

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.

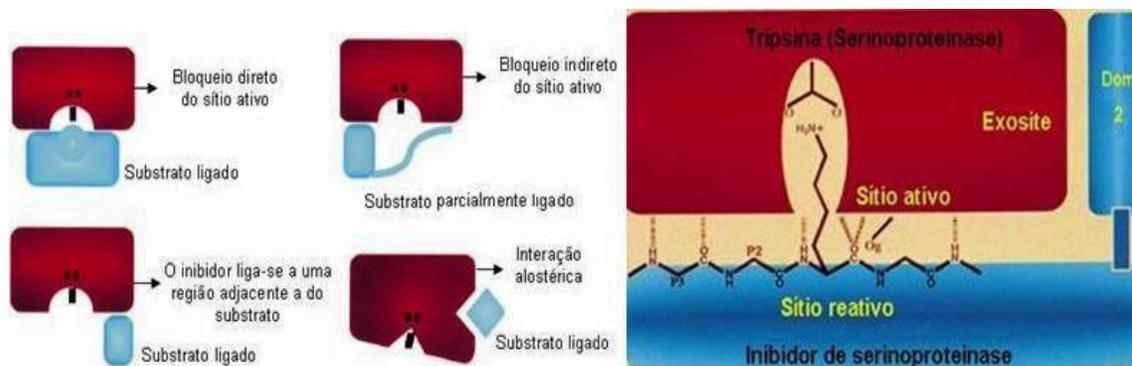


Figura 9 – Mecanismos de inibição de proteinases e interação entre um inibidor de serinoproteinase com sua enzima-alvo, evidenciando a especificidade entre os sítios ativo e reativo (Bode & Huber, 2000).

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 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).

- 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).

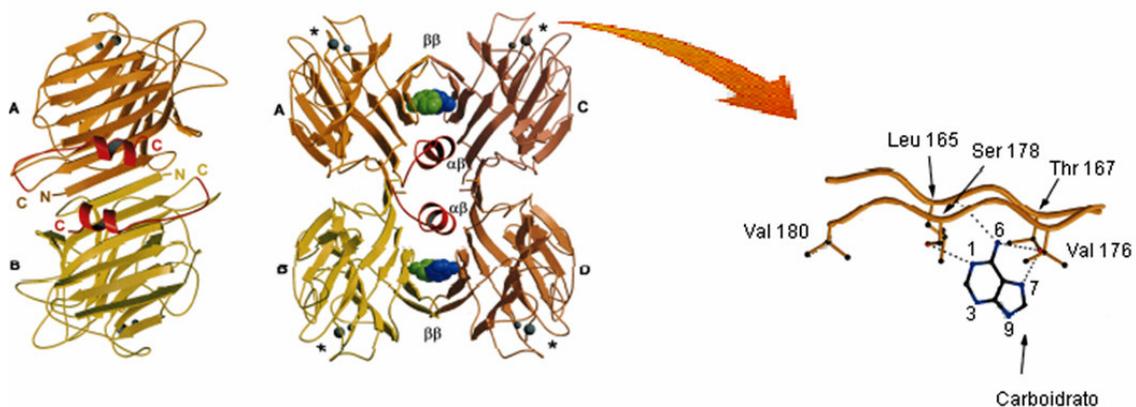


Figura 11 – Esquema de uma molécula de lectina, evidenciando sua estrutura e a ligação entre alguns resíduos de aminoácidos da lectina com a porção carboidrato de uma glicoproteína de superfície celular.

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 ressuspendido 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.

