



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

Potenciais Fungicida e Inseticida de Proteínas Presentes em Sementes de *Dioclea megacarpa* Rolfe

Adelina Braga Batista

Fortaleza, CE

2009

TITULO DA DISSERTAÇÃO

**Potenciais Fungicida e Inseticida de
Proteínas Presentes em Sementes de *Dioclea
megacarpa* Rolfe**

ADELINA BRAGA BATISTA

**DISSERTAÇÃO SUBMETIDA À COORDENAÇÃO DO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA, COMO
REQUISITO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
BIOQUÍMICA**

ORIENTAÇÃO

Prof^a Ilka Maria Vasconcelos

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FORTALEZA-CE**

Abril-2009

B336p Batista, Adelina Braga

Potenciais fungicida e inseticida de proteínas presentes em sementes de *Dioclea megacarpa* Rolfe / Adelina Braga Batista, 2009.

125 f. ;il. enc.

Orientadora: Profa. Dra. Ilka Maria Vasconcelos

Área de concentração: Bioquímica Vegetal

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências. Depto. de Bioquímica, Fortaleza, 2009.

Esta dissertação foi apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca de Ciências e Tecnologia da referida Universidade.

A citação de qualquer trecho desta dissertação é permitida, desde que seja feita de acordo com as normas da ética científica.

Adelina Braga Batista

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: ____/____/____

Dr. Benildo de Sousa Cavada
Universidade Federal do Ceará

Dra. Marjory Lima Holanda
Universidade Federal do Maranhão

Dra. Ilka Maria Vasconcelos
(Orientadora)

“O verdadeiro heroísmo consiste em persistir por mais um momento quando tudo parece perdido”.

- Autor Desconhecido -

Agradecimentos

A Profa. Dra. **Ilka Maria Vasconcelos**, por me acolher em seu laboratório, por ter acreditado no meu potencial, mesmo sabendo que eu não tinha algum tipo de experiência com a pesquisa e, por hoje, ter transformado uma Fisioterapeuta numa Mestre em Bioquímica. Em especial, pelo carinho e preocupação demonstrados.

Ao **Prof. Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira**, por todo conhecimento transmitido, bem como pela abertura do seu laboratório para o desenvolvimento de grande parte dessa dissertação.

Ao **Prof. Benildo Sousa Cavada** e a **Profa. Marjory Lima Holanda** que aceitaram o convite para participação da banca examinadora.

Ao Laboratório da **Profa. Dra. Norma Maria Benevides**, que teve participação intensa para realização deste trabalho, por tamanha prestatividade de seus componentes: **Luana, Edfrank, Aninha, Ticiane, Gabi, Ariévilo, Ivana**.

Aos meus amigos de mestrado e doutorado do LABTOX. **Hermógenes David**, meu “Google Ambulante”, que se tornou um grande amigo e que foi de fundamental importância para meu amadurecimento científico. **Mirella Leite**, pela excelente convivência e pela ajuda nos gráficos e tabelas dessa dissertação. **Janne Keilla**, que não pôde estar presente nesses últimos meses, mas que me ensinou muito quando presente. **Geórgia Sampaio**, “dona” de um coração enorme, e que me ajudou bastante, principalmente no início desta pesquisa. **Daniel Câmara**, que conquistou meu respeito e minha amizade. **Juliana Gifoni** pelas boas risadas dadas. **Daniele Souza**, que apesar de não trabalhar mais no laboratório, tive a oportunidade de conhecer; tornando-se uma pessoa pela qual tenho imensa satisfação da presença.

Ao meu grande amigo e companheiro de todas as horas, **Henrique Pinho**, que esteve presente neste trabalho do começo ao fim. Agradeço também por “vestir a camisa” da nossa amizade, por ter sido meu ouvido, por me acalmar nos momentos mais difíceis e por me proporcionar tanta alegria quando está ao meu lado.

Aos meus IC’s do coração, que a meu ver, são muito melhores que alguns Doutores que estão aí no mercado de trabalho. **Hélen Costa**, que também trilhou meus conhecimentos científicos iniciais, além de ter sido meu ouvido em muitos momentos. **Raquel Rocha**,

tornou uma grande amiga e que foi de fundamental importância para o desfecho desse trabalho. **Handerson Ribeiro**, que conquistou a minha admiração e que foi responsável pelas eletroforeses finais. **Martônio Viana**, que é praticamente um anexo do LABTOX, pela ajuda em muitas etapas.

Ao meu grande amigo **Davi Farias**, que sempre levantou minha auto-estima, ressaltando minha capacidade de enfrentar todos os obstáculos impostos. Por toda a disponibilidade em diferentes situações, que foram desde ajuda em diversos experimentos até aos inúmeros conselhos dados. Também, por tornar meus dias muito mais felizes pelas boas gargalhadas dadas quando estamos juntos.

Ao laboratório de Defesa de Plantas. **Fredy**, pela paciência em me ajudar com o ensaio da atividade quitinásica, com o qual quebrei tanto a cabeça. **Darcy**, por ser uma das pessoas mais generosas que já conheci. **Hélio**, pela disponibilidade em ajudar.

Aos meus outros colegas do Departamento de Bioquímica, **Eliane, Cristina, Raquelzinha, Adilton, Rafael, Cléverson**, que de uma maneira ou outra, deram uma mãozinha, às vezes uma mãozona, neste trabalho.

Aos funcionários, **Nêga, Márcio, D. Mariza**.

A minha família: **meus pais**, por toda a dedicação e suporte dados; ao meu irmão **Gustavo**, que apesar da pouca idade, já tem consciência da importância deste Mestrado; a minha irmã=amiga=companheira, **Amanda**, que viveu intensamente essa fase da minha vida, compartilhando absolutamente todos os momentos de alegria e tristeza vividos.

As minhas grandes amigas de toda uma vida, que sempre acreditaram que eu chegaria longe, **Paula, Gabi e Nara**, as quais deposito uma imensa confiança.

A **DEUS**, por tudo que conquistei e por tudo que sou. **Que soube dar cada coisa, assim como retirar cada qual no momento certo da minha vida.**

Muito Obrigada!

Este trabalho foi realizado graças ao auxílio das seguintes instituições:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CAPES), através da concessão de bolsa de Pós-Graduação à autora deste trabalho e de auxílio à pesquisa através dos Projetos de Pesquisa: 1) *Moringa oleifera*: Uma Fonte Alternativa de Proteínas como Aditivo em Ração em Substituição ao Milho e/ou Soja no Setor Produtivo Avícola (Nº do Processo: 503426/2003-2 CT-Agronegócio/MCT/CNPq/MESA 01/2003); 2) Recuperação e Otimização da Infra-Estrutura do Laboratório de Toxinas Vegetais (Nº do Processo: 412497/2003-4 CNPq); 3) Bioquímica, Biologia Molecular e Fisiologia de Plantas (Nº do Processo: 620231/2004-1 MCT/CNPq/PADCT) e 4) Prospecção de Peptídeos/Proteínas de Plantas Nativas e Cultivadas do Nordeste Brasileiro com Potencial Biotecnológico no Controle de Pragas e Doenças Agrícolas (Nº do Processo: 301086/2006-0).

Banco do Nordeste (BNB), por concessão de auxílio à pesquisa através do Projeto de Pesquisa “Genômica Funcional, Estrutural e Comparativa do Feijão-Caupi (*Vigna unguiculata*)” (MCT/BNB, Programa RENORBIO – Rede Nordeste de Biotecnologia).

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, em cujos laboratórios esta pesquisa foi realizada.

RESUMO

Dioclea megacarpa Rolfe é usada como sinonímia de *D. relexa* var. *grandiflora*, uma espécie pertencente à família Fabaceae (Leguminosae). Estudos prévios, realizados por nosso grupo de pesquisa, demonstraram a presença em suas sementes de proteínas ativas contra fungos fitopatogênicos, dentre eles *Aspergillus niger*. Assim, o presente trabalho foi proposto no intuito de avaliar a bioatividade de proteínas de sementes de *D. megacarpa* contra fungos, conduzindo à sua purificação e caracterização parcial, bem como à investigação de seu mecanismo de ação. Outro objetivo deste trabalho foi examinar o potencial inseticida da lectina com especificidade por glucose-manose, isolada de sementes de *D. megacarpa* (Moreira *et al.*, 1983), contra o bruquídeo do feijão-caupi *Callosobruchus maculatus*. Para tanto, farinha de sementes foi posta em contato com NaCl 0,15 M (1:5, p/v), seguida de agitação contínua por 3 h, filtração em pano de trama fina, re-extração por 1 h e centrifugação a 11.500 x g, 30 min, 4 °C. O sobrenadante obtido, denominado de extrato total, se mostrou ativo contra *A. niger* e apresentou várias proteínas bioativas, compreendendo lectina (129,27 UH/mgP, com eritrócitos tripsinizados de coelho), inibidor de tripsina (18,91 mg de tripsina inibida/gF), urease (47,50 U/gF), toxina (DL₅₀ 119,60 mgP/Kg de peso corpóreo de camundongo), quitinase (1,66 nKat/mgP) e β-1,3-glucanase (0,55 nKat/mgP). Por outro lado, atividades peroxidásica e proteolítica não foram detectadas. Para purificação da proteína antifúngica, foram realizadas cromatografias em matrizes de Sephadex G-50, Quitina e Resource-Q, essa última acoplada ao sistema de FPLC. A proteína antifúngica purificada de sementes de *D. megacarpa*, denominada de *Dm*-PAF, com massa molecular aparente de 67-68 kDa (PAGE-SDS), não mostrou atividades hemaglutinante e quitinásica e apresentou sua seqüência NH₂-terminal bloqueada. *Dm*-PAF, em concentração baixíssima (0,015 µgP/µL), se mostrou capaz de inibir o crescimento das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida tropicalis*, cuja investigação do mecanismo de ação não revelou envolvimento dessa proteína com bombas de H⁺-ATPase. Em adição, a lectina ligante a glucose-manose, obtida na cromatografia em Sephadex G-50, mostrou potente atividade inseticida contra *C. maculatus*, interferindo em parâmetros importantes relacionados ao ciclo de vida do inseto. Os dados apresentados mostram as sementes de *D. megacarpa* como uma rica fonte de proteínas interessantes, possivelmente envolvidas no mecanismo de defesa das plantas.

ABSTRACT

Dioclea megacarpa Rolfe is the correct synonym for *D. relexa* var. *grandiflora*. This species belongs to Fabaceae, the legume family. Previous studies, realized in our research group, showed the presence of active proteins for several phytopathogenic fungi in the seeds of this species, among of them *Aspergillus niger*. Thus, the present work was proposed with the objective of determining the bioactivity of protein(s) from *D. megacarpa* seeds against fungi, leading to its/their purification and partial characterization and further investigation of its/their action mechanism. Another approach of this work it was analyze the insecticidal potential of glucose/mannose-specific lectin, isolated from *D. megacarpa* seeds (Moreira *et al.*, 1983), against the cowpea bruchid *Callosobruchus maculatus*. For this, seed flour was placed in contact with 0.15 M NaCl (1:5, w/w), followed by stirring for 3 h, filtration through a nylon cloth, re-extraction for 1 h, centrifugation at 11,500 x g, for 30 min, at 4 °C. The supernatant obtained, named total extract, showed antifungal activity against *A. niger* and presented several bioactive proteins, including lectin (129.27 UH/mgP, using trypsinized rabbit erythrocytes), trypsin inhibitor (18.91 mg de tripsina inibida/gF), urease (47.50 U/gF), toxin (LD₅₀ 119.60 mgP/Kg mice body weight), chitinase (1.66 nKat/mgP) e β-1,3-glucanase (0.55 nKat/mgP). On the other hand, peroxidasic and proteolytic activities were not detected. For purification of antifungal principle, several chromatographies were performed on Sephadex G-50, Chitin and Resource Q, this last connected to an FPLC system. The purified antifungal protein, named *Dm*-PAF, with apparent molecular mass of 67-68 kDa (SDS-PAGE), did not show any haemagglutinating or chitinolytic activity and presented its NH₂-terminal sequence blocked. *Dm*-PAF, at a very low concentration (0.015 µgP/µL), it was able to inhibit the growth of *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida tropicalis* yeasts. The investigation of the antifungal action mechanism excluded the possibility of interaction between *Dm*-PAF and H⁺-ATPase pumps. In addition, the glucose/mannose-specific lectin, obtained from Sephadex G-50 column, exhibited a potent insecticidal activity against *C. maculatus*, interfering in important parameters related to life cycle of this insect. These data show to be the *D. megacarpa* seeds a rich source of biologically interesting proteins, possibly involved in the defense mechanism of plants.

1. INTRODUÇÃO



Estimativas apontam para um crescimento em torno de 1.900% na quantidade de agroquímicos liberados no ambiente nos últimos 50 anos, visando o combate de insetos-praga e fungos fitopatogênicos (KARUNGI *et al.*, 2000). Esse fato aumenta consideravelmente os custos na produção agrícola, além de não se mostrar tão eficiente, reduzindo em apenas 7% os prejuízos na agricultura, e de deixar resíduos indesejáveis no meio ambiente e nos alimentos, causando, inclusive, contaminações aos agricultores (CARLINI e GROSSI-DE-SÁ, 2002, SMAGGHE *et al.*, 2006, FIELDS, 2006, SÁ *et al.* 2009). Refletindo a não eficiência completa dos agroquímicos, sobressaem-se as estimativas de perdas agrícolas causadas por fungos, 12% do potencial de grãos (LEE *et al.*, 2003), e por insetos, 10% da produção armazenada, representando mais de 90 milhões de grãos (CARLINI e GROSSI-DE-SÁ, 2002).

Buscando amenizar o quadro apresentado, estudos têm sido direcionados para a detecção de novas substâncias bioativas (DUKE, 1993, DAAYF *et al.*, 1995, TEGEGNE *et al.*, 2008, RIZZELLO *et al.*, 2009) Muitas das substâncias descritas são de natureza protéica e, a maioria dessas, de origem vegetal, dada a grande biodiversidade desse reino. Algumas dessas proteínas têm se mostrado passíveis de serem expressas em plantas transgênicas devido ao seu potencial em proteger culturas economicamente importantes, contribuindo para a redução do uso de produtos químicos na agricultura (GAO *et al.*, 2000; VILA *et al.*, 2001; GONZALES *et al.*, 2002; MORENO *et al.*, 2003; VICENT *et al.*, 2007). Todavia, é fato que, para uma utilização segura dessas proteínas, conhecimentos prévios sobre suas propriedades estruturais, biológicas e fisiológicas são de extrema relevância.

Com base no exposto, e em consonância com os trabalhos realizados por nosso grupo de pesquisa, tendo como foco a participação de proteínas de origem vegetal como armas de defesa contra fungos e insetos, é que o presente trabalho foi proposto. Para tanto, foi buscada uma espécie presente na caatinga cearense para servir de material de estudo. Esse bioma foi selecionado pelo seu potencial para prospecção de novas proteínas bioativas e, sobretudo, por ter sido pouco explorado cientificamente [MARACAJÁ *et al.*, 2003; AMBIENTE BRASIL-AMBIENTE NATURAL (CAATINGA), 2009]. A espécie selecionada foi a *Dioclea megacarpa* Rolfe, pois um “screening” prévio realizado em nosso laboratório mostrou a presença em suas sementes de substâncias ativas contra os fungos fitopatogênicos *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *F. viguliforme* e *Penicillium herguei*. Contudo, não havendo sido realizado um estudo mais aprofundado com foco na purificação e caracterização da(s)

substância(s) bioativa(s), o presente trabalho foi proposto. Para monitorar a purificação da(s) substância(s) antifúngica(s) foi usado como modelo experimental um dos fungos descritos, o *A. niger*, dada à confirmação de sua identidade por seqüenciamento do DNA ribossomal.

No início do desenvolvimento do presente trabalho, alguns questionamentos surgiram, dentre esses: (a) o princípio responsável pela atividade antifúngica seria de natureza protéica? (b) caso fosse, essa atividade seria devido à lectina descrita por Moreira *et al.* (1983)? (c) A exemplo de outras lectinas, a lectina descrita por Moreira *et al.* (1983), cuja é de fácil obtenção, apresentaria atividade inseticida contra *C. maculatus*?

Diante das considerações feitas, foi formulada a hipótese a seguir: “Sementes de *D. megacarpa* constituem-se em uma rica fonte de proteínas de defesa, ativas no controle de fungos e do inseto *C. maculatus*”. Para testar essa hipótese, os seguintes questionamentos foram elaborados:

1. *Qual(is) proteína(s) seria(m) responsável(is) pela atividade antifúngica detectada no extrato total de sementes de D. megacarpa?*
2. *A lectina, descrita por Moreira et al. (1983), seria capaz de interferir negativamente em parâmetros importantes relacionados ao ciclo vital do inseto C. maculatus?*

No intuito de responder aos questionamentos supracitados, várias abordagens experimentais foram feitas, incluindo diferentes técnicas de purificação e caracterização de proteínas, além de bioensaios com fungos e inseto.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 - Defesa Vegetal

Ao longo da evolução, as plantas desenvolveram um sofisticado e elaborado sistema de defesa, como forma de defesa diante do grande número de inimigos potenciais que as cercam, abrangendo fungos, insetos, bactérias, vírus, ácaros, nematóides e mamíferos. Esse mecanismo de defesa é mediado por reações complexas, muitas dessas sendo ativadas em resposta a tais agressores (FRITG *et al.*, 1998; SHAO *et al.*, 1999; VERONESE *et al.*, 2003; MONTESINOS, 2003, JONES e TAKEMOTO, 2004; FERREIRA *et al.*, 2007, CHANG *et al.*, 2008). Essas reações apresentam semelhanças com o sistema de imunidade inata, isto é, não mediado por anticorpos dos animais (MOLINA, 2003).

A velocidade com que a planta reconhece a presença do agressor determina a rapidez da resposta à invasão. Se a resposta for mais rápida do que o processo de infecção/predação, a planta pode conter o agressor, caracterizando a resistência; caso contrário, uma situação definida como suscetibilidade predomina (SHEWRY e LUCAS, 1997, DATTA e MUTHUKRISHNAN, 1999; HAMMOND-KOSACK e JONES, 2000, DE WIT, 2007).

As duas principais estratégias relacionadas à defesa de plantas contra o ataque de pragas e patógenos compreendem as defesas pré-formadas ou constitutivas e as defesas pós-formadas ou induzidas (NÜRNBERGER *et al.*, 2004; FERNANDES *et al.*, 2006). As defesas constitutivas são compostas de estruturas físicas e químicas, que funcionam como barreiras visando conter a invasão de microorganismos. As defesas físicas são representadas por pêlos, tricomas, espinhos, ceras, parede celular, dentre outras estruturas. Já as defesas químicas consistem de reações bioquímicas que ocorrem nas células e tecidos vegetais, produzindo substâncias com ação tóxica ao patógeno ou que são capazes de criar condições adversas ao seu desenvolvimento na planta (BOWLES, 1990, OLIVEIRA, *et al.*, 2004). Essas substâncias são representadas por terpenóides, ácidos hidroxâmicos, glicosídeos cianogênicos, compostos fenólicos, peptídeos etc (MENEZES e JARED, 2002).

A outra linha de defesa, compreendendo os mecanismos de resposta induzidos, corresponde a qualquer mudança morfológica ou fisiológica, resultante da ação de

patógenos. Quando as plantas são atacadas por fitopatógenos, é desenvolvido um mecanismo de defesa conhecido como Resposta Hipersensitiva (HR) (WANG *et al.*, 1996; LAMB e DIXON, 1997). Essa resposta é caracterizada pela falência rápida do tecido vegetal ao redor do sítio de infecção, resultando em necrose, que impossibilita a propagação do patógeno para outros tecidos da planta, interrompendo, assim, a manifestação da doença. A planta, também, pode desenvolver uma resposta conhecida como Resistência Sistêmica Adquirida (SAR), sendo estabelecida após a HR. Essa resposta é caracterizada pela ativação sistêmica de várias classes de genes que codificam proteínas relacionadas à patogênese, denominadas simplesmente de PR-proteínas, e pelo desenvolvimento de uma resistência prolongada a infecções causadas por uma gama de patógenos, inclusive por aqueles diferentes do patógeno que iniciou o ataque (STINTZI *et al.*, 1993; KESSMANN *et al.*, 1994; STICHER *et al.*, 1997; VAN LOON e VAN STRIEN, 1999b, GHOSH, 2009).

2.2 - Proteínas Envolvidas na Defesa Vegetal

As plantas dispõem de um vasto número de peptídeos e proteínas, dentre outras substâncias, capazes de protegê-las contra o ataque de pragas e patógenos. A síntese de algumas dessas proteínas é induzida por agentes bióticos ou abióticos, outras são expressas constitutivamente (VAN DEN BERGH *et al.*, 2002, OLIVEIRA 2004).

Várias são as proteínas vegetais supostamente envolvidas na defesa vegetal. As mais conhecidas incluem lectinas, inibidores de proteases, proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs dos tipos 1 e 2) e glico-hidrolases (BOWLES, 1990; CHRISPEELS e RAIKHEL, 1991; PEUMANS e VAN DAMME, 1995; KOIWA *et al.*, 1997, NASI *et al.* 2009). Uma família que, também, merece destaque é a das PR-proteínas, em particular as quitinases (SINGH, *et al.*, 2007). Outras proteínas envolvidas na defesa de plantas são as arcelinas, canatoxina, toxina da soja e formas modificadas de proteínas de estocagem (CARLINI e GROSSI-DE-SÁ, 2002; VASCONCELOS *et al.*, 2008). Há, ainda, um

grupo de compostos de defesa denominado de peptídeos antimicrobianos ou AMP, compreendendo tioninas, defensinas, proteínas de transferência de lipídios, peptídeos tipo heveína e tipo “knottin” (VAN DEN BERGH *et al.*, 2002). Alguns dos compostos citados defendem o vegetal do ataque de insetos fitófagos, outros de fungos, bactérias ou vírus. Há, ainda, aqueles que são potentes contra a ação de mais de um tipo de agente agressor (DATTA e MUTHUKRISHNAN, 1999; LI e CLAEESON, 2003, LAM e NG, 2009).

Dentre os compostos citados, as lectinas se destacam como proteínas de defesa por sua ampla atuação frente a herbívoros e patógenos. Tal proteção ocorre devido à sua capacidade de ligação a glicoconjugados e, conseqüente, desestabilização do metabolismo do agressor, exercendo, assim, efeitos deletérios (BANDYOPADHYAY *et al.*, 2001). Em animais superiores, essa interação pode ocasionar efeitos agudos e/ou crônicos. Os efeitos agudos são caracterizados por vômitos, náuseas e diarreia com conseqüente prejuízo à permeabilidade da mucosa intestinal. Os efeitos crônicos levam, principalmente, à hiperplasia e à hipertrofia do intestino delgado (VASCONCELOS e OLIVEIRA, 2004). Em insetos, são muitos os efeitos deletérios associados à ação de lectinas. Todavia, há consenso de que um requisito básico para que lectinas possam exercer ação inseticida é sua resistência à proteólise por enzimas digestivas. Assim sendo, essas proteínas podem interagir especificamente com glicoconjugados na superfície do trato digestório de células epiteliais do inseto, ou mesmo com enzimas digestivas glicosiladas, interferindo na assimilação de proteínas e prejudicando, por conseguinte, a digestão e absorção de nutrientes (JANZEN *et al.*, 1976; GATEHOUSE *et al.*, 1995; CARLINI e GROSSI-DE-SÁ, 2002; MACEDO *et al.*, 2007).

Lectinas, também, têm mostrado ação contra fungos. Essa ação é verificada especialmente naquelas que se ligam à quitina, como as lectinas de batata e tomate (SCHLUMBAUM *et al.*, 1986). A lectina de *Urtica dioica* (UDA), com 8,5 kDa, é um outro exemplo, tendo se mostrado capaz de inibir o crescimento de diversos fungos por atuar na síntese e/ou deposição de quitina na parede celular (BROEKAERT *et al.*, 1989). Ação antifúngica também foi verificada na heveína (500-2000 µgP/mL), que mostrou atividade inibitória sobre a germinação de esporos e crescimento de hifas de *Pyrenophore triticirepentis* (VAN PARIJS *et al.*, 1991). Mais recentemente, foi descrito o potencial antifúngico da lectina cotiledonária de *Lutzelburgia auriculata* (LAA), tendo sido constatada sua liberação no meio circundante durante a germinação, além da

expressiva inibição dos fitopatógenos *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium solani*, *Aspergillus niger* e *Sacharomyces cerevisiae* (MELO *et al.*, 2005).

Além das lectinas, um destaque também deve ser dado para as PR-proteínas. Essas proteínas foram reunidas em diferentes grupos, de acordo com suas características físico-químicas e imunológicas, assim como grau de similaridade (STINTZI *et al.*, 1993). Atualmente, as PR-proteínas estão classificadas em 17 grupos, como mostrados na TABELA 1, todos eles apresentando atividade antifúngica e/ou antibacteriana *in vitro*. Muitas dessas proteínas estão expressas constitutivamente nas plantas, porém, em baixos níveis. Outras nem mesmo são detectadas em condições fisiológicas normais. Todavia, em ambos os casos, uma elevação significativa é observada quando o vegetal é submetido a condições de estresse (CHRISTENSEN *et al.*, 2002).

Dentre o grupo das PR-proteínas, sobressaem-se como potentes proteínas de defesa as quitinases. Essas enzimas são capazes de hidrolisar quitina, um polímero de (β -1,4) *N*-acetilglucosamina (CHEONG *et al.*, 2000, KAO *et al.*, 2009). Plantas superiores produzem diferentes tipos de quitinases, diferindo na estrutura protéica, substrato específico, mecanismo de catálise e sensibilidade para inibidores (BRUNNER *et al.*, 1998). As enzimas da classe I, conceituadas atualmente como quimerolectinas, possuem 39 a 42 resíduos de aminoácidos compondo a extremidade NH₂-terminal (domínio heveínico), apresentando alta similaridade com os domínios de ligação à quitina presentes na UDA, lectina de trigo (WGA) e heveína. Em contrapartida, as quitinases da classe II não apresentam capacidade de ligação à quitina, não possuindo esse domínio na extremidade NH₂-terminal. Mesmo assim, ambas são consideradas quitinases, dada à atividade quitinásica demonstrada, revelando que a ação da enzima é independente do sítio de ligação a carboidratos. Já as da classe III apresentam atividade lisozímica e não se assemelham estruturalmente com os outros tipos. As outras classes incluem: classe IV, na qual as enzimas apresentam alta similaridade com as da classe I (SANTOS *et al.*, 2004); classe V, que apresenta dois domínios de ligação à quitina (GOMES, 2002) e classe VI, cujos componentes são similares a algumas quitinases bacterianas (SANTOS *et al.*, 2004). Os principais alvos das quitinases são os fungos fitopatogênicos. Como exemplos de quitinases antifúngicas, as de milho, tabaco, ervilha, abacaxi, feijão, trigo e cevada podem ser citadas, tendo sido verificados seus efeitos inibitórios na germinação de esporos e/ou desenvolvimento de hifas (TAIRA *et al.*, 2005).

