



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

ANTÔNIO JUSCELINO SUDÁRIO SOUSA

**CARACTERIZAÇÃO DO EXSUDATO DE SEMENTES DE *Moringa oleifera*
LAMARCK E INVESTIGAÇÃO DE SEU PAPEL NA DEFESA DO VEGETAL**

FORTALEZA-CEARÁ

2013

ANTÔNIO JUSCELINO SUDÁRIO SOUSA

**CARACTERIZAÇÃO DO EXSUDATO DE SEMENTES DE *Moringa oleifera*
LAMARCK E INVESTIGAÇÃO DE SEU PAPEL NA DEFESA DO VEGETAL**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Bioquímica. Área de Concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ilka Maria Vasconcelos

Co-orientadora: Dr^a Juliana Menezes Gifoni

FORTALEZA - CE

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- S696c Sousa, Antônio Juscelino Sudário.
 Caracterização de exsudato de sementes de *Moringa oleifera* Lamarck e investigação do seu papel da defesa vegetal / Antônio Juscelino Sudário Sousa. – 2013.
 103 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2013.
 Área de Concentração: Bioquímica vegetal.
 Orientação: Profa. Dra. Ilka Maria Vasconcelos.
 Coorientação: Dra. Juliana Menezes Gifoni.
1. *Moringa oleifera*. 2. Fisiologia vegetal. 3. Proteína ligante – quitina. 4. Atividade nematoide.
I. Título.

ANTÔNIO JUSCELINO SUDÁRIO SOUSA

**CARACTERIZAÇÃO DO EXUDATO DE SEMENTES DE *Moringa oleifera*
LAMARCK E INVESTIGAÇÃO DE SEU PAPEL NA DEFESA DO VEGETAL**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Aprovada em 16/05/2013

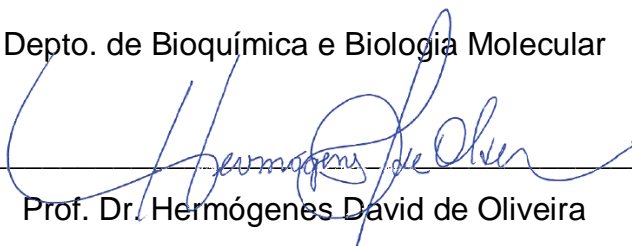
BANCA EXAMINADORA



Prof.^a. Dr.^a. Ilka Maria Vasconcelos (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará

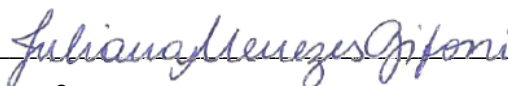
Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular



Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira

Universidade Federal do Ceará

Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular



Dr.^a. Juliana Menezes Gifoni

Universidade Federal do Ceará

PNPD/CAPES

*A Deus,
À minha esposa, Natalya,
Aos meus pais, Edilson e Francisca,
Às minhas irmãs, Luana e Regina,
Dedico com amor.*

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

Os trabalhos experimentais que compõem esta dissertação foram realizados com o apoio dos seguintes Programas/Instituições:

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ, através do **Laboratório de Toxinas Vegetais**, sob a coordenação da Dr^a. Ilka Maria Vasconcelos.

PROGRAMA DE APOIO A PLANOS DE REESTRUTURAÇÃO E EXPANSÃO DAS UNIVERSIDADES FEDERAIS (REUNI) / COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR (CAPES) - através da concessão de bolsa de mestrado e de fomentos à pesquisa.

CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO (CNPq) e FUNDAÇÃO CEARENSE DE APOIO AO DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO (FUNCAP) - pela contribuição para a melhoria nas condições experimentais e formação de recursos humanos dentro do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da UFC.

AGRADECIMENTOS

À Profa Dra. Ilka Maria Vasconcelos, por ter depositado sua confiança em mim, pela orientação deste trabalho, pelo comprometimento como orientadora e ser humano, pelos ensinamentos, pelas palavras de apoio e, principalmente, pela paciência.

À Dra. Juliana Menezes Gifoni, por sua contribuição para a realização deste trabalho, por meio de explicações e sugestões, pela dedicação ao ensinar a forma correta de manusear os equipamentos, de proceder durante o desenvolvimento deste trabalho, pelo seu apoio como pesquisadora e como amiga.

Ao Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira, por aceitar o convite para participar desta banca e pelas inúmeras contribuições ao longo deste trabalho.

Ao professor José Tadeu Abreu de Oliveira, por sua contribuição para a realização deste trabalho, por disponibilizar seu laboratório para a realização de alguns experimentos.

Ao professor Thalles Barbosa Grangeiro, por sua contribuição para a realização deste trabalho, por disponibilizar seu laboratório para a realização de alguns experimentos.

Ao professor Francisco Geraldo Barbosa, pelo apoio experimental no fornecimento do fitonematoide *Meloidogyne incognita*.

A todos os professores deste departamento que, de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho: seja na disponibilização de seus laboratórios, no empréstimo de reagentes e equipamentos ou nos conhecimentos transmitidos durante as aulas.

A grande amiga do Laboratório de Fitoquímica Aplicada LABFITO: Roberta Rocha pela colaboração prestada.

A todos os amigos do laboratório de Toxinas Vegetais: Adelina, Ana Paula, Daniele, Ednésio, Hellen, Henrique, Lucas, Mariana, Marina, Mirela, Paulo, Raquel Rocha, Vanessa, por compartilhar as bancadas, pelo companheirismo, pela ajuda nos experimentos e pelo apoio.

À Coordenação do programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, na pessoa do Prof. Dr. Márcio Viana Ramos.

A todos os funcionários do Departamento.

Aos demais colegas do Departamento, em especial, aos que se dispuseram a me ajudar, disponibilizando material e conhecimento: Ana Lúdia, Antônio Rocha, Darcy, Edivar, Fredy, Helton, Hudson, Martônio, Pedro, Ricardo, Rodolfo, Tatiana, Terezinha, Washington.

Aos meus pais Antônio Edilson de Sousa e Francisca Sudário Brilhante Sousa pela forma com que me educaram, apoiaram, e me incentivaram, contribuindo para a formação do meu caráter e me fazendo ser quem sou.

À minha querida esposa Natalya Fachine Silva Sousa por ter estado sempre ao meu lado e por me incentivar a não desistir de meus objetivos e lutar pelos meus sonhos.

Aos meus sogros José Ueides Silva e Maria do Socorro Fachine Silva pelas ótimas conversas, incentivo e apoio.

Às minhas irmãs Francisca Luana Sudário Sousa e Cicera Regina Sudário Sousa.

E finalmente a Deus pelo dom da vida e por ter possibilitado a conquista de todos os meus objetivos.

“A persistência é o melhor caminho do êxito”.

Charles Chaplin

RESUMO

Moringa oleifera (moringa) é uma espécie pertencente à família Moringaceae que se caracteriza por ser muito resistente a insetos e fungos. Trabalhos prévios realizados por nosso grupo de pesquisa revelaram a presença de proteínas ligantes à quitina em sementes de moringa, dentre elas a *Mo-CBP₃*, sugerindo uma correlação positiva entre essa proteína e a resistência da planta. No início do desenvolvimento da planta, para que ocorra a germinação, deve haver a embebição da semente, um processo seguido pela exsudação. Na exsudação, compostos do metabolismo primário e secundário são externalizados da semente, alguns deles exercendo ação de defesa da nova planta ao impedirem o ataque de herbívoros e/ou patógenos. O presente trabalho teve como objetivos caracterizar o exsudato de sementes de moringa quanto à composição bioquímica e atividade biológica e investigar a presença de *Mo-CBP₃* no exsudato, visando contribuir para o estabelecimento de seu papel fisiológico. Inicialmente, foram estabelecidas as condições de exsudação, dando ênfase ao tempo e solvente. Uma maior exsudação de proteínas foi observada em sementes embebidas com água destilada por 24 horas. Esse exsudato mostrou a presença de atividades inerentes a metabólitos primários (protease, β -1,3-glucanase, quitinase, inibidor de tripsina e inibidor de papaína) e secundários (saponinas e esteroides). *Mo-CBP₃* foi também detectada no exsudato, usando anticorpos policlonais anti-*Mo-CBP₃*. A presença de *Mo-CBP₃* no exsudato de sementes de moringa foi confirmada após este ter sido submetido à cromatografia em matriz de quitina, procedida pela análise através de *dot blotting* e eletroforese em gel de poliacrilamida. Os dados obtidos mostraram que o material retido na matriz de quitina corresponde a 0,26% do total de proteínas exsudadas, é reconhecido pelo anticorpo anti-*Mo-CBP₃* e apresenta perfil eletroforético similar ao da *Mo-CBP₃* purificada de sementes de moringa. Na avaliação da atividade deste exsudato frente à fitopatógenos, ação contra fungos não foi detectada, nas condições de ensaio empregadas, exceto para *Candida parapsilosis* que mostrou uma discreta redução na taxa de crescimento. Contrariamente, uma potente atividade contra nematoide foi verificada, tendo sido o exsudato de sementes capaz de causar até 100% de mortalidade para indivíduos de *Meloidogyne incognita* em estágio de J2. Quando investigada a presença de *Mo-CBP₃* em raiz, um órgão vegetal que apresenta o fenômeno de exsudação e, também, é capaz de interagir

diretamente com o nematoide, resultados positivos foram encontrados. De fato, *Mo-CBP₃* está presente em raízes de moringa, já nos estágios iniciais do desenvolvimento, conforme resultados mostrados por ELISA e através da técnica de RT-PCR. Os dados, em conjunto, sugerem que no fenômeno da exsudação, proteínas devem desempenhar funções essenciais e que, no caso da moringa, *Mo-CBP₃* já participa nos estágios iniciais do desenvolvimento dessa planta arbórea, papel este que pode estar relacionado com a proteção contra patógenos.

Palavras-chave: Moringa, exsudação, proteína ligante à quitina, atividade nematicida.

ABSTRACT

Moringa oleifera (moringa) is a species belonging to the family Moringaceae which is characterized as having high resistance to insects and fungi. Previous work carried out by our research group revealed the presence of chitin-binding proteins in moringa seeds, among them *Mo*-CBP₃, suggesting a positive correlation between this protein and the plant resistance. At the onset of the new plant development, for germination to occur, seed imbibition is required, a process followed by exudation. In exudation process, primary and secondary metabolites are released in the medium outside the seeds, some of them protecting the new plant against herbivores and/or pathogens. This study aimed to characterize the chemical composition and biological activities of moringa seed exudate and to investigate the presence of *Mo*-CBP₃ in the exudate, in order to contribute to the establishment of its physiological role. Initially, the best conditions for exudation were established, emphasizing the time and solvent. A higher exudation of seed proteins was observed in distilled water after 24 hours. This exudate showed the presence of activities related to primary (protease, β -1,3-glucanase, chitinase, trypsin inhibitor and papain inhibitor) and secondary (steroid and saponins) metabolites. *Mo*-CBP₃ was also detected in the exudate, using polyclonal antibodies anti-*Mo*-CBP₃. The presence of *Mo*-CBP₃ in the moringa seed exudate was confirmed after chromatography on chitin matrix and analyses by dot blotting and polyacrylamide gel electrophoresis. The data obtained showed that the retained material on the chitin matrix corresponds to 0.26% of the total protein, it is recognized by anti-*Mo*-CBP₃ and has electrophoretic profile similar to that of *Mo*-CBP₃ which was purified from moringa seeds. In the activity tests to pathogens, the seed exudate showed no antifungal activity, under the conditions used, except for *Candida parapsilosis* which had a slight reduction in its growth rate. In contrast, a potent activity against nematode was found as the seed exudate was able to cause a mortality rate up to 100% of *Meloidogyne incognita* in J2 stage. When investigated the presence of *Mo*-CBP₃ in moringa hoots, a plant organ that shows the exudation phenomenon and is also able to interact directly with the nematode, positive results were found. In fact, *Mo*-CBP₃ is present in moringa hoots, in the initial stages of the plant development, according to the results shown by ELISA and RT-PCR. The data, taken together, suggest that in the exudation phenomenon, proteins must play essential roles. In the case of moringa, *Mo*-CBP₃ already participates in the initial stages of

development of this tree species, playing a role that must be related to protection against pathogens.