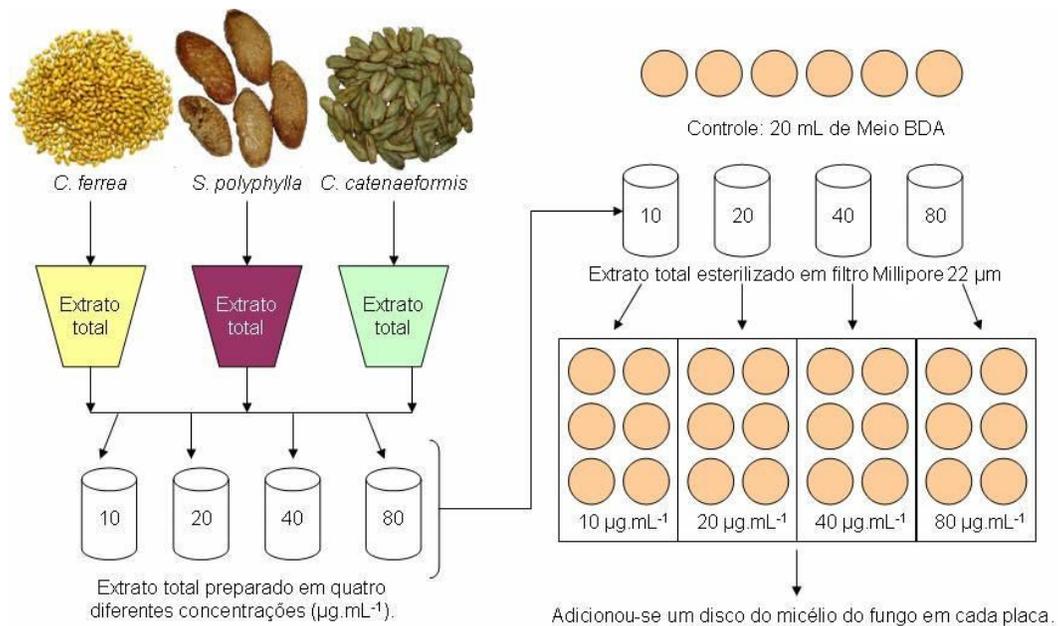


Figura 12 - Fluxograma do método para a realização dos bioensaios.

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

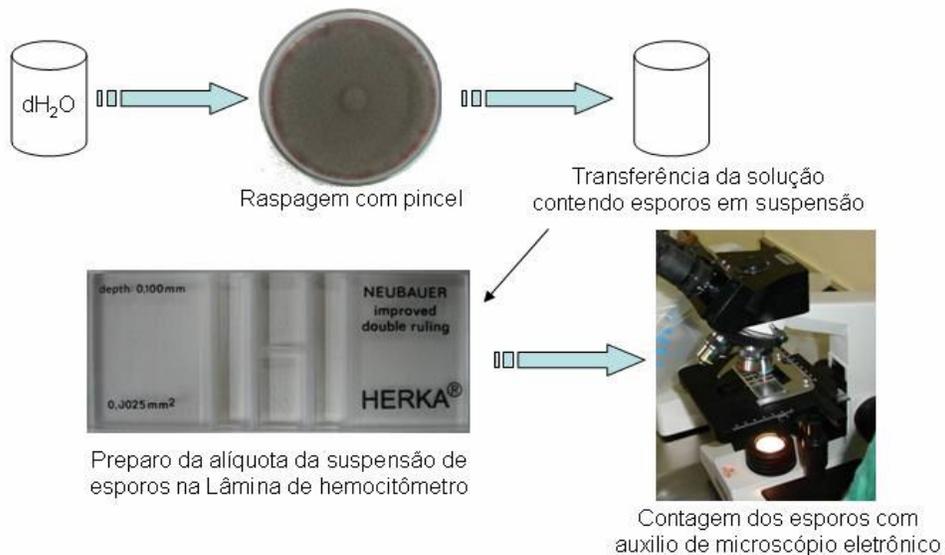
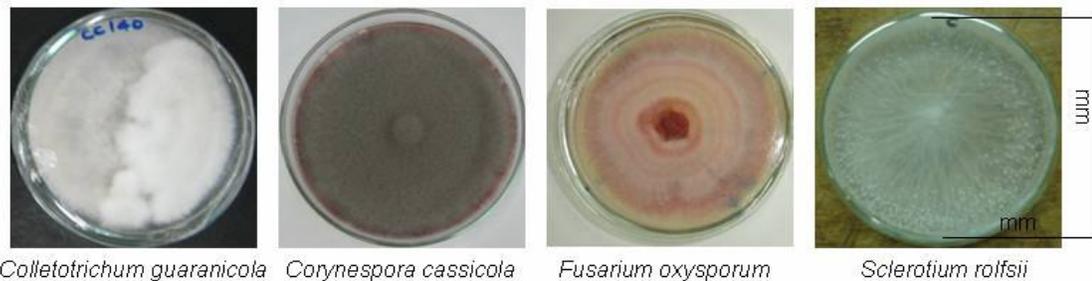