TABELA 1 - Famílias de Proteínas Relacionadas à Patogênese (PR-Proteínas)

Família	Membros	Atividades
PR-1	Fumo PR-1	Antifúngica, anti-oomicetos
PR-2	Fumo PR-2	B-1,3-glucanase
PR-3	Fumo P, Q	Quitinase
PR-4	Fumo R	Quitinase (Classe I)
PR-5	Fumo S	Thaumatina-Like
PR-6	Tomate Inibidor I	Inibidor de Protease
PR-7	Tomate P69	Endoproteinase
PR-8	Quitinase Pepino	Quitinase
PR-9	Peroxidase Formadora de Lignina/Fumo	Peroxidase
PR-10	Salsinha PR-1	Ribonuclease-like
PR-11	Quitinase Classe V Fumo	Quitinase
PR-12	Defensinas	Antifúngica
PR-13	Tioninas	Antifúngica
PR-14	LTP4 Cevada	Proteína transferidora de lipídio
PR- 15	O _x O _a Cevada	Oxalato oxidase
PR- 16	O _x OLP Cevada	Oxalato oxidase-like
PR- 17	PRp27 Fumo	Desconhecida

Fonte: Van Loon *et al.*, 2006.

A atividade antifúngica das quitinases pode, ainda, ser potencializada pela sua associação com outras proteínas de defesa, dentre elas osmotinas, β -1,3-glucanases e proteínas inativadoras de ribossomos (NEHAUS, 1999).

Além das quitinases, estudos também têm sido direcionados para outras classes de PR-proteínas, dentre as quais estão peroxidases, proteases, proteínas do tipo taumatina, defensinas, β -1,3-glucanases, tioninas, proteínas de transferência de lipídios (LTPs), inibidores de proteinases, proteínas inativadoras de ribossomos e glicoproteínas ricas em hidroxiprolinas (VAN LOON, 1999; SELITRENNIKOFF, 2001).

Ainda com foco na defesa vegetal, além dos peptídeos e proteínas já citados, ressaltam-se aqueles ligantes à quitina nativa e/ou a oligômeros de *N*-acetilglucosamina (GlcNac). Esses componentes estão comumente presentes na constituição de fungos e insetos, possibilitando a ligação dessa classe de proteínas/peptídeos. Essa interação pode afetar, de forma negativa, o crescimento de fungos e insetos, levando à proposição de que esses compostos ligantes à quitina apresentam um papel de defesa nas plantas (RAUSCHER *et al.*, 1999; ZAREIE *et al.*, 2002). Dentre esses compostos encontram-se as quitinases básicas ou de classe I, as lectinas de gramíneas, WGA e suas três isoformas, de *U. dioica* e de solanáceas, peptídeos antimicrobianos de amaranto, Ac-AMP 1 e Ac-AMP 2, e heveína (MIRELMAN *et al.*, 1975; SCHUMBAUM *et al.*, 1986; BROEKAERT *et al.*, 1989; VAN PARIJS *et al.*, 1991, 1992; LEE *et al.*, 2003).

2.3 - Predadores Vegetais

2.3.1 - Fungos

Estima-se que há mais de 1,5 milhões de espécies fúngicas no mundo, embora apenas cerca de 70.000 tenham sido descritas. Fungos são microrganismos eucariotos,

heterotróficos, aclorofilados, absortivos, imóveis, possuindo como principais barreiras de proteção a membrana plasmática e a parede celular (ADAMS, 2004).

O gênero *Aspergillus* é um exemplo vastamente distribuído na natureza, agrupando organismos considerados fungos da terra que, freqüentemente, colonizam plantas, levando à queda da safra na agricultura (GREGORY, 1973). São encontrados com alta freqüência como saprofitos (BARKAI-GOLAN, 1980, 2002; SNOWDON, 1990). Durante seu ciclo de vida, muitas espécies de *Aspergillus* são capazes de produzir diversas micotoxinas em frutas e vegetais (MOSS, 1977; SCOTT, 1994, 2004).

Uma espécie de *Aspergillus* que pode causar doença em plantas é o *A. niger*, que ataca com freqüência sementes armazenadas, prejudicando a germinação. Essa espécie é encontrada, principalmente, em bulbos e grãos. Esse fungo também é conhecido como mofo negro dos bulbos de cebola, devido à cor escura das estruturas do patógeno (BERGAIMIN *et al.*, 1995). A classificação taxonômica do *A. niger* compreende:

Reino: Fungi

Divisão: Eucomyceta

Classe: Deuteromicetos

Ordem: Moniliales

Família: Moniliacea

Gênero: *Aspergillus*

Espécie: *Aspergillus niger*

2.3.2 - Insetos

Os insetos representam um grupo diverso de animais, possuindo um milhão ou mais de espécies (LALITHA *et al.*, 2005). Tem sido estimado que metade deles seja composto por espécies fitófagas, competindo com o homem na busca por recursos disponíveis na natureza (DALY *et al.*, 1978). Esses animais são considerados os mais

devastadores de todas as pragas conhecidas, cuja ação predatória sobre plantações tem sido responsável por perda na produtividade final de várias culturas de importância agrícolas (VASCONCELOS e OLIVEIRA, 2004).

Callosobruchus maculatus (Fabr., 1975) (Coleoptera: Bruchidae), conhecido popularmente como gorgulho, é uma espécie bastante estudada por ser a principal praga de estocagem do feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] (MACEDO *et al.*, 2007). O cultivo dessa leguminosa ocorre, principalmente, na Região Nordeste do Brasil, fazendo parte, inclusive, da alimentação básica de sua população, constituindo-se em uma das principais fontes de suprimento protéico (OIGIANGBE e ONIGBINDE, 1996, RAMOS *et al.*, 2007).

Esse coleóptero passa pelas fases de ovo, larva, pupa e adulto. A fêmea adulta faz postura na parte externa do grão, onde o ovo fica aderido, ocorrendo alguns dias depois penetração das larvas, completando, assim, seu desenvolvimento. No estágio inicial, o inseto se alimenta do endosperma e num estágio posterior do embrião da semente. Esse processo de alimentação causa uma considerável perda de peso, redução de nutrientes e do poder germinativo em sementes (PUZZI, 1977; CARDOSO, 2000). As perdas nos períodos de infestação severa podem chegar a 100%, dentro de 6 meses (HALL *et al.*, 1997).

Os métodos convencionais de controle ao *C. maculatus* com inseticidas orgânicos sintéticos têm apresentado, não raras vezes, resultados insatisfatórios. Além desse problema, o uso repetido, por décadas, desses inseticidas, tem prejudicado o controle biológico pelas enemias naturais e levado ao surgimento de espécies de insetos resistentes aos pesticidas (SALUNKE *et al.*, 2005, SOMTA *et. al.*, 2008). Ainda que o pesticida tenha sido eficaz, há possibilidades de re-infestação do inseto, pelas más condições de armazenamento das sementes. Assim, as limitações de ordem econômica e suas desvantagens, como a toxicidade, dificultam o emprego dessa forma de controle com sucesso (ARRUDA e BATISTA,1998).

2.4 - Mecanismo de Ação de Proteínas Antifúngicas

Os mecanismos de ação dos peptídeos e proteínas antifúngicos são diversos, sendo os mais comuns aqueles envolvendo uma atuação direta na membrana plasmática e/ou na parede celular do fungo, ou ainda, em alvos intracelulares (SELITRENNIKOFF, 2001; THEIS e STAHL, 2004; WANG e NG, 2005).

A membrana celular dos fungos é formada por uma bicamada lipídica composta de fosfolipídeos, esfingolipídeos e esteróis, sendo alvo de vários grupos de peptídeos e proteínas antifúngicos (TOSSI *et al.*, 2000). Essa membrana, a rigor, funciona como uma barreira dotada de permeabilidade seletiva, além de participar de outras importantes funções, tais como transdução de sinais, transporte de solutos, alvo energético, replicação do DNA, secreção, dentre outras. As proteínas antifúngicas são capazes de interagir com componentes lipídicos dessa membrana, levando à formação de poros, alteração no potencial de membrana e efluxo de componentes celulares essenciais (PATTON e LESTER, 1991; THEIS e STAHL, 2004). Outra forma de atuação das proteínas antifúngicas seria nas proteínas periféricas ou integrais presentes na membrana celular. Melo *et al.* (2005) demonstraram que a lectina cotiledonária de *L. auriculata* era capaz de promover ação inibitória sobre fungos, através de sua interação com bombas H⁺-ATPases presentes na membrana celular. Essas bombas de prótons são responsáveis pela regulação e manutenção do gradiente de prótons necessário para a entrada de nutrientes na célula (SERRANO, 1989; MONK e PERLIN, 1994), em um processo denominado antiporte.

Outro mecanismo de ação antifúngico seria pela capacidade de proteínas interagirem, degradarem, ou inibirem a produção de qualquer um dos constituintes da parede celular do fungo, constituída por quitina, β -1,3- e β -1,6-glucanos, ácidos urônicos, mananas e proteínas (FIGURA 1). Exemplos de proteínas antifúngicas que atuam por esse mecanismo incluem β -1,3-glucanases (RAIKHEL *et al.*, 1993), quitinases (SINGH *et al.*, 2007), lectinas (VAN PARIJS *et al.*, 1991), proteases (MENDIETA *et al.*, 2006), dentre outras.

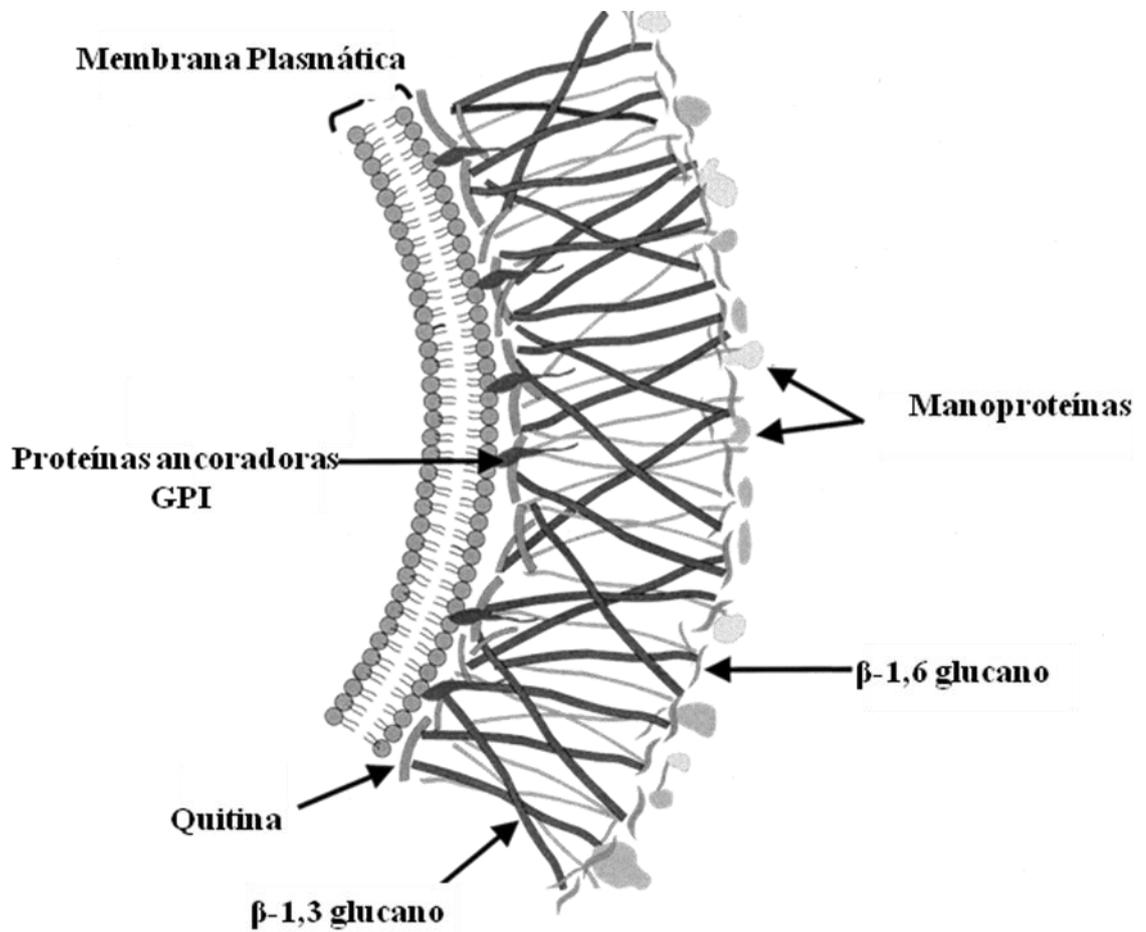


FIGURA 1 - Esquema estrutural ilustrativo da parede celular de fungos. Fonte: Selitrennikoff (2001).

Proteínas antifúngicas podem, ainda, penetrar na célula fúngica e interagir com uma variedade de alvos intracelulares, prejudicando, por exemplo, a síntese de proteínas, DNA, RNA e esteróis (ODDS *et al.*, 2003). Algumas proteínas inativadoras de ribossomos são bons exemplos, possuindo atividade antifúngica intrínseca devido à sua habilidade em depurinar o rRNA, resultando no impedimento da síntese protéica. RIPs do tipo 2 podem, inclusive, se ligar às células fúngicas e formar um canal, que permite a entrada do efetômero (cadeia A), possuidor de atividade *N*-glicosidásica, provocando danos ao RNA (HWU *et al.*, 2000).

2.5 - *Dioclea megacarpa* Rolfe

Fabaceae (Leguminosae) compreende uma larga família de plantas florescentes, representada por Orquidaceae e Compositae, com três subfamílias compreendendo 650 gêneros e mais de 18.000 espécies (VARELA *et al.*, 2004). A tribo Phaseoleae compreende um vasto número de gêneros, sendo economicamente a mais importante das tribos de Fabaceae. Essa tribo pode, ainda, ser dividida em oito subtribos: Diocleinae, Cajaninae, Phaseolinae, Clitoriinae, Ophrestiinae, Kennediinae, Erythrinae e Glycininae (POLHILL, 1994, VARELA *et al.*, 2004).

Espécies da subtribo Diocleinae são mais encontradas no Novo Mundo, apresentando uma série de características primitivas: frequência de flores largas com proeminentes discos sobre o ovário, hilo geralmente alongado e aminoácidos do tipo canavanina estão usualmente presentes (VARELA *et al.*, 2004). Treze gêneros de Diocleinae foram reconhecidos, compreendendo *Dioclea*, *Cymbosema*, *Cleobulia*, *Canavalia*, *Pachyrhizus*, *Macropsychnanthus*, *Luzonia*, *Camptosema*, *Cratyliia*, *Collaea*, *Galactia*, *Calopogonium*, e *Herpyza* (VARELA *et al.*, 2004). *Dioclea megacarpa* Rolfe, conhecida vulgarmente como mucunã, é uma leguminosa arbustiva, cujas flores são roxas, se mostrando rica em aminoácidos não protéicos, do tipo L-canavanina (FIGURA 2).



FIGURA 2 - Exsicata *Dioclea megacarpa* Rolfe.

Fonte: Herbário Prisco Bezerra – UFC.

Dioclea megacarpa Rolfe foi classificada anteriormente como *Dioclea grandiflora* (Mart.) no herbário da Universidade Federal do Ceará, Prisco Bezerra. Conseqüentemente, alguns trabalhos foram publicados com a classificação incorreta dessa espécie.

Os estudos referentes a componentes protéicos dessa espécie se restringiram ao isolamento e caracterização das lectinas glucose/manose específica (MOREIRA *et al.*, 1983) e lactose específica (MELGAREJO *et al.*, 2005), bem como do inibidor de tripsina (CARVALHO *et al.*, 1988). Dentre essas proteínas, apenas a lectina glucose/manose específica foi estudada biologicamente, onde se enfocou os efeitos causados pela ingestão por animais superiores (GRANT, 1991).

A taxonomia dessa espécie está apresentada a seguir:

Reino: Plantae

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Ordem: Fabales

Família: Fabaceae

Tribo: Phaseolea

Subtribo: Diocleinae

Gênero: *Dioclea*

Espécie: *Dioclea megacarpa* Rolfe

3. OBJETIVOS

3.1 - Gerais

- ✓ Avaliar a bioatividade de proteínas presentes em sementes de *Dioclea megacarpa* Rolfe contra fungos, conduzindo à sua purificação e caracterização parcial, bem como a investigação de seu mecanismo de ação;
- ✓ Examinar o potencial inseticida da lectina glucose-manose ligante (Moreira *et al.*, 1983) presente em sementes de *D. megacarpa* contra o inseto *Callosobruchus maculatus*.

3.2 - Específicos

- ✓ Avaliar o potencial fungicida do extrato protéico preparado a partir de farinha de sementes de *D. megacarpa* frente a fungos filamentosos e leveduriformes, através de medidas da inibição da germinação e/ou do crescimento em ensaios *in vitro*;
- ✓ Purificar e caracterizar parcialmente, a partir do extrato total de sementes de *D. megacarpa*, a(s) proteína(s) ativa(s) contra fungos;
- ✓ Buscar dados que contribuam para o conhecimento do mecanismo de ação da(s) proteína(s) antifúngica(s), avaliando dentre outras propriedades, sua capacidade de interação com bombas de H⁺-ATPase;
- ✓ Avaliar o potencial inseticida da lectina reportada por Moreira *et al.* (1983) contra *Callosobruchus maculatus*, através da análise de parâmetros relacionados ao ciclo vital do inseto.

4. MATERIAIS



4.1 - Sementes

Sementes de *Dioclea megacarpa* Rolfe (mucunã) foram coletadas em excursões para os municípios de Crato e Quixadá, localizados no estado do Ceará, regiões integrantes do bioma da caatinga.

4.2 - Eritrócitos

Os eritrócitos utilizados nos ensaios de hemaglutinação foram obtidos a partir de amostras de sangue de coelho albino adulto (linhagem Nova Zelândia), mantido no biotério do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará (UFC).

4.3 - Animais de Experimentação

4.3.1 - Camundongos

Camundongos Swiss (*Mus musculus*), 20 a 25 g, foram obtidos de colônias do Biotério Central da UFC.

4.3.2 - *Callosobruchus maculatus*

Gorgulhos (*Callosobruchus maculatus*; Coleoptera: Bruchidae), insetos adultos, foram provenientes de colônias desenvolvidas no Laboratório de Citogenética, do Departamento de Biologia da UFC.

4.4 - Fungos

4.4.1 - Fungo Filamentoso

O fungo fitopatogênico *Aspergillus niger* foi obtido da micoteca mantida pelo Laboratório de Proteínas Tóxicas do Departamento de Bioquímica e Biologia da UFC.

4.4.2 - Fungos Leveduriformes

As espécies de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (1038) e *Candida tropicalis* (CE017) foram obtidas da micoteca mantida no Laboratório de Microbiologia da UFC. Os números entre parênteses ao lado de cada espécie correspondem ao código de acesso à micoteca do Departamento de Microbiologia da UFC.

4.5 - Reagentes Químicos

Acrilamida, *N,N'*-metileno bisacrilamida, albumina sérica bovina, “Coomassie Brilliant Blue” G e R, ditioneitol, *N,N,N',N'*-tetrametiletanolamina e marcadores de massa molecular foram obtidos da Sigma Chemical Co, St. Louis, EUA.

β -mercaptoetanol e dodecil sulfato de sódio (SDS) foram obtidos da Merck, Darmstadt, Alemanha.

As matrizes cromatográficas foram adquiridas da Pharmacia, Uppsala, Suécia.

Os reagentes utilizados para análise da seqüência NH_2 -terminal foram adquiridos da Wako Pure Chemicals Industries, Osaka, Japão.

Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico e obtidos comercialmente.

5. MÉTODOS



5.1 - Preparação da Farinha de Sementes

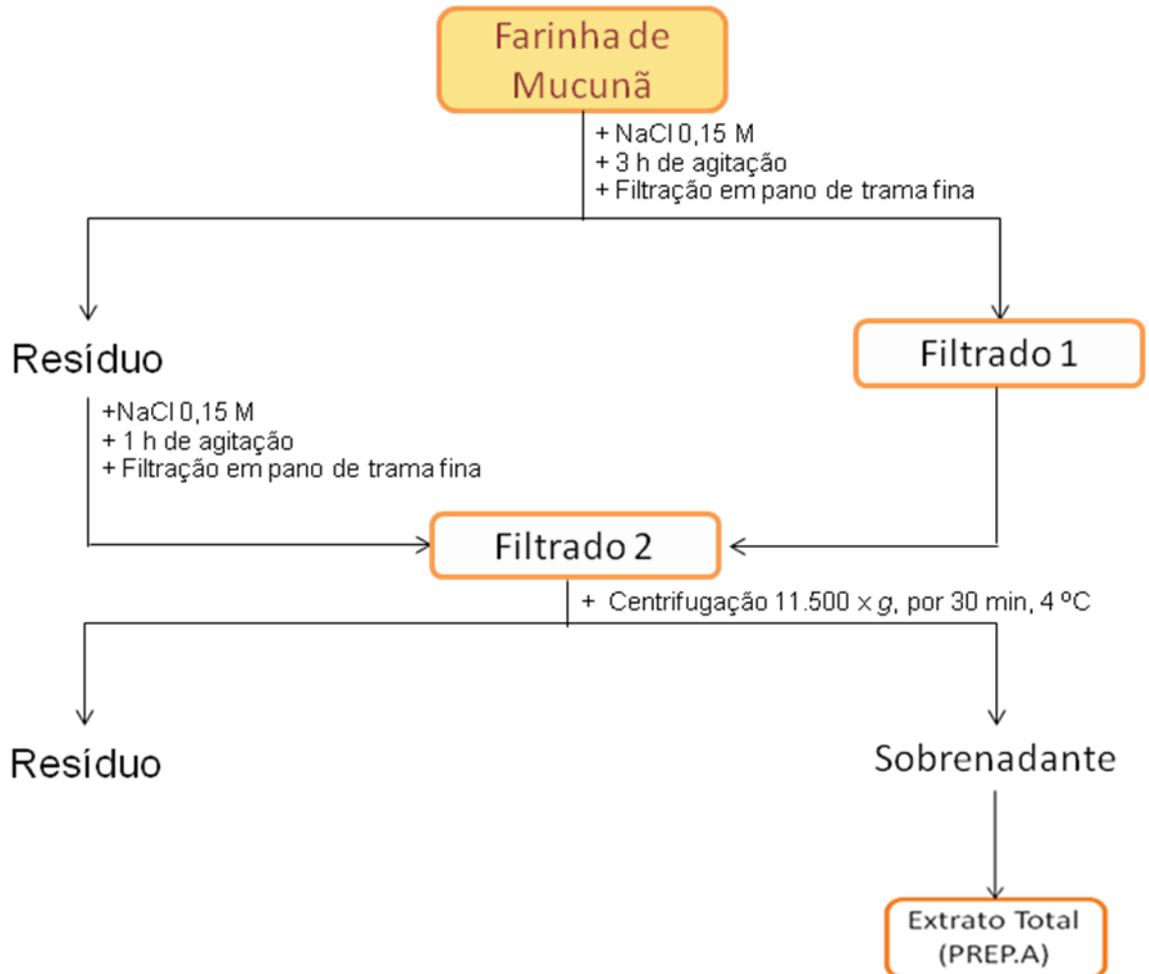
Sementes de *Dioclea megacarpa* Rolfe foram deixadas secar ao sol, por aproximadamente 24 horas. Posteriormente, foram trituradas em liquidificador e, subsequentemente, em moinho rotatório para café. As farinhas foram acondicionadas em frascos hermeticamente fechados e conservados a 4 °C.

5.2 - Obtenção do Extrato Total

O protocolo utilizado para extração de proteínas foi o estabelecido por Moreira e colaboradores (1983), com algumas modificações (FIGURA 3). Para obtenção do extrato total, a farinha foi posta em contato com NaCl 0,15 M, na proporção 1:5 (m/v), deixada sob agitação contínua por 3 horas, 4 °C, sendo, em seguida, a suspensão filtrada em pano de trama fina. O resíduo obtido foi re-extraído nas mesmas condições descritas, exceto o tempo que foi de 1 hora. Os filtrados foram reunidos e centrifugados a 11.500 x g, 30 minutos, 4 °C, sendo o precipitado descartado e o sobrenadante obtido denominado de Extrato Total.

5.3 - Determinação de Proteína

Para determinação do teor de proteínas foi utilizada a metodologia descrita por Bradford (1976). A 100 µL de amostra, em diferentes concentrações, foram adicionados

FIGURA 3 - Esquema de obtenção do extrato total de sementes de *Dioclea megacarpa*.

2,5 mL do reagente de Bradford. A mistura foi agitada e, após 10 minutos em repouso, foram feitas leituras de absorvância a 595 nm (espectrofotômetro tipo Novapesc II, Pharmacia). A concentração protéica foi estimada usando uma curva obtida a partir de concentrações conhecidas de albumina sérica bovina (BSA).

5.4 - Detecção e Dosagem de Proteínas Bioativas no Extrato Total de Sementes de *D. megacarpa*

5.4.1 - Lectina

Para detecção e dosagem de lectina foi empregada a técnica de hemaglutinação segundo a metodologia descrita por Moreira e Perrone (1977). Extrato total de sementes de *D. megacarpa*, ou frações protéicas de processos cromatográficos (descritos mais adiante), foram submetidos a diluições seriadas (1/2, 1/4, 1/8, 1/16 etc) em tubos de ensaio, na presença de NaCl 0,15 M, contendo Ca^{+2} 0,005 M e Mn^{+2} 0,005M, pH 2,6. A 0,25 mL de cada diluição, foi adicionado igual volume de uma suspensão de hemácias (2%), tratadas ou não com tripsina. Os tubos foram incubados a 37 °C, 30 minutos, deixados em repouso por mais 30 minutos à temperatura ambiente e, em seguida, centrifugados a 3.000 x g, 30 segundos, temperatura ambiente. A visualização dos aglutinados foi feita a olho nu e os resultados foram expressos em unidade de hemaglutinação (UH), definida como o inverso da maior diluição da amostra ainda capaz de aglutinar hemácias.