Keywords: Moringa, exudation, chitin-binding protein, nematicidal activity.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 - Partes da planta de <i>M. oleifera</i> (moringa).....	26
Figura 2 - Esquema geral de produção de anticorpos policlonais anti- <i>Mo-CBP</i> ₃	48
Figura 3 - Germinação de sementes e cultivo de plântulas de moringa.....	54
Figura 4 - Teores de proteínas exsudadas por semente de moringa após diferentes tempos de contato com água destilada.....	62
Figura 5 - Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condição desnaturante (PAGE-SDS; 12,5%) de exsudatos de sementes de moringa obtidos em diferentes tempos de contato com água destilada.....	63
Figura 6 - Teores de proteínas exsudadas por semente de moringa quando postas em contato com diferentes solventes por 24 horas.....	64
Figura 7 - Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condição desnaturante (PAGE-SDS; 12,5%) das proteínas exsudadas de sementes de moringa quando postas em contato com diferentes solventes por 24 horas.....	65
Figura 8 - <i>Dot blotting</i> para determinação do título do anticorpo primário anti- <i>Mo-CBP</i> ₃	70
Figura 9 - Cromatografia do exsudato de sementes de moringa, obtido após contato com água por 24 horas, em matriz de quitina.....	73
Figura 10 - Imunodeteção de <i>Mo-CBP</i> ₃ na fração retida em matriz de quitina usando o anticorpo primário anti- <i>Mo-CBP</i> ₃	74
Figura 11 - Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (PAGE-SDS; 12,5%), na ausência e presença de β-mercaptoetanol, das frações resultantes do exsudato de sementes de moringa após cromatografia em matriz de quitina.....	75
Figura 12 - Fotomicrografia em microscópio óptico da germinação de conídios de diferentes fungos fitopatogênicos incubados com exsudato de sementes de moringa, obtido após contato com água destilada	

	por vinte quatro horas.....	76
Figura 13 -	Efeito do exsudato de sementes de moringa, obtido após contato com água destilada, por 24 horas, sobre o crescimento de leveduras.....	78
Figura 14 -	Eletroforese em gel de agarose (1,2%) dos produtos de PCR usando iniciadores específicos para o gene da <i>Mo</i> -CBP3.....	84

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1 - Reagentes e seus volumes utilizados na PCR.....	59
Tabela 2 - Detecção de metabólitos secundários em exsudato de sementes de moringa após contato com água por 24 horas.....	67
Tabela 3 - Detecção e quantificação de proteínas bioativas presentes no exsudato de sementes de moringa após contato com água por 24 horas.....	68
Tabela 4 - Teores de <i>Mo-CBP₃</i> exsudados por sementes de moringa ao longo de 24 horas.....	72
Tabela 5 - Porcentagem de J2 de <i>Meloidogyne incognita</i> mortos e inativos após 24 horas de exposição ao exsudato de sementes de moringa e a <i>Mo-CBP₃</i> pura.....	79
Tabela 6 - Concentração proteica e detecção de <i>Mo-CBP₃</i> em raízes de plântulas de moringa.....	80
Tabela 7 - Rendimento de RNA total obtido de raízes de plântulas de moringa.....	82
Tabela 8 - Rendimento de RNA mensageiro purificado de raízes de plântulas de moringa.....	83

SUMÁRIO

	Pág.
1	INTRODUÇÃO..... 21
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA..... 25
2.1	<i>Moringa oleifera</i> Lam..... 25
2.2	Fisiologia das Sementes: Germinação e Exsudação..... 27
2.2.1	<i>Germinação e exsudação</i> 27
2.3	Moléculas de defesa de plantas..... 29
2.4	Fitopatógenos..... 30
2.4.1	<i>Fungos</i> 30
2.4.2	<i>Nematoides</i> 31
3	OBJETIVOS..... 34
3.1	Objetivo Geral..... 34
3.2	Objetivos Específicos..... 34
4	MATERIAIS..... 36
4.1	Sementes..... 36
4.2	Coelho..... 36
4.3	Eritrócitos..... 36
4.4	Modelos Experimentais..... 36
4.4.1	<i>Fungos</i> 36
4.4.2	<i>Nematoides</i> 36
4.5	Reagentes Químicos..... 37
5	MÉTODOS..... 39
5.1	Exsudação de sementes de moringa..... 39
5.1.1	<i>Seleção de sementes</i> 39
5.1.2	<i>Determinação das condições de exsudação</i> 39
5.2	Dosagem de proteínas..... 39
5.3	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)..... 40
5.4	Determinação qualitativa de metabólitos secundários..... 41
5.5	Detecção de proteínas bioativas relacionadas à defesa..... 41
5.5.1	<i>Atividade hemaglutinante</i> 41
5.5.2	<i>Atividade inibitória de tripsina</i> 41

5.5.3	Atividade inibitória de papaína.....	42
5.5.4	Atividade proteolítica.....	43
5.5.5	Atividade quitinásica.....	43
5.5.6	Atividade β-1,3-glucanásica.....	44
5.5.7	Atividade catalase.....	45
5.5.8	Atividade peroxidásica de ascorbato.....	45
5.5.9	Atividade peroxidásica de fenóis.....	45
5.6	Imunodeteccção da proteína Mo-CBP₃.....	46
5.6.1	Produção de anticorpos policlonais.....	46
5.6.2	Determinação do título dos anticorpos produzidos.....	47
5.6.3	Purificação de Mo-CBP₃ a partir do exsudato de sementes.....	47
5.6.3.1	Cromatografia em matriz de quitina.....	49
5.6.4	Imunodeteccção de Mo-CBP₃ no exsudato e fração ligante à quitina..	49
5.7	Atividades biológicas do exsudato.....	49
5.7.1	Atividade Antifúngica.....	49
5.7.1.1	Cultivo dos fungos.....	49
5.7.1.2	Obtenção dos esporos.....	50
5.7.1.3	Inibição da germinação dos esporos de fungos fitopatogênicos.....	50
5.7.1.4	Avaliação da inibição do crescimento usando como modelo fungos leveduriformes.....	51
5.7.2	Atividade nematicida e nematostática.....	51
5.7.2.1	Obtenção de massas de ovos e de J2 de <i>Meloidogyne incognita</i>	51
5.7.2.2	Ensaio de atividade nematicida e nematostática.....	52
5.8	Detecção de Mo-CBP₃ em raízes de plântulas de <i>moringa</i>.....	52
5.8.1	Plantio de sementes e cultivo de plântulas.....	52
5.8.2	Extração de proteínas das raízes de plântulas.....	53
5.8.3	Imunodeteccção de Mo-CBP₃ em raízes de plântulas.....	53
5.8.4	Detecção de transcritos de RNA para Mo-CBP₃ em raízes de plântulas.....	55
5.8.4.1	Extração de RNA.....	55
5.8.4.2	Análise da integridade do RNA total.....	56
5.8.4.3	Tratamento do RNA com DNase.....	56
5.8.4.4	Purificação do RNA.....	56

5.8.4.5	<i>Transcrição reversa (RT - Reverse transcription) e PCR (Reação em Cadeia da Polimerase).....</i>	57
6	RESULTADOS.....	61
6.1	Exsudação de sementes de moringa.....	61
6.1.1	<i>Determinação das condições de exsudação.....</i>	61
6.2	Determinação qualitativa de metabólitos secundários no exsudato de sementes de moringa.....	61
6.3	Detecção de proteínas bioativas relacionadas à defesa vegetal no exsudato de sementes de moringa.....	66
6.3.1	<i>Atividade hemaglutinante.....</i>	66
6.3.2	<i>Atividade inibitória de tripsina.....</i>	66
6.3.3	<i>Atividade inibitória de papaína.....</i>	66
6.3.4	<i>Atividade proteolítica.....</i>	66
6.3.5	<i>Atividade quitinásica.....</i>	69
6.3.6	<i>Atividade β-1,3-glucanásica.....</i>	69
6.3.7	<i>Atividade peroxidásica.....</i>	69
6.4	Imunodetecção da proteína Mo-CBP₃ no exsudato de sementes de moringa.....	69
6.4.1	<i>Produção de anticorpos policlonais anti-Mo-CBP₃.....</i>	69
6.4.2	<i>Presença de Mo-CBP₃ nos exsudatos de sementes de moringa obtidos em diferentes tempos.....</i>	69
6.5	Purificação de Mo-CBP₃ a partir do exsudato de sementes.....	71
6.5.1	<i>Cromatografia em matriz de quitina.....</i>	71
6.5.2	<i>Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS.....</i>	71
6.6	Avaliação de atividades biológicas do exsudato frente à fitopatógenos.....	71
6.6.1	<i>Atividade antifúngica.....</i>	71
6.6.2	<i>Atividades nematocida e nematostática.....</i>	77
6.7	Detecção de Mo-CBP₃ em raízes de plântulas de moringa.....	77
6.7.1	<i>Extração de proteínas das raízes de plântulas.....</i>	77
6.7.2	<i>Imunodetecção de Mo-CBP₃ nas raízes das plântulas.....</i>	77
6.7.3	<i>Detecção de transcritos de RNA para Mo-CBP₃ em raízes de plântulas.....</i>	81

7	DISCUSSÃO.....	86
8	CONCLUSÃO.....	93
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

As plantas são constantemente ameaçadas por patógenos, responsáveis por causar uma quantidade significativa de doenças, dentre os quais se destacam vírus, bactérias, fungos e nematoides (SPIRIG *et al.*, 2010). Os nematoides de galhas, em especial o *Meloidogyne incognita*, têm causado grandes perdas de rendimento em várias culturas de interesse econômico. Alguns trabalhos relatam perdas consideráveis em culturas de feijão, milho, batata e tomate, acometidas por tal espécie de nematoide, tanto em campo quanto em casa de vegetação (DI VITO; VOVLAS; INSERRA, 1980; DI VITO; CIANCIOTTA; ZACCHEO, 1991; DI VITO; PARISI; CATALANO, 2004; RUSSO *et al.*, 2007).

Com o intuito de reduzir as perdas causadas por nematoides, agricultores utilizam, tradicionalmente, nematicidas, um mercado que movimenta cerca de 800 milhões de dólares, apenas para o controle em legumes e hortaliças (SIKORA *et al.*, 2008). Como consequência do uso crescente e indiscriminado de agrotóxicos, diversos problemas de ordem ambiental têm ocorrido, como a contaminação da água, do solo, dos alimentos e dos animais. Como resultado, há ainda a intoxicação direta e indireta de agricultores, o surgimento de populações de pragas cada vez mais resistentes a esses compostos químicos, além de desequilíbrios ecológicos (HERNÁNDEZ; MARGALIDA, 2008; MORANDI; BETTIOL, 2009). As preocupações com segurança humana e ambiental, juntamente com o aumento do custo de produtos químicos, incentivaram o desenvolvimento de estratégias alternativas de controle de nematoides como rotação de culturas, tratamento de pousio (descanso das terras cultiváveis, por um período), controle biológico e uso de cultivares resistentes (STOCKDALE *et al.* 2001; HARRIER; WATSON, 2004; DONG; ZHANG, 2006). Neste cenário, ganha também destaque especial à busca de moléculas vegetais que possuam propriedades deletérias a pragas e cuja utilização seja de baixo custo e que cause pouco ou nenhum impacto ambiental.

Dentre os diversos compostos químicos produzidos pelas plantas, capazes de conferir resistência a pragas, e que estão presentes em suas sementes, destacam-se os metabólitos secundários e as proteínas. Estas últimas, além de desempenhar diferentes funções nas células como, por exemplo, constituição estrutural, enzimática e de reserva, também atuam na defesa vegetal. As proteínas que participam da defesa vegetal utilizam mecanismos de ação baseados em suas

propriedades como atividade hidrolítica e inibição enzimática, por exemplo. Tais propriedades permitem a ação direta dessas proteínas sobre a parede celular e membrana plasmática, ou inibição de enzimas digestivas, respectivamente (STANGARLIN *et al.*, 2011).