Figura 13 – Fluxograma do monitoramento dos bioensaios durante a coleta dos dados de crescimento micelial e contagem dos esporos.

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.

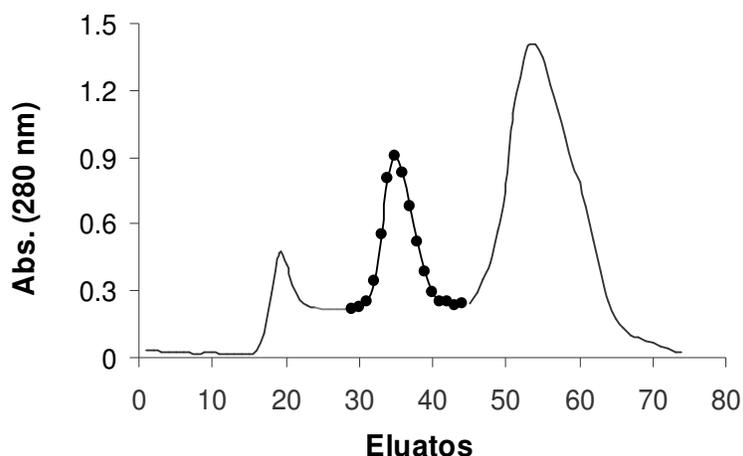


Figura 14 – Cromatografia em coluna de Sephadex G-100 (62,5 x 1,5 cm), equilibrada com tampão Tris/HCl 0,05M contendo NaCl 0,15M, pH 8,0. Amostra: 200 mg de extrato de *C. ferrea var. cearensis*. Fluxo de eluição: 0,3mL/min. Frações de 3mL foram coletadas e monitoradas a 280 nm. “●” círculo cheio indica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

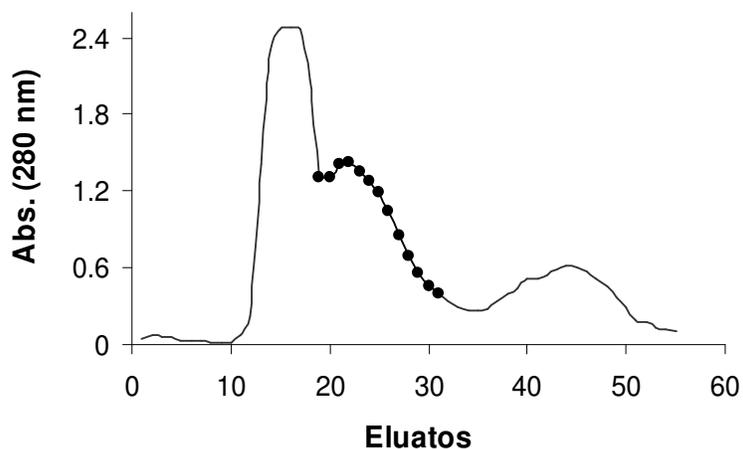


Figura 15 – Cromatografia em coluna de Sephadex G-100 (62,5 x 1,5 cm), equilibrada com tampão Tris/HCl 0,05M contendo NaCl 0,15M, pH 8,0. Amostra: 200mg de extrato de *S. polyphylla*. Fluxo de eluição: 0,3mL/min. Frações de 3mL foram coletadas e monitoradas a 280 nm. “●” círculo cheio indica atividade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