A técnica utilizada para tratamento enzimático dos eritrócitos foi a descrita por Lis e Sharon (1972). Inicialmente, amostras contendo 1 mL de sangue foram lavadas três vezes com NaCl 0,15 M e, em seguida, tripsina foi adicionada na proporção de 0,1 mg de enzima para 10 mL da suspensão de eritrócitos 2%. Essa suspensão foi incubada

por 1 hora, 4 °C, sob agitação ocasional e centrifugada a 3.000 x g, 5 minutos. Os eritrócitos tratados foram novamente lavados com NaCl 0,15 M (6 vezes) e o “pellet” de células resultante, suspenso em um volume de NaCl 0,15 M, suficiente para obtenção de hemácias a 2%.

5.4.2 - Inibidor de Tripsina

A determinação do teor de inibidores de tripsina foi realizada conforme o método originalmente descrito por Kakade e colaboradores (1974), com pequenas modificações (HAMERSTRAND *et al.*, 1981). Farinha de sementes de *D. megacarpa* (20 mg) foi suspensa em 1 mL de NaOH 0,01 N, mantida sob agitação constante por 3 horas à temperatura ambiente e, em seguida, em repouso por 30 minutos. Após isso, foi retirada uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante, que foi misturada com 0,5 mL de NaOH 0,01 N e centrifugada a 14. 000 x g, por 5 minutos. Após centrifugação, uma alíquota de 0,1 mL da amostra foi retirada e incubada em meio de reação que consistia de 1,6 mL de Tris-HCl 0,05 M, pH 8,2, contendo CaCl₂ 0,02 M, 0,1 mL de tripsina (solução estoque de 0,4 mg em 10 mL de HCl 0,001 N) e 0,1 mL do substrato *N*α-L-benzoil-arginina-*p*-nitroanilida (BAPNA). A mistura foi incubada a 37 °C, por 45 minutos. A reação foi interrompida com 0,2 mL de uma solução de ácido acético a 30% (v/v) e a leitura feita a 410 nm. Os resultados foram calculados baseados na curva padrão obtida com o inibidor de tripsina de soja (padrão) e expressos como quantidade em mg de tripsina inibida por g de farinha.

5.4.3 - Urease

A determinação da atividade ureásica foi realizada segundo a metodologia descrita por Kaplan (1969), com algumas modificações (VASCONCELOS *et al.*, 1997).

Alíquota de 0,1 mL de uma solução de uréia 0,5 M foi misturada com 0,7 mL de EDTA 2%, tamponado com fosfato de potássio 0,2 M, pH 6,5. Após adição de 0,2 mL do extrato total de sementes de *D. megacarpa* (preparado com tampão fosfato de sódio 0,01 M, pH 7,0, contendo NaCl 0,15 M, usando o mesmo protocolo previamente descrito), a mistura foi incubada a 37 °C, por 15 minutos. Em seguida, foi adicionado à mistura 1 mL da solução A (62 g de fenol + 0,25 g de nitropussiatode sódio/L) e 1 mL da solução B (43 mL de hipoclorito de sódio 5,25% + 20 g de hidróxido de sódio/L), sendo então, deixada a 37 °C, por mais 5 minutos. Transcorrido esse tempo, 7 mL de água deionizada foram adicionados aos tubos, sendo esses cobertos com parafilme e agitados vigorosamente. As leituras das absorbâncias foram feitas a 625 nm e a atividade enzimática foi avaliada em relação à curva padrão obtida com a urease comercial (Sigma 41H7008 – 870.000 U/g).

5.4.4 - Toxina

Para avaliação da toxicidade de sementes de *D. megacarpa*, por via intraperitoneal (i.p), foram usados camundongos Swiss, pesando entre 20-25 g, alimentados *ad libitum* com dieta peletizada comercial. Diferentes teores de proteína foram testados de modo a encontrar a dose máxima não letal, a dose mínima capaz de causar 100% de letalidade e doses intermediárias envolvendo percentuais de morte no intervalo de 0-100%. Para toxicidade, foram considerados válidos apenas os resultados observados no período de 24 horas. A toxicidade foi expressa como DL₅₀, sendo uma unidade de DL₅₀ considerada como a quantidade de proteína (mg de proteína/Kg de peso corpóreo) necessária para produzir convulsões e morte em 50% dos animais testados (VASCONCELOS *et al.*, 1994).

5.4.5 - Atividade Quitinásica

A determinação da atividade quitinásica foi realizada seguindo metodologia descrita por Boller (1993), que teve como parâmetro a liberação de *N*-acetil-D-glucosamina (NAG), a partir da ação hidrolítica das enzimas sobre quitina coloidal. Para essa finalidade, 250 μ L da amostra foram incubados com 250 μ L de quitina coloidal, a 37 °C, durante 1 hora. A atividade enzimática foi interrompida pela fervura dos tubos, em banho-maria, por 10 minutos. Após resfriamento em banho de gelo, os tubos foram centrifugados a 10.000 x *g*, por 10 minutos, e alíquotas de 300 μ L foram retiradas e incubadas com 10 μ L de uma solução da enzima glucuronidase (EC 3.2.1.31), a 37 °C, durante 1 hora. Essa solução de glucuronidase foi preparada através da diálise de um preparado bruto obtido de *Helix pomatia* (Sigma Chemical Co. - “Type HP-2”, 132.000 unidades/mL) com tampão acetato de sódio 0,050 M, pH 5,2, e diluição de 10 vezes com o mesmo tampão de reação. Para determinação de NAG liberada no ensaio, 310 μ L do hidrolisado foram acrescidos de 190 μ L de tampão acetato de sódio 0,050 M, pH 5,2, e 100 μ L de uma solução de tetraborato de sódio e potássio 0,6 M. Imediatamente, os tubos foram fervidos em banho-maria por 5 minutos e resfriados em banho de gelo. Foi adicionado, então, 1 mL da solução de *p*-dimetilaminobenzaldeído (DMAB), preparada pela dissolução de 10 g de DMAB em 100 mL de uma solução ácido acético glacial contendo 12,5 % (v/v) de ácido clorídrico 11,5 M. A mistura foi mantida a 37 °C em banho-maria, por 20 minutos, e imediatamente lida a absorbância a 585 nm. Para cálculo do teor de açúcar liberado no ensaio, uma curva padrão foi construída a partir de soluções de glucose, com concentrações variando de 100 a 500 μ M em tampão acetato de sódio 0,050 M, pH 5,2 (REISSING *et al.*, 1955). A atividade quitinolítica foi expressa em nKat/mgP, onde 1 η Kat equivale a 1 mol de NAG liberado por segundo.

5.4.6 - Atividade β -1,3-Glucanásica

A atividade β -1,3-glucanásica foi determinada através do método colorimétrico descrito por Boller (1993), considerando a formação de glicose a partir do substrato

laminarina. Primeiramente, a solução de laminarina (2 mgP/mL), diluída em tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2, foi aquecida a 60 °C, por 10 minutos, e exaustivamente dialisada contra o mesmo tampão para remoção de glucose livre. Alíquota de 100 µL da amostra foi incubada com 900 µL de uma solução de laminarina, a 50 °C, por 30 minutos. Em seguida, 1,0 mL da solução "D" (1,0 mL da solução "B" + 25,0 mL da solução "A") foi adicionado, e a mistura incubada a 100 °C, por 20 minutos. As soluções "A" e "B" foram compostas, respectivamente, por 25,0 g de carbonato de sódio anidro + 25,0 g de tartarato de sódio e potássio + 20,0 g de bicarbonato de sódio + 200 g de sulfato de sódio anidro + água q.s.p. 1 L e 15,0 g de sulfato de cobre hidratado + 20 µL de ácido sulfúrico concentrado + água q.s.p. 100 mL. Após resfriamento dos tubos, 1,0 mL da solução "C" (3,0 g de arseniato de sódio + água grau Milli-Q q.s.p. 25,0 mL) foi adicionado, os quais foram agitados até a completa remoção de gases sendo, então, deixados em repouso por 5 minutos. As leituras de absorbância foram feitas a 520 nm. Para cálculo da quantidade de açúcar liberado foi utilizada uma curva construída a partir de concentrações variadas de glucose (7,5 a 240 µg/mL), preparadas em tampão acetato de sódio, 0,05 M, pH 5,2. A atividade β-1,3-glucoanásica foi expressa em ηKat/mgP, onde 1 ηKat equivale a 1 mol de glucose liberado por segundo.

5.4.7 - Atividade Peroxidásica

Para determinação da atividade peroxidásica foi utilizada a metodologia descrita por Urbanek *et al.* (1991). Foi usado como substrato doador de prótons o guaiacol e como acceptor o peróxido de hidrogênio. A reação catalisada pela peroxidase produz um composto colorido, 3,3'-dimetoxi-4,4'-bifenolquinona (DOERGE *et al.*, 1997), que é medido por espectrometria. Partindo-se de 100 µL da amostra, diluída ou não dependendo de sua atividade, foram adicionados 500 µL de guaiacol 0,02 M e 500 µL de peróxido de hidrogênio 0,06 M para um volume final de ensaio de 2 mL, completados com tampão acetato de sódio 0,050 M, pH 5,2. A mistura foi incubada por

10 minutos, a 30 °C, e a absorvância medida a 480 nm. A variação de 1 unidade de absorvância por minuto foi assumida como sendo 1 unidade de atividade peroxidásica (1 UAPox).

5.4.8 - Atividade Proteolítica

Para determinação da atividade proteolítica total foi utilizada a metodologia descrita por Xavier-Filho (1989). Azocaseína foi usada como substrato não específico para avaliação da atividade proteolítica total. Essa proteína, ao sofrer degradação por proteases, em geral, libera um composto denominado de “azo” que funciona como cromóforo, sendo detectado no comprimento de onda de 420-440 nm. Para liberação desse cromóforo, inicialmente foi promovida a incubação por 1 hora de 500 µL da amostra (diluídas em tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 6,0 contendo ditioneitol 0,003 M) com 200 µL de uma solução 1% de azocaseína em tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 6,0, a 37 °C. A reação de proteólise foi parada após o tempo decorrido com adição de 300 µL de ácido tricloroacético (TCA) 20% que, também, promove a precipitação das proteínas totais. Foi realizada uma centrifugação a 10.000 x g, por 10 minutos, com finalidade de separar a azocaseína precipitada dos peptídeos em solução. Uma alíquota de 400 µL do sobrenadante foi alcalinizada com 400 µL de uma solução de hidróxido de sódio 2 N e a absorvância medida a 420 nm. A variação de 0,01 unidade de absorvância por minuto foi assumida como sendo 1 unidade de atividade proteolítica (1 UAP).

5.5 - Purificação de Proteínas Bioativas do Extrato Total de Sementes de *D. megacarpa*

Além das atividades descritas, foi verificado que o extrato total de sementes de *D. megacarpa* apresentava propriedades antifúngicas frente a fungos filamentosos e

leveduriformes. Assim, a atividade antifúngica foi monitorada durante o fracionamento protéico resultante das diferentes cromatografias. Em paralelo, algumas das atividades relacionadas às proteínas bioativas supracitadas foram também avaliadas. A FIGURA 4 mostra o esquema de purificação utilizado.

5.5.1 - Cromatografia em Matriz de Sephadex G-50

Esse procedimento foi usado para obtenção da lectina pura, tendo sido realizado conforme descrito por Moreira *et al.* (1983). Alíquota do extrato total (200 mgP) foi aplicada em coluna de Sephadex G-50 (28,5 x 3,1 cm), previamente equilibrada com NaCl 0,15 M contendo 0,005 M Ca^{+2} e 0,005 M Mn^{+2} . Em seguida, a coluna foi percolada com a mesma solução de equilíbrio até que as proteínas não retidas, apresentadas sob a forma de dois picos protéicos, denominados S1 e S2, fossem completamente removidas. A eluição da proteína retida (S3), correspondente à lectina, foi efetuada com tampão glicina-HCl 0,1 M, contendo NaCl 1 M, Ca^{+2} 0,005 M e Mn^{+2} 0,005 M, pH 2,6. O fluxo utilizado foi de 30 mL/h e frações de 6 mL foram coletadas, a 4 °C (coletor Pharmacia LKB FRAC-100). A cromatografia foi monitorada através de leituras de absorvância a 280 nm. De posse das diferentes frações protéicas, foram avaliadas as atividades hemaglutinante, quitinásica e antifúngica. Nos testes com fungos, foram investigados os efeitos sobre a germinação de esporos e crescimento das hifas de *A. niger* e, também, sobre o crescimento de *S. cerevisiae*.

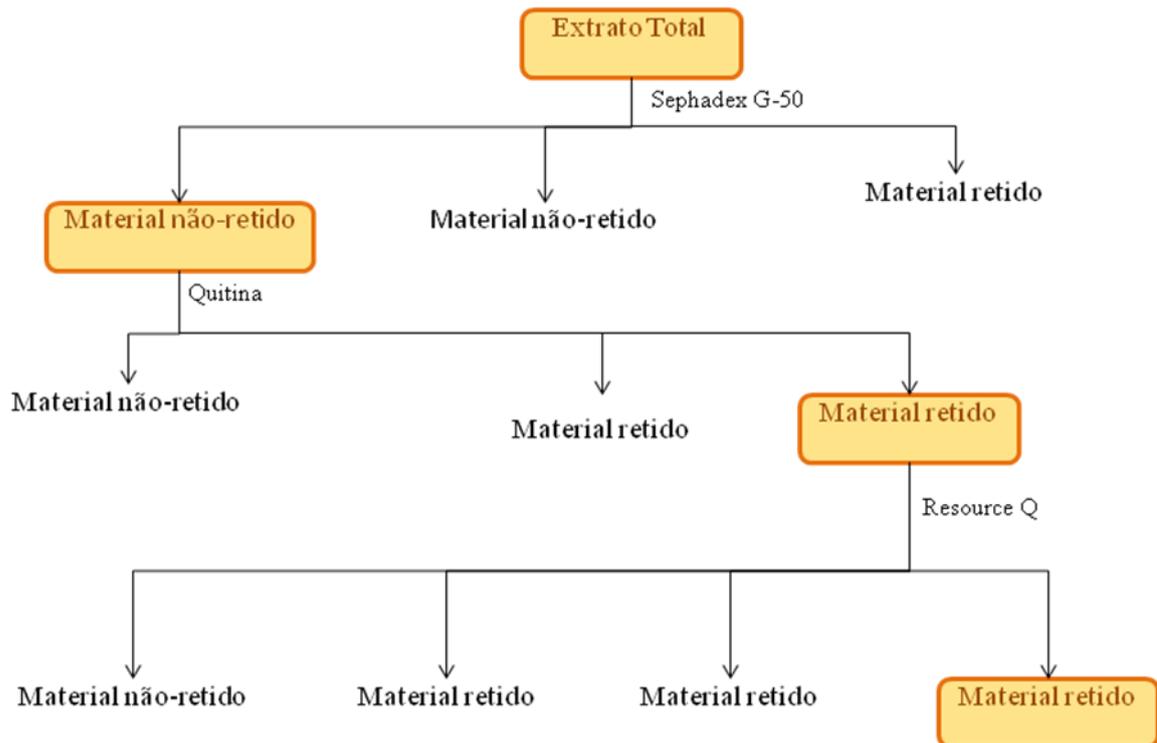


FIGURA 4 - Esquema geral de obtenção da lectina glicose/manose-específica (S3) e da purificação da proteína antifúngica (RQ3) presentes em sementes de *Dioclea megacarpa*.

5.5.2 - Cromatografia em Matriz de Quitina

Alíquotas de S1 (100 mgP) foram aplicadas em coluna de quitina (12,0 x 2,7 cm), previamente equilibrada com NaCl 0,15 M. A coluna foi percolada com solução de equilíbrio até que as proteínas não retidas, denominadas Q1, fossem completamente removidas. Em seguida, foi procedida a eluição das proteínas retidas com ácido acético 0,05 M e, posteriormente, com tampão glicina 0,1 M, pH 9,0. As proteínas eluídas sob essas condições foram denominadas de Q2 e Q3, respectivamente. O fluxo utilizado foi de 30 mL/h e frações de 6 mL foram coletadas, a 4 °C (coletor Pharmacia LKB FRAC-100). A cromatografia foi monitorada através de leituras de absorvância a 280 nm. Ao final do processo cromatográfico, foram avaliadas as atividades hemaglutinante, quitinásica e antifúngica de Q1, Q2 e Q3.

5.5.3 - Cromatografia em Matriz de Resource Q Acoplada ao Sistema de FPLC

O material eluído da matriz de quitina sob condição básica (Q3; 10 mgP) foi submetido à cromatografia de troca iônica em coluna de Resource Q (6,4 mm x 30 mm), previamente equilibrada com tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2. A coluna foi percolada com o tampão de equilíbrio até que as proteínas não retidas (RQ) fossem completamente removidas. As proteínas retidas foram eluídas com o tampão de equilíbrio acrescido de concentrações crescentes de NaCl, 0,1 M, 0,2 M e 0,3 M, tendo resultado os materiais denominados de RQ1, RQ2 e RQ3, respectivamente. O processo cromatográfico foi desenvolvido em sistema de FPLC, a um fluxo constante de 0,5 mL/min, sendo coletadas alíquotas de 1,5 mL/tubo (coletor Pharmacia LKB FRAC-100). A cromatografia foi monitorada através de leituras de absorvância a 280 nm. Ao

final do processo cromatográfico, foram avaliadas as atividades hemaglutinante, quitinásica e antifúngica de RQ, RQ1, RQ2 e RQ3.

5.6 - Perfil Eletroforético de Proteínas Bioativas Purificadas de Sementes de *D. megacarpa*

A determinação do perfil eletroforético das proteínas foi avaliado seguindo a metodologia descrita por Laemmli (1970), adaptada para o uso de placas medindo 10,0 x 8,0 cm. O gel de aplicação encerrava 3,5% de acrilamida e 1,0% de SDS, preparados em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, e o gel de separação 15% de acrilamida e 1,0% de SDS, solubilizados em tampão Tris-HCl 3,0 M, pH 8,8. O preparo das amostras (1,0 mg/mL) foi realizado através da diluição em tampão Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8, contendo SDS 1,0%, na ausência ou presença de β -mercaptoetanol 2,0%. Em seguida, as amostras tratadas com o agente redutor foram aquecidas a 100 °C, por 15 minutos, e centrifugadas a 10.000 x g, 5 minutos, a 10 °C. Aos sobrenadantes, foram acrescentados cristais de sacarose e azul de bromofenol a fim de conferir densidade e cor às amostras, respectivamente. Aliquotas encerrando 20 μ L das amostras foram aplicadas no gel, que foi submetido a uma corrente de 20 mA, durante 1 hora. As bandas protéicas foram visualizadas por revelação com prata (BLUM *et al.*, 1987). A metodologia utilizada consistiu de várias etapas e soluções: solução de fixação (metanol 50%, ácido acético 12% e formaldeído 0,5 mL/L), solução de lavagem (etanol 50%), solução de pré-tratamento (tiosulfato de sódio 0,2 g/L), solução de impregnação (nitrato de prata 2 g/L e formaldeído 0,75 mL/L), solução de revelação (carbonato de sódio 60 g/L, formaldeído 0,5 mL/L e tiosulfato de sódio 0,2 g/L), solução de bloqueio da reação (metanol 50% e ácido acético 12%) e solução de enxágüe e acondicionamento (metanol 50%). Como marcadores de massa molecular foram usadas: albumina sérica bovina (67,0 kDa), albumina do ovo (45,0 kDa), gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (36,0 kDa), anidrase carbônica bovina (29,0 kDa), tripsinogênio de pâncreas bovino (24,0 kDa), inibidor de tripsina de soja tipo Kunitz (20,1 kDa) e lactalbumina (14,2 kDa).

Comparação das mobilidades das bandas protéicas das amostras em relação àquelas dos marcadores foi empregada para cálculo da massa molecular aparente.

5.7 - Determinação da Sequência NH₂-Terminal

A determinação da seqüência de aminoácidos NH₂-terminal foi realizada em seqüenciador automático de proteínas (Shimadzu PPSQ-23A). Para tanto, a amostra de interesse foi concentrada por liofilização, solubilizada em ácido trifluoracético 0,01% e submetida ao seqüenciamento. No processo de identificação dos aminoácidos, os derivados de feniltioidantoína dos aminoácidos (PTH-aminoácidos) foram detectados a 269 nm, após separação em coluna de fase reversa C₁₈ (4,6 x 2,5 mm), conduzida sob condições isocráticas de acordo com as instruções do fabricante. As seqüências obtidas foram submetidas ao alinhamento automático através do sistema NCBI-BLAST.

5.8 - Bioensaios com Proteínas Purificadas de Sementes de *D. megacarpa*

5.8.1 - Avaliação da Atividade Antifúngica

5.8.1.1 - Cultivo de Fungo Filamentoso

O cultivo do fungo *A. niger* foi realizado em 25 mL de meio ágar batata dextrose (PDA), distribuídos em placas de Petri (10 cm de diâmetro), em condições estéreis, ficando mantidas em câmara de germinação do tipo B.O.D., a 27 °C, umidade de 70% e fotoperíodo de 12 horas. O meio de cultivo foi constituído de 39 g de PDA, dissolvidos

em 1 L de água, preparado sob banho-maria com água em ebulição e autoclavado por 15 min, 120 °C, 1,5 Kgf. Os “pellets” repicados do meio de cultura foram colocados no centro das placas de Petri, que foram fechadas sob condições estéreis em capela de fluxo laminar.

5.8.1.2 - Obtenção dos Esporos

A suspensão de esporos foi obtida conforme descrito por Melo *et al.* (1997). Após um período aproximado de duas semanas, tempo suficiente para crescimento adequado da colônia micelial, cerca de 10 mL de água grau Milli-Q estéril foram adicionados à placa de Petri. Movimentos suaves na superfície do micélio foram realizados com auxílio de uma alça de Drigalski, previamente flambada, para liberação dos esporos. A suspensão de esporos foi filtrada em tecido de nylon estéril (2 vezes), para remoção das hifas remanescentes. Posteriormente, foi feita a contagem de esporos em câmara de Neubauer, seguida de diluição a fim de se obter um inóculo encerrando $2,0 \times 10^5$ esporos/mL.

5.8.1.3 - Ensaio de Inibição da Germinação dos Esporos

O ensaio de inibição de germinação de esporos foi realizado seguindo a metodologia descrita por Ji e Kúc (1996), adaptada para uso de placas de polietileno reticuladas. Uma alíquota de 10 µL da suspensão de esporos ($2,0 \times 10^5$ esporos/mL) foi incubada com 10 µL da amostras-teste, a diferentes concentrações, e com controles negativo (NaCl 0,15 M) e positivo (peróxido de hidrogênio 0,1 M). As placas foram mantidas a 37 °C, em torno de 15 horas, sendo a umidade do local conservada por meio de papel embebido em água grau Milli-Q. Decorrido o tempo de germinação, o material foi visualizado em microscópio óptico (“Olimpus System Microscope BX 60”). Foram

considerados como germinados os esporos que apresentaram tubo germinativo correspondente a duas vezes o tamanho dos esporos não germinados.

5.8.1.4 - Ensaio de Inibição do Crescimento em Meio Sólido

O ensaio de inibição do crescimento de fungos em meio sólido foi realizado seguindo a metodologia descrita por Wang e Ng (2007), com modificações. “Pellet” do fungo foi colocado no centro de placas de Petri (10 cm de diâmetro), contendo 25 mL de meio PDA, que foram incubadas em câmara B.O.D. até o desenvolvimento da colônia micelial. O meio solidificado foi circular e poços foram distribuídos de forma equidistante à borda micelial. Alíquotas (100 µL) das amostras foram dispostas nos poços numerados. Nistatina e água grau Milli-Q ou NaCl 0,15 M foram utilizados como controles positivo e negativo, respectivamente. As placas de Petri foram incubadas em câmara B.O.D. a 27 °C, por aproximadamente 72 horas, com fotoperíodo de 12 horas, até que o crescimento micelial tivesse envolvido o disco contendo o controle negativo e formado halo de inibição nas proximidades do controle positivo. A formação de halos de inibição nas proximidades das amostras-teste foi avaliada. Todo procedimento foi realizado em condições estéreis.

5.8.1.5 - Ensaio de Inibição do Crescimento de Leveduras

Para obtenção das células de leveduras, alíquotas das espécies *Candida tropicalis* e *Saccharomyces cerevisiae* foram retiradas de uma placa de Petri, que possuía colônias crescidas e, em seguida, repicadas em novas placas contendo ágar Sabouraud, sendo realizadas estriações sobre o meio, para obtenção de um crescimento celular homogêneo. Essa nova placa foi deixada na estufa a 30 °C, por 48 horas e,

posteriormente, usada para obtenção das células utilizadas no ensaio. Com auxílio de uma alça de manipulação, uma colônia isolada foi retirada e adicionada ao meio BHI (Brain Heart Infusion), sendo ajustada sua concentração (1×10^4 células/mL) utilizando-se turbidimetria a 600 nm.

A avaliação da atividade das amostras-teste sobre o crescimento celular de leveduras foi feita em meio líquido. Placas (96 poços) de cultura de células contendo 100 µL de meio de cultura para o crescimento celular (ágar Sabouraud) receberam 100 µL do meio ajustado contendo as células de levedura (1×10^4 células/mL). O acompanhamento do efeito das amostras-teste sobre as leveduras testadas foi realizado através da densidade óptica, calculada a partir de leituras a 600 nm em um leitor de ELISA, nos tempos de 0, 11, 18, 23 36 e 43 horas. Controles foram feitos sem a adição das amostras-teste. Os ensaios foram feitos em triplicata e em condições estéreis usando capela de fluxo laminar, segundo metodologia adaptada de Broekaert *et al.* (1990).