Dentre as muitas proteínas envolvidas na proteção de plantas, encontram-se as proteínas ligantes à quitina, as quais merecem um destaque especial, já que a quitina é um dos principais constituintes da parede celular de muitas espécies de fungos, estando também presente no exoesqueleto e membrana peritrófica de insetos e na cutícula de nematoides (ZELTINS; SCHREMPF, 1995; ASENSIO *et al.*, 2000). Algumas dessas proteínas ligantes à quitina têm a capacidade de afetar negativamente o crescimento destes organismos justamente por se ligarem à quitina de sua constituição, mesmo que não haja degradação desta, levando à perda das propriedades estruturais e funcionais da molécula (WANG; GRANADOS, 2000; ZAREIE; MELANSON; MURPHY, 2002).

Moringa oleifera Lamarck é uma espécie vegetal que se destaca por sua alta resistência contra estresses bióticos. *M. oleifera* é uma espécie pertencente à família Moringaceae, originária do noroeste da Índia. Esta espécie parece ser um importante repositório de moléculas de defesa contra predadores, uma vez que é bastante resistente a doenças, sendo afetada por poucas espécies de insetos (RAMACHANDRAN; PETER; GOPALAKRISHNAN, 1980) e capaz de inibir o crescimento de várias espécies de bactérias e fungos (NWOSU; OKAFOR, 1995). Estudos de nosso grupo de pesquisa verificaram a presença de proteínas ligantes à quitina em extratos aquosos de sementes de *M. oleifera* (GOMES, 2002), que poderiam estar relacionadas à sua elevada resistência observada. Mais tarde, Gifoni e colaboradores (2012) purificaram e caracterizaram uma destas proteínas, à qual chamaram de *Mo-CBP*₃, cujas principais características são termoestabilidade e atividade antifúngica. Essas propriedades sugerem que esta proteína pode ser uma potencial ferramenta biotecnológica para o controle de fitopatógenos.

Sabe-se que as plantas acumulam muitos tipos de proteínas de defesa em seus tecidos mais vulneráveis, uma vez que as sementes são o veículo de propagação e sobrevivência da espécie. A síntese de alguns destes compostos pode ser induzida, enquanto outros são expressos constitutivamente e conferem resistência contra predadores fitófagos e nematoides, bem como infecção por vírus, bactérias e fungos (CARLINI; GROSSI-DE-SÁ, 2002; VAN DEN BERGH *et al.*,

2002). Logo, durante a embebição da semente e ao longo das fases da germinação, muitos destes compostos são exsudados e interferem com o desenvolvimento de microrganismos ao redor da plântula (NÓBREGA *et al.*, 2005; OKUBARA; PAULITZ, 2005; ROSE *et al.*, 2006). Alguns destes compostos já foram identificados e têm capacidade de inibir o crescimento de patógenos (BARBOUR; HATTERMANN; STACEY, 1991; ROSE *et al.*, 2006).

Considerando que o período entre a embebição das sementes e o estabelecimento de uma nova planta é um momento crítico para o desenvolvimento vegetal, foi formulada a seguinte hipótese:

“O exsudato de sementes de *Moringa oleifera* contém moléculas envolvidas na defesa vegetal que lhe conferem atividade contra herbívoros e /ou fitopatógenos. Dentre estas moléculas, deve constar a proteína ligante à quitina, denominada *Mo-CBP₃*”.

Para testar tal hipótese, foi realizado um estudo bioquímico de caracterização do exsudato de *M. oleifera*, quanto a moléculas envolvidas na defesa vegetal e atividades biológicas apresentadas por ele.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 *Moringa oleifera* Lam.

A *Moringa oleifera* é uma espécie tropical pertencente à família monogenérica Moringaceae, que possui 14 espécies arbóreas ou arbustivas. Esta planta é originária do noroeste da Índia (RAMACHANDRAN; PETER; GOPALAKRISHNAN, 1980) e hoje é distribuída em todas as regiões tropicais e subtropicais da África, Ásia e Américas (KARADI *et al.*, 2006). Ela apresenta um crescimento rápido e capacidade de sobreviver em solos pobres, requerendo o mínimo de atenção e sendo capaz de resistir a longos períodos de seca (JAHN, 1991; NDABIGENGESERE, 1995; FAHEY, 2005).

M. oleifera é uma árvore de pequeno porte (7-12 m), possui casca grossa e cinza, flores brancas perfumadas, folhas grandes e compostas, frutos compridos com sementes trialadas no seu interior (MAKKAR; BECKER, 1996), como pode ser visto na Figura 1.

Durante séculos a moringa tem sido utilizada na alimentação humana, principalmente em países da África e da Ásia, onde todas as suas partes são consumidas (MAKKAR; BECKER, 1996; GUEVARA *et al.*, 1999; FAHEY, 2005). Sua utilização é notável, também, na medicina popular e na indústria. Nesta última é utilizado principalmente o óleo de suas sementes, similar em qualidade ao azeite de oliva, perfazendo um percentual que varia em torno de 40% da massa total da semente (OLIVEIRA *et al.*, 1999; ANWAR; BHANGER, 2003). Suas sementes contêm proteínas coagulantes que são úteis para a remoção da turbidez da água (GASSENSCHMIDT *et al.*, 1995). Segundo Sengupta e colaboradores (2012), o extrato das sementes de moringa foi capaz de remover da água de irrigação, por coagulação, 97% de ovos de helmintos parasitas de mamíferos. Também contra nematoides parasitas de vegetais já foi verificada ação da planta, quando Hoan e Davide (1979) observaram a ação nematicida das raízes de moringa contra *Meloidogyne incognita*.

Várias propriedades terapêuticas têm sido atribuídas a diversas partes da árvore da moringa. Dentre elas, podem ser destacadas: estimulação cardíaca e circulatória; anti-hipertireoidismo e atividades hipocolesterolêmica, hipotensiva, antinociceptiva, anti-inflamatória, antimicrobiana, antiviral, antioxidante e antitumoral

Figura 1 – Partes da planta de *M. oleifera* (moringa)



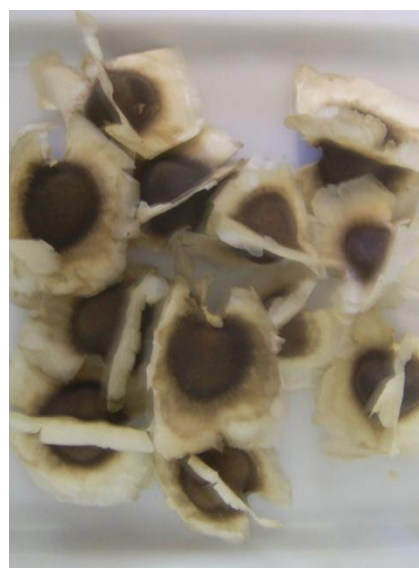
A)



B)



C)



D)

Fonte: Próprio autor.

A) Árvore de moringa; B) Frutos; C) Inflorescência; D) Sementes.

(CÁCERES *et al.*, 1991; GHASI; NWOBODO; OFILI, 2000; TAHILIANI; KAR, 2000; LIPIPUN *et al.*, 2003; COSTA-LOTUFO *et al.*, 2005; ANWAR *et al.*, 2007; CHUMARK *et al.*, 2008; PEREIRA *et al.*, 2011). Seus frutos possuem atividade antilipidêmica (MEHTA *et al.*, 2003). A casca do tronco e o extrato aquoso de suas folhas apresentam atividade hipoglicemiante (KAR; CHOUDHARY; BANDYOPADHYAY, 2003; DE PAULA, 2012).

Dentre todas as características da moringa, uma das principais é a elevada resistência a doenças, sendo esta planta afetada por apenas poucas espécies de insetos (RAMACHANDRAN; PETER; GOPALAKRISHNAN, 1980). Uma vez que as sementes de moringa são ricas em proteínas ligantes à quitina (GOMES, 2002) e que a quitina é um constituinte de insetos, fungos e nematoides, é bastante provável que essa resistência esteja relacionada a componentes proteicos dessa natureza. De fato, Gifoni e colaboradores (2012) purificaram e caracterizaram, a partir das sementes de moringa, uma glicoproteína ligante à quitina, termoestável, com potente atividade contra fungos fitopatogênicos.

2.2 Fisiologia das Sementes: Germinação e Exsudação

2.2.1 Germinação e exsudação

As plantas são fontes de diversos produtos naturais, alguns dos quais apresentam atividades biológicas. Elas exsudam uma variedade de substâncias através de suas superfícies externas e de suas sementes em germinação. As substâncias liberadas ao longo deste processo podem exercer efeito quimioatrativo para microrganismos presentes no solo ou ainda impedir que a semente seja colonizada por fitopatógenos (BARBOUR; HATTERMANN; STACEY, 1991; EMMERT *et al.*, 1998; NÓBREGA *et al.*, 2005; OKUBARA; PAULITZ, 2005).

Exsudatos de plantas consistem de misturas complexas de moléculas grandes e pequenas (IQBAL; FRY, 2012). Essas moléculas podem ser exsudadas pelas plantas através de suas raízes, partes aéreas e sementes em germinação (ROSE *et al.*, 2006). Falando-se especificamente de sementes em germinação, muitos estudos mostram que estas liberam compostos que podem interferir com o desenvolvimento de microrganismos do meio circundante (NÓBREGA *et al.*, 2005; OKUBARA; PAULITZ, 2005; ROSE *et al.*, 2006). Uma variedade destes compostos

exsudados de sementes já foi identificada e alguns deles trazem benefícios diretos para a germinação, enquanto outros têm a habilidade de inibir o crescimento de patógenos, prevenindo a infecção das sementes (BARBOUR; HATTERMANN; STACEY, 1991; ROSE *et al.*, 2006). Além desses compostos, existem ainda aqueles que estimulam o crescimento de microrganismos, tanto benéficos quanto prejudiciais (NELSON, 2004). Os compostos presentes nos exsudatos de sementes são normalmente encontrados nas plantas como constituintes e intermediários metabólicos celulares normais. Dentre os mais comumente descritos encontram-se açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos, flavonoides, esteróis e proteínas (NELSON, 1990). Os tipos e quantidades de substâncias exsudadas de sementes em germinação podem ser influenciados pelo pH do solo, temperatura, mistura do solo, presença de microrganismos, etc. (NELSON, 1990).

As sementes são uma estrutura de plantas que evoluiu de modo a proteger o embrião totalmente desenvolvido, mas vulnerável. Elas podem ser extremamente tolerantes a condições ambientais adversas, desde que estejam em estado de dessecação. Neste estado seco, sua atividade metabólica é drasticamente reduzida a um nível muito baixo (o que caracteriza a quiescência), sendo assim capaz de manter a sua capacidade de germinar por períodos consideráveis (HOPPE; BRUN, 2004). Essas estruturas são ricas em compostos de reserva como carboidratos, lipídios e proteínas, que são mobilizados para o desenvolvimento do embrião. Isto as torna muito atrativas a microrganismos e predadores, de modo que estratégias de defesa que garantam o estabelecimento da nova plântula, como a exsudação de compostos de defesa, são fundamentais para o vegetal (HOPPE; BRUN, 2004; SIMÕES, 2008).

A exsudação de sementes é um processo que está intimamente ligado à germinação. Esta é descrita como uma série de eventos que começa com a embebição e termina com a emergência da radícula pelo tegumento (SCARAFONI *et al.*, 2013). A embebição pode ser definida como o período em que a semente seca quiescente começa a absorver água. Partindo-se para uma descrição mais detalhada, a germinação é um processo que corresponde a três fases distintas (BEWLEY, 1997), a primeira delas sendo justamente a entrada de água, de maneira rápida, na semente, ou seja, a embebição. É um processo estritamente físico, dirigido grandemente pela composição de proteínas, lipídeos e carboidratos da semente, a permeabilidade do tegumento e a diferença de potencial hídrico dentro e

fora da semente (NELSON, 2004). Esse processo resulta num inchaço da semente. Ainda, de acordo com Nelson (2004), o aumento da pressão interna da semente leva não somente à ruptura do tegumento, mas também à liberação de substâncias internas, e esta rápida perda de componentes celulares e vacuolares é referida como exsudação. A segunda fase é a reiniciação dos processos metabólicos. Aqui cessam a entrada de água e a exsudação, havendo um platô na absorção de água (BEWLEY, 1997). Essa fase inclui a reaquisição, pelas membranas celulares, de suas propriedades de permeabilidade seletiva, além de reparo do DNA e de outras macromoléculas danificadas durante a dessecação (SRIVASTAVA, 2002). Nesta fase, a maioria dos eventos metabólicos ocorre para preparar a semente para expansão e emergência da radícula (BEWLEY, 1997). Dessa forma, novas mitocôndrias, RNAm e proteínas são sintetizados para suportar o metabolismo dentro da radícula que começará sua expansão. A terceira e última fase é a emergência da radícula através do tegumento, que envolve o crescimento celular e a ruptura dos tecidos ao redor do embrião, mas tipicamente não envolve divisão celular (SRIVASTAVA, 2002).