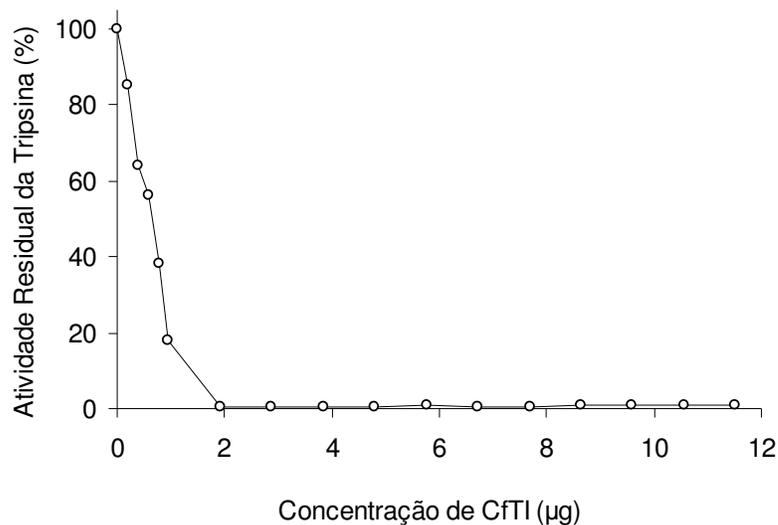


Figura 16 – Curva de inibição da tripsina bovina por CfTI. A atividade inibitória do sítio ativo da tripsina bovina foi determinada pelo ensaio de incubação com DL-BAPNA, na presença de diferentes concentrações do inibidor.

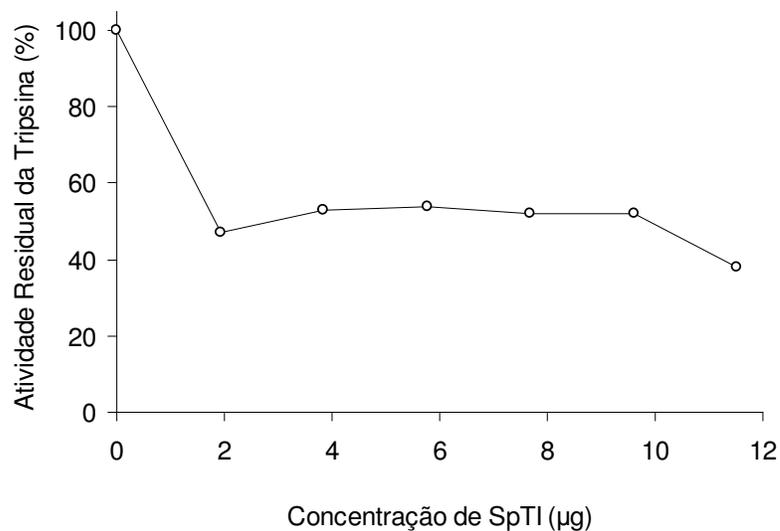


Figura 17 – Curva de inibição da tripsina bovina por SpTI. A atividade inibitória do sítio ativo da tripsina bovina foi determinada pelo ensaio de incubação com DL-BAPNA, na presença de diferentes concentrações do inibidor.

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.

