do efeito do extrato de *C. ferrea* var. *cearensis* sobre o crescimento micelial de *F. oxysporum*.

Fator de Variação	SQ	GL	QM	F	P	r	R ²
Tratamento	161,327	4	40,332	5,575	0,002	0,687	0,471
Resíduo	180,867	25	7,235				
Total	342,194	29	47,567				

Tabela 14 – Análise de variância do efeito do extrato de *C. ferrea* var. *cearensis* sobre a esporulação de colônias de *F. oxysporum*.

Fator de Variação	SQ	GL	QM	F	P	r	R ²
Tratamento	28990,904	4	7247,726	21,04	0,000	0,878	0,771
Resíduo	8611,896	25	344,476				
Total	37602,800	29	7592,202				

Tabela 15 – Análise de variância do efeito do extrato de *C. catenaeformis* sobre o crescimento micelial de *F. oxysporum*.

Fator de Variação	SQ	GL	QM	F	P	r	R ²
Tratamento	193,707	4	48,427	8,173	0,000	0,753	0,567
Resíduo	148,129	25	5,925				
Total	341,836	29					

Tabela 16 – Análise de variância do efeito do extrato de *C. catenaeformis* sobre a esporulação de colônias de *F. oxysporum*.

Fator de Variação	SQ	GL	QM	F	P	r	R ²
Tratamento	29896,325	4	7474,081	19,735	0,000	0,871	0,759
Resíduo	9467,885	25	378,715				
Total	39364,210	29	7852,806				

Tabela 17 – Análise de variância do efeito do extrato de *S. polyphylla* sobre o crescimento micelial de *F. oxysporum*.

Fator de Variação	SQ	GL	QM	F	P	r	R ²
Tratamento	394,966	4	98,741	18,373	0,000	0,864	0,746
Resíduo	134,354	25	5,374				
Total	529,320	29	104,125				

Tabela 18 – Análise de variância do efeito do extrato de *S. polyphylla* sobre a esporulação de colônias de *F. oxysporum*.

Fator de Variação	SQ	GL	QM	F	P	r	R ²
Tratamento	16676,888	4	4169,222	8,908	0,000	0,767	0,588
Resíduo	11700,437	25	468,017				
Total	28377,325	29	4637,239				

Análise estatística do bioensaio com os três extratos sobre o crescimento micelial e a esporulação de *Sclerotium rolfsii*.

Quadro 4 – Estatística básica do Bioensaio com *S. rolfsii* e os extratos das três espécies (*C. ferrea* var. *cearensis*, *C. catenaeformis* e *S. polyphylla*).

Variável	Crescimento micelial (mm)			Nº de conídios x 10 ⁴ .mL ⁻¹		
	Cf	Cc	Sp	Cf	Cc	Sp
N	30	30	30	30	30	30
Valor mínimo	88,889	93,333	85	205	150	240
Valor máximo	100	100	100	590	590	686
Mediana	100	100	89,444	327,5	275,5	447
Média	98,796	99,556	92,259	344,6	299,233	461,533
Erro Padrão	0,527	0,309	0,875	15,633	19,209	22,074
Desvio Padrão	2,889	1,691	4,790	85,623	105,212	120,906
Variância	8,346	2,861	22,945	7331,42	11069,5	14618,3
Limite superior	99,875	100,187	94,048	376,572	338,520	506,680
Limite inferior	97,718	98,924	90,471	312,628	259,947	416,386
Coeficiente de Variação	0,029	0,017	0,052	0,248	0,352	0,262

* Cf, Cc e Sp: extrato total de *Caesalpinia ferrea* var. *cearensis*, *Cedrelinga catenaeformis* e *Swartzia polyphylla*, respectivamente.

Análise de Variância

Tabela 19 – Análise de variância do efeito do extrato de *C. ferrea* var. *cearensis* sobre o crescimento micelial de *S. rolfsii*.

Fator de Variação	SQ	GL	QM	F	P	r	R ²
Tratamento	173,868	4	43,467	15,943	0,000	0,848	0,718
Resíduo	68,158	25	2,726				
Total	242,026	29	46,292				

Tabela 20 – Análise de variância do efeito do extrato de *C. ferrea* var. *cearensis* sobre a esporulação de colônias de *S. rolfsii*.

Fator de Variação	SQ	GL	QM	F	P	r	R ²
Tratamento	156944,867	4	39236,217	17,621	0,000	0,859	0,738
Resíduo	55666,333	25	2226,653				
Total	212611,200	29	41462,870				

Tabela 21 – Análise de variância do efeito do extrato de *C. catenaeformis* sobre o crescimento micelial de *S. rolfsii*.

Fator de Variação	SQ	GL	QM	F	P	r	R ²
Tratamento	8,889	4	2,222	0,750	0,567	0,327	0,107
Resíduo	74,074	25	2,963				
Total	82,963	29	5,185				

Tabela 22 – Análise de variância do efeito do extrato de *C. catenaeformis* sobre a esporulação de colônias de *S. rolfsii*.

Fator de Variação	SQ	GL	QM	F	P	r	R ²
Tratamento	228235,2	4	57058,8	15,375	0,000	0,843	0,711
Resíduo	92780,1	25	3711,207				
Total	321015,367	29					

Tabela 23 – Análise de variância do efeito do extrato de *S. polyphylla* sobre o crescimento micelial de *S. rolfsii*.

Fator de Variação	SQ	GL	QM	F	P	r	R ²
Tratamento	566,111	4	141,528	35,639	0,000	0,922	0,851
Resíduo	99,280	25	3,971				
Total	665,391	29	145,499				

Tabela 24 – Análise de variância do efeito do extrato de *S. polyphylla* sobre a esporulação de colônias de *S. rolfsii*.

Fator de Variação	SQ	GL	QM	F	P	r	R ²
Tratamento	94542,5	4	23635,617	1,794	0,162	0,472	0,223
Resíduo	329389,0	25	13175,560				
Total	423931,467	29	36811,177				