2.3 Moléculas de defesa de plantas

Muitos tipos de moléculas de defesa de plantas acumulam-se nas sementes, já que elas são o veículo de propagação e sobrevivência da espécie (CARLINI; GROSSI-DE-SÁ, 2002). São várias as moléculas de plantas que estão envolvidas com a defesa vegetal. Dentre elas, destacam-se os metabólitos secundários e as proteínas. Os metabólitos secundários são aqueles que não apresentam função direta nas atividades bioquímicas primárias, como crescimento, desenvolvimento e reprodução (FERNANDES, 2011). Muitos desses metabólitos são responsáveis pelos efeitos medicinais ou tóxicos mostrados por diversas plantas.

Além dos metabólitos secundários, existem muitas proteínas já bem caracterizadas envolvidas na defesa vegetal. Dentre elas, podem ser destacadas as lectinas, proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs), os inibidores de enzimas proteolíticas, quitinases, glucanases, toxinas e peptídeos antimicrobianos (CHRISPEELS; RAIKHEL, 1991; PEUMANS; VAN DAMME, 1995; KOIWA;

BRESSAN, HASEGAWA, 1997; CARLINI; GROSSI-DE-SÁ, 2002; VAN DEN BERGH *et al.*, 2002).

Muitas das proteínas de defesa de plantas são capazes de se ligar à quitina, um biopolímero constituinte de insetos, fungos, nematoides e de algumas bactérias (ASENSIO *et al.*, 2000; COLOMBO *et al.*, 2005). Dentre estas proteínas, está a *Mo-CBP₃*, uma proteína ligante à quitina que mostra potente atividade antifúngica contra várias espécies de fitopatógenos. Esta foi purificada de sementes de *M. oleifera* por Gifoni e colaboradores (2012). Suas principais características são a glicosilação (2,5% de carboidratos), baixa massa molecular (14,3 kDa) e termoestabilidade.

2.4 Fitopatógenos

2.4.1 Fungos

Diversas espécies de fungos são capazes de parasitar ou até destruir totalmente plantas, de forma que 20% das perdas na produção agrícola mundial são oriundas de doenças causadas por esses organismos (CHAPAGAIN; WIESMAN; LAHKIM, 2007). Fungos são organismos eucariotos, heterotróficos, que podem viver como parasitas ou em simbiose com outros organismos. Boa parte dos fungos tem uma estrutura composta quase sempre de filamentos ramificados, que apresentam parede celular constituída por quitina (MENEZES; OLIVEIRA, 1993). Basicamente, a parede celular de fungos é composta por glucanos, lipídeos, peptídeos, proteínas e quitina, variando a proporção, concentração e disposição desses elementos entre as espécies, ou entre fases do ciclo de vida (SELITRENNIKOFF, 2001; DE GROOT; RAM; KLIS, 2005). A parede deve ser relativamente rígida para proteger a célula das pressões externas e do próprio turgor, mas também deve ser maleável o suficiente para permitir o crescimento do fungo (THEIS; STAHL, 2004; DE GROOT *et al.*, 2005). Uma vez que esta estrutura desempenha um papel fundamental na célula, pois além de conferir proteção e resistência está envolvida no transporte de água e nutrientes, a perturbação de sua integridade resulta em sérios prejuízos ao organismo.

Dentre os constituintes da parede celular de fungos, um dos alvos mais importantes nos estudos de moléculas vegetais antifúngicas é a quitina. Isto se dá

porque, juntamente com o β -1,3-glucano, a quitina é o principal componente da parede celular (ZEKINS; SCHREMPF, 1995). A degradação da quitina por quitinases, ou mesmo a sua interação com proteínas ligantes, podem alterar ou destruir a estrutura da parede celular. De acordo com Wang e Granados (2000), a inibição da síntese de quitina em leveduras e fungos filamentosos resulta na biogênese anormal da parede celular.

2.4.2 Nematoides

Os nematoides pertencem ao filo Nematoda, que inclui parasitas de plantas e animais, bem como muitas espécies de vida livre. Os nematoides fitopatogênicos são parasitas obrigatórios e obtêm seus nutrientes apenas do citoplasma de células vegetais vivas (WILLIAMSON; HUSSEY, 1996). Alguns são ectoparasitas, vivendo fora de seus hospedeiros. Outros são endoparasitas e vivem dentro de raízes, podendo ser de hábito migratório ou sedentário (BROWN; ROBERTSON; TRUDGILL, 1995).

A família Heteroderidae de endoparasitas sedentários é a que causa os maiores danos econômicos mundiais (WILLIAMSON; HUSSEY, 1996). Os Heteroderidae são divididos em 2 grupos: os nematoides de cisto, cujos principais gêneros são o *Globodera* e o *Heterodera*, e os nematoides de galhas, destacando-se o gênero *Meloidogyne*. Dentre os fitonematoide, os do gênero *Meloidogyne* são considerados os de maior interesse em todo o mundo (FERRAZ *et al.*, 2001).

Os nematoides formadores de galhas possuem um ciclo de vida com seis estágios. Inicialmente ainda dentro do ovo, o indivíduo jovem, denominado juvenil de primeiro estágio (J1) sofre uma ecdise, dando origem ao estágio J2 ou juvenil de segundo estágio (ABAD *et al.*, 2008). A interação entre a planta e o J2 se dá quando este é atraído pelos exsudatos radiculares, por meio de órgãos quimiorreceptores localizados na sua extremidade anterior (PERRY, 1996). Uma vez chegando até a raiz da potencial planta hospedeira o J2 penetra preferencialmente na zona de alongação. Este, quando se torna fêmea, adquire hábito sedentário e induz o surgimento de células vegetais gigantes e multinucleadas que servirão como fonte de alimento (GOVERSE *et al.*, 2000; ENGLER *et al.*, 2004). As células gigantes conectam-se a células vizinhas e delas recebem parte dos nutrientes e

fotoassimilados produzidos pela planta, formando as tão características galhas (FERRAZ *et al.*, 2001; ONYEKE; AKUESHI, 2012).

Durante o seu desenvolvimento, o nematoide se alimenta a partir das células gigantes das galhas, por meio de um estilete, drenando nutrientes da planta hospedeira e resultando em uma distribuição anormal de fotoassimilados, com um fluxo maior para o seu local de alimentação. Isto prejudica o desenvolvimento da planta, causa murcha e aumenta a susceptibilidade da planta a outros patógenos (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Contabilizar os danos econômicos causados por nematoides, particularmente do gênero *Meloidogyne*, é muito difícil. Alguns estudos indicam algo em torno de 100 milhões de dólares anuais (KOENNING *et al.*, 1999; RIPOLL *et al.*, 2003). Já dados mais recentes apontam perdas da ordem de bilhões de dólares anualmente, no mundo todo (NICOL *et al.*, 2011).

Há trabalhos demonstrando que o controle químico dessas pragas pode ser eficaz (CASELA; FERREIRA; PINTO, 2006). Entretanto, o uso de nematicidas tem um custo elevado, além de causar grande impacto ambiental contaminando a água e o solo (BAKER *et al.*, 1997). Desta forma, é imprescindível que se busquem medidas alternativas de controle que causem menos impacto sobre meio ambiente, tal como a prospecção de proteínas de defesa nos próprios vegetais.

3 OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Caracterizar o exsudato de sementes de *Moringa oleifera* quanto à composição bioquímica e atividade biológica, bem como detectar a *Mo-CBP₃*, uma proteína ligante à quitina que está presente nessas sementes, como componente importante do exsudato contribuindo, já nos estágios iniciais, para o desenvolvimento dessa espécie vegetal.

3.2 Objetivos Específicos

- Estabelecer a melhor condição para a exsudação de sementes de moringa;
- Caracterizar o exsudato das sementes de moringa quanto à composição de metabólitos secundários;
- Caracterizar o exsudato de sementes de moringa quanto à presença de proteínas bioativas relacionadas à defesa vegetal;
- Detectar, por ensaios imunoenzimáticos, a presença da proteína *Mo-CBP₃* no exsudato de sementes de moringa;
- Avaliar o efeito *in vitro* do exsudato de sementes de moringa sobre as fases de germinação e crescimento de fungos;
- Avaliar a atividade nematostática e nematicida do exsudato de sementes de moringa sobre o nematoide das galhas *Meloidogyne incognita* em estágio de J2;
- Detectar e quantificar a *Mo-CBP₃* em raízes de plântulas de moringa utilizando-se de anticorpo policlonal contra *Mo-CBP₃*;
- Detectar a presença de transcritos do gene da *Mo-CBP₃* em raízes de plântulas de moringa.

4 MATERIAIS

4 MATERIAIS

4.1 Sementes

As sementes de *Moringa oleifera* Lamarck foram obtidas de árvores situadas no Campus do Pici, da Universidade Federal do Ceará (UFC), na Cidade de Fortaleza, Ceará, entre os meses de outubro e dezembro de 2012.

4.2 Coelho

Para a produção de anticorpos foi utilizado coelho adulto albino (linhagem Nova Zelândia), de aproximadamente 3 kg, mantido no biotério do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBBM) da UFC.

4.3 Eritrócitos

Os eritrócitos utilizados nos ensaios de hemaglutinação foram obtidos de sangue de coelhos e camundongos mantidos no biotério do DBBM da UFC.

4.4 Modelos Experimentais

4.4.1 Fungos

Os fungos filamentosos *Colletotrichum gloesporioides*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani* e *Rhizoctonia solani* foram provenientes da micoteca mantida no laboratório de Toxinas Vegetais (DBBM/UFC). Os fungos leveduriformes *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *Saccharomyces cerevisiae* foram obtidos da micoteca do Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia, Departamento de Biologia, UFC.

4.4.2 Nematoides

Nematoídes da espécie *Meloidogyne incognita* foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Fitoquímica Aplicada (LABFITO) do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da UFC.

4.5 Reagentes Químicos

Ácido etilenodiamínico tetra-acético (EDTA), acrilamida, albumina sérica bovina (BSA), azocaseína, azul brilhante de coomassie G-250 e R-250, azul de bromofenol, ditioneitol (DTT), glucose, *N,N,N',N'*-tetrametiletenodiamino (TEMED), *N,N'*-metileno bisacrilamida, *N*- α -benzoil-DL-arginina-*p*-naftilamida (BANA), *N*- α -benzoil-DL-arginina-*p*-nitroanilida (BAPNA), papaína, persulfato de amônio, sulfato de amônio, tris (hidroximetil) aminometano e 7-dimetilaminocumarina-4-ácido acético (DMACA) foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EUA).

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

Concert™ Plant RNA Reagent foi obtido da Invitrogen.

O "RNeasy Mini Kit" foi obtido da QIAGEN Biotecnologia Brasil Ltda (São Paulo, Brasil).

A transcriptase reversa (Improm-II™ Reverse Transcriptase) foi obtida da Promega Corporation (Wisconsin, USA).

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

5 MÉTODOS

5 MÉTODOS

5.1 Exsudação de sementes de moringa

5.1.1 Seleção de sementes

Para obtenção dos exsudatos, sementes de moringa foram selecionadas por tamanho, cor e peso, de forma que fossem formados grupos de sementes com a maior uniformidade possível. As sementes, livres de danos e sem qualquer alteração morfológica perceptível, para a desinfecção as sementes de moringa foram submersas em solução contendo hipoclorito de sódio 0,2% por 5 minutos e em seguida foram lavadas 3 vezes com água destilada para a remoção do hipoclorito de sódio. Dez sementes foram distribuídas por erlenmeyer de 125 mL, contendo um volume de meio de exsudação suficiente para cobrir todas as sementes (3 mL de solução por semente) e mantido aberto. As exsudações foram realizadas em câmara climatizada (Estufa BOD) a 28 °C e fotoperíodo de 12 horas com luz e 12 horas no escuro.