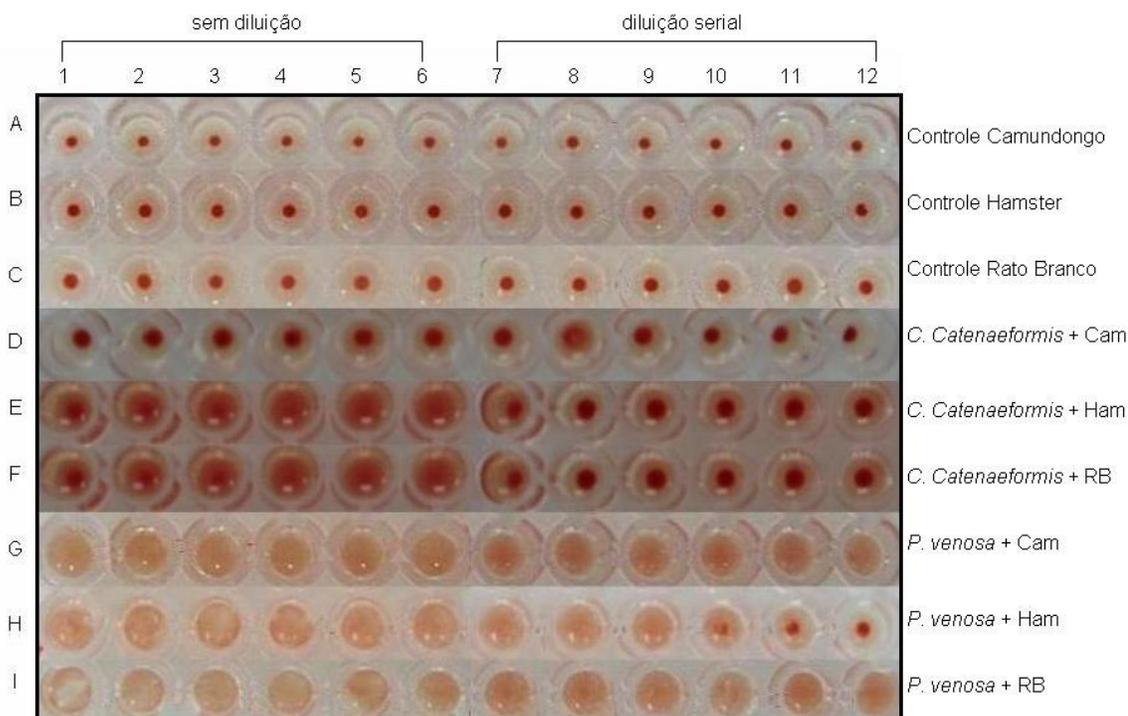


Figura 18 – Ensaio de detecção da AHE nos extratos totais. Legenda: A – controle negativo (hemácias de camundongo); B – controle negativo (hemácias de hamster); C – controle negativo (hemácias de rato branco); D - extrato total de *C. catenaeformis* + hemácias de camundongo; E - extrato total de *C.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

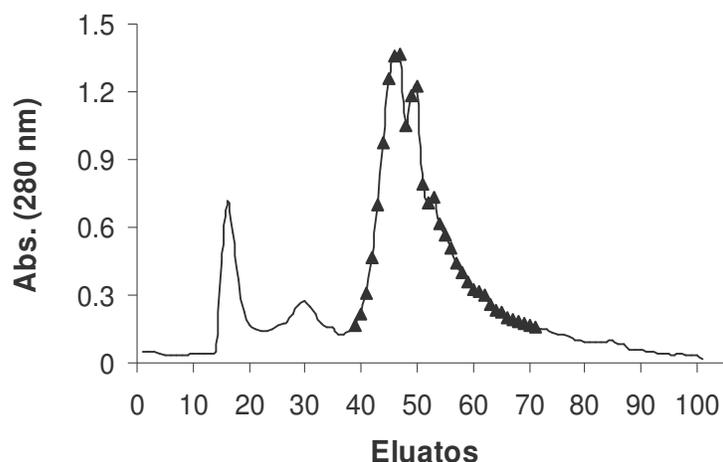


Figura 19 – Cromatografia em coluna de Sephadex G-100 (62,5 x 1,5 cm) equilibrada com tampão Tris/HCl 0,05M contendo NaCl 0,15M, pH 8,0. Amostra: 220mg de extrato liofilizado de *C. catenaeformis*. Fluxo de eluição: 0,3mL/minuto. Frações de 3mL foram coletadas e monitoradas a 280 nm. “▲” triângulo cheio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