5.8.1.6 - Ensaio de Inibição da Acidificação Estimulada por Glicose

O ensaio foi realizado segundo metodologia descrita por Gomes (1996), com alterações. Células de *S. cerevisiae* foram postas para crescer em meio ágar Sabouraud, por 16 horas, 30 °C, sobre um agitador giratório a 160 rpm. Após esse período, a suspensão de células foi centrifugada a $3.000 \times g$, 4 °C, 5 minutos, e lavadas com água grau Milli-Q, por 3 vezes. O precipitado foi ressuscitado em água, encerrando uma concentração final de $1,0 \times 10^7$ células/mL. A alíquotas de 50 µL dessa suspensão foram adicionados 4 mL da amostra-teste, encerrando 0,015 µgP/µL, que foram incubadas em banho de gelo, com movimentos suaves ocasionais, por 1 hora. Posteriormente, 1 mL da solução de glicose 0,5 M foi adicionado e o pH do meio monitorado a intervalos de 1 minuto, no período de 20 minutos. Ao final do ensaio, os valores de pH foram utilizados para cálculo da variação das concentrações hidrogeniônicas $[H^+]$, nas culturas controle e

experimental. Foram usados como controles positivo e negativo formaldeído e tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 6,0, respectivamente.

5.8.2 - Avaliação da Atividade Inseticida

5.8.2.1 - *Callosobruchus maculatus* (FIGURA 5)

5.8.2.1.1 - Origem e Manutenção dos insetos

C. maculatus, insetos adultos, foram obtidos de genótipos comerciais de feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], adquiridos em Fortaleza-CE. Os insetos foram mantidos em recipientes de vidro, contendo sementes suscetíveis de feijão-caupi. Os recipientes foram vedados com um tecido poroso e, depois, acondicionados em câmara de crescimento tipo B.O.D., a 27 °C, fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro e umidade relativa do ar em torno de 70-80% (FIGURA 6).

5.8.2.1.2 - Preparação das Dietas

Sementes de feijão-caupi, apresentando tegumentos íntegros, livres de injúria física ou mecânica e, ainda, não mostrando vestígios de contato prévio com insetos ou microorganismos (ovos, orifícios ou outros sinais típicos), foram selecionadas. As



FIGURA 5 - *Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1775) (Coleoptera: Bruchidae).

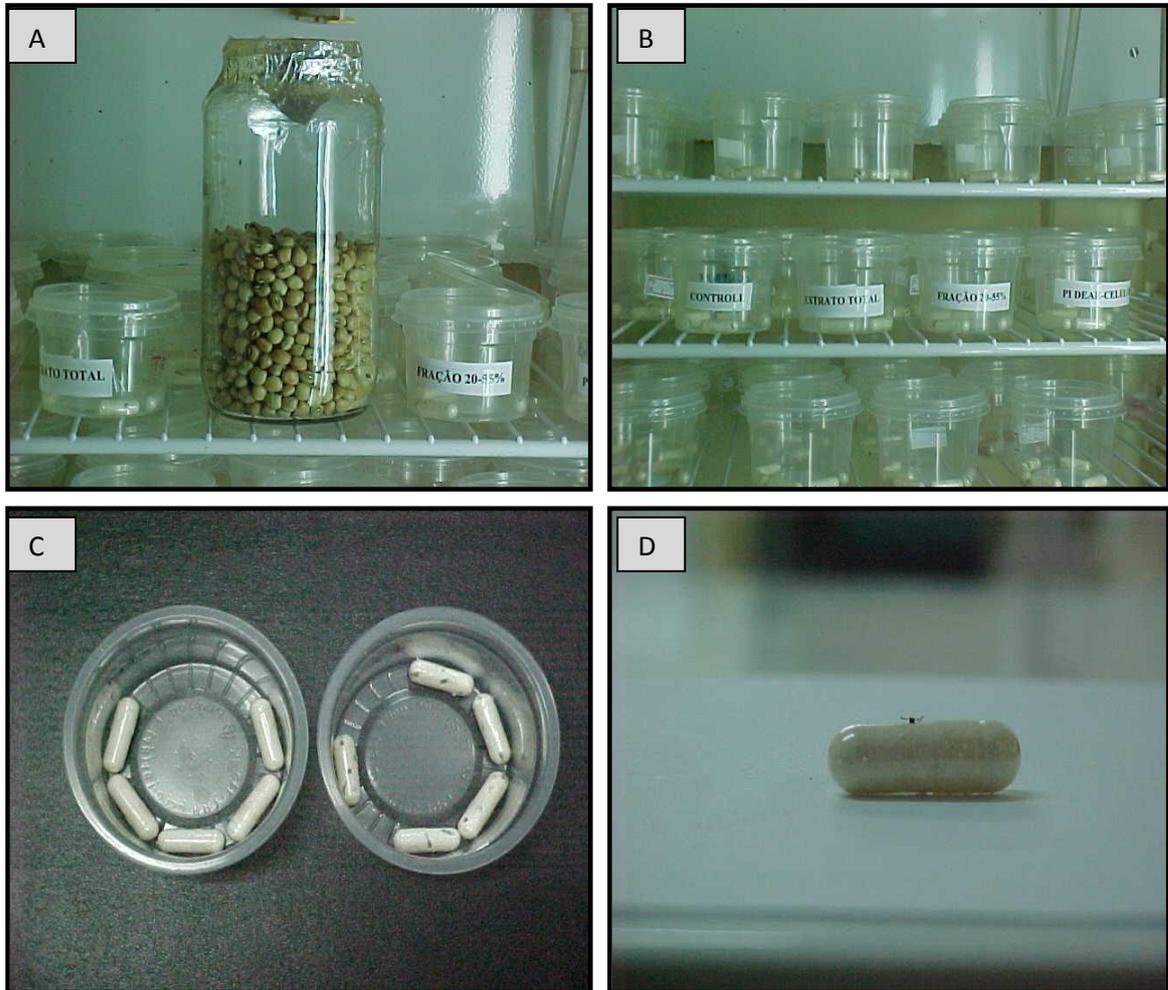


FIGURA 6 - Condições de ensaio usadas na avaliação da atividade inseticida da lectina de *D. megacarpa* (S3) para *Callosobruchus maculatus* (gorgulho). A) Fecundação das fêmeas; B) Acondicionamento e infestação das sementes artificiais; C) Cápsulas sem larva (controle) e infestadas com larvas e D) Inseto adulto emergindo da cápsula infestada.

sementes escolhidas foram destegumentadas, trituradas em liquidificador e, em seguida, em moinho elétrico de café para obtenção de uma farinha fina.

Para preparação das sementes artificiais, foram utilizadas cápsulas de gelatina (2 cm x 0,7 cm) contendo cerca de 0,5 g de farinha de feijão-caupi, prensada através de encapsuladora manual (Capsutec 180). As sementes artificiais encerravam amostras de lectina de *D. megacarpa*, nos teores de 0,1, 0,25 e 0,5%. Sementes artificiais contendo apenas farinha de sementes de feijão-caupi foram utilizadas como controle. As sementes foram pesadas e divididas em potes plásticos (10 sementes/pote), que foram cobertos com tampas perfuradas e acondicionados em câmara de crescimento tipo B.O.D., mantendo as condições já apresentadas. Cada tratamento foi composto por 3 repetições.

5.8.2.1.3 - Ensaio Biológico

Fêmeas fecundadas foram colocadas nos potes plásticos, contendo as sementes artificiais, para o período de infestação. Passado o período de ovoposição, as fêmeas foram retiradas dos potes e os ovos postos em excesso retirados das sementes artificiais com auxílio de uma agulha fina, de modo que cada semente contivesse 8 ovos. Após o período de 7 dias, foi realizada a contagem dos ovos eclodidos. Posteriormente, as cápsulas foram redistribuídas entre as repetições de cada tratamento. Os insetos emergidos das cápsulas foram contados e pesados diariamente. Ao final de 60 dias de experimento, os seguintes parâmetros foram avaliados: peso médio, percentual de emergência, tempo médio de desenvolvimento, índice de crescimento (IC) e índice de resistência (IR).

Para cálculo do IC foi utilizada a seguinte fórmula:

$$IC = \log E/T,$$

onde E representa a percentagem de adultos emergidos e T o tempo médio de desenvolvimento.

O IR foi calculado a partir do IC, através da fórmula $IR = IC \text{ da amostra teste} / IC \text{ do controle} \times 100$ (HOWE, 1971).

Os resultados foram submetidos à análise de variância e a significância das diferenças entre as médias foi determinada por teste de Tukey ($p < 0,05$), através do programa MSTATC.

6. RESULTADOS

6.1 - Detecção e Dosagem de Proteínas Bioativas no Extrato Total de Sementes de *D. megacarpa*

O procedimento usado para preparação do extrato total a partir de farinha de sementes de *D. megacarpa* rendeu uma quantidade considerável de proteínas, correspondente a 263,61 mgP/100 gF.

Os resultados referentes à avaliação de proteínas bioativas no extrato total de sementes de *D. megacarpa* estão representados na TABELA 2. Conforme mostram os dados, sementes dessa espécie se apresentam como uma fonte diversificada de componentes com essas propriedades.

O extrato total apresentou atividade hemaglutinante correspondente a $80,00 \pm 1,20$ UH/mgP. Um aumento dessa atividade para $129,27 \pm 1,50$ UH/mgP foi constatado, após tratamento dos eritrócitos com tripsina.

Atividade inibitória de tripsina também foi detectada no extrato total, cujo valor foi $18,91 \pm 0,72$ mg de tripsina inibida/gF.

Outra propriedade apresentada pelo extrato total foi a capacidade de hidrolisar uréia em dióxido de carbono e amônia, denotando presença de urease, tendo sido mensurada uma atividade equivalente a $47,50 \pm 12,29$ U de urease/KgF.

O extrato total exibiu, ainda, toxicidade quando injetado por via i.p. em camundongos, no intervalo de 1 a 24 horas, tendo sido essa atividade demonstrada pela DL_{50} , cujo valor foi $119,60 \pm 1,50$ mgP/Kg de peso corpóreo.

Proteínas relacionadas à patogênese (PR-proteínas), tais como quitinases e β -1,3-glucanases, se mostraram, também, ativas no material analisado, com atividades iguais $1,66 \pm 0,15$ e $0,55 \pm 1,6$ η kat/mgP, respectivamente.

Diferentemente do observado para as proteínas citadas até então, atividades peroxidásica e proteásica não foram encontradas no extrato total de sementes de mucunã, pelo menos nas condições de ensaios realizadas.

TABELA 2 - Detecção e dosagem de proteínas bioativas no extrato total de sementes de *Dioclea megacarpa*

Proteínas Bioativas	Extrato Total
Lectina (UH/mgP)*	
Eritrócito não tripsinizado	80,00 ± 1,20
Eritrócito tripsinizado	129, 27 ± 1,50
Inibidor de tripsina (mg de tripsina inibida/gF)	18,91 ± 0,72
Urease (U/gF) ¶	47,50 ± 12,29
Toxina (DL ₅₀) [‡]	119,60 ± 1,50
Quitinase (ηKat/mgP) [#]	1,66 ± 0,15
β-1,3-glucanase [§] (ηKat/mgP)	0,55 ± 1,60
Peroxidase	Não detectada
Protease	Não detectada

Média ± desvio padrão de três análises, cada uma em triplicata.

* Uma UH corresponde ao valor recíproco da maior diluição capaz de provocar aglutinação visível a olho nu.

¶ Atividade ureásica foi expressa como unidades de urease por Kg de farinha. Um grama de urease pura contém 870.000 unidades (Sigma).

‡ Atividade tóxica foi expressa como DL₅₀. Uma DL₅₀ representa a quantidade de proteína em mgP/Kg de peso corpóreo de camundongo capaz de produzir convulsão e morte em 50% dos animais após administração por via intraperitoneal.

Atividade quitinásica está expressa em ηKat/mgP, onde 1 ηKat representa 1 ηmol de *N*-acetil-D-glucosamina liberado por segundo.

§ Atividade β-1,3-glucanásica está expressa em ηKat/mgP, onde 1 ηKat equivale a 1 nmol de glucose liberado por segundo.

6.2 - Avaliação da Presença de Proteínas com Propriedades Antifúngicas no Extrato Total de Sementes de *D. megacarpa*

O extrato total, preparado a partir da farinha de sementes de *Dioclea megacarpa*, mostrou a presença de proteínas com propriedades antifúngicas. A atividade inibitória do crescimento de *A. niger* foi mantida mesmo após diálise exaustiva do extrato total contra NaCl 0,15 M (FIGURA 7). A atividade inibitória perdurou por até 168 horas de monitoramento.

6.3 - Purificação de Proteínas Bioativas Presentes em Sementes de *D. megacarpa*

A estratégia de purificação das proteínas está sumarizada na FIGURA 4, mostrada em *Métodos*. Como critério para estabelecimento do protocolo de purificação foi adotado o teste antifúngico realizado com as diferentes frações protéicas após cada passo cromatográfico.

6.3.1 - Cromatografia em Matriz de Sephadex G-50

Como primeira etapa de purificação, alíquotas do extrato total foram submetidas à cromatografia em matriz de Sephadex G-50, visando a obtenção da lectina pura, bem como de proteínas livres de lectina. Dessa cromatografia, resultaram duas frações

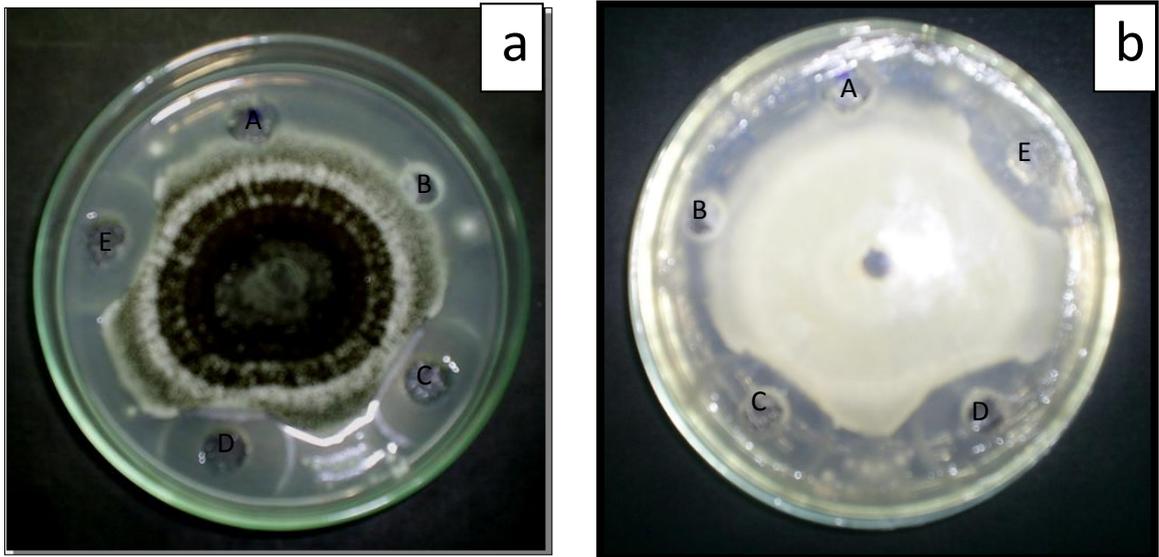


FIGURA 7 - Avaliação da inibição do crescimento do fungo *Aspergillus niger* em meio sólido por extratos e frações protéicas de sementes de *Dioclea megacarpa*, após 24 horas de incubação. As figuras a e b representam a visão anterior e posterior, respectivamente, da placa. (A) - Solução de NaCl 0,15 M; (B) e (E) - Material retido (lectina) e não retido (S1), respectivamente, em coluna de Sephadex G-50; (C) e (D) Extrato total dialisado e não dialisado, respectivamente. Concentrações das amostras: 400 µgP/mL.

protéicas não retidas, denominadas S1 e S2, e um material retido, chamado S3, correspondente à lectina (Moreira *et al.*, 1983), eluída com tampão glicina-HCl 0,1 M, contendo NaCl 1 M, Ca^{+2} 0,005 M e Mn^{+2} 0,005 M, pH 2,6 (FIGURA 8).

Avaliação do potencial antifúngico, realizada por diferentes técnicas, revelou atividade em S1, que na concentração de 400 $\mu\text{gP}/\text{mL}$ se mostrou capaz de inibir o crescimento do fungo *A. niger*, tendo a inibição perdurado até 168 horas de monitoramento. Contrariamente, a lectina não se mostrou ativa diante das condições de ensaio conduzidas (FIGURA 7). Tendo S1 mostrado atividade inibitória sobre o crescimento das hifas, foi avaliada sua ação na fase inicial de desenvolvimento do fungo, ou seja, na germinação dos esporos. Notavelmente, S1 na concentração de 0,25 $\mu\text{gP}/\mu\text{L}$ inibiu completamente a germinação dos esporos de *A. niger*, quando comparado ao controle (FIGURA 9).

Além do fungo filamentoso, S1 foi capaz de inibir o crescimento da levedura *S. cerevisiae*, cuja inibição foi em torno de 50% na concentração de 0,1 $\mu\text{gP}/\mu\text{L}$ (FIGURA 10), denotando o potencial antifúngico dessa fração protéica.

6.3.2 - Cromatografia em Matriz de Quitina

Tendo S1 apresentado atividade antifúngica, essa fração protéica foi selecionada para dar prosseguimento ao processo de purificação. Assim sendo, S1 foi dialisado (*cut-off* 12 kDa) exaustivamente contra água, liofilizado e, posteriormente, aplicado na coluna de quitina (FIGURA 11). A aplicação de S1 resultou numa fração não retida (Q1) à matriz, obtida pela percolação da coluna com a solução de equilíbrio, e de proteínas retidas que foram eluídas com ácido acético 0,05 M, pH 3,0 (Q2), seguido de tampão glicina 0,1 M, pH 9,0 (Q3).

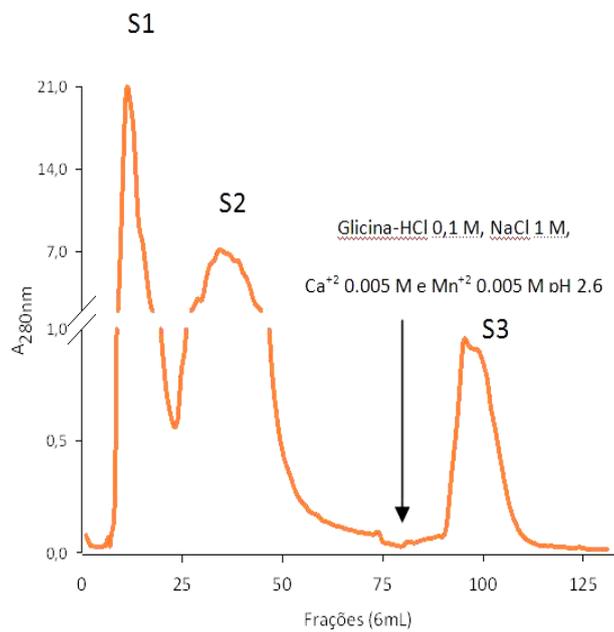


FIGURA 8 - Cromatografia de afinidade em matriz de Sephadex G-50. Extrato total (200 mgP), obtido a partir de sementes de *Dioclea megacarpa*, foi aplicado em coluna de Sephadex G-50 (28,5 x 3,2 cm), equilibrada com NaCl 0,15 M contendo Ca⁺² 0,005 M e Mn⁺² 0,005 M. As proteínas retidas foram eluídas com tampão glicina-HCl 0,1 M, NaCl 1 M, Ca⁺² 0,005 M e 5 Mn⁺² 0,005 M, pH 2,6. Fluxo: 30 mL/h; Frações: 6 mL/tubo.



FIGURA 9 - Fotomicrografia em microscópio óptico de esporos de *Aspergillus niger* após 12 horas de germinação em meio ágar batata dextrose. (a) - Incubação com H₂O; (b) - Incubação com o material não retido (S1) em coluna de Sephadex G-50 (2,5 µgP), oriundo do extrato total de *Dioclea megacarpa*.

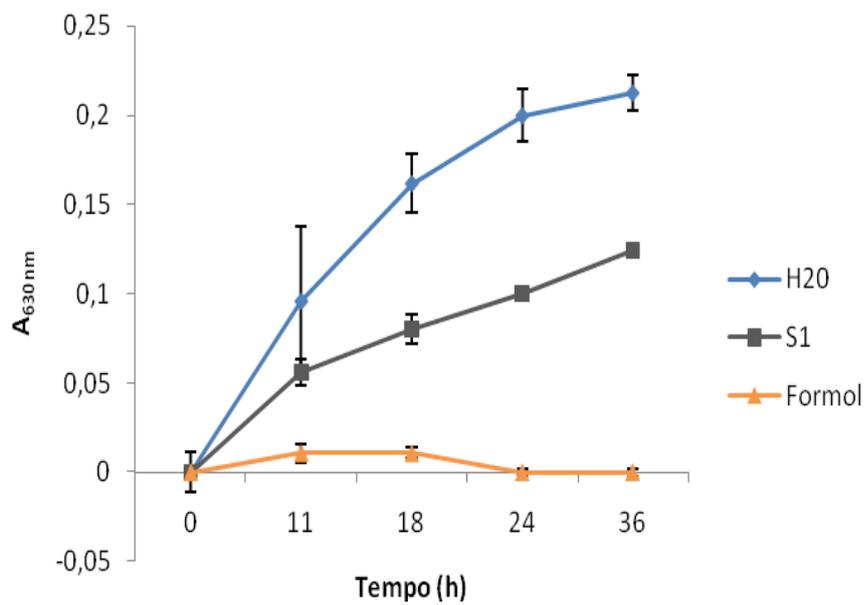


FIGURA 10 - Teste de inibição do crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* em meio BHI (“Brain Heart Infusion”) pelo material protéico não retido (S1) em coluna de Sephadex G-50. Concentração da amostra: 0,1 $\mu\text{gP}/\mu\text{L}$. Controle positivo: formol; Controle negativo: H₂O.

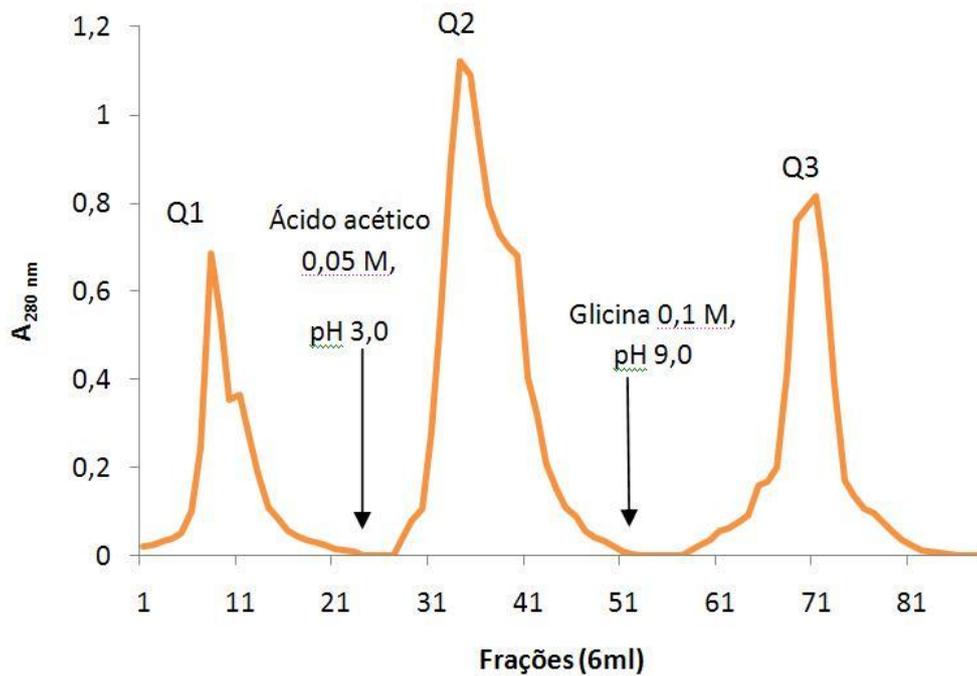


FIGURA 11 - Cromatografia em matriz de quitina. S1 (100 mgP), fração não retida em coluna de Sephadex G-50, foi aplicada em matriz de quitina (12 x 2,7 cm), previamente equilibrada com NaCl 0,15 M. Q1 corresponde às proteínas não retidas na matriz de quitina, obtidas após percolação da coluna com solução de NaCl 0,15 M. Q2 e Q3 representam as proteínas retidas, que foram eluídas com ácido acético 0,05 M e com tampão glicina 0,1 M, pH 9,0, respectivamente. Fluxo: 30 mL/h; Frações: 6 mL/tubo.

Dentre as diferentes frações protéicas obtidas, Q1, Q2 e Q3, apenas Q3 foi capaz de inibir o crescimento de *S. cerevisiae* (FIGURA 12), nas condições de ensaio realizadas. Uma inibição em torno de 75% foi verificada com a concentração de 0,06 $\mu\text{gP}/\mu\text{L}$ de Q3.

6.3.3 - Cromatografia em Matriz de Resource Q Acoplada ao Sistema de FPLC

Q3, representando a fração protéica com atividade antifúngica, foi dialisado (*cut-off* 12 kDa) exaustivamente contra água, liofilizado e, posteriormente, submetido à cromatografia de troca iônica em coluna de Resource Q acoplada ao sistema de FPLC (FIGURA 13), equilibrada com tampão acetato de sódio 0,005 M, pH 5,2. Esse procedimento resultou na obtenção de uma fração não retida (RQ), obtida apenas com o tampão de equilíbrio, e de três outras frações retidas, eluídas com o tampão de equilíbrio acrescido de concentrações crescentes de NaCl, 0,1 M, 0,2 M e 0,3 M, denominadas de RQ1, RQ2 e RQ3, respectivamente.

Dentre os diferentes picos resultantes da cromatografia em coluna de Resource Q, RQ3 concentrou toda a atividade inibitória do crescimento de *S. cerevisiae* (FIGURA 14). Em uma concentração baixíssima (0,015 $\mu\text{gP}/\mu\text{L}$), RQ3 manteve inibido em 100% o crescimento dessa levedura até 23 horas após incubação. Mesmo com 43 horas, uma inibição notável, em torno de 60%, do crescimento da levedura ainda foi encontrada, demonstrando a excelente capacidade de RQ3 em impedir o crescimento fúngico.