5.1.2 Determinação das condições de exsudação

Para determinar as melhores condições de exsudação, buscou-se primeiramente avaliar qual o período de tempo ideal para exsudação do maior teor de proteínas. Para isso, a embebição das sementes foi feita em água destilada, durante os diferentes tempos de 1, 6, 12, 18 e 24 horas. A partir do tempo escolhido, seguiu-se a busca pelo melhor tampão de exsudação. Foi então utilizado o intervalo de tempo de embebição de 24 horas e, além da água destilada, foram testados os tampões acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2; fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,0; Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0 e glicina 0,05 M, pH 9,0. Após o término da embebição, os exsudatos foram coletados e os teores de proteínas determinados. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

5.2 Dosagem de proteínas

Para determinação do teor de proteínas foi utilizada a metodologia descrita por Bradford, (1976). A 100 μ L de amostra, em diferentes concentrações, foram adicionados 2,5 mL do reagente de Bradford. A mistura foi agitada e após 10 minutos em repouso foram feitas leituras das absorvâncias a 595 nm (Espectrofotômetro Biochrom Libra S12). A concentração proteica foi estimada através de uma curva padrão obtida a partir de concentrações conhecidas de albumina sérica bovina (BSA).

5.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

O perfil eletroforético do exsudato foi analisado segundo a técnica de 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 0,125 M, pH 6,8; o de separação, 12,5% de acrilamida e 1,0% de SDS, em tampão Tris-HCl 0,375 M, pH 8,8. Para a eletroforese dos exsudatos de sementes de moringa, as amostras foram precipitadas com uso de ácido tricloroacético 20% em acetona, deixando em contato durante 30 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g, por 15 minutos, a 4 °C. O precipitado formado foi ressuspenso em acetona, a 4 °C e centrifugado a 10.000 x g, por 15 minutos. Depois, foram feitas mais cinco lavagens utilizando-se acetona nas condições já descritas. Após a última centrifugação, foi realizada a secagem do precipitado, até a completa evaporação da acetona. As amostras de exsudato foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8 contendo SDS 1%, na presença de β -mercaptoetanol 1%. Em seguida, as amostras foram aquecidas a 100 °C, por 10 minutos e centrifugadas a 10.000 x g, por 1 minuto. Aos sobrenadantes foram acrescentados cristais de sacarose e azul de bromofenol a fim de conferir densidade e cor às amostras, respectivamente. A corrida eletroforética foi realizada em sistema vertical (HOEFER SE 250, GE Healthcare), sendo os géis submetidos a uma amperagem de 20 mA, voltagem de 150 V e potência de 10 W. Como marcador de massa molecular foi utilizado um kit contendo, fosforilase B (97 kDa), albumina sérica bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina de soja, tipo Kunitz (20,1 kDa) e α -lactoalbumina (14,4 kDa). A coloração das bandas proteicas foi feita utilizando Coomassie G-250 "Blue Silver" (CANDIANO et al., 2004).

5.4 Determinação qualitativa de metabólitos secundários

A determinação qualitativa de metabólitos secundários em exsudato de sementes de moringa foi realizada utilizando-se a metodologia descrita por Matos (1999). Ao exsudato de sementes de moringa liofilizado (500 mg) foi adicionado 2,5 mL de álcool para realização das análises. A avaliação da presença de metabólitos secundários foi feita para os grupos dos fenóis, taninos, antocianinas, antocianidinas, flavonas, flavonóis, xantonas, chalconas, auronas, flavononóis, leucoantocianidinas, catequinas, flavononas, esteroides e triterpenoides. Todas as detecções foram baseadas na modificação ou aparecimento de coloração. Foi avaliada, também, a presença ou ausência de saponinas e alcaloides, a partir da formação ou não de espuma e precipitado, respectivamente.

5.5 Detecção de proteínas bioativas relacionadas à defesa

5.5.1 Atividade hemaglutinante

Para realização da atividade hemaglutinante, eritrócitos foram obtidos a partir de amostras de sangue de coelho albino adulto (raça Nova Zelândia). Para determinação da atividade direta foi seguida a metodologia descrita por Moreira e Perrone (1977), adaptada para tubos de ensaio. As diluições foram obtidas a partir de uma solução contendo o exsudato liofilizado na concentração de 1 mgP/mL dissolvido em solução salina 0,15 M, esta solução foi diluída em série em solução salina 0,15 M (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, etc.) e, a cada diluição, foi adicionada, na proporção de 1:1, a suspensão a 2% de eritrócitos de coelho, tratados ou não com tripsina, segundo metodologia proposta por Lis e Sharon (1972).

Os tubos foram incubados a 37 °C, por 1 hora. Após esse tempo, a aglutinação dos eritrócitos foi visualizada a olho nu. Os resultados foram expressos como unidades de hemaglutinação (UH), sendo uma UH correspondente ao valor recíproco da maior diluição na qual ainda se visualiza aglutinação de eritrócitos.

5.5.2 Atividade inibitória de tripsina

A presença de inibidores de tripsina no exsudato foi determinada

utilizando-se a metodologia descrita por Erlanger e colaboradores (1961), com algumas modificações. Primeiramente, foi realizada uma curva padrão utilizando-se alíquotas de 10 a 30 μL de tripsina (EC 3.4.21.4) (0,3 mg/mL, em HCl 0,001 M). A estas alíquotas foram adicionados uma amostra de 100 μL de exsudato na concentração de 1 mgP/mL e o tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5, contendo CaCl_2 0,02 M, até o volume de 800 μL . Os tubos foram então incubados a 37 °C, em banho-maria, por 10 minutos. Posteriormente, foram adicionados 500 μL da solução do substrato BApNA 0,001 M. Os tubos foram novamente colocados em banho-maria, a 37 °C, por 15 minutos, sendo, em seguida, adicionada a solução de parada (120 μL de ácido acético 30%). Para as amostras em branco, a mistura reacional continha tanto a tripsina como a amostra a ser testada, mas a reação foi parada antes da adição do substrato. Uma unidade de atividade inibitória de tripsina (UI) foi definida como sendo a quantidade de inibidor que diminuiu a atividade da tripsina (controle) em 0,01 da absorbância a 410 nm. A atividade inibitória foi expressa como atividade específica (UI/mgP). Os ensaios foram realizados em triplicata.

5.5.3 Atividade inibitória de papaína

Para determinação da atividade inibitória de papaína foi empregada a metodologia descrita por Abe e colaboradores (1992). Para isso foi utilizada papaína (2x cristalizada Sigma). Vinte μL de uma solução de papaína (3.4.22.2) (1 mg de papaína dissolvida em água e diluída 50 vezes em tampão fosfato de sódio 0,25 M, pH 6,0) foram adicionados a 40 μL de solução ativadora (tampão fosfato de sódio 0,25 M, pH 6,0, EDTA 0,001 M e DTT 0,002 M). Foram adicionados ainda 200 μL de exsudato na concentração de 1 mgP/mL diluído em tampão fosfato de sódio 0,25 M, pH 6,0 e os tubos de ensaio foram expostos a banho de gelo. O conjunto foi imediatamente incubado em banho-maria a 37 °C, por 10 minutos. Posteriormente foram acrescentados 200 μL do substrato BANA 0,001 M. Passados 20 minutos, a reação foi parada com 500 μL de HCl 2% diluído em etanol e o conjunto foi mantido em temperatura ambiente por mais 5 minutos. Foram então adicionados mais 500 μL do cromógeno DMACA 0,06%. A absorbância foi medida a 540 nm, 30 minutos após o acréscimo do último reagente. Uma unidade de atividade (UI) foi determinada como a quantidade de inibidor que diminuiu a atividade da protease em 0,01 da

absorbância a 540 nm. A atividade inibitória foi expressa como atividade específica (UI/mgP).

5.5.4 Atividade proteolítica

Para a determinação da atividade proteolítica total foi utilizada a metodologia descrita por Xavier-Filho e colaboradores (1989). Azocaseína foi utilizada como substrato não específico para a 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 de 500 μ L de exsudato na concentração de 1 mgP/mL (diluído em tampão fosfato de sódio 0,25 M, pH 6,0 contendo DTT 0,003 M), por uma hora, 37 °C, juntamente com 200 μ L de uma solução de 1% de azocaseína (m/v), em tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 6,0 a 37 °C. Passado o tempo de incubação, a reação foi interrompida com a adição de 300 μ L de ácido tricloroacético 20% (v/v) e o conjunto foi centrifugado a 10.000 x g, por 10 minutos, com o objetivo de separar a azocaseína precipitada dos peptídeos em solução. Uma alíquota de 400 μ L do sobrenadante foi alcalinizada com 400 μ L de uma solução de hidróxido de sódio 2 N e a absorbância medida a 420 nm. A variação de 0,01 unidades de absorbância por minuto foi assumida como sendo 1 unidade de atividade proteolítica (1 UAP).

5.5.5 Atividade quitinásica (EC 3.2.1.14)

A determinação da atividade quitinásica foi realizada seguindo-se a metodologia descrita por Boller (1993), que teve como parâmetro a liberação de *N*-acetil-D-glucosamina (NAG), a partir da ação hidrolítica das enzimas das amostras sobre a quitina coloidal. Para essa finalidade, 250 μ L de exsudato (1 mgP/mL) 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, 25 °C por 10 minutos, e alíquotas de 300 μ L foram retiradas e incubadas com 10 μ L de uma solução da enzima glucoronidase (EC 3.2.1.31), a 37 °C, por 1 hora. A solução

de glucoronidase usada nos ensaios foi preparada por diálise da preparação bruta de *Helix pomatia* (Tipo HP-2, 132.000 Unidades/ml) com tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2, e diluição (10 vezes) com o mesmo tampão de reação. Para avaliar a liberação de NAG, 310 µL do hidrolisado foram misturados com 190 µL de acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2, e 100 µL de tetraborato de sódio e potássio 0,6 M. Os tubos foram novamente fervidos por 5 minutos, resfriados e a estes acrescentados uma solução de *p*-dimetilaminobenzaldeído (DMAB), preparada dissolvendo-se 10,0 g de DMAB em 100 ml de ácido acético glacial contendo 12,5% (v/v) de ácido clorídrico 11,5 M. As leituras foram realizadas a 585 nm (Espectrofotômetro Biochrom Libra S12). Para cálculo da quantidade de açúcar liberado na reação, uma curva padrão construída com concentrações variadas (100 a 500 µM) de Nacetil-D-glucosamina foi utilizada (REISSIG et al., 1955). A atividade quitinolítica foi expressa em nKat/mgP, onde 1 nKat equivale a 1 nmol de *N*-acetil-D-glucosamina liberado por segundo.

5.5.6 Atividade β -1,3-glucanásica (EC 3.2.2.6 e EC 3.2.1.39)

A atividade β -1,3-glucanásica do exsudato foi determinada através do método colorimétrico descrito por Boller (1992) e medida em função da velocidade de degradação da laminarina (substrato) e formação de glucose. A solução de laminarina (2 mg/mL) foi dissolvida em água ultra pura, aquecida a 60 °C, por 10 minutos e, em seguida, dialisada exaustivamente contra água ultra pura para remoção de glucose livre. No ensaio realizado em triplicata, alíquotas de 100 µL de exsudato 1 mgP/mL em tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2 foram incubadas com 900 µL da solução de laminarina a 30 °C por 30 minutos. Após a incubação, foi adicionado, a cada amostra, 1 mL de uma mistura de duas soluções A+B na proporção 25:1 (solução "A" contendo 25 g de carbonato de sódio anidro, 25 g de tartarato de sódio potássio, 20 g de bicarbonato de sódio e 200 g de sulfato de sódio anidro e água deionizada q.s.p. 1000 mL; Solução "B" contendo 15 g de sulfato de cobre hidratado, 20 µL de ácido sulfúrico e água q.s.p. 100 mL), a mistura reacional foi levada a fervura em banho-maria por 20 minutos. Após resfriamento em banho de gelo por 5 minutos, foi acrescentado 1 mL de uma solução contendo 3 g de arseniato de sódio e água deionizada q.s.p. para 25 mL) e os tubos agitados, vigorosamente, até a completa remoção dos gases formados, sendo, em seguida,

deixados em repouso por cinco minutos. A leitura das absorvâncias foi realizada a 520 nm. O cálculo do teor de açúcares liberados no ensaio foi realizado com base em uma curva padrão construída a partir de soluções com concentrações conhecidas de glucose, variando de 3 a 30 µg/mL. A atividade β-1,3-glucanásica foi expressa em nanokatal (nkat), sendo 1 nanokatal equivalente a 1 nanomol de glucose liberada por mL por segundo.