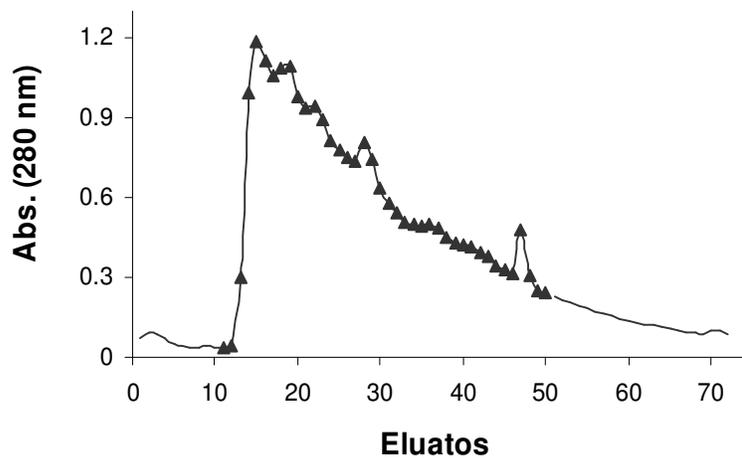


Figura 20 – Cromatografia em coluna de Sephadex G-100 (62,5 x 1,5 cm) equilibrada com tampão Tris/HCl 0,05M contendo NaCl 0,15M, pH 8,0. Amostra: 220mg de extrato liofilizado de *P. venosa*. Fluxo de eluição: 0,3mL/minuto. Frações de 3mL foram coletadas e monitoradas a 280 nm. “▲” triângulo cheio indica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

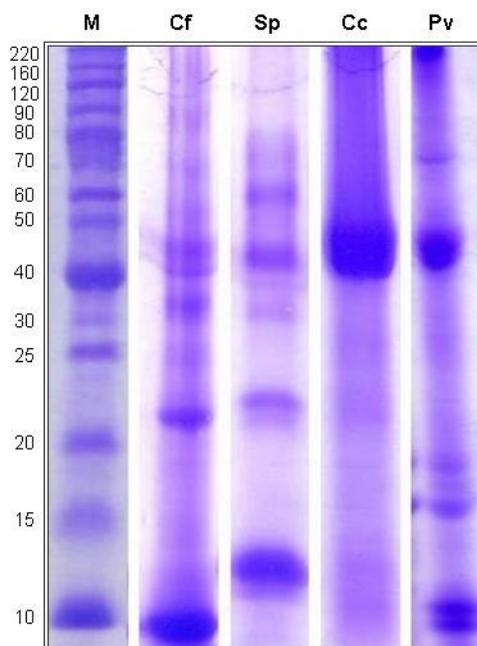


Figura 21 - Eletroforese em SDS-PAGE (12,5%). Cf: 30 μ g de extrato total de *C. ferrea* var. *cearensis*; Sp: 30 μ g de extrato total de *S. polyphylla*; Cc: 30 μ g de extrato total de *C. catenaeformis* e Pv: 30 μ g de extrato total de *P. venosa*. M: marcadores de massa molecular: BenchMark Protein 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).

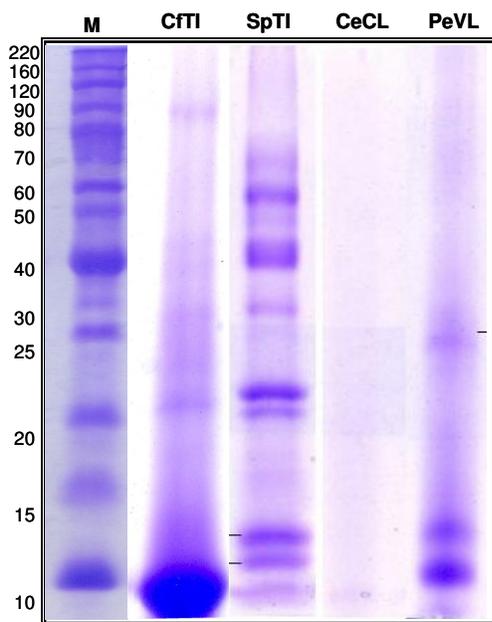


Figura 22 - Eletroforese em SDS-PAGE (12,5 %). CfTI e SpTI: 30 µg de frações com atividade inibitória; CeCL e PeVL: 30 µg de frações com AHE. M: marcadores de massa molecular: BenchMark Protein Ladder (220 kDa – 10 kDa). kDa: kilodalton. As bandas de proteínas foram coradas com Coomassie brilliant blue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