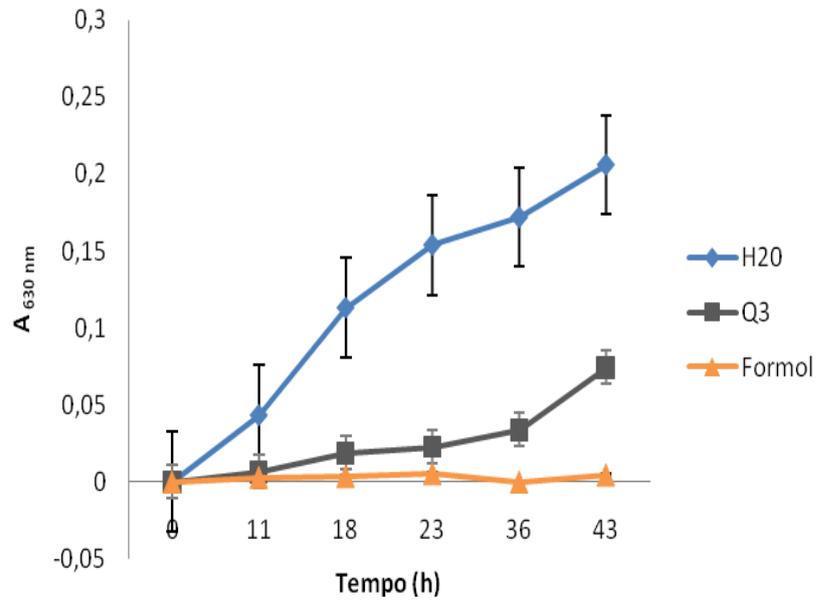


FIGURA 12 - Teste de inibição do crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* em meio BHI (“Brain Heart Infusion”) pelo material protéico retido (Q3) em matriz de quitina, eluído com tampão glicina 0,1 M, pH 9,0. Concentração da amostra: 0,06 $\mu\text{gP}/\mu\text{L}$. Controle positivo: formol; Controle negativo: H_2O .

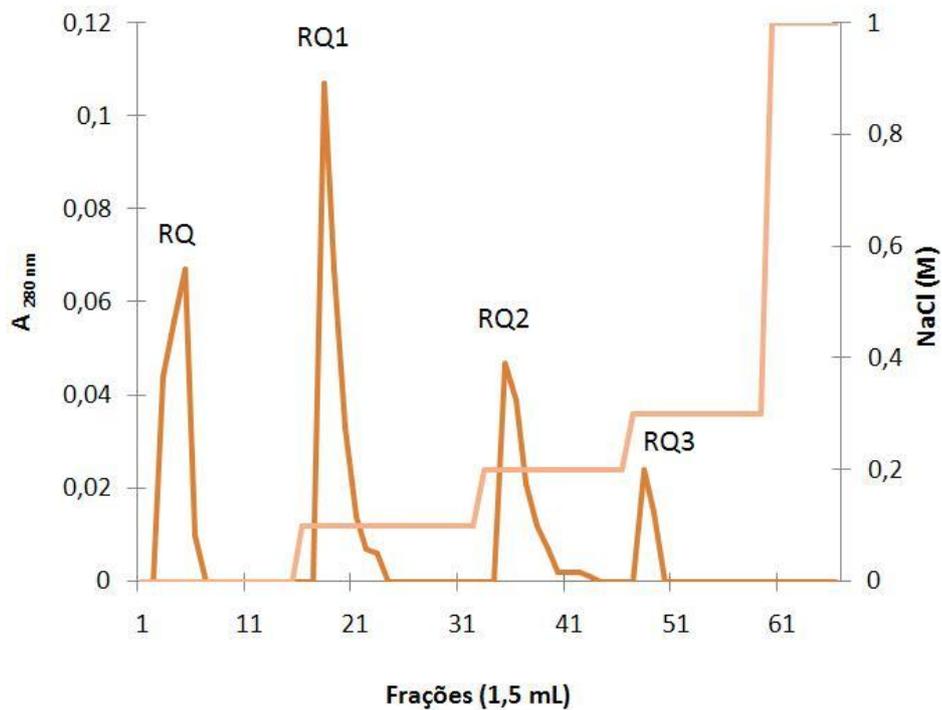


FIGURA 13 - Cromatografia de troca iônica em coluna de Resource Q acoplada ao sistema de FPLC. Q3 (10 mgP), fração retida em matriz de quitina eluída com glicina 0,1 M, pH 9,0, foi aplicada em coluna de Resource Q (6,4 mm x 30 mm), equilibrada com tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2. RQ1 corresponde às proteínas não retidas na Resource Q, obtidas após percolação da coluna com tampão de equilíbrio. RQ1, RQ2 e RQ3 representam as proteínas retidas, que foram eluídas com tampão de equilíbrio acrescido de 0,1 M, 0,2 M e 0,3 M de NaCl, respectivamente. Fluxo: 0,5 mL/min.; Frações: 1,5 mL.

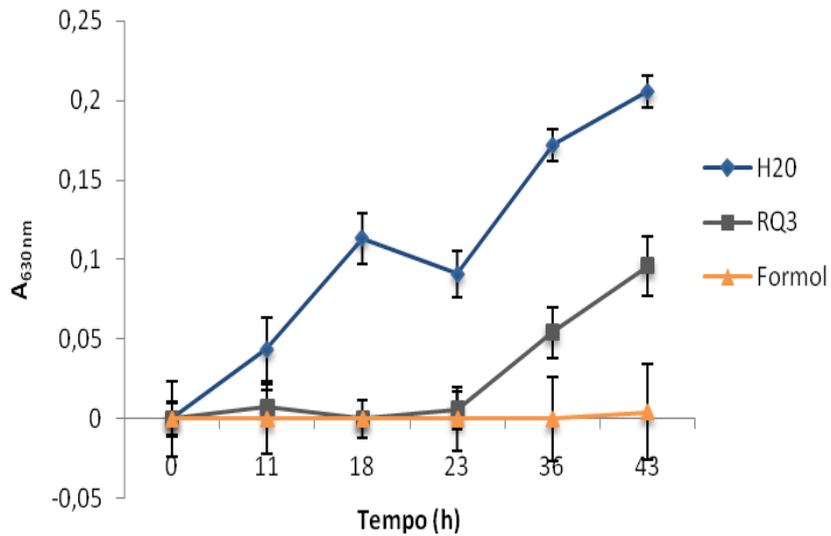


FIGURA 14 - Teste de inibição do crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* em meio BHI (“Brain Heart Infusion”) pelo material protéico retido (RQ3) em matriz de Resource Q, eluído com tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2, acrescido de 0,3 M de NaCl. Concentração da amostra: 0,015 $\mu\text{gP}/\mu\text{L}$. Controle positivo: formol; Controle negativo: H₂O.

Habilidade de RQ3 em inibir o crescimento também foi verificada frente a *C. tropicalis*. Nesse caso, RQ3 se mostrou ainda mais potente, conservando 100% de inibição após 36 horas de incubação (FIGURA 15).

RQ3 representou 0,31% da farinha de sementes de *D. megacarpa* e 0,1% da proteína total (TABELA 3).

6.4 - Avaliação do Perfil Eletroforético de RQ3 e S3 (Lectina)

RQ3 em PAGE-SDS, na ausência de β -mercaptoetanol apresentou uma única banda com massa molecular aparente de 67-68 kDa (FIGURA 16, Raia 2). Porém, na presença do agente redutor (2%) e aquecimento a 100 °C, por 15 minutos, foram verificadas duas bandas bem próximas, com massas moleculares aparentes de 69 kDa e 67 kDa (FIGURA 16, Raia 3). Dada a aparente pureza de RQ3, esse passou a ser denominado de proteína antifúngica de *D. megacarpa* ou simplesmente *Dm*-PAF, que será assim referida de agora em diante.

O perfil eletroforético da lectina de *D. megacarpa* revelou a presença de três subunidades protéicas, com massas moleculares aparentes de 25-26, 13-14 e 8-9 kDa (FIGURA 17).

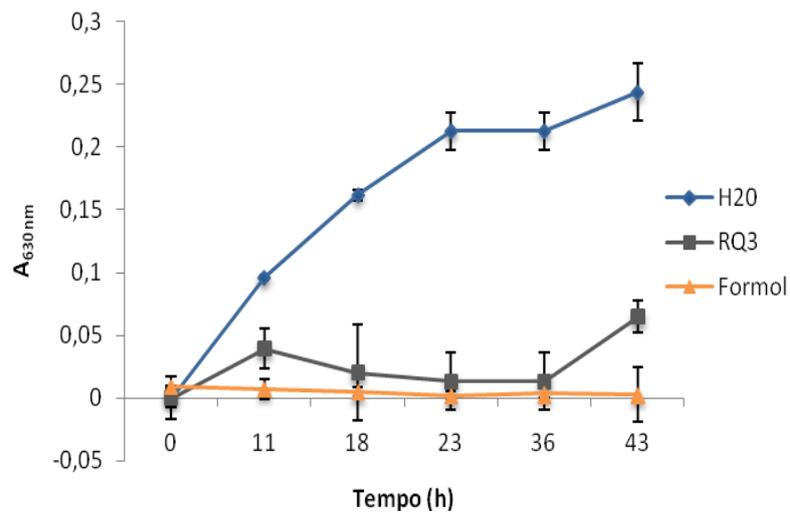


FIGURA 15 - Teste de inibição do crescimento da levedura *Candida tropicalis* em meio BHI (“Brain Heart Infusion”) pelo material protéico retido (RQ3) em matriz de Resource Q, eluído com tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2, acrescido de 0,3 M de NaCl. Concentração da amostra: 0,015 $\mu\text{gP}/\mu\text{L}$. Controle positivo: formol; Controle negativo: H_2O .

TABELA 3 - Etapas de purificação, com os respectivos teores e rendimento protéicos, usadas na obtenção da proteína com atividade antifúngica presente em sementes de *Dioclea megacarpa*

Amostras ^a	Proteína (mgP/100 gF) ^b	Rendimento ^c (%)
Extrato total	263,61 ± 5,0	100
S1 (Sephadex G-50)	247,80 ± 6,0	94
Q3 (Quitina)	34,20 ± 1,0	13
RQ3 (Resource Q)	0,31 ± 0,1	0,1

^a Etapas de purificação conforme descritas em *Métodos*. Os resultados representam a média e desvio padrão de seis experimentos similares.

^b Quantidade total de proteína recuperada (mg) em cada etapa de purificação a partir de 100 g de farinha de *D. megacarpa*.

^c Recuperação de proteína em cada etapa de purificação, considerando aquela determinada no extrato total como sendo 100%.

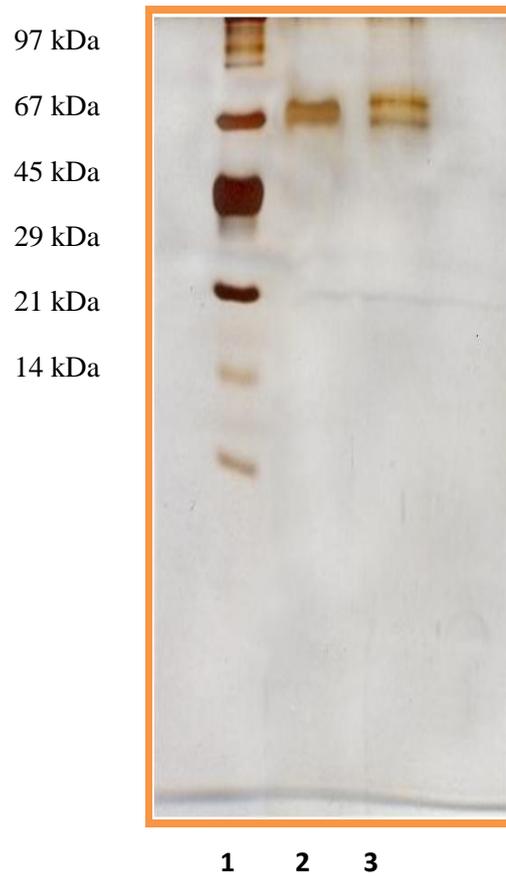


FIGURA 16 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) sob condições desnaturantes da proteína antifúngica de *D. megacarpa* (*Dm*-PAF), na presença e ausência de β -mercaptoetanol (2,0%), revelada com prata. Raia 1 - Marcadores de massa molecular; Raia 2 - *Dm*-PAF na ausência do agente redutor e Raia 3 - *Dm*-PAF na presença do agente redutor.

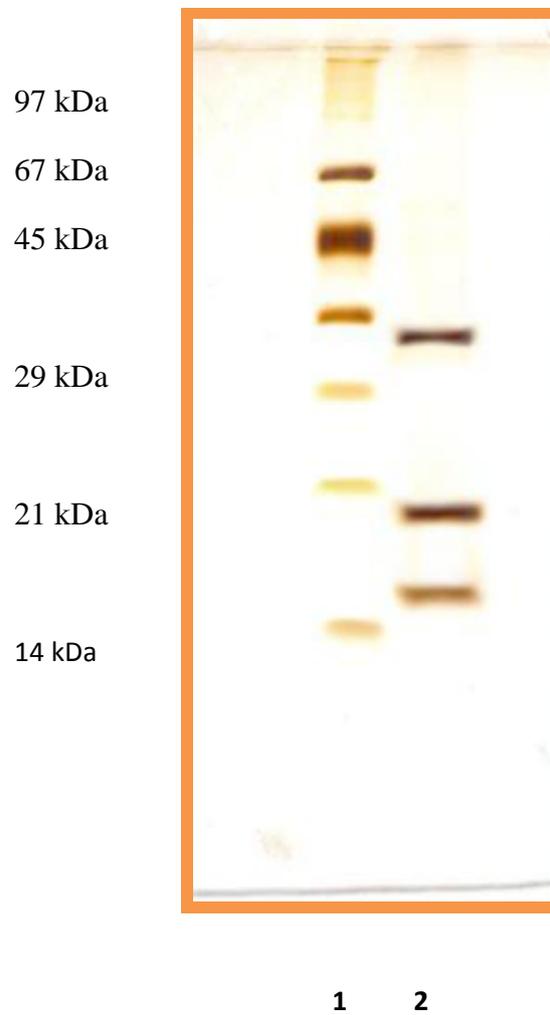


FIGURA 17 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) sob condições desnaturantes da lectina de *D. megacarpa*, revelada com prata. Raia 1 - Marcadores de massa molecular e Raia 2- lectina.

6.5 - Determinação da Sequência NH₂-Terminal da Dm-PAF

Apesar da aparente pureza da *Dm*-PAF, ao tentar se determinar sua sequência NH₂-Terminal, por degradação de Edman, os resultados obtidos foram não conclusivos. Particularmente, em relação aos cinco primeiros resíduos. Provavelmente, pelo fato do NH₂-terminal estar bloqueado.

6.6 - Monitoramento da Atividade Hemaglutinante nas Etapas de Purificação da Dm-PAF

O monitoramento da presença de lectinas, avaliada através da atividade hemaglutinante, nas diferentes etapas de purificação da *Dm*-PAF se encontra na TABELA 4. S1 e S3, correspondentes aos primeiro pico protéico não retido e ao pico retido em Sephadex G-50, respectivamente, foram capazes de aglutinar eritrócitos não tratados e tratados com tripsina. S3 corresponde à lectina caracterizada por Moreira e colaboradores (1983) e suas atividades ($256 \pm 1,2$ e $1028,94 \pm 1,2$ UH/mgP, com eritrócitos não tripsinizados e tripsinizados, respectivamente) foram maiores quando comparadas àquelas verificadas em S1 ($30,3 \pm 2,3$ e $60,9 \pm 1,5$ UH/mgP, com eritrócitos não tripsinizados e tripsinizados, respectivamente). Atividade hemaglutinante detectada em S1 foi observada mesmo quando aplicada pequena quantidade de proteína na coluna supracitada, denotando uma não saturação da matriz. Na segunda etapa de purificação, em que S1 foi submetido à cromatografia em coluna de quitina, atividade hemaglutinante ainda foi encontrada, ficando restrita à fração Q2, cujas atividades frente a eritrócitos não tratados e tratados com tripsina foram $90,6 \pm 1,7$ e $130,3 \pm 1,9$ UH/mgP, respectivamente. Por outro lado, na terceira etapa de purificação não foi observada atividade hemaglutinante em nenhuma das frações resultantes, incluindo RQ3

TABELA 4 - Monitoramento da atividade hemaglutinante nas etapas de purificação da *Dm*-PAF

Amostras	Atividade Hemaglutinante (UH/mgP) [*]	
	Eritrócito não tripsinizado	Eritrócito Tripsinizado
Extrato total	80,00 ± 1,20	129,27 ± 1,50
S1 (Sephadex G-50)	30,3 ± 2,3	60,9 ± 1,5
S2 (Sephadex G-50)	ND [†]	ND
S3 (Sephadex G-50)	256 ± 1,2	1028,94 ± 1,2
Q1 (Quitina)	ND	ND
Q2 (Quitina)	90,6 ± 1,7	130,3 ± 1,9
Q3 (Quitina)	ND	ND
<i>Dm</i> -PAF ou RQ3 (Resource Q)	ND	ND

Média ± desvio padrão de três análises, cada uma em triplicata.

* Uma UH corresponde ao valor recíproco da maior diluição capaz de provocar aglutinação visível a olho nu.

[†] ND - Não detectada.

ou *Dm*-PAF; fato este já esperado, uma vez que não tinha sido detectada atividade hemaglutinante em Q3, fração protéica aplicada na Resource Q.

6.7 - Monitoramento da Atividade Quitinásica nas Etapas de Purificação da *Dm*-PAF

A TABELA 5 mostra os resultados de avaliação da atividade quitinásica nas etapas de purificação da *Dm*-PAF. S1 e S2, as duas frações protéicas não retidas na matriz de Sephadex G-50, se mostraram capazes de hidrolisar quitina, cujas atividades foram $3,9 \pm 0,7$ e $2,0 \pm 1,0$ η Kat/mgP, respectivamente. Após submissão de S1 à cromatografia em coluna de quitina, atividade quitinásica ficou concentrada na fração não retida ou Q1 ($51,3 \pm 1,5$ η kat/mgP) e naquela eluída com ácido acético 0,05 M ou Q2 ($80,0 \pm 1,2$ η kat/mgP). Ainda que Q3 não tenha mostrado atividade quitinásica, os picos protéicos resultantes de sua cromatografia em matriz de Resource Q foram avaliados quanto à capacidade de hidrolisar quitina, não tendo sido detectada atividade quitinásica em nenhum desses.

6.8 - Avaliação do Mecanismo de Ação Antifúngica da *Dm*-PAF

Uma vez que *Dm*-PAF não mostrou ser uma hololectina ou uma quitinase e nem apresentou sequência NH₂-terminal, para que fosse feita uma busca de similaridade com outras proteínas, quando avaliada nas condições descritas, foi realizado outro experimento, na tentativa de conhecer o seu mecanismo de ação antifúngica. Nesse sentido, foi avaliado o seu efeito sobre a acidificação do meio por *S. cerevisiae*, após adição de glucose (FIGURA 18). *Dm*-PAF não foi capaz de inibir a liberação de H⁺ para o meio extracelular, decorrente da ação de entrada de glucose nessa levedura. Conseqüentemente, não houve variação na concentração de [H⁺] entre a cultura controle

TABELA 5 - Monitoramento da atividade quitinásica nas etapas de purificação da *Dm*-PAF

Amostras	Atividade Quitinásica (η kat/mgP) [*]
Extrato total	1,7 \pm 0,1
S1 (Sephadex G-50)	3,9 \pm 0,7
S2 (Sephadex G-50)	2,0 \pm 1,0
S3 (Sephadex G-50)	ND [¶]
Q1 (Quitina)	51,3 \pm 1,5
Q2 (Quitina)	80,0 \pm 1,2
Q3 (Quitina)	ND
RQ (Resource Q)	ND
RQ1 (Resource Q)	ND
RQ2 (Resource Q)	ND
<i>Dm</i> -PAF ou RQ3 (Resource Q)	ND

Média \pm desvio padrão de três análises, cada uma em triplicata.

* 1 η kat representa 1 η mol de *N*-acetil-D-glucosamina liberado por segundo.

¶ ND - Não detectada.

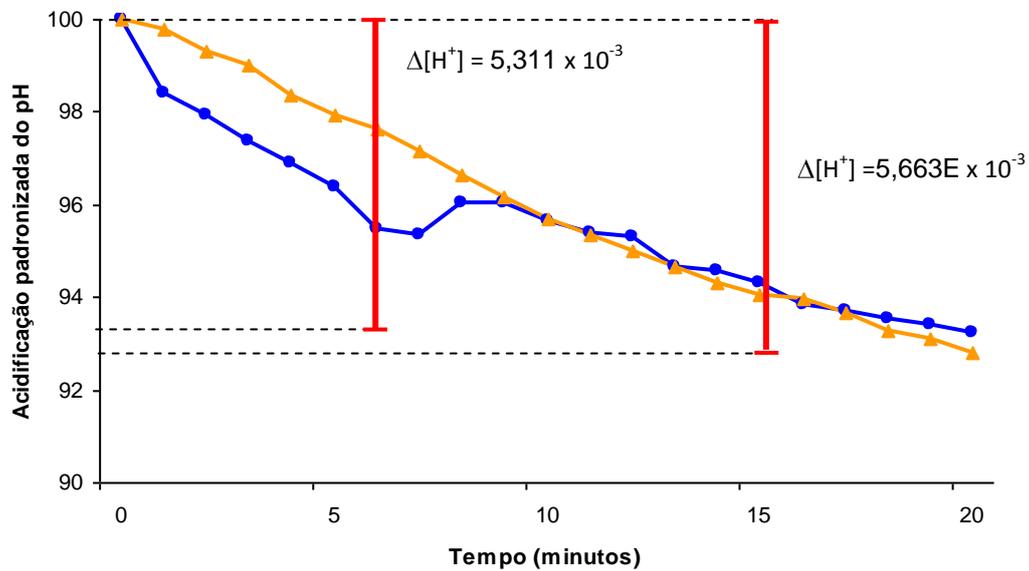


FIGURA 18 - Acidificação do meio promovida por células de leveduras ($1,0 \times 10^7$ células/mL) após adição de glucose 0,5 M. O valores iniciais de pH das culturas foram padronizados em 100, de forma a permitir a comparação entre os tratamentos; (●) - Tris-HCl 0,005 M, pH 7,2 (controle); (▲) *Dm*-PAF (0,015 μ gP/ μ L). As barras em vermelho indicam a variação de prótons (H^+) nos tratamentos.

(Tris-HCl 0,005 M, pH 7,2) e a cultura contendo *Dm*-PAF, na concentração de 0,015 µgP/µL.

6.9 – Avaliação da Atividade Inseticida da Lectina (S3) de *D. megacarpa* contra *C. maculatus*

Nesse bioensaio, foram utilizadas amostras liofilizadas da lectina de *D. megacarpa* (S3), misturadas à farinha de feijão-caupi, nos níveis de inclusão a 0,1, 0,25 e 0,5%. Os resultados de peso médio, tempo médio de desenvolvimento e percentual de emergência dos insetos estão mostrados nas FIGURAS 19, 20 e 21.

Em relação ao peso médio dos insetos adultos, a lectina de *D. megacarpa*, nos níveis de inclusão testados, não foi capaz de interferir significativamente ($p > 0,05$) nesse parâmetro, quando comparadas ao grupo controle (FIGURA 19).

Quanto ao tempo médio de desenvolvimento dos insetos, mesmo a 0,1% de inclusão nas sementes artificiais, a lectina de *D. megacarpa* mostrou habilidade em retardar o desenvolvimento dos insetos quando comparada ao grupo controle. Entretanto, esse efeito não foi dose-dependente, desde que diferença significativa não foi encontrada nos diferentes tratamentos com a amostra-teste ($p > 0,05$) (FIGURA 20).

Quando analisado o percentual de emergência, somente a dieta experimental encerrando 0,5% de lectina mostrou efeito significativo ($p < 0,05$). Uma redução em torno de 40% da emergência de insetos adultos, em relação ao grupo controle, foi verificada com esse grupo experimental (FIGURA 21).

Outros parâmetros mensurados foram os índices de crescimento e de resistência. Para ambos os parâmetros, todos os tratamentos incluindo a lectina de *D. megacarpa* diferiram significativamente ($p < 0,05$) do tratamento controle. Por outro lado, as variações nos níveis de inclusão da lectina não resultaram em diferenças significativas ($p > 0,05$) (TABELA 6).

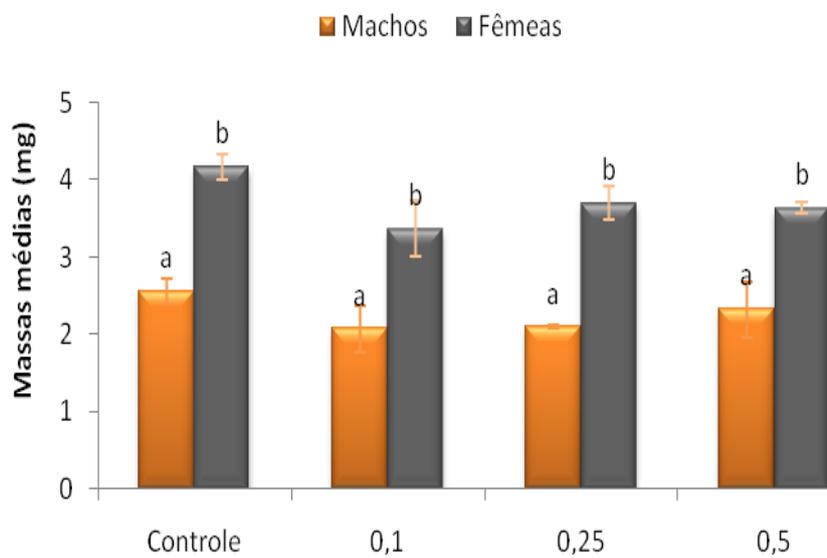


FIGURA 19 - Avaliação do efeito da lectina de *Dioclea megacarpa* (S3) sobre o ganho de peso dos insetos *Callosobruchus maculatus* (machos e fêmeas). Os tratamentos empregados encerravam dieta experimental (lectina a 0,1, 0,25 e 0,5%) e dieta controle (farinha de sementes de feijão-caupi). A duração do bioensaio foi de 60 dias. Letras iguais representam valores que não diferiram significativamente ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey.