5.5.7 Atividade catalase (EC 1.11.1.6)

A determinação da atividade catalase foi realizada de acordo com Havar; McHale (1987); Peixoto *et al.*, (1999); Oliveira; Gondim; Vasconcelos (2010). Para que ocorra a reação de dismutação do H₂O₂ pela catalase são necessárias duas moléculas de H₂O₂, que ira produzir H₂O e O₂. Um tubo de ensaio contendo 600 µL de tampão fosfato de potássio 0,075 M, pH 7,0, foi incubado 30 °C por 10 min, adicionar 300 uL de exsudato (1mgP/mL) e 100 µL de peróxido de hidrogênio 0,112 M. A mistura foi incubada por mais 10 minutos, a 30 °C, e a absorvância medida a 240 nm. A variação de 1 unidade de absorvância por minuto foi assumida como sendo 1 unidade de atividade catalase (1 UACAT).

5.5.8 Atividade peroxidásica do ascorbato (EC 1.11.1.11)

A determinação da atividade peroxidase de ascorbato foi realizada utilizando o ascorbato como doador específico de elétrons. O Princípio do ensaio baseia-se na redução do H₂O₂ em água, através da oxidação do *L*-ascorbato (Koshiba, 1993; Peixoto *et al.*, 1999; Oliveira; Gondim; Vasconcelos, 2010). Para o procedimento do ensaio, em um tubo contendo 800 µL de tampão fosfato de potássio 0,05 M, pH 6,0, acrescido de 0,5 mM de ácido *L*-ascórbico foi adicionado 100 µL de exsudato (1 mgP/mL). Após incubarção em banho maria a 30 °C, por 10 min foi adicionado a mistura reacional 100 µL de peróxido de hidrogênio 0,002 M. As leituras das absorvâncias foram realizadas a 290 nm. A variação de 1 unidade de absorvância por minuto foi assumida como sendo 1 unidade de atividade peroxidásica (1 UAAPX).

5.5.9 Atividade peroxidásica de fenóis (EC 1.11.1.7)

Para determinação da atividade peroxidásica de fenóis foi utilizada a metodologia descrita por Urbanek e colaboradores (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. Em 100 µL de exsudato (1 mgP/mL), 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 0,05 M, pH 5,2. A mistura foi incubada por 10 minutos, a 30 °C, e a absorbância medida a 480 nm. A variação de 1 unidade de absorbância por minuto foi assumida como sendo 1 unidade de atividade peroxidásica (1 UAPOX).

5.6 Imunodeteção da proteína *Mo*-CBP₃

5.6.1 Produção de anticorpos policlonais

Para a produção de anticorpos anti-*Mo*-CBP₃, esta proteína foi purificada de sementes de moringa de acordo com o protocolo descrito por Gifoni e colaboradores (2012). De posse da proteína purificada, os anticorpos policlonais anti-*Mo*-CBP₃ foram produzidos em coelho albino de aproximadamente 4 kg, previamente aclimatado, de acordo com o esquema mostrado na Figura 2. Antes de ser iniciado o processo de imunização, uma amostra de sangue do animal foi coletada para obtenção do soro pré-imune. Para produção de anticorpos policlonais, os animais foram imunizados com uma emulsão contendo cerca de 1 mg de *Mo*-CBP₃ diluído em 0,5 mL de NaCl 0,15 M estéril e 0,5 mL de adjuvante completo de Freund (Sigma Chemical, Co.). O processo de imunização consistiu na administração subcutânea de 1 mg do antígeno distribuído em dez sítios dispostos bilateralmente ao longo da região tóraco-lombar da coluna vertebral dos animais. Vinte e um dias após a primeira inoculação foi realizada uma nova inoculação de proteína, também pela via subcutânea. Nessa, e em todas as demais imunizações, o antígeno foi preparado conforme descrito anteriormente, mas usando o adjuvante incompleto de Freund. A segunda imunização foi acompanhada pela coleta de 10 mL de sangue, para obtenção do primeiro soro imune. Duas outras coletas (10 mL) foram realizadas em intervalos de 10 dias após a segunda imunização, sendo essas

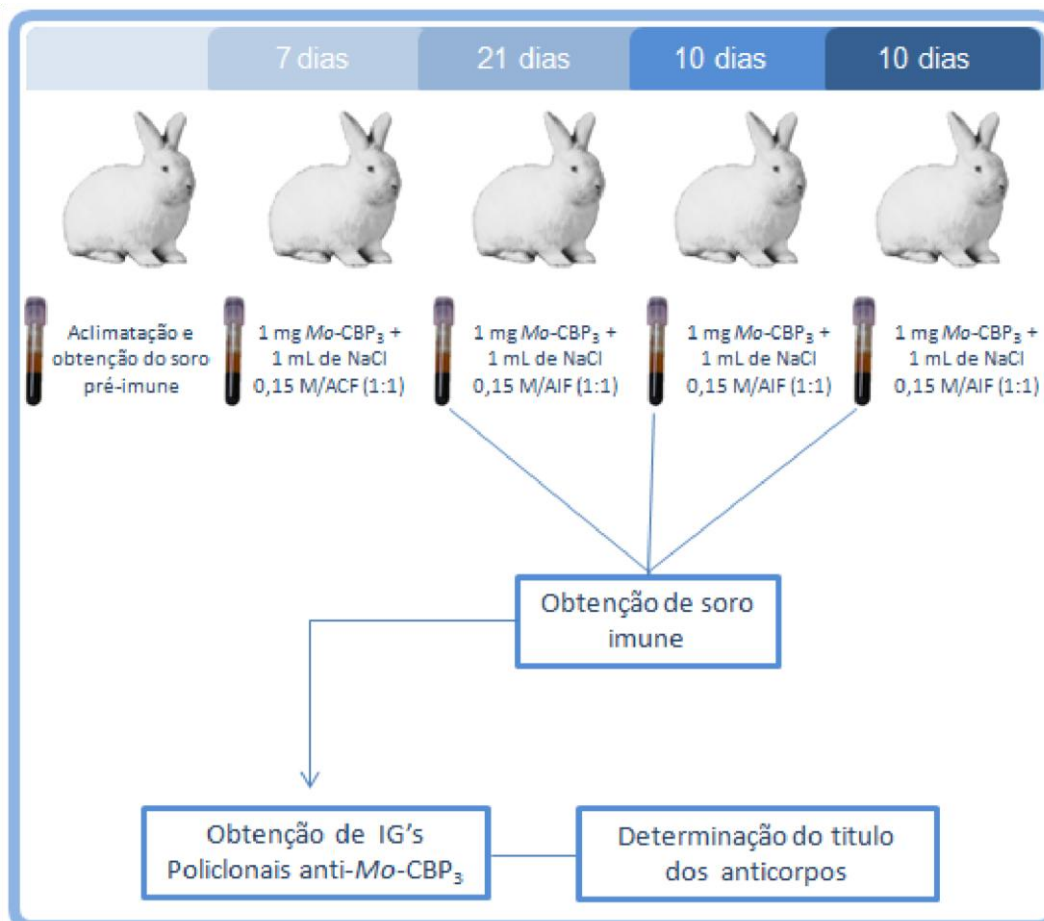
também acompanhadas pela administração de 1 mg de antígeno. Os antissoros obtidos nas coletas foram reunidos, precipitados com sulfato de amônio a 33% de saturação e, em seguida, dialisados em trocas alternadas com água destilada e tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,0, a cada 6 horas, durante três dias. O dialisado (última troca realizada com água deionizada) foi, então, centrifugado (1.500 x g, 20 minutos, 4 °C) e o sobrenadante submetido à cromatografia em coluna de Proteína A-agarose P2545, equilibrada com tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 8,0, contendo NaCl 0,15 M. A eluição do material não retido foi realizada com o tampão de equilíbrio, enquanto que o retido (rico em IgG policlonal anti-*Mo*-CBP₃) foi eluído com tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 3,0 contendo ácido cítrico 0,1 M. Esses materiais foram, em seguida, dialisados contra água deionizada, liofilizados e armazenados a 2 °C. (Figura 2).

5.6.2 Determinação do título dos anticorpos produzidos

O título dos anticorpos produzidos contra *Mo*-CBP₃ foi determinado através de Dot Blot, seguindo-se a metodologia descrita por Towbin e colaboradores (1979). Para isso, 10 µL da proteína *Mo*-CBP₃ (0,2 mg/mL em água deionizada) foram aplicados sobre membrana de nitrocelulose e deixados secar. Em seguida, a membrana foi bloqueada com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, contendo NaCl 0,15 M, Tween 20 0,05% e 5% de leite em pó desnatado, sendo deixadas sob leve agitação durante, aproximadamente, 1 hora. Subsequentemente as membranas foram imersas em solução de anticorpo primário nas diluições de 1:100, 1:250, 1:500 e 1:1000 no tampão de bloqueio e mantidas por 2 horas a 37 °C.

Após essa etapa, as membranas foram lavadas, pelo menos cinco vezes, com tampão de bloqueio, sendo então, incubadas em presença do anticorpo secundário 1:1000 (IgG de cabra anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina), a 37 °C, por 1 hora. A membrana foi novamente lavada com o mesmo tampão e, por fim, submetida ao processo de revelação com o substrato cromogênico da fosfatase alcalina, 5-bromo-4-cloro-3-indol-fosfato/nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT).

5.6.3 Purificação de *Mo*-CBP₃ a partir do exsudato de sementes

Figura 2 – Esquema geral de produção de anticorpos policlonais anti-*Mo*-CBP₃.

Fonte: Próprio autor

ACF e AIF representam, respectivamente, Adjuvante Completo e Adjuvante Incompleto de Freund. IG's representam imunoglobulinas.

O exsudato de sementes de moringa, obtido como descrito previamente, foi concentrado por liofilização. Em seguida, foi ressuspensão em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0, contendo NaCl 0,15 M e centrifugado a 10.000 x g, por 5 minutos, sendo desprezado o precipitado.

5.6.3.1 Cromatografia em matriz de quitina

Com o objetivo de purificar a *Mo*-CBP₃ do exsudato de sementes de moringa, o sobrenadante foi submetido à cromatografia em matriz de quitina (2,0 mL). A matriz foi equilibrada com tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0, contendo NaCl 0,15 M. A amostra (18 mg de proteínas do exsudato) foi posta em contato com a matriz por um período de 30 minutos. As proteínas não retidas foram eluídas com o mesmo tampão de equilíbrio (fluxo de 30 mL/hora), já a fração retida foi eluída com HCl 0,1 M (P_{HCl}). As frações eluídas foram monitoradas por leitura de absorbância a 280 nm (Espectrofotômetro Biochrom Libra S12). O material retido na matriz foi dialisado contra água destilada e liofilizado.

5.6.4 Imunodeteção de *Mo*-CBP₃ no exsudato e fração ligante à quitina

Com o objetivo de detectar a presença de *Mo*-CBP₃ no exsudato de sementes de moringa e na fração proteica retida em matriz de quitina (2 µgP; 0,2 mg/mL), foi utilizada a técnica de *dot blotting*, conforme metodologia previamente descrita no item 5.6.2. De forma complementar, a detecção da proteína no exsudato foi feita por ELISA (ROWHANI; FALK, 1995), conforme metodologia descrita mais adiante.

