

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.