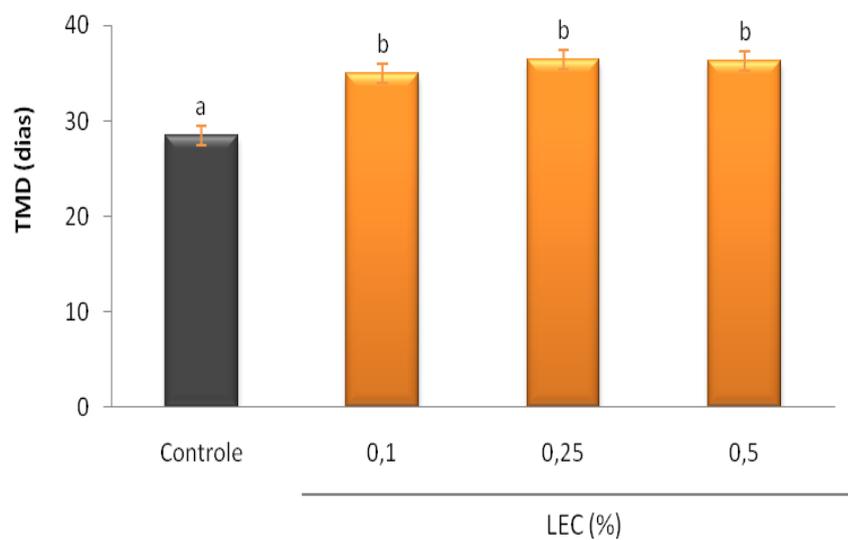


FIGURA 20 - Avaliação do efeito lectina de *Dioclea megacarpa* (S3) sobre o tempo médio de desenvolvimento dos insetos *Callosobruchus maculatus*. Os tratamentos empregados encerravam dieta experimental (lectina 0,1, 0,25 e 0,5%) e dieta controle (farinha de sementes de feijão-caupi). A duração do bioensaio foi de 60 dias. Letras iguais representam valores que não diferiram significativamente ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey.

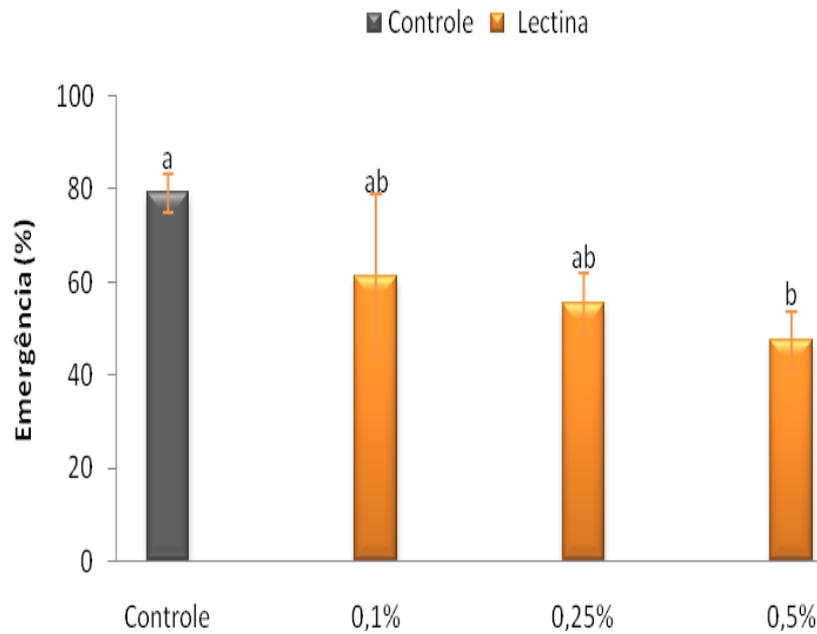


FIGURA 21 - Avaliação do efeito lectina de *Dioclea megacarpa* (S3) sobre a emergência dos insetos *Callosobruchus maculatus*. Os tratamentos empregados encerravam dieta experimental (lectina a 0,1, 0,25 e 0,5%) e dieta controle (farinha de sementes de feijão-caupi). A duração do bioensaio foi de 60 dias. Letras iguais representam valores que não diferiram significativamente ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey.

TABELA 6 - Índices de crescimento e de resistência calculados para *Callosobruchus maculatus*, quando alimentados com sementes artificiais contendo dieta experimental (lectina de *Dioclea megacarpa* a 0,1, 0,25 e 0,5%) e dieta controle (farinha de sementes de feijão-caupi)

Tratamentos	Índice de Crescimento	Índice de Resistência
Controle	0,07 ± 0,00 ^a	100,00 ± 0,00 ^a
Lectina 0,1%	0,05 ± 0,03 ^b	77,27 ± 4,30 ^b
Lectina 0,25%	0,05 ± 0,00 ^b	72,72 ± 0,00 ^b
Lectina 0,5%	0,05 ± 0,00 ^b	70,20 ± 3,80 ^b

Letras diferentes em cada coluna representam valores que diferiram significativamente ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

7. DISCUSSÃO

Estudos iniciais, realizados por nosso grupo de pesquisa, demonstraram que sementes de *Dioclea megacarpa* contêm compostos protéicos ativos capazes de comprometer o desenvolvimento de fungos fitopatogênicos. Diante desse dado, o presente trabalho teve como foco principal a purificação da proteína com ação antifúngica. Além disso, foi avaliada a propriedade inseticida de uma proteína também presente na semente de *D. megacarpa*, a lectina glucose/manose específica, descrita por Moreira *et al.* (1983). Essa abordagem, voltada para o estudo de proteínas antifúngicas e inseticidas, teve como finalidade especular o potencial de sementes de *D. megacarpa* como fonte de proteínas bioativas envolvidas na defesa de plantas. Para tanto, foram selecionados como modelos experimentais o fungo filamentosso *Aspergillus niger*, os fungos leveduriformes *Sacharomyces cerevisiae* e *Candida tropicalis* e o inseto fitófago *Callosobruchus maculatus*.

Em consonância com o exposto, inicialmente foi feita uma avaliação no extrato total, preparado a partir da farinha de sementes de *D. megacarpa*, de atividades relacionadas com proteínas envolvidas na defesa da planta, compreendendo lectina, inibidor de tripsina, urease, toxina, quitinase, β -1,3 glucanase, protease e peroxidase.

Para melhor visualização da atividade hemaglutinante, relacionada à presença de lectina, foi necessário o uso de íons Ca^{+2} e Mn^{+2} . Esses íons se ligam a sítios específicos na lectina, contribuindo para sua interação com carboidratos específicos (MOREIRA *et al.*, 1991). A atividade hemaglutinante detectada no extrato total correspondeu a $80,00 \pm 1,20$ UH/mgP, aumentando para $129,27 \pm 1,5$ UH/mgP após o tratamento dos eritrócitos com tripsina (TABELA 2). Esse aumento é atribuído a uma maior exposição de resíduos de carboidratos presentes na membrana celular, resultante do tratamento das células com enzimas proteolíticas, contribuindo para a interação lectina-carboidrato e, conseqüentemente, maior aglutinação de eritrócitos (PEUMANS e VAN DAMME, 1995). Mesmo na ausência do tratamento enzimático, a atividade específica detectada para o extrato total de *D. megacarpa* foi, aproximadamente, oito vezes maior quando comparada àquela detectada no extrato total de uma espécie desse mesmo gênero, *D. guianenses*, que apresentou 10,78 UH/mgP (VASCONCELOS *et al.*, 1991). A atividade hemaglutinante detectada em sementes de *D. megacarpa* está, provavelmente, relacionada à presença de duas lectinas; uma dessas descrita por Moreira *et al.* (1983) e a outra por Melgarejo *et al.* (2005).

A atividade inibitória de tripsina foi outra atividade detectada no extrato total de sementes de *D. megacarpa*, denotando sua capacidade de interferir na ativação de pro-

enzimas e hidrólise de proteínas dietéticas e endógenas (HOPFER *et al.*, 1998). Essa atividade inibitória de tripsina foi quantificada em $18,91 \pm 0,72$ mg de tripsina inibida/gF (TABELA 2), sendo esse valor inferior aos encontrados por Siebra (2004), que estudou os genótipos de soja BR-10, TRC e TRC-H, cujos valores variaram de $77,20 \pm 1,40$ a $79,10 \pm 0,40$ mg de tripsina inibida/gF.

Adicionalmente, o extrato total de *D. megacarpa* foi capaz de hidrolisar uréia a dióxido de carbono e amônia, uma atividade correspondente a $47,5 \pm 12,29$ U de urease/KgF (TABELA 2). Similarmente ao observado com o inibidor de tripsina, a atividade ureásica detectada no presente estudo foi relativamente menor àquela presente em sementes de soja, cujos valores variaram de $107,30 \pm 9,47$ a $219,28 \pm 2,60$ U de urease/KgF (VASCONCELOS *et al.*, 2001).

O extrato total de *D. megacarpa* mostrou, ainda, presença de outra proteína bioativa, exibindo mortalidade em camundongos quando injetado por via intraperitoneal, no intervalo de 1 a 24 horas. Os animais apresentaram sintomas típicos de comprometimento do sistema nervoso, tais como piloereção, taquicardia, convulsão, estiramento da cauda e patas, culminando com morte. Sua DL_{50} foi $119,6 \pm 1,5$ mgP/Kg de peso corpóreo (TABELA 2), sendo cerca de duas vezes menor do que aquela do genótipo de soja TRC-H (SIEBRA, 2004), evidenciando, assim, sua toxicidade.

Dentre as proteínas relacionadas à patogênese, foi detectada a presença da enzima quitinase, através da avaliação da degradação do substrato quitina à *N*-acetilglucosamina. A atividade específica detectada no extrato total de *D. megacarpa* correspondeu a $1,66 \pm 0,15$ η Kat/mgP (TABELA 2), se apresentando maior do que aquelas encontradas em genótipos da soja, cujas atividades variaram de 0,26 a 0,44 η Kat/mgP (SIEBRA, 2004). O extrato total de *D. megacarpa* também se mostrou capaz de catalisar a quebra hidrolítica de ligações β -1,3-glucosídicas presentes nos β -1,3 glucanos, considerados os principais componentes da parede celular dos fungos (MEANS *et al.*, 1992). Todavia, essa atividade foi relativamente baixa, correspondendo a $0,55 \pm 1,60$ η Kat/mgP, um valor bem inferior aos encontrados nos genótipos de soja Seridó e Seridó-RCH, que corresponderam a 9,84 e 12,06 η Kat/mgP, respectivamente (SOUZA, 2001). Inversamente ao descrito para quitinase e β -1,3-glucanase, proteases e peroxidases não foram detectadas no extrato total das sementes de *D. megacarpa*, pelo menos nas condições de ensaio realizadas.

No intuito de averiguar se as atividades contra fungos fitopatogênicos e leveduras, detectadas no extrato total de *D. megacarpa*, estavam associadas à lectina

que interagiu com a matriz de Sephadex G-50 (MOREIRA *et al.*, 1983), cromatografia usando essa coluna foi escolhida como primeiro procedimento de purificação da proteína com ação antifúngica (FIGURA 8). Os resultados obtidos mostraram que a atividade antifúngica, monitorada com o fungo *Aspergillus niger* não estava vinculada à lectina que interagiu com a matriz de Sephadex G-50, mas a fração protéica não retida, denominada S1 (FIGURA 7). Ainda que a matriz de Sephadex G-50 não tenha retido a proteína com ação antifúngica, essa permaneceu como primeira etapa no procedimento de purificação, dada sua excelente capacidade em separar proteínas, dentre essas, a lectina reportada por Moreira *et al.* (1983) da proteína antifúngica de interesse.

Dado o elevado teor de proteínas de S1, $247,80 \pm 6,0$ mgP/100 gF, representando 94% das proteínas do extrato total (TABELA 3), essa fração foi selecionada para dar prosseguimento à purificação da proteína antifúngica. Entretanto, essa fração protéica apresentou além de atividade antifúngica, atividades hemaglutinante (TABELA 4) e quitinásica (TABELA 5). Uma vez que não houve saturação da matriz de Sephadex G-50 com as proteínas do extrato total, é possível que a atividade hemaglutinante detectada em S1 estivesse associada à lectina reportada por Melgarejo *et al.* (2005).

A coexistência em uma mesma fração protéica de atividades quitinásica e antifúngica pareceu bem satisfatória, diante do principal foco do presente trabalho. De fato, algumas quitinases afetam negativamente o crescimento de fungos, sendo esse efeito negativo ocasionado pela degradação da quitina decorrente da ação dessas enzimas, acarretando perda de suas propriedades estruturais e funcionais (WANG e GRANADOS, 2000, ZAREIE *et al.*, 2002). Diante de tais considerações, a matriz de quitina foi selecionada como próximo passo de purificação. Além disso, a matriz de quitina tem se mostrado um excelente suporte para ligação de várias proteínas antifúngicas, tais como quitinases (FERREIRA *et al.*, 2007), proteínas ligantes à quitina (HUANG *et al.*, 2000) e vicilinas (SALES *et al.*, 1996, FIRMINO *et al.*, 1996, GOMES *et al.*, 1998).

A aplicação da fração S1 na matriz de quitina resultou em uma fração não retida (Q1) e duas outras frações retidas à coluna, uma eluída com solução de ácido acético 0,05 M, pH 3,0 (Q2), e a outra com tampão glicina 0,1 M, pH 9,0 (Q3) (FIGURA 11). A atividade antifúngica, dessa vez avaliada apenas contra *S. cerevisiae*, dada à facilidade, sensibilidade da técnica e ao uso de pequena quantidade de proteína, ficou concentrada na fração protéica Q3 (FIGURA 12). Q3 apresentou um teor médio de

proteína correspondente a $34,20 \pm 1,0$ mgP/100 gF, representando 13% da proteína presente no extrato total (TABELA 3). Apesar da atividade antifúngica detectada em Q3, atividades hemaglutinante e quitinásica não foram mais observadas nessa fração protéica, demonstrando serem essas oriundas de proteínas distintas. Tais atividades, por outro lado, ficaram concentradas na fração protéica eluída em condições ácidas (TABELAS 4 e 5). Interessantemente, quando comparadas às respectivas atividades em passos anteriores, foi observada uma purificação dessa(s) proteína(s), além da purificação daquela com atividade antifúngica.

Ainda não tendo sido empregada a cromatografia de troca iônica no procedimento de obtenção da proteína pura, uma técnica, muitas vezes, bastante útil para essa finalidade, a matriz de Resouce Q, acoplada ao sistema de FPLC, foi utilizada. Esse procedimento possibilitou a separação eficaz de proteínas, resultando na obtenção de quatro picos bem definidos; um não retido (RQ) e outros três eluídos após adição de 0,1 M, 0,2 M e 0,3 M de NaCl ao tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2 (tampão de equilíbrio), denominados RQ1, RQ2 e RQ3, respectivamente (FIGURA 13). Dentre os diferentes picos resultantes da cromatografia em coluna de Resource Q, RQ3 concentrou a atividade antifúngica, tendo se mostrado capaz de inibir o crescimento das leveduras *S. cerevisiae* e *C. tropicalis* (FIGURAS 14 e 15). Experimentos adicionais comprovaram a ausência de atividades hemaglutinante e quitinásica associadas ao pico RQ3 (TABELAS 4 e 5). O teor médio de proteínas em RQ3 foi 0,31 mgP/100 gF, correspondendo 0,1% da proteína presente no extrato total (TABELA 3).

Após cada processo cromatográfico, eletroforeses eram realizadas, a fim de analisar os perfis eletroforéticos das frações protéicas obtidas. Assim, quando analisado o perfil de RQ3, esse pareceu estar puro, apresentando apenas uma banda de massa molecular aparente em torno de 67-68 kDa, quando submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida sob condição desnaturante (PAGE-SDS), na ausência de β -mercaptoetanol (FIGURA 16, Raia 2). Quando adicionado β -mercaptoetanol 2,0% à amostra, duas bandas protéicas distintas, com massa molecular aparente na faixa de 67-69 kDa, foram visualizadas (FIGURA 16, Raia 3). Uma vez que houve alterações nos perfis eletroforéticos da amostra sem e com β -mercaptoetanol, é provável que pontes dissulfeto intracadeia tenham sido desfeitas. Todavia, pelos resultados obtidos, é possível que esse efeito não tenha atingido uniformemente todas as moléculas de proteína, ocasionando padrão ligeiramente distinto de migração, possibilitando, assim, a visualização de duas bandas protéicas. Uma das razões para isso poderia estar

relacionada às condições usadas para redução, envolvendo a quantidade de β -mercaptoetanol e o tempo de aquecimento (β -mercaptoetanol 2,0%, aquecimento a 100 °C, por 15 minutos). Algumas proteínas mostram uma maior resistência para o rompimento de pontes dissulfeto. Por exemplo, a SBTX, uma toxina presente em sementes da soja, apenas mostrou dissociação efetiva de suas cadeias após tratamento com β -mercaptoetanol 5%, por 30 minutos (VASCONCELOS *et al.*, 2008). O tratamento da SBTX com esse agente redutor a 1% não resultou numa separação satisfatória, pois, ora havia uma separação parcial, ora as subunidades não eram separadas (VASCONCELOS *et al.*, 2008). Outro exemplo, é o caso da proteína lisozima que, apenas foi completamente reduzida após sua incubação com DTT 2 mM, a 30 °C, durante 4 horas, seguida de uma alquilação com iodoacetamida 6 mM, 30 °C, durante 1 hora, na ausência de luz (TOUCH *et al.*, 2004). De fato, pontes dissulfeto estabilizam fortemente a estrutura tridimensional de uma proteína (WEDEMEYER *et al.*, 2000), sendo, portanto, difícil de controlar o grau de clivagem dessas pontes (CAYOT *et al.*, 2002).

Dada a aparente pureza de RQ3, esse passou a ser denominado de proteína antifúngica de *D. megacarpa*, ou simplesmente *Dm*-PAF. Apesar da pureza constatada, sua sequência NH₂-terminal, obtida por degradação de Edman, não foi conclusiva. Provavelmente, pelo fato do NH₂-terminal estar bloqueado, em concordância com o que tem sido verificado com a maioria das proteínas vegetais (CARUSO, 2001, OLIVEIRA, 2009). A não obtenção da sequência NH₂-terminal da *Dm*-PAF, combinada à ausência de atividades hemaglutinante e quitinásica associadas a essa proteína, impossibilitaram, diante dos experimentos conduzidos, uma classificação definida da proteína antifúngica em estudo. Proteína antifúngica, mas desprovida de atividades hemaglutinante e quitinásica, tem sido descrita na literatura; um exemplo é a HM30, uma proteína de folhas de *Hydrangea macrophyta* (YANG e GONG, 2002).

Ainda que os resultados obtidos não tenham permitido a classificação da *Dm*-PAF, os resultados de ação antifúngica coligados a essa proteína são contundentes. No presente trabalho, a ação antifúngica foi perseguida através do uso de diferentes técnicas, compreendendo ensaio de inibição da germinação de esporos, ensaio de inibição de crescimento de fungos em meio sólido e ensaio de inibição do crescimento de leveduras em meio líquido. Acompanhando a atividade antifúngica das diferentes amostras analisadas, iniciando do extrato total até a obtenção da *Dm*-PAF, é possível fazer o relato descrito a seguir.

O extrato total (400 $\mu\text{gP/mL}$), ainda que dialisado, foi capaz de inibir o crescimento do fungo *A. niger* em meio sólido (FIGURA 7). Entretanto, essa inibição aparentemente foi maior no extrato não dialisado, possivelmente pela presença de compostos secundários e peptídeos menores que 12 kDa, ressaltando o potencial de sementes de *D. megacarpa* no combate a fitopatógenos. Compostos secundários são conhecidos por inibirem a ação de inúmeros organismos, dentre os quais se destacam os fungos (LIU *et al.*, 2001, SÁ *et al.*, 2009). Essa ação contra fungos é, também, evidenciada com diversos peptídeos. Um exemplo é um peptídeo de massa molecular de 8 kDa isolado de *Cicer arietinum* L. (grão-de-bico), que promoveu inibição do crescimento micelial dos fungos *Physalospora piricola*, *Mycosphaerella arachicola* e *Botrytis cinerea* (CHU *et al.*, 2003). Inibição da atividade antifúngica também foi demonstrada por um peptídeo isolado de sementes de *Phytolacca americana* (PAFP-s), que inibiu o crescimento de *Trichoderma viridae*, *Fusarium oxysporum*, *Morchella conica* e *Pyricularia oryzae* (SHAO *et al.*, 1999).

Avaliada na mesma concentração do extrato total, a fração S1 (400 $\mu\text{gP/mL}$), representando o pico não retido na cromatografia em Sephadex G-50, também inibiu o desenvolvimento do fungo *A. niger* (FIGURA 7). Essa concentração foi relativamente alta, em torno de oito vezes maior do que aquela da toxina da soja, quando avaliados seus efeitos sobre o fitopatógeno *Cercospora sojina* (VASCONCELOS *et al.*, 2008). Contudo, inibição do *A. niger* não foi evidenciada em S3, a lectina caracterizada por Moreira *et al.* (1983) (FIGURA 7). S1 (0,25 $\mu\text{gP}/\mu\text{L}$) foi, ainda, capaz de inibir a germinação dos esporos de *A. niger* (FIGURA 9). Nesse caso, a concentração foi duas vezes menor do que aquela das proteínas ligantes à quitina (0,5 $\mu\text{gP}/\mu\text{L}$), presentes em sementes de *Moringa oleifera*, que mostraram habilidade para inibir a germinação dos esporos dos fungos *F. solani*, *Rizhoctonia solani*, *Colletotrichum gloeosporioides* e *C. lindemuthianum* (GIFONI, 2005). Concentrações protéicas mais elevadas do que a de S1 foram, ainda, observadas com as lectinas da soja (SBA) e de amendoim (PNA), que apresentaram efeitos inibitórios sobre a germinação dos esporos de diferentes fungos na concentração de 5 $\mu\text{gP}/\mu\text{L}$ (BARKAI-GOLAN *et al.*, 1978). Ainda nesse contexto, outro exemplo é a proteína isolada da cana-de-açúcar, denominada canecistatina, que mostrou efeito inibitório sobre a germinação de esporos e crescimento micelial do fungo *Trichoderma resei* na concentração de 200 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (COSTA *et al.*, 2002). Quando avaliados os efeitos de S1 sobre o crescimento de leveduras, ação inibitória foi encontrada numa concentração ainda menor, 0,1 $\mu\text{gP}/\mu\text{L}$ (FIGURA 10).

Quanto a Q3, representando o pico protéico com atividade antifúngica oriundo da cromatografia em coluna de quitina, atividade inibitória sobre o crescimento de *S. cerevisiae* foi encontrada numa concentração menor, 0,06 $\mu\text{gP}/\mu\text{L}$ (FIGURA 12). Essa atividade foi potencializada com a purificação da proteína, uma vez que *Dm*-PAF, representando a proteína antifúngica pura, apresentou efeito inibitório para *S. cerevisiae* na concentração de 0,015 $\mu\text{gP}/\mu\text{L}$ (FIGURA 14). *Dm*-PAF, na mesma concentração citada, também se mostrou ativa contra a levedura patogênica *C. tropicalis*, evidenciando seu potencial como ferramenta para uso clínico (FIGURA 15). *C. tropicalis* foi, também, inibida por uma proteína de 30 kDa isolada de *Sorghum bicolor*, porém, numa concentração expressivamente maior, 18 $\mu\text{gP}/\mu\text{L}$ (MINCOFF *et al.*, 2006). Diferente do relatado para *Dm*-PAF, uma defensina isolada de sementes de *Phaseolus vulgaris*, denominada PvD1, foi capaz de inibir apenas o crescimento de *S. cerevisiae*, mas não o de *C. tropicalis*, quando testada a 100 $\mu\text{gP}/\mu\text{L}$ (GOMES *et al.*, 2008). Em adição, inibição do crescimento de *S. cerevisiae* foi evidenciada pela lectina de *Luetzelburgia auriculata*, denominada de LAA (MELO *et al.*, 2005), porém a uma concentração 333 vezes maior do que a demonstrada para *Dm*-PAF.

No intuito de se evidenciar mais à frente os efeitos da *Dm*-PAF, foi avaliado se o mecanismo de ação pelo qual essa proteína estaria atuando seria pela interação com bombas H^+ -ATPases. Para tanto, leveduras foram escolhidas pela facilidade de manipulação de suas células, atribuída à sua natureza unicelular. Células de levedura apresentam parede celular constituída pelos polissacarídeos estruturais β -1,3-glucana, β -1,6-glucana e quitina e são permeáveis a dextranas com 70 kDa, sugerindo que *Dm*-PAF poderia interagir diretamente com a parede, ou mesmo com constituintes da membrana celular por apresentar livre trânsito, desencadeando algum tipo de efeito sobre essas estruturas (NOBEL *et al.*, 1989). Os dados obtidos no presente trabalho excluem a possibilidade de atuação dessa proteína juntamente a bombas H^+ -ATPases, evidenciada pela não inibição da acidificação do meio promovida por células de *S. cerevisiae* ($1,0 \times 10^7$ células/mL) após adição de glucose 0,5 M (FIGURA 18). A atividade H^+ -ATPases é mediada por bombas de prótons que utilizam energia para manutenção da estabilidade osmótica da célula fúngica, bem como para a homeostase funcional do pH intracelular (TATSADJIEU *et al.*, 2009). A eficiência desse mecanismo é indicada pela acidificação das células, visto que, adicionando açúcares num meio, comumente glucose, que contém células vivas em fase estacionária, o transporte dessa molécula através dessas bombas de prótons (antiporte Glicose- H^+) é rapidamente induzido, resultando na

promoção gradual do abaixamento do pH externo pelo aumento da concentração externa de H^+ (MONK e PERLIN, 1994; SETO-YOUNG *et al.*, 1997; TATSADJIEU *et al.*, 2009). Diferentemente do verificado para a *Dm*-PAF, esse mecanismo de ação foi verificado para a lectina cotiledonária de *L. auriculata* (MELO *et al.*, 2005). Assim sendo, estudos adicionais são necessários de modo a avaliar se a ação antifúngica da *Dm*-PAF é decorrente de sua atuação direta na parede celular e/ou na membrana plasmática do fungo e/ou em alvos intracelulares.

Uma vez a *Dm*-PAF atuando diretamente na parede celular do fungo, poderia haver comprometimento de uma das principais funções desempenhadas por essa estrutura, que é a proteção do organismo contra condições hostis (RAST *et al.*, 2003). Efeito deletério na parede celular foi verificado para uma proteína antifúngica de 30 kDa isolada de sementes *S. bicolor*, resultando na inibição da formação do tubo germinativo que, por sua vez, necessita da integridade da parede celular para divisão das células (MINCOFF *et al.*, 2006).