5.7 Atividades biológicas do exsudato

5.7.1 Atividade Antifúngica

5.7.1.1 Cultivo dos fungos

As culturas foram mantidas em meio ágar batata-dextrose (PDA), à temperatura ambiente. O meio de cultura consistiu em 39 g de ágar batata-dextrose dissolvidos em 1 litro de água deionizada, q.s.p., preparado sob banho-maria com

água em ebulição, sendo este meio autoclavado por 20 minutos, a 120 °C, 1,5 kgf e distribuído (20 mL) em placas de Petri (10 cm de diâmetro), nas quais o fungo foi repicado. Os péletes repicados do meio de cultura foram colocados no centro das placas de Petri, que foram fechadas sob condições estéreis em capela de fluxo laminar.

5.7.1.2 Obtenção dos esporos

Após os fungos terem tomado todo o diâmetro das placas de Petri, aproximadamente doze dias do repique (cultura fresca), essas foram abertas em câmara de fluxo laminar e a elas foram adicionados 5 mL de água deionizada. Com o auxílio de uma alça de Drigalski, manuseada suavemente sobre a superfície da cultura, os esporos foram retirados, deixando-os suspensos em água. A suspensão contida em cada placa foi filtrada em malha de nylon para a remoção das hifas. A concentração dos esporos foi ajustada para $2,0 \times 10^5$ esporos/mL após contagem em Câmara de Neubauer, ao microscópio óptico (Olympus System Microscope BX 60), com aumento de 400x.

5.7.1.3 Avaliação da inibição da germinação dos esporos de fungos fitopatogênicos

A ação *in vitro* do exsudato de sementes de moringa sobre a germinação de esporos de fungos fitopatogênicos foi determinado usando-se placas de Petri de poliestireno com depressões (Prolab), seguindo metodologia adaptada por Ji e Kué (1996), como descrito a seguir. As espécies de fungos utilizadas nos ensaios foram *Colletotricum gloesporioides*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani* e *Rhizoctonia solani*. Dez microlitros de uma suspensão de esporos contendo $2,0 \times 10^5$ esporos/mL foram adicionados por célula da placa. 10 µL do exsudato encerrando 20 µg de proteína, foram adicionados às células contendo a suspensão de esporos. Para fins de controle, foram utilizados água destilada e peróxido de hidrogênio 0,1 M. Cada tratamento e controle foi realizado em triplicata. As placas foram fechadas e deixadas em recipiente contendo papel de filtro embebido com água destilada, no escuro, à temperatura ambiente, sendo a análise monitorada a partir de 24 horas em microscópio óptico (Olympus System Microscope BX 60). Esporos foram

considerados germinados caso apresentassem tubo germinativo de, ao menos, duas vezes o seu comprimento.

5.7.1.4 Avaliação da inibição do crescimento usando como modelo fungos leveduriformes

Para avaliação da ação do exsudato de sementes de moringa sobre o crescimento de fungos, diferentes fungos leveduriformes foram selecionados como modelos experimentais, por serem de fácil manuseio e crescimento rápido, ideais para ensaios *in vitro*. Para tanto, o ensaio foi realizado em meio líquido usando os fungos *Candida parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*, utilizando a metodologia descrita por Freire e colaboradores (2002), com algumas modificações. Alíquotas de 10 µL da suspensão de conídios ($2,0 \times 10^5$ conídios/mL) foram incubadas em 100 µL do meio “yeast potato dextrose” (YPD), por 12 horas, a 30 °C, na ausência de luz. Decorrido o tempo de germinação, foram adicionados ao meio exsudato de sementes de moringa obtido após contato com água destilada por 24 horas, bruto e dialisados, nas concentrações de 200 e 300 µgP/mL, respectivamente, previamente filtrados (filtro Millex GV, porosidade de 0,22 µm). As absorbâncias a 660 nm foram lidas a intervalos de 6 horas, até 24 horas após o início do experimento. Como controle negativo foi utilizada água deionizada.

5.7.2 Atividade nematocida e nematostática

5.7.2.1 Obtenção de massas de ovos e de J2 de *Meloidogyne incognita*

Os ovos de *M. incognita* foram obtidos a partir de raízes de *Vernonia polyanthes* infectadas 60 dias antes do ensaio biológico e mantidas em casa de vegetação. Após a colheita, as raízes foram cuidadosamente lavadas com água da torneira, para retirada de porções do solo ainda aderidas na mesma e, em seguida, lavadas com água destilada, antes da retirada das massas de ovos. As massas foram obtidas por meio de sua retirada manual das raízes com uso de seringas, agulhas e lupa estereoscópica, sendo colocadas em microtubo de 1,5 mL contendo água destilada estéril, a 10 °C. Após a retirada, as massas de ovos foram colocadas sobre uma tela composta de tecido fino e depositadas em uma placa de Petri (6 cm

de diâmetro), contendo 2 mL de água destilada estéril. As placas foram acondicionadas em recipiente plástico fechado, contendo papel de filtro embebido com água, e mantidas em temperatura ambiente, na ausência de luz. Os J2 eclodidos migraram através da malha de tecido, sendo coletados na placa de Petri. Para os ensaios experimentais, J2 eclodidos entre 24 e 48 horas foram usados, os quais foram retirados da placa de Petri com auxílio de uma micropipeta. A população de J2 (numero de J2/10 μ L) foi estimada com o auxílio de lâmina e lupa estereoscópica.

5.7.2.2 Ensaio de atividade nematicida e nematostática

O ensaio de atividade nematicida do exsudato sobre indivíduos juvenis de 2º estágio de *M. incognita* foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Coimbra e Campos (2005), com modificações. Alíquotas de 50 μ L de uma suspensão contendo, em média, 60 juvenis (J2) foram colocadas em poços de placas de Kline e, em seguida, amostras de 150 μ L de exsudato foram adicionadas de modo a perfazer 200 μ L de volume final de ensaio, e de forma que nesse volume final contivesse 4 e 8 μ gP/J2 em diferentes grupos. As placas foram mantidas em umidade elevada, à temperatura ambiente e na ausência de luz. Água estéril foi utilizada como controle. As condições de aquecimento das amostras aquecidas foram as seguintes: O exsudato foi incubado em banho-maria a 100 °C por meia hora. Os nematoides foram observados 24 horas após incubação com o exsudato, sendo contados: o número de nematoides vivos, J2 com intenso movimento; e mortos, J2 imóveis e sem movimentação mesmo após serem tocados com agulha. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os dados obtidos foram convertidos em valores percentuais e comparados aos grupos controles.

5.8 Detecção de Mo-CBP₃ em raízes de plântulas moringa

5.8.1 Plantio de sementes e cultivo de plântulas

O plantio de sementes de moringa foi realizado em casa de vegetação do DBBM (UFC), mantendo-se a temperatura entre 25 a 28 °C e a umidade atmosférica variável entre 75 a 85%. As sementes foram colocadas para germinar em papel filtro

embebido com água destilada, em condições estéreis. Após a germinação, ou seja, o início da emissão da radícula pelo tegumento, as sementes foram transferidas para vasos de plástico como capacidade para 5 mL, contendo areia lavada e autoclavada, tendo sido colocada uma semente já germinada por vaso. A irrigação das plantas foi realizada manualmente durante todos os dias de cultivo, utilizando-se inicialmente água e, após 5 dias, solução nutritiva diluída (HOAGLAND; ARNON, 1950), sempre em dias alternados (FIGURA 3).

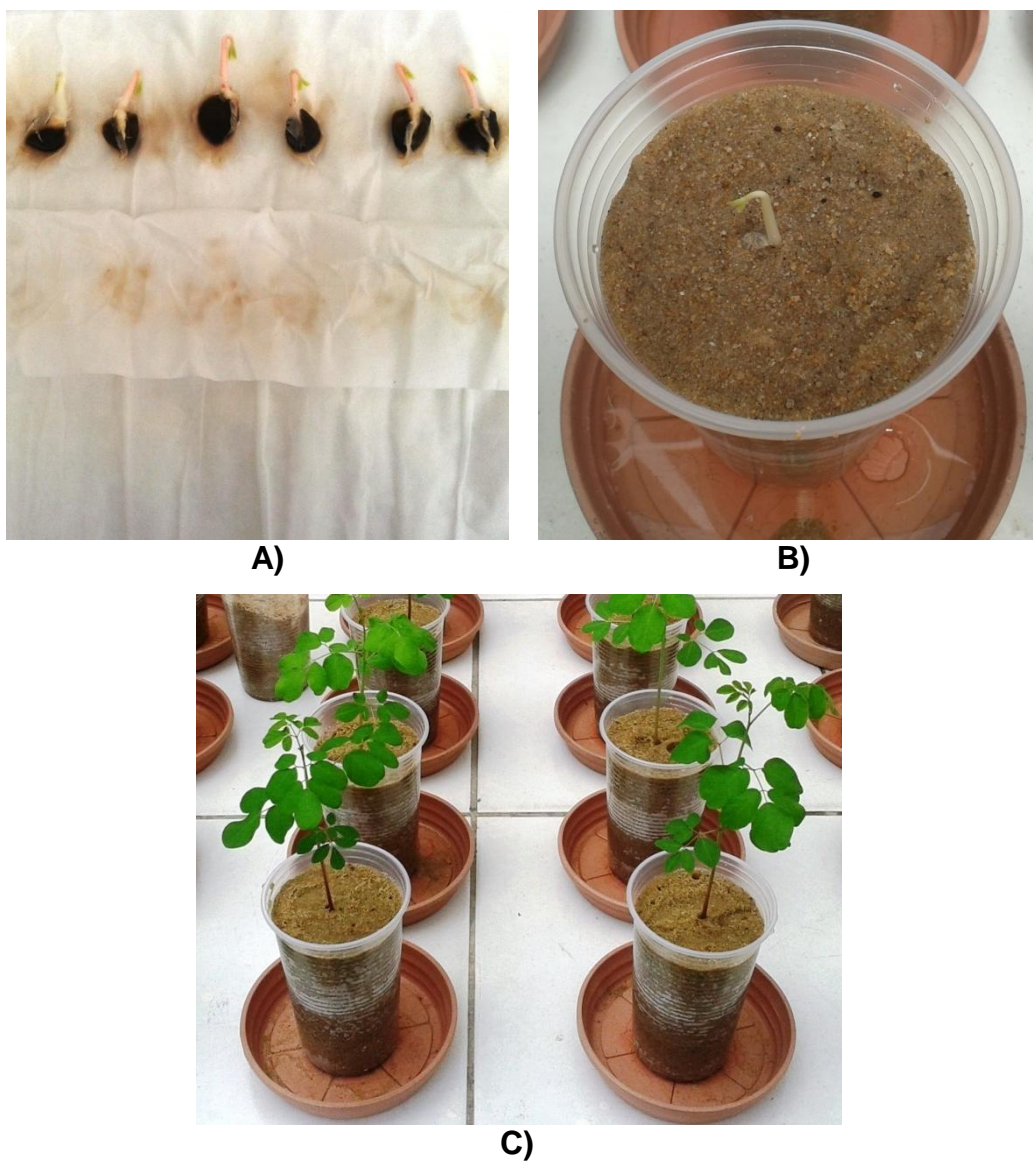
5.8.2 Extração de proteínas das raízes de plântulas

A partir de cada grupo de raízes [(R15 – 15 dias após o plantio ou 15 DAP) e (R30 – 30 dias após o plantio ou 30 DAP)] foram produzidos três extratos, sendo cada um, realizado a partir de raízes de três plântulas, que foi considerado como uma unidade experimental. Para a produção do extrato, as raízes foram maceradas em nitrogênio líquido. As farinhas obtidas foram colocadas em contato com tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0, contendo EDTA 0,01, PMSF 0,001 M e DTT 0,01 M, na proporção de 1:3 (p/v), a 4 °C, durante 4 horas, sob agitação. As suspensões foram centrifugadas a 16.000 x g, 30 minutos, 4° C, e os sobrenadantes armazenados a - 20 °C até o momento do uso.