Ação antifúngica oriunda de alteração no funcionamento da membrana seria outra possibilidade de atuação proposta para a *Dm*-PAF. Vicilinas de *Vigna unguiculata* (feijão-caupi) mostraram potente ação antifúngica, provavelmente por uma atuação sinérgica, em interações com a membrana plasmática e parede celular. Tal fato foi resultante da ligação de vicilinas a polissacarídeos e a glicoconjugados na superfície da célula fúngica (GOMES *et al.*, 1998). Como a *Dm*-PAF mostrou ser uma proteína ligante à quitina, essa proteína poderia apresentar um mecanismo de atuação similar ao demonstrado por essas vicilinas.

Outra possibilidade para ação da *Dm*-PAF poderia estar vinculada à sua entrada na célula, ocorrendo interação com vários alvos intracelulares (ODDS *et al.*, 2003). Atividade antifúngica intrínseca foi apresentada por uma RIP de 20 kDa, isolada do cogumelo *Lyophyllum shimeji*, que se mostrou capaz de formar um canal nas células fúngicas, permitindo a entrada do efêmero (cadeia A), possuidor de atividade *N*-glicosidásica, causadora de danos ao RNA (NG *et al.*, 2001).

Durante a realização do presente trabalho, inexistência de estudos referentes à atividade inseticida para as lectinas presentes nas sementes de *D. megacarpa* foi verificada. No entanto, atividade inseticida de lectinas vegetais contra diversas espécies de insetos pertencentes às ordens Coleoptera, Homoptera, Diptera e Lepidoptera tem sido relatada (GATHEHOUSE *et al.*, 1995; CARLINI e GROSSI-DE-SÁ, 2002; VASCONCELOS e OLIVEIRA, 2004). Essas evidências associadas à facilidade de

obtenção da lectina ligante à matriz de Sephadex G-50, resultante do procedimento de purificação da *Dm*-PAF, motivaram a realização de um bioensaio com foco na atividade inseticida dessa lectina, usando como modelo experimental o inseto *C. maculatus*, pertencente à ordem Coleoptera. Todavia, antes de sua utilização para esse propósito, seu perfil eletroforético foi analisado. Por esse procedimento, foi confirmada a presença de suas três subunidades protéicas, com massas moleculares aparentes nas faixas de 25-26, 13-14 e 8-9 kDa (FIGURA 17). Esse perfil é inalterado mesmo com a presença de agente redutor (MOREIRA *et al.*, 1983). Essas três subunidades são comumente encontradas em várias outras lectinas, tais como aquelas isoladas de *Canavalia ensiformis* (WANG *et al.*, 1971; HAGUE, 1975), *C. brasiliensis* (MOREIRA e CAVADA, 1984), *C. maritima*, *C. gladiata* (HAGUE, 1975; YAMAUCHI e MINAMIKAA, 1990) e *Cratylia floribunda* (OLIVEIRA *et al.*, 1991).

No ensaio com *C. maculatus*, a lectina supracitada foi incorporada em sementes artificiais, preparadas com farinha de feijão-caupi, nos seguintes níveis de inclusão: 0,1, 0,25, 0,5% (p/p). Vários parâmetros foram analisados ao longo de 60 dias de experimento, visando avaliar os efeitos dessa lectina sobre *C. maculatus*. Um desses foi o ganho de peso, tendo sido verificado separadamente os machos e as fêmeas (FIGURA 19). A razão para isso é que, machos, geralmente, apresentam peso corpóreo menor do que as fêmeas, o que poderia interferir nos cálculos de peso médio dos insetos adultos atingido ao final do experimento. Os resultados obtidos mostraram que mesmo no nível mais alto de inclusão (0,5%), a lectina de *D. megacarpa* não interferiu significativamente ($p > 0,05$) no peso dos insetos, quando comparada ao grupo controle (FIGURA 19). Interferência de lectina sobre o peso corpóreo de *C. maculatus* já foi verificada, como a promovida pela lectina isolada de *Gracilaria ornata*. No entanto, isso apenas foi observado quando incluída em um nível mais elevado, a 1% (LEITE *et al.*, 2005).

Diferentemente do observado para o ganho de peso, a lectina de *D. megacarpa* foi capaz de retardar o desenvolvimento dos insetos, sendo o menor nível de inclusão já suficiente para causar esse efeito (FIGURA 20). O retardo ocorrido foi correspondente a um período de 6 a 8 dias. Efeito sobre esse parâmetro tem sido verificado com outras proteínas vegetais. Um exemplo é o inibidor recombinante de proteinase cisteínica de sementes de *Glycine max*, denominado N2, que numa faixa de inclusão similar a usada no presente trabalho, causou um atraso de 10 dias no tempo médio de desenvolvimento do *C. maculatus* (LALITHA *et al.*, 2005).

Diferença significativa no tratamento com a lectina de *D. megacarpa* em relação ao controle foi, ainda, verificada no percentual de emergência dos insetos, porém apenas no nível de 0,5% de inclusão (FIGURA 21). A lectina de *Talisia esculenta* causou, também, diminuição da taxa de sobrevivência dos insetos, quando incorporada em sementes artificiais nos níveis de 0,5 a 2%, sendo o efeito dose-dependente (MACEDO *et al.*, 2002).

O índice de crescimento (IC) e o índice de resistência (IR) foram dois outros parâmetros analisados. O IC relaciona os efeitos causados por um determinado tipo de dieta sobre o tempo de desenvolvimento e percentagem de insetos emergentes. O princípio desse índice está baseado no fato de que as condições adversas impostas por uma dieta inadequada são capazes de prolongar o tempo médio de desenvolvimento e diminuir o número de insetos emergentes, resultando num índice de crescimento baixo. Em contrapartida, uma dieta considerada adequada para os insetos resulta num alto valor de índice de crescimento (HOWE, 1971). Já o índice de resistência é baseado na relação entre o IC do grupo de insetos alimentados com a dieta teste e o IC do grupo controle, sendo expresso em percentagem. Apesar do IC e IR serem considerados medidas arbitrárias, eles têm sido empregados na tentativa de ajudar a condensar e ordenar os efeitos de amostras-teste sobre diferentes modelos experimentais (MACHUKA *et al.*, 2000). Dessa forma, esses índices foram considerados para os diferentes tratamentos realizados no presente trabalho (TABELA 6), tendo sido encontrados IC e IR significativos ($p < 0,05$) nos tratamentos contendo a lectina em comparação ao controle. Lectinas de *Sphenostylis stenocarpa*, denominadas Enugu 95-3 e Umueze 98-3-2, quando incluídas a 5% apresentaram IC e IR cerca de duas vezes maior e igual, respectivamente (MACHUKA *et al.*, 2000), aos verificados com a lectina de *D. megacarpa*.

A rigor, o ciclo biológico do inseto constitui uma variável importante ao se avaliar a resistência de genótipos a pragas, pois quanto mais alongado é o ciclo, maior é o índice de resistência do genótipo (REDDEN e McGUIRE, 1983). A resistência é caracterizada pelo alongamento do período de ovo até adulto e pela redução no número de insetos adultos emergidos, sendo considerada do tipo antibiose (ARAÚJO e WATT, 1988). No caso específico do presente trabalho, esses parâmetros foram utilizados para avaliar a influência da lectina sobre o *C. maculatus*. De fato, nos tratamentos em que essa lectina foi incorporada na dieta, foram verificados aumento no tempo médio de desenvolvimento e redução na emergência dos insetos. Portanto, a análise em conjunto

dos parâmetros aqui avaliados deixa patente o efeito inseticida da lectina de *D. megacarpa* para *C. maculatus*, podendo vir a comprometer seriamente o ciclo vital desse inseto.

Por fim, os resultados aqui apresentados respondem aos questionamentos realizados no início do trabalho, mostrando serem as sementes de *D. megacarpa* uma rica fonte de proteínas de defesa, ativas no controle de fungos e do inseto *C. maculatus*.

8. CONCLUSÕES

No presente trabalho, foi purificada de sementes de *Dioclea megacarpa* Rolfe uma proteína antifúngica com massa molecular aparente de 67-68 kDa. Essa proteína não mostrou ser hololectina e nem quitinase, apresentando sua sequência NH₂-terminal bloqueada. Apesar de sua potente atividade antifúngica (0,015 µgP/µL), os dados obtidos excluem o envolvimento com bombas de H⁺-ATPase como parte integrante de seu mecanismo de ação.

A lectina presente em sementes de *D. megacarpa*, previamente descrita por Moreira *et al.* (1983), mostrou potencial inseticida contra *Callosobruchus maculatus*, interferindo em parâmetros importantes relacionados ao ciclo vital do inseto.

Os dados aqui apresentados, ainda que necessitem de uma caracterização mais minuciosa, respondem aos questionamentos realizados no início do trabalho, mostrando serem as sementes de *D. megacarpa* uma rica fonte de proteínas de defesa, ativas no controle de fungos e do inseto *C. maculatus*.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, D. J. Fungal cell wall chitinases and glucanases. **Microbiology**, v. 150, p. 2029-2035, 2004.

AGIZZIO, A. P., DA CUNHA, M., CARVALHO, A. O., OLIVEIRA, M. A., RIBEIRO, S. F. F., GOMES, V. M. The antifungal properties of a 2S albumin-homologous protein from passion fruit seeds involve plasma membrane permeabilization and ultrastructural alterations in yeast cells. **Plant Science**, v. 171 (4), p. 515-522, 2006.

AMBIENTE BRASIL-AMBIENTE NATURAL (Caatinga). Disponível em <http://www.ambientebrasil.com.br/composer.php3?base=./natural/index.html&conteudo=./natural/biomas/caatinga.html>. Acesso em 15/01/2009.

AMORIM, I. L., DADIVE, A. C., CHAVES, M. M. F. Morfologia do fruto e da semente e germinação da semente de *Trema micrantha* (L.) Blum. **Cerne**, v. 3 (1), p. 138-152, 1997.

ARAÚJO, J. P. P., WATT, E. E. **O caupi no Brasil**. Brasília, EMBRAPA-CNPAF, p. 722, 1988.

ARRUDA, F. P., BATISTA, J. L. Efeito da luz, de óleos vegetais e de cultivares de caupi na infestação do caruncho (*Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1775) (Coleoptera: Bruchidae). **Caatinga**, v.11 (1/2), p. 53-57, 1998.

BANDYOPADHYAY, S., ROY, A., DAS, S. Binding of garlic (*Allium sativum*) leaf lectin to the gut receptors of homoptera pests is correlated to its insecticidal activity. **Plant Science**, v. 161, p. 1025-1033, 2001.

BARKAI-GOLAN, R. An Annotated Check List of Post-Harvest Fungal Diseases of Fruits and Vegetables in Israel. **The Agricultural Research Organization**, 2^a ed., 2002.

BARKAI-GOLAN, R. Species of *Aspergillus* causing post-harvest fruit decay in Israel. **Mycopathologia**, v. 71, p 13-16, 1980.

BARKAI-GOLAN, R., MIRELMAN, D., SHARON, N. Studies on growth inhibition by lectins of *Penicillia* and *Aspergilli*. **Archives of Microbiology**, v. 116, p. 119-124, 1978.

BERGAMIN FILHO, A., KIMATI, H., AMORIM, L. Fisiologia do Parasitismo. **Manual de Fitopatologia**, 3^a ed., p. 343-414, 1995.

BLUM, H., BEIER, H., GROSSA, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, p. 93-99, 1987.

BOLLER, T. Biochemical analysis of chitinases and β -1,3-glucanase. In: GURR, S.J., Mc PHERSON, M.J., BOWLES, D. J. **Molecular Plant Pathology: A Practical Approach**, vol. II, 1992.

BOLLER, T. Biochemical analysis of chitinases and β -1,3-glucanase. In: GURR, S.J., Mc PHERSON, M. J., BOWLES, D. J. **Molecular Plant Pathology**. IRL Press, New York, p. 23-29, 1993.

BOWLES, D.J. Defense related proteins in higher plants. **Biochemistry**, v. 59, p. 837-907, 1990.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities for proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BROEKAERT, W. F., TERRAS, F. R. G., CAMMUE, B. P. A., VANDERLEYDEN, J. An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. **FEMS Microbiology Letters**, v. 69 (2), p. 55-59, 1990.

BROEKAERT, W. F., VAN PARIJS, J., LEYNS, F. JOOS, H., PEUMANS, W. J. A chitin-binding lectin from stinging nettle rhizomes with antifungal properties. **Science**, v. 245, p. 1100-1102, 1989.

BRUNNER, F., STINTZI, A., FRITIG, B., LEGRAND, M. Substrate specificities of tobacco chitinases, **The Plant Journal** , v.14, p. 225-234, 1998.

CARDOSO, B. B. Fixação biológica de nitrogênio em plantas de feijão-de-corda inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. na presença de diferentes níveis de salinidade. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal do Ceará, 90 p., 2000.

CARLINI, C. R., GROSSI-DE-SÁ, M. F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon**, v. 40, p. 1515-1539, 2002.

CARUSO, C., CHILOSI, G., LEONARDI, L., BERTINI, L., MAGRO, P., BUONOCORE, V., CAPORALE, C. A basic peroxidase from wheat kernel with antifungal activity. **Phytochemistry**, v. 58, p. 734-750, 2001.

CARVALHO, M. M. M., XAVIER FILHO, J., ARY, Maria Bacache ; CAMPOS, F. A. P., MOREIRA, R. A. Trypsin Inhibitor in Seeds of *Dioclea grandiflora* Mart. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 11, p. 81-84, 1988.

CAYOT, P., ROSIER, H., ROULLIER, L., HAERTLE, T., TAINTURIER, G. Electrochemical modifications of proteins: disulfide bonds reduction. **Food Chemistry**, v. 77, p. 309-315, 2002.

CHANG, H. T., CHENG, Y. H., WU, C. L., CHANG, S. T., CHANG, T. C., SU, Y. Antifungal activity of essential oil and its constituents from *Calocedrus macrolepis* var. *formosana* Florin leaf against plant pathogenic fungi. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 6266–6270, 2008.

CHEONG, Y. H., KIM, C. Y., CHUN, H. J., MOON, B. C., PARK, H. C., KIM, J. K., LEE, S-H., HAN, C-D., LEE, S. Y., CHO, M. J. Molecular cloning of a soybean class III β -1,3-glucanase gene that is regulated both developmentally and in response to pathogen infection. **Plant Science**, v. 154, p. 71-81, 2000.

CHISPEELS, M. J., RAIKHEL, N. V. Lectins, lectin genes and their role in plant defense. **Plant Cell**, v. 3, p. 1-9, 1991.

CHRISTENSEN, A. B., CHO, B. H., NAESBY, M., GREGERSEN, P. L., BRANDT, J., MADRIZ-ORDEÑA, K., COLLINGE, D. B., THORDAL-CRISTENSEN, H. The molecular characterization of two barley proteins establishes the novel PR-17 family of pathogenesis-related proteins. **Molecular Plant Pathology**, v. 3 (3), p. 135-144, 2002.

CHU, K. T., LIU, K. H., NG, T. B. Cicerarin, a novel antifungal peptide from the green chickpea. **Peptides**, v. 24, p. 659–663, 2003.

COSTA, S. A., BELTRAMINI, L. M., THIEMANN, O. H., SILVA, F. H. A sugarcane cystain: recombinant expression, purification, and antifungal activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 296, p. 1194-1199, 2002.

DAAYF, F., SCHMITT, A., BELANGER, R.R. The effects of plant extracts of *Reynoutria sachalinensis* on powdery mildew development and leaf physiology of long English cucumber. **Plant Disease**. v. 79, 577-580, 1995.

DALY, H. V., DOYEN, J. T., EHRLICH, P. **Introduction to insect biology and diversity**. New York, McGraw-Hill Book Co., 1978.

DATTA, S. K., MUTHUKRISHNAN, S. Pathogenesis-Related Proteins in Plants. **Ed. CRC Press**. Boca Raton, Florida, 1999.

DE WIT, P. J. G. M. How plants recognize pathogens and defend themselves. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64 p. 2726–2732, 2007.

DOERGE, D. R., DIVI, R. L., CHUCHWELL, M. I. Identification of the colored guaiacol oxidation product produced by peroxidases. **Analytical Biochemistry**, v. 250, p. 10-17, 1997.

DUKE, S.O. Natural pesticides from plants. In: Janick, J., Simon, J.E. (Eds.), **Advances in New Crops Timber Press, Portland**, pp. 511-517, 1993.

FAO. The state of food and agriculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **FAO Agriculture Series**, n°. 38, 2006.

FERNANDES, C. F., VASCONCELOS, I. M., SILVEIRA, J. A. G., MORAES, V. C., OLIVEIRA, J. T. A. Induction of an anionic peroxidase in cowpea leaves by exogenous salicylic acid. **Journal of Plant Physiology**, v. 163, p. 1040-1048, 2006.

FERREIRA, R. B., MONTEIRO, S., FREITAS, R., SANTOS, C. N., CHEN, Z., BATISTA, L. M., DUARTE, J., BORGES, A.; TEIXEIRA, A. R. The role of plant defence proteins in fungal pathogenesis. **Molecular Plant Pathology**, v. 8, p. 677-700, 2007.

FIELDS, P. G. Effect of *Pisum sativum* fractions on the mortality and progeny production of nine stored-grain beetles. **Journal of Stored Products Research**, v. 42, p. 86-96, 2006.

FIRMINO, F., FERNADES, K. V. S., SALES, M. P., GOMES, V. M., MIRANDA, M. R. A., DOMINGUES, S. J. S. Cowpea (*Vigna unguiculata*) vicilins associate with chitinous structures in midgut and feeds of the bruchid Beetles *Callosobruchus maculatus* and *Zabrote subfasciatus*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29, p. 749-756, 1996.

FISHER, P. J., ANSON, A. E., PETRINI, O. Antibiotic activity of some endophytic fungi from ericaceous plants. **Botanica Helvetica**, v. 94, p. 249-253, 1984.

FRITIG B., HEITZ T., LEGRAND M. Antimicrobial proteins in induced plant defense. **Current Opinion in Immunology**, v. 10, p. 16-22, 1998.

GAO, A. G., HAKIM, S.M., MITTANCK, C. A., WU, Y., WOERNER, B. M., STARK, D. M., SHAH, D. M., LIANG, J., ROMMENS, C. M. Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide. **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 1307-1310, 2000.

GATEHOUSE, A. M. R., BARBIERI, L., STIRPE, F., CROY, R. R. D. Effects of ribosome-inactivating proteins on insect development- differences between Lepidoptera and Coleoptera. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 54, p. 43-51, 1990.

GATEHOUSE, A. M. R., POWELL, K. S., PEUMANS, W. J., VAN DAMME, E. J. M., GATEHOUSE, J. A. Insecticidal properties of plant lectins: their potencial in plant protection. **In: Lectins Biomedical Perspectives. Pusztain, A., Bardocz, S. Eds., London: Taylor e Francis Ltda., cap. 3, p. 35-57, 1995.**

GHOSH, M. Purification of a lectin-like antifungal protein from the medicinal herb, *Withania somnifera*. **Fitoterapia**, v. 80, p. 91–95, 2009.

GIFONI, J. M. Proteínas ligantes à quitina de sementes de *Moringa oleifera* Lamarck e seu papel na defesa da planta. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal do Ceará, 2005.

GOLDSTEIN I. J., HAYES, C. E. The lectins: carbohydrate binding proteins of plant and animals. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v. 35, p. 127-340, 1980.

GOMES, A. P. G., DIAS, S. C., BLOCH Jr., C., MELO, F. R., FURTADO Jr., J. R., MONNERAT, R. G., GROSSI-DE-SÁ, M. F., FRANCO, L. O. Toxicity to cotton boll weevil *Anthonomus grandis* of a trypsin inhibitor from chickpea seeds. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 140, p. 313-319, 2005a.

GOMES, A. S. Purificação, caracterização físico-química e biológica de proteínas ligantes à quitina presentes nas sementes de *Moringa oleifera* Lamarck. **Monografia do Departamento de Biologia**. Universidade Federal do Ceará, 100 p., 2002.

GOMES, C. E. M., BARBOSA, A. E. A. D., MACEDO, L. L. P., PITANGA, J. C. M., MOURA, F. T., OLIVEIRA, A. S., MOURA, R. M., QUEIROZ, A. F. S., MACEDO, F. P., ANDRADE, L. B. S., VIDAL, M. S., SALES, M. P. Effect of trypsin inhibitor from *Crotalaria pallida* seeds on *Callosobruchus maculatus* (cowpea weevil) and *Ceratitidis capitata* (fruit fly). **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 43, p. 1095-1102, 2005b.

GOMES, P. D., DOS SANTOS, I. S., MELLO, E. O., DIZ, M. S. S., CARVALHO, A. O., DE SOUZA-FILHO, G. A., DA CUNHA, M., VASCONCELOS, I. M., FERREIRA, B. S., GOMES, V. M. Isolation, characterization and cloning of a cDNA encoding a new

antifungal defesin from *Phaseolus vulgaris* L. seeds. **Peptides**, v. 29, p. 2090-2100, 2008.

GOMES, V. M., OLIVEIRA, A. E. A., XAVIER-FILHO, J. A chitinase and β -1,3 glucanase isolated from the seeds of cowpea [*Vigna unguiculata* L. Walp.] inhibit the growth of fungi and insect pest of the seed. **Journal Science of Food Agriculture**, v. 72, p. 86-90, 1996.

GOMES, V. M.; CUNHA, M.; MIGUENS, F. C.; FERNANDES K. V. S; ROSE, T. L; FILHO, J. X. Ultrastructure and immunolabelling of fungi treated with *Vigna unguiculata* vicilins (7S storage proteins). **Plant Science**, v. 138, p. 81-89, 1998.

GONZALES, C. F., PROVIN, E. M., ZHU, L., EBBOLE, D. J. Independent and synergistic activity of synthetic peptides against thiabendazde-resistant *Fusarium sambucinum*. **Phytopathology**, v. 92, p. 917-924, 2002.

GRANT, G. Lectins. In: Felix D'MELO, J. P., Duffus, C. M., Duffus, J. H. (Eds.), Toxic Substances in Crop Plants. **The Royal Society of Chemistry**, London, p. 49-67, 1991.

GREGORY, P. H. The Microbiology of the Atmosphere. In: **Leonard Hill (Books) Limited. London**, 1973.

GURNEY, K. A., MANTLE, P. G. Biosynthesis of 1- *N*-methyl-albonoursin by an endophytic *Streptomyces* sp. isolated from perennial ryegrass. **Journal of Natural Products**, v. 56, p. 1194-1198, 1993.

HAGUE, D. R. Studies of storage proteins of high plants. I. Concanavalin A from three species of the genus *Canavalia*. **Plant Physiology**, v. 55, p. 636-642, 1975.

HALL, A. E., SINGH, B. B., EHLERS, J. D. Cowpea beeding. **Plant Breeding**, v. 15, p. 217-274, 1997.

HAMERSTRAND, G. H., BLACK, L. T., GLOVER, J. D. Trypsin inhibitors in soy products: modification of standart analytical procedure. **Cereal Chemistry**, v. 58, p. 42-45, 1981.

HAMMOND-KOSACK, K. E., JONES, J. D. G. Responses to Plant Pathogenes In: **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**, p. 1102-1156, Ed. BB Buchanan, American Society of Plant Physiology, Rockville, Maryland, USA, p. 1367, 2000.

HOPFER, U. Digestão e Absorção de Constituintes Nutricionais Básicos. In: **Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas**. DEVLIN, T. M (Ed.) São Paulo. Ed. Edgard Blücher Ltda., p. 888-915, 1998.

HOWE, R. W. A parameter for expressing the suitability of an environment for insect development. **Journal of Stored Product Research**, v. 7, p. 63-65, 1971.

HUANG, X., XIE, W., GONG, Z. Characteristics and antifungal activity of a chitin binding protein from *Ginkgo biloba*. **FEBS Letters**, v. 478, p. 123-126, 2000.

HWU, L., HUANG, C. C., CHEN, D. T., LIN, A. The action mode of ribosome inactivating protein α -sacarin. **Journal of Biomedical Science**, v. 7, p. 420-428, 2000.

JANZEN, D. H., JUSTER, H. B., LENER, I. E. Insecticidal action of the phytohemagglutinin in back bean on a bruchis beetle. **Science**, v. 192, p. 795-796, 1976.

JI, C., KÚC, J. Antifungal activity of cucumber β -1,3-glucanase and chitinase. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 49, p. 257-265, 1996.

JONES D. A., TAKEMOTO D., Plant Innate Immunity – Direct and indirect recognition of general and specific pathogen-assoceated molecules. **Current Opinion in Immunology**, v. 16, p .48-62, 2004.

KAKADE, M.L., RACKIS, J.J., McGHEE, J.E., PUSKI, G. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: a collaborative analysis of an improved procedure. **Cereal Chemistry**, v. 51, p. 376-382, 1974.

KAO, M. P., CHEN, C.I, HUANG, S. C., LIN, K. M., CHANG, Y. C., LIU, Y. C. Preparation of fermentation-processed chitin and its application in chitinase affinity adsorption. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 343-348, 2009.

KAPLAN, A. The determination of urea, amonia and urease. In: **Methods of Biochemical Analysis**. GLICK, D. (Ed.) John Wiley e Sons, New York, USA, p. 311-314, 1969.

KARUNGI, J., ADIPALA, E., OGENGA-LATIGO, M.W., KYAMANYAWA, S., OYOBO, N., JACKAI, L.E.N. Pest management in cowpea. Part 2. Integrating planting time, plant density & inseticide application for the controlo f cowpea field pests in eastern Uganda. **Crop Protection**, v.19, p. 237-245, 2000.

KESSMANN, H., STAUB, T., HOFMANN, C., MAETZKE, T., HERZOG, J., WARD, E., UKNES, S., RYALS, J. Induction of systemic acquired resistance in plants by chemicals. **Annual Reviews of Phythopatology**, v. 32, p. 439-459, 1994.

KOCOURECK, J., HOREJSI, V. Defining a lectin. **Nature**, v. 290, p. 188, 1986.

KOIWA, H., BRESSAN, R. A., HASEGAWA, P. M. Regulation of proteinase inhibitors and plant defense. **Trends in Plant Science**, v. 2, p. 379-384, 1997.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural protein during the assembly of bacteriophage t4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LALITHA, S., SHADE, R. E., MURDOCK, L. L., BRESSAN, R. A., HASEGAWA, P. M., NIELSEN, S. S. Effectiveness of recombinant soybean cysteine proteinase inhibitors against selected crop pests. **Comparative Biochemistry and Physiology**, parte C, v. 140, p. 227-235, 2005.

LAM, S. K., NG, T. B. Passiflin, a novel dimeric antifungal protein from seeds of the passion fruit. **Phytomedicine**, v. 16, p. 172–180, 2009.

LAMB, C., DIXON R. A. A. The oxidative burst in plant disease resistance. **Current Opinions in Biotechnology**, v. 9, p. 679-685, 1970.

LAMB, C., DIXON R. A. The oxidative burst in plant disease resistance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 48, p. 251-275, 1997.

LEE, O. S., LEE, B., PARK, N., KOO, J.C., KIM, Y.H., PRASAD D, T., KARIGAR, C., CHUN, H. J., JEONG, B. R., KIM, D. H., NAM, J., YUN. J. G., KWAK, S. S., CHO, M. J., YUN, D. J. Pn-AMPs, the hevein-like proteins from *Pharbitis nil* confers disease resistance against phytopathogenic fungi in tomato, *Lycopersicon esculentum*. **Phytochemistry**, v. 62, p. 1073-1079, 2003.

LEITE, Y. F. M. M., SILVA, L. M. C. M., AMORIM, R. C. N., FREIRE, E. A., JORGE, D. M. M., GRANGEIRO, T. B., BENEVIDES, N. M. B. Purification of a lectin from the marine red alga *Gracilaria ornata* and effect on the development of the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1724, p. 137-145, 2005.

LI, S., CLAESON, P. Cys/Gly-rich proteins with a putative single chitin-binding domain from oat (*Avena sativa*) seeds. **Phytochemistry**, v. 63, p. 249-255, 2003.

LIS, H., SHARON, N. Lectins in higher plants. **In The Biochemistry of Plants: A comprehensive treatise**. Academic Press, New York, v. 6, p. 371-447, 1981.

LIU, C. H., ZOU, W. X., LU, H., TAN, R. X. Antifungal activity of *Artemisia annua* endophyte cultures against phytopathogenic fungi. **Journal of Biotechnology**, v. 88, p. 277-282, 2001.

MACEDO, M. L. R., FREIRE, M. G. M., NOVELLO, C. J., MARANGONI, S. *Talisia esculenta* lectin and larval development of *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Biochemistry et Biophysica Acta**, v. 1571, p. 83-88, 2002.

MACEDO, M. L. R., FREIRE, M. G. M., SILVA, M. B. R., COELHO, L. C. B. B. Insecticidal action of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera : Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus*

maculatus (Coleoptera: Bruchidae). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 146, p. 486-498, 2007.

MACHUKA, J. S., OLADAPO, G. O., MAARTEN, J. C., LOUIS, E. N. J. The african yam bean seed lectin affects the development of the cowpea weevil but does not affect the development of larvae of the legume pod borer. **Phytochemistry**, v. 53, p. 667-674, 2000.

MARACAJÁ, P. B., BATISTA, C. H. F., SOUSA, A. H., VASCONCELOS, W. E. Levantamento florístico e fitosociológico do extrato arbustivo-arbóreo de dois ambientes na Vila Santa Catarina, Serra do Mel, RN. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 3, p. 13, 2003.

MEANS, F. J., NEUHANS, J. M., SEPERISEN, C., RYALS, J. The primary structure of plant pathogenesis-related glucanohydrolases and their genes. In BOLLER, T., MEINS, F., JR. (Eds.). **Genes Involved in Plant Defense**. Vienna, Springer-Verlag, New York, p. 245, 1992.

MELGAREJO, L. M.; VEGA, N.; PÉREZ, G. Isolation and characterization of novel lectins from *Canavalia ensiformes* DC and *Dioclea grandiflora* Mart. ex. Benth. seeds. **Journal Plant Physiology**, v. 17, p. 315-32, 2005.

MELO, V. M. M., MEDEIROS D. A., RIOS, F. J. B., CASTELAR, L. I. M., CARVALHO F. F. U. Antifungal properties (agglutinins) from the red alga *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux. **Botanica Marina**, v. 40, p. 281-284, 1997.

MELO, V. M. M., VASCONCELOS, I. M., GOMES, V. M., CUNHA, M., SOARES, A. A., OLIVEIRA, J. T. A. A cotyledonary agglutinin from *Luetzelburgia auriculata* inhibits the fungal growth of *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium solani* and *Aspergillus niger* and impairs glucose-stimulated acidification of the incubation medium by *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Plant Science**, v. 169, p. 629-639, 2005.

MENDIETA, J. R., PAGANO, M. R., MUÑOZ, F. F., DALEO, G. R., GUEVARA, M. G. Antimicrobial activity of potato aspartic proteases (StAPs) involves membrane permeabilization. **Microbiology**, v. 152, p. 2039-2047, 2006.

MENEZES, H., JARED, C. Immunity in plants and animals: common ends through different means using similar tools. **Comparative Biochemistry and Physiology**, part C, v. 132, p. 1-7, 2002.

MINCOFF, P. C., GARCIA, C. D., UEDA-NAKAMURA, T., NAKAMURA, C. V., DIAS FILHO, B. P. Isolation and characterization of a 30 kD antifungal protein from seeds of *Sorghum bicolor*. **Research in Microbiology**, v. 157 (4), p. 326-32, 2006.

MIRELMAN, D., GALUN, E., SHARON, N., LOTAN, R. Inhibition of fungal growth by wheat germ agglutinin. **Nature**, v. 256, p. 414-416, 1975.

MOLINA, A. Peptídios antimicrobianos e imunidade inata em plantas. **BioPress net**, n. 7, 2003.

MONK, B. C., PERLIN, D. S. Fungal plasma-membrane proton pumps as promising new antifungal targets. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 20 (3), p. 209-223, 1994.

MONTESINOS, E. Development, registration and commercialization of microbial pesticides for plant protection. **International Microbiology**, v. 6, 245-252, 2003.

MORAIS, J. K. S. Aspectos estruturais da toxina da soja (SBTX) e sua participação na defesa vegetal. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Ceará, 2007.

MOREIRA, R. A., AINOUS, I. L., OLIVEIRA, J. T.A., CAVADA, B. S. Plant lectins, chemical and biological aspects. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, n. II, p. 211-218, 1991.

MOREIRA, R. A., CAVADA, B. S. Lectin from *Canavalia brasiliensis* (Mart.). Isolation, characterization and behavior during germination. **Biologia Plantarum**, v. 26, p. 113-120, 1984.

MOREIRA, R. A., PERRONE, J. C. Purification and partial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology**, v. 59, p. 783-787, 1977.

MOREIRA, R. A., BARROS A. C. H., STEWART, J. M., PUSZTAI, A. Isolation and characterization of a lectin from the seeds of *Dioclea grandiflora* (Mart.). **Planta**, v. 158, p.63-68, 1983.

MORENO, A. B., DEL POZO, A. M., BORJA, M., SAN SEGUNDO, B. Activity of the antifungal protein from *Aspergillus giganteus* against *Botrytis cinerea*. **Phytopathology**, v. 93, p. 1344–1353, 2003.

MOSS, M.O. *Aspergillus* mycotoxins. In **Genetics and Physiology of Aspergillus**. J.E, Smith and J.A. Patlman, (Eds). Academic Press, New York and London, p. 499-524, 1977.

NASI, A., Picariello, G., Ferranti, P. Proteomic approaches to study structure, functions and toxicity of legume seeds lectins. Perspectives for the assessment of food quality and safety. **Journal of Proteomics**, x, 2009.

NEUHAUS, J. M. Plant chitinases (PR-3, PR-4, PR-8, PR-11). In: Datta, S. K. and Muthukrishnan, S. Pathogenesis-Related Proteins in Plants, **CRC Press**, p. 77–105, 1999.

NG, T. B., LAM, S. K. First simultaneous isolation of a ribosome inactivating protein and an antifungal protein from a mushroom (*Lyophyllum shimeji*) together with evidence for synergism of their antifungal effects. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 393, p. 271-280, 2001.

NOBEL, J. G., DIJKERS, C., HOOIJBERG, E., KLIS, F. M. Increasead cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae* after treatment with dithiothreitol or EDTA. **Journal of Genetic Microbiology**, v. 135, p. 2077-2089, 1989.

NÜRNBERGER, T., BRUNNER, F., KEMMERLING, B., PIATER, L. Innate immunity in plants and animals: Striking similarities and obvious differences. **Immunological Reviews**, v. 198, p. 249-266, 2004.

ODDS, F. C., BROWN, A. J. P., GOW, N. A. R. Antifungal agents: mechanisms of action. **Trends in Microbiology**, v.11, p. 272-279, 2003.

OIGIANGBE, N. O., ONINGBINDE, A. O. The association between some physico-chemical characteristics and susceptibility of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) to *Callosobruchus maculatus* (F.). **Journal of Stored Products Research**, v. 32, p. 7-11, 1996.

OLIVEIRA, H. P. Proteínas Antifúngicas do Látex de *Masdenia megalantha* [Goyder e Morillo, 1994.]: Caracterização parcial e mecanismo de ação. **Dissertação de Mestrado**. Universidade de Fortaleza, 2009.

OLIVEIRA, J. T. A., CAVADA, B. S., MOREIRA, R. A. Isolation and partial characterization of a lectin from *Cratylia floribunda* Mart. seeds. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 14, p. 63-68, 1991.

OLIVEIRA, J. T. A., RIOS, F. J. B., VASCONCELOS, I. M., FERREIRA, F. V. A., NOJOSA, G. B. A., MEDEIROS, D. A. *Cratylia argentea* seed lectin, a possible defensive protein against plant-eating organisms: effects on rat metabolism and gut histology. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 1737–1747, 2004.

PATTON, J., LESTER, R. L. The phosphoinositol sphingolipids of *Saccharomyces cerevisiae* are highly localized in the plasma membrane. **Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 3101-3108, 1991.

PEUMANS, W. J., VAN DAMME, E. J. M. Lectin as plant defense proteins. **Plant Physiology**, v. 109, p. 347-352, 1995.

POLHILL, R. M. Classification of the Leguminosae. In: **F.A. Bisby, J. Buckingham and J.B. Harborne**, Editors, *Phytochemical Dictionary of the Leguminosae*, Chapman e Hall, New York, p. 45–47, 1994.

PUZZI, D. A. Manual de armazenamento de grãos; armazéns e silos. **Agronômica Ceres**, São Paulo, 405 p., 1977.

RAIKHEL, N.V., LEE, H. I., BROEKAERT, W. F. Structure and function of chitin-binding proteins. **Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular. Biology.** v.44, p. 591–615, 1993.

RAMOS, M. V., SOARES, E. L., FREITAS, C. D. T., OLIVEIRA, S. J., SOUSA, P. A. S., SALES, M. P., BARRETO-FILHO, J. D. M., BANDEIRA, G. P. Characterization and insecticidal properties of globulins and albumins from *Lutzelburguia auriculata* (Allemão) Ducke seeds towards *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). **Journal of Stored Products Research**, v. 43, p. 459–467, 2007.

RAST D. M., BAUMGARTNER D., MAYER C., HOLLENSTEIN G.O. Cell wall-associated enzymes in fungi. **Phytochemistry**, v. 64, p. 339-366, 2003.

RAUSCHER, M., ÁDÁM, A. L., WIRTZ, S. GUGGENHEIM, R., MENDGEN, K., DEISING, H. B. PR-1 protein inhibits the differentiation of rust infection hyphae in leaves of acquired resistant broad bean. **The Plant Journal**, v. 19 (6), p. 625-633, 1999.

REDDEN, R. J., MCGUIRE, J. The genetic evaluation of bruchid resistance in seed of cowpea. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 34, p. 707-716, 1983.

REISSIG, J. L., SROMENGER, J. L., LELOIR, L. F. A modified colorimetric method for estimation of N-acetylamino sugars. **Biological Chemistry**, v. 217, p. 959-966, 1955.

RIZZELLO, C. G., CODA, R., ANGELIS, M., Di CAGNO, R., CARNEVALI, P., GOBBETTI, M. Long-term fungi inhibitory activity of water-soluble extract from *Amaranthus* spp. seeds during storage of gluten-free and wheat flour breads. **International Journal of Food Microbiology**, xx, xxxxxxxx, 2009.

SÁ, R. A., ARGOLO A. C. C., NAPOLEÃO, T. H, GOMES, F.S, SANTOS, N. D. L, MELO, C. M. L., ALBUQUERQUE, A. C., XAVIER, H. S., COELHO, C. B. B., BIEBER, L. W, PAIVA, P. M. G. Antioxidant, Fusarium growth inhibition and Nasutitermes corniger repellent activities of secondary metabolites from *Myracrodruon urundeuva* heartwood. **International Biodeterioration e Biodegradation**, p. 1–8, 2009.

SÁ, R. A., SANTOS, N. D. L., SILVA, C. S. S. B., NAPOLEÃO, T. H., GOMES, F. S., CAVADA, B. S., COELHO, L. C. B. B, NAVARRO, D. M. A. F., BIEBER, L. W., PAIVA, P. M. G. Larvicidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* on *Aedes aegypti*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 139, p. 300–306, 2009.

SALES, M. P., GOMES, V. M., FERNANDES, K. V., XAVIER-FILHO, J. Chitin-binding proteins from cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds . **Brazilian Journal Medical Biological Research**, v. 29, p. 319-326, 1996.

SALUNKE, B. K., KOTKAR, H. M., MENDKI, P. S., UPASANI, S. M., MAHESHWARI, V. L. Efficacy of flavonoids in controlling *Callosobruchus chinensis* (L.) (Coleoptera: Bruchidae), a post-harvest pest of grain legumes. **Crop Protection**, v. 24, p. 888-893, 2005.

SANTOS, I. S., DA CUNHA, M., MACHADO, O. L.T., GOMES, V. M. A chitinase from *Adenanthera pavonina* L. seeds: purification, characterization and immunolocalisation. **Plant Science**, v. 167, p. 1203-1210, 2004.

SCHLUMBAUM, A., MAUCH, F., VÖGELI, U., BOLLER, T. Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. **Nature**, v. 324, p. 365-367, 1986.

SCOTT, P. M. Other mycotoxins in *Mycotoxins in Food, Detection and Control* (N. Magan and M. Olsen, eds). **Woodhead Publishing Limited**, Cambridge, England, p. 406-440, 2004.

SELITRENNIOKOFF, C. P. Antifungal proteins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 2883- 2894, 2001.

SERRANO, R. Structure and function of plasma membrane ATPase. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 40, p. 61-94, 1989.

SETO-YOUNG, D., MONK, B., MASON, A. B., PERLIN, D. S. Exploring an antifungal target in the plasma membrane Hq-ATPase of fungi. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1326, p. 249–256, 1997.

SHAO, F., HU, Z., XIONG, YU-MEI, HUANG, QIN-ZAO, WANG, CHUN-GUANG, ZHU, RONG-HUAN, WANG, DA-CHENG. A new antifungal peptide from the seeds of *Phytolacca americana*: characterization, amino acid sequence and cDNA cloning. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1.430, p. 262-268, 1999.

SHARON, N. Lectins: from obscurity into the limelight. **Protein Science**, v. 7, p. 2042-2048, 1998.

SHEWRY P. R., LUCAS J. A. Plant proteins that confer resistance to pests and pathogens. **Advances in Botanical Research**, v.26, p.135-92, 1997

SIEBRA, E. A. Toxina da soja [*Glycine max* (L.) Merrill]: aspectos bioquímicos e seu provável papel na defesa da planta. **Doutorado em Bioquímica**. Universidade Federal do Ceará, p. 148, 2004.

SINGH A., KIRUBAKARAN, S. I., SAKTHIVEL, N. Heterologous expression of new antifungal chitinase from wheat. **Protein Expression and Purification**, v. 56 p. 100-109, 2007.

SMAGGHE, G., SADEGHI, A., VAN DAMME, E. J. M., PEUMANS, W. J. Deterrent activity of plant lectins on cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (F.) oviposition. **Phytochemistry**, v. 67, p. 2078–2084, 2006.

SNOWDON, A. L. Post-Harvest Diseases and Disorders of Fruits and Vegetables, Vol.1: General Introduction and Fruits. Boca Raton, FL: **CRC Press**, 1990.

SOARES-COSTA, A., BELTRAMINI, L. M., THIEMANN, O. H., HENRIQUE-SILVA, F. A surgane cystatin: recombinant expression purification and antifungal activity. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 296, p. 1194-1199, 2002.

SOMTA, C., SOMTA, P., TOMOOKA, N., OOI, P. A. C., VAUGHAN, D. A., SRINIVES, P. Characterization of new sources of mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek resistance to bruchids, *Callosobruchus* spp. (Coleoptera: Bruchidae). **Journal of Stored Products Researchs**, v. 44, p. 316–321, 2008.

SOUZA, D. O. B. Avaliação bioquímica e nutricional da soja [*Glycine max* (L) Merr.] cv. Seridó e Seridó-RCH. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Ceará, 102 p., 2001.

STICHER, L., MAUCH-MANI, B., MÉTRAUX, J. P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 35, p. 235-270, 1997.

STINTZI, A., HEITZ, T., PRASAD, V., PRASAD, V., WIEDEMANNMERDINOGLU, S., KAUFFMANN, S., GEOFFROY, P., LEGRAND, M., FRITIG, B. Plant pathogenesis-related proteins and their role in defense against pathogens. **Biochemie**, v. 75, p. 687-706, 1993.

TAIRA, T., TOMA, N., ISHIHARA, M. Purification, characterization, and antifungal activity of pineapple (*Ananas comosus*) leaf chitinases. **Biosciences, Biotechnology and Biochemistry**, v. 69, p. 189-196, 2005.

TATSADJIEU, N. L. , JAZET DONGMO, P. M., NGASSOUM, M. B. B, ETO, F., MBOFUNG, C. M. F. Investigations on the essential oil of *Lippia rugosa* from Cameroon for its potential use as antifungal agent against *Aspergillus flavus* Link ex. Fries. **Food Control**, v.20, p. 161-166, 2009.

TEGEGNE, G., PRETORIUS, J. C., SWART, W. J. Antifungal properties of *Agapanthus africanus* L. extracts against plant pathogens. **Crop Protection**, v 27, p 1052-1060, 2008.

THEIS, T., STAHL, U. Antifungal proteins: targets, mechanisms and prospective applications. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.61, p. 437-455, 2004.

TOSSI, A., SANDRI, L., GIANGASPERO, A. Amphipathic, α -helical antimicrobial peptides. **Biopolymers**, v. 55, p. 4-30, 2000.

TOUCH V., HAYAKAWA S., SAITOH K. Relationships between conformational changes and antimicrobial activity of lysozyme upon reduction of its disulfide bonds. **Food Chemistry**, v. 84, p. 421-428, 2004.

URBANEK, H., KUZNIAK-GEBAROWSKA, E., HERKA, K. Elicitation of defense responses in bean leaves by *Botrytis cinera* polygalacturonase. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 13, p. 43-50, 1991.

VAN DEN BERGH, K. P. B., PROOST, P., VAN DAMME, J., COOSEMANS, J., VAN DAMME, E. J. M., PEUMANS, W. J. Five disulfide bridges stabilize a hevein-type antimicrobial peptide from the bark of spindle tree (*Euonymus europaeus* L.). **FEBS Letters**, v. 530, p. 181-185, 2002.

VAN LOON, L. C. Occurrence and properties of plant pathogenesis-related proteins. In: Datta, S.K., Muthukrishnan, S. (Eds.), Pathogenesis-Related Proteins in Plants. **CRC Press**. Boca Raton, p. 1-19, 1999a.

VAN LOON, L. C., VAN STRIEN, E. A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 55, p. 85-97, 1999b.

VAN PARIJS, J., BROEKAERT, W. F., GOLDSTEIN, I. J., PEUMANS, W. J. Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. **Planta**, v. 183, p. 258-264, 1991.

VAN PARIJS, J., JOOSEN, H. M., PEUMANS, W. J. GEUNS, J. M., VAN LAERE, A. J. Effect of lectin UDA (*Urtica dioica* agglutinin) on germination and cell wall formation of *Phycomyces blakesleeanus* Burgeff. **Archives of Microbiology**, v. 158, p. 19-25, 1992.

VARELA, E. S., LIMA, J. P. M. S., GALDINO, A. S., PINTO, L. S., BEZERRA, W. M., NUNES, E. P., ALVES, M. A. O., GRANGEIRO, T. B. Relationships in subtribe Diocleinae (Leguminosae; Papilionoideae) inferred from internal transcribed spacer sequences from nuclear ribosomal DNA. **Phytochemistry**, v. 65 (1), p. 59-69, 2004.

VASCONCELOS, I. M., CAVADA, B. S., MOREIRA, R. A., OLIVEIRA, J. T. A. Purification and partial characterization of a lectin from the seeds of *Dioclea guianensis*. **Journal of Food Biochemistry**, v. 15, p. 137-154, 1991.

VASCONCELOS, I. M., MAIA, A. A. B., MOREIRA, R. A., NETO, M. A. F., CAMPELO, G. J. A. Composition, toxic and antinutritional factors of newly developed cultivars of brazilian soybean (*Glycine max*). **Journal of the Science of Food and Agricultural**, v. 75, p. 419-426, 1997.

VASCONCELOS, I. M., MAIA, A. A. B., SIEBRA, E. A., OLIVEIRA, J. T. A., CARVALHO, A. F. F. U., MELO, V. M. M., CARLINI, C. R., CASTELAR, L. I. M. Nutritional study of two Brazilian soybean (*Glycine max*) cultivars differing in the contents of antinutritional and toxic proteins. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 12, p. 1-8, 2001.

VASCONCELOS, I. M., OLIVEIRA, J. T. A. Antinutritional properties of plant lectins. **Toxicon**, v. 44, p. 385-403, 2004.

VASCONCELOS, I. M., TRENTIM, A., GUIMARÃES, J. A., CARLINI, C. R. Purification and physicochemical characterization of soyatoxin, a novel toxic protein isolates from soybeans (*Glycine max*). **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 312, p. 357-366, 1994.

VASCONCELOS, I. M., MORAIS, J. K. S., SIEBRA, E. A., CARLINI, C. R., SOUSA, D. O. B., BELTRAMINI, L. M., MELO, V. M. M., OLIVEIRA, J. T. A. SBTX, a new toxic protein distinct from soyatoxin and other soybean [*Glycine max*] proteins, and its inhibitory effect on *Cescospora soja* growth. **Toxicon**, v. 51, p. 952-963, 2008.

VERONESE, P., RUIZ, M. T., COCA, M. A., HERNANDEZ-LOPEZ, A., LEE, H., IBE, J. I., DAMSZ, B., PARDO, J. M., HASEGAWA, P. M., BRESSAN, M., NARASIMHAN, M. In defense against pathogens. Both plant sentinels and foot soldiers need to know the enemy. **Plant Physiology**, v.131, p. 1.580-1.590, 2003.

VILA, L., LACADENA, V., DEL POZO, A. M., SAN SEGUNDO, B. A protein from the mold *Aspergillus giganteus* is a potent inhibitor of fungal plant pathogens. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 14, p. 1331–11327, 2001.

VINCENT, S. M. HO, JACK, H., WONG, T. B., NG. A thaumatin-like antifungal protein from the emperor banana. **Peptides**, v. 28, p. 760-766, 2007.

WANG, H. LI, J., BOSTOCK, R. M., GILCHRIST, D. G. Apoptosis: a functional paradigm for programmed plant cell death induced by a host-selective phytotoxin and invoked during development. **The Plant Cell**, v. 8, p. 375-391, 1996.

WANG, H. X., NG, T. B. An antifungal protein from the pea *Pisum sativum* var. Arvense. **Peptides**, v. 27 (7), p. 1732-1737, 2006a.

WANG, H. X., NG, T. B. Concurrent isolation of a Kunitz-type trypsin inhibitor with antifungal activity and a novel lectin from *Pseudostellaria heterophylla* roots. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 342, p. 349-353, 2006b.

WANG, H. X., NG, T. B. An antifungal peptide from red lentil seeds. **Peptides**, v. 28, p. 547-552, 2007.

WANG, H. X., NG, T. B. An antifungal peptide from the coconut. **Peptides**, v. 26, p. 2392-2369, 2005.

WANG, J. L., CUNNINGHAM, B. A., EDELMANS, G. Unusual fragments in the subunit structure of a concanavalin. **The Proceedings of the National Academy Sciences**, USA, v. 68, p. 1130-1134, 1971.

WANG, P., GRANADOS, R. R. Calcofluor disrupts the midgut defense system in insects. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 30, p. 135-143, 2000.

WEDEMEYER, W. J., WELKER, E., NARAYAN, M., SCHERAGA, H. A. Disulfide bonds and proteins folding. **Biochemistry**, v. 39, p. 4207-4216, 2000.

XAVIER-FILHO, J. CAMPOS, F., MARIA, A. P., ARY, B., SILVA, C. P., CARVALHO, M. M. M. Poor correlation between the levels of proteinase inhibitors found in seeds of different cultivars of cowpea (*Vigna unguiculata*) and the resistance/susceptibility to predation by *Callosobruchus maculatus*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 37 p. 1139-1143, 1989.

YAMAUCHI, D., MINAMIKAWA, T. Structure of the gene encoding concanavalin A from *Canavalia gladiata* and its expression in *Escherichia coli* cells. **FEBS Letters**, v. 260, p. 127-130, 1990.

YANG, Q., GONG, Z-Z. Purification and characterization of an ethylene-induced antifungal protein from leaves of guelder rose (*Hydrangea macrophylla*). **Protein Expression and Purification**, v. 24, p. 76-82, 2002.

YANG, X., LI, J., WANG, X., FANG, W., BIDOCHKA, M. J., SHE, R., XIAO, Y., PEI, Y. Psc-AFP, an antifungal protein with trypsin inhibitor activity from *Psoralea corylifolia* seeds. **Peptides**, v. 27, p. 1726-1731, 1996.

ZAREIE, R., MELANSON, D. L., MURPHY, P. J. Isolation of fungal cell wall degrading proteins from barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves infected with *Rhynchosporium secalis*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 15 (10), p. 1031-1039, 2002.