5.8.3 Imunodeteção de Mo-CBP₃ em raízes de plântulas

A presença de Mo-CBP₃ em extrato de raízes de *Moringa oleifera* foi verificada pelo uso da técnica de ELISA indireto (Enzyme Linked Imunossorbent Assay) descrita por Rowhani e Falk (1995). Os teores de proteína dos extratos obtidos foram determinados pelo método de Bradford (1976). Para o ELISA, as amostras, que consistiam do extrato proteico das raízes, foram diluídas em tampão de acoplamento (carbonato/bicarbonato de sódio 0,05 M, pH, 9,6) para uma concentração final de 50 µgP/mL. Após a impregnação de 100 µL do antígeno em placas de microtitulação, por 12 horas, a 4 °C, a placa foi lavada 5 vezes com tampão PBST (fosfato de sódio 0,1 M, fosfato de potássio 0,01 M, pH 7,4, contendo NaCl 0,15 M e Tween 20 0,05%), por 10 minutos cada lavagem. A seguir, foi feito o bloqueio do sistema com o tampão de lavagem PBST, contendo 5% de leite em pó desnatado, durante 12 horas. Seguiram-se lavagens com PBST para retirada do

Figura 3 – Germinação de sementes e cultivo de plântulas de moringa



Fonte: Próprio autor.

A) Semente de moringa germinada; B) Plântula recém-transferida para a areia; C) Plântulas 15 dias após a germinação.

excesso de tampão de bloqueio, sendo, em seguida, feita a incubação com o anticorpo primário diluído (1:750) durante 12 horas, a 4 °C. Após nova série de lavagens, 100 µL do anticorpo secundário IgG de cabra anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina foram adicionados ao sistema e, após 3 horas a 37 °C, foi realizada a revelação utilizando-se *p*-nitrofenil fosfato (*p*NPP), a 1 mg/mL, dissolvido em água deionizada. A reação foi parada com a adição de 40 µL de NaOH 3 N e as leituras foram, então, realizadas a 405 nm. A concentração de Mo-CBP₃ foi estimada a partir de uma curva padrão obtida com amostras de Mo-CBP₃ em concentrações conhecidas.

5.8.4 Detecção de transcritos de RNA para Mo-CBP₃ em raízes de plântulas

5.8.4.1 Extração de RNA

Para a obtenção do RNA total foram utilizadas raízes de moringa coletadas 15 e 30 dias após o plantio. O dia do plantio foi considerado o início da embebição em papel de germinação. Para a extração de RNA, as raízes foram coletadas e mantidas em nitrogênio líquido. Com o auxílio de almofariz e pistilo, o material vegetal foi macerado e a ele adicionado o reagente “Concert™ Plant RNA Reagent” (Invitrogen®), na quantidade de 0,5 mL de reagente para cada 100 mg de tecido. Em seguida, essa suspensão foi agitada em vórtex e, após incubação dos tubos por 5 minutos, foi centrifugada a 12.000 x g, por 2 minutos, à temperatura de 25 °C (Eppendorf® MiniSpin, Model 533). O sobrenadante foi transferido para um microtubo de 1,5 mL estéril e a ele adicionado 0,1 mL de NaCl 5 M, sendo, em seguida, homogeneizado. Logo após, à mistura foi adicionado 0,3 mL de clorofórmio, seguido de homogeneização e centrifugação a 12.000 x g, por 10 min, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo estéril e a ele adicionado isopropanol na relação de 1:1 (v/v). Este foi deixado sob incubação, à temperatura ambiente, durante 10 min. Seguiu-se uma nova centrifugação durante 10 minutos, a 12.000 x g, a 4 °C. O RNA precipitado foi lavado com etanol 75% e, por fim, resuspendido em 30 µL água deionizada tratada previamente com DEPC (dietilpirocarbonato). A quantificação do RNA foi realizada através de leitura espectrofotométrica (espectrofotômetro NanoDrop 2000) pelas medidas das absorbâncias das preparações a 260 nm, utilizando-se a equação:

$$[\text{RNA}] = 40 \mu\text{g/mL} \times \text{Diluição} \times \text{DO}_{260\text{nm}}$$

5.8.4.2 *Análise da integridade do RNA total*

A integridade das amostras de RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose (1,2%) em tampão TBE (Tris-Borato 0,04 M, EDTA 1 mM), preparado com água grau deionizada. Imediatamente antes da eletroforese foi preparado o tampão de amostra para um volume de 10 μL , adicionando-se 60% (v/v) de azul de bromofenol [0,25% (m/v)], glicerol 30% (v/v) (preparados com tampão TE - Tris-EDTA), 1 μL de brometo de etídio (1 mg/mL), incluindo 3 μL da amostra de RNA. Em seguida, a amostra foi aplicada em gel de agarose 1,2% e após a corrida eletroforética, as bandas correspondentes às subunidades 28 S e 18 S do RNA ribossomal foram visualizadas através do uso de brometo de etídeo (0,1%) em água destilada, sob luz ultravioleta em câmara escura equipada com um transluminador acoplado a um sistema de fotodocumentação (Vilber LourmartTM). Após análise, a amostra foi armazenada a - 80 °C.

5.8.4.3 *Tratamento do RNA com DNase*

A fim de remover DNA genômico contaminante na amostra do RNA total, amostras de 10 μg de RNA total foram padronizadas para um volume final de 30 μL . Cada alíquota foi tratada com 10 U da enzima DNase (RQ1 DNase, Promega®) e 3 μL de tampão da enzima 10x, a 37 °C, durante 30 minutos. Para inativar a ação da DNase, após a incubação, às alíquotas foram adicionados 3 μL da enzima RQ1 DNase Stop Solution (Promega®) e o conjunto incubado a 65 °C por 10 minutos. Em seguida, o RNA total tratado foi estocado a -20 °C, até o momento da purificação do RNA total.

5.8.4.4 *Purificação do RNA*

Para purificação do RNA total de raízes de moringa foi utilizado o kit (RNeasy Mini Kit) da Qiagen. Para isto, as amostras de RNA resultantes do tratamento do RNA com a enzima DNase foram ajustadas para um volume de 100 μL com água sem RNase e a elas adicionados 350 μL do tampão de lise RLT. Após

agitação, foram adicionados 250 µL de etanol (98%) às amostras de RNA diluído. Depois de misturar bem, com auxílio de pipeta, as amostras foram imediatamente transferidas para as colunas (RNeasy Mini Spin Column) encaixadas em um microtubo de 2 mL, e o conjunto centrifugado durante 15 segundos a 8.000 x g, à temperatura ambiente, tendo sido o sobrenadante descartado. Depois disso, as colunas foram novamente colocadas no tubo coletor e a elas foram adicionados 500 µL de tampão RPE (tampão de lavagem), seguidos de centrifugação durante 15 segundos a 8.000 x g, à temperatura ambiente, sendo o sobrenadante descartado. Logo após descartar o sobrenadante, as colunas foram colocadas em tubos coletores e adicionados mais 500 µL de tampão RPE. Em seguida, foram centrifugadas por 2 minutos a 8.000 x g, à temperatura ambiente, sendo o sobrenadante descartado. A coluna foi transferida para um microtubo estéril e a ela adicionado 30 µL de água livre de RNase. Para eluir o RNA total da coluna, foi realizada uma centrifugação a 8.000 x g, durante 1 minuto, à temperatura ambiente. As amostras obtidas foram imediatamente armazenadas a - 80 °C, até a utilização.

5.8.4.5 Transcrição reversa (RT - Reverse transcription) e PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)

A síntese do cDNA do gene de *Mo-CBP₃* foi obtido pela reação de RT-PCR usando um molde de RNA do transcrito e sintetizado pela transcriptase reversa. Esta reação foi realizada utilizando-se uma amostra de RNA, proveniente de um pool de RNA total (produzido a partir de quantidades iguais de RNA extraído de raízes de moringa, coletadas nos intervalos de tempo de 15 e 30 dias após a germinação). A 1.500 ng de RNA purificado foram adicionados 1 µL de Oligo (dT)₁₅ 5 µM e água livre de RNase, até o volume de 5 µL de mistura reacional. A mistura foi incubada em termociclador (PTC-200 Thermo Cycle - MJ Research, USA), por 5 minutos a 25 °C, para o pareamento dos primers; e mais 5 minutos a 4 °C. Em seguida, foi adicionada uma mistura reacional consistindo de 4 µL do tampão da enzima RT Impron II 5X concentrado, 5 µL de uma mistura de dNTP 1 mM, 2,4 µL de MgCl₂ 25 mM e 1 µL da enzima RT Impron II, e 2,6 µL de água deionizada perfazendo-se 20 µL de volume total de reação. A mistura foi incubada a 42 °C por uma hora em termociclador para a síntese do cDNA e a 70 °C por 15 minutos, para

a inativação da enzima, sendo mantidos a 4 °C, até a estocagem do material a - 20 °C.

A fim de amplificar o gene da proteína *Mo*-CBP3, a 600 ng de cDNA (2 µL) foram adicionados 4 µL de tampão da enzima GoTaq DNA polimerase flexi (Promega®), 5 µL de dNTP, 2,5 µL dos iniciadore senso (5'-GCTGATGGCGATGAATGAACACTG-3') (5 µM), e 2,5 µL do iniciadores antisenso:

Mo-RevA 5'-CACGGGGTACATTTGAGCAACTAG-3';

Mo-RevB 5'-AGCTTCGAGCTCTACGAACACACA-3';

Mo-RevC 5'- GTTACACCGCTAGTGGCTCTCGTC-3'

na concentração de 5 mM. Além disso, foram adicionados 0,125 µL de GoTaq DNA polimerase (Promega®) e água (q.s.p.) livre de RNase, para um volume final de 25 µL (TABELA 1). A amplificação foi realizada em termociclador (PTC-200 Thermo Cycle - MJ Research, USA), ocorrendo uma etapa de desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos e 33 ciclos subsequentes de desnaturação a 95 °C por 1 minuto, seguida de pareamento a 60 °C por 1,5 minuto e extensão a 72 °C por 1,5 minuto. Após completarem-se os 33 ciclos, uma etapa de extensão final a 72 °C, durante 15 minutos foi procedida. Os produtos obtidos foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 1,2% e visualizados com brometo de etídio. A captura da imagem foi realizada com auxílio de luz ultravioleta (302 nm) em transiluminador (Macrovue™ Transluminator, Pharmacia Biotec).

Tabela 1 – Reagentes e seus volumes utilizados na PCR

Componente	Volume (μL)		
	Ver A	Ver B	Ver C
<i>5X Green GoTaq® Reaction Buffer</i>	5	5	5
dNTP Mix, 1mM	5	5	5
Iniciadores senso 5 μM	2,5	2,5	2,5
Iniciadores antisenso 5 μM	2,5	2,5	2,5
<i>GoTaq® DNA Polymerase</i> (5u/ μL)	0,125	0,125	0,125
DNA molde (300 ng/ μL)	2	2	2
H ₂ O livre de DNase q.s.p. 25 μL	7,875	7,875	7,875

Fonte: próprio autor

6 RESULTADOS

6 RESULTADOS

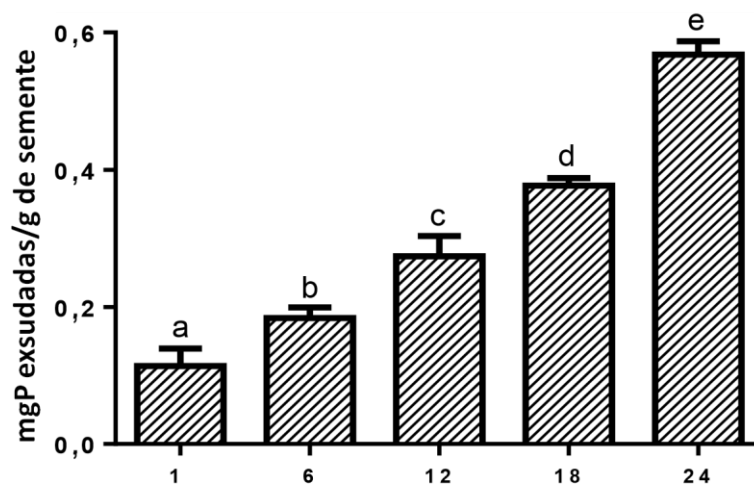
6.1 Exsudação de sementes de moringa

6.1.1 Determinação das condições de exsudação

De acordo com o gráfico mostrado na Figura 4, o tempo de exsudação que promoveu a liberação de proteínas em maior quantidade, sem haver mudança de cor, presença de precipitado e cheiro forte, foi o de 24 horas. A exsudação ocorreu de forma que os teores de proteína exsudados foram progressivamente maiores ao longo do tempo. No tempo de 24 horas após a embebição, o teor médio de proteínas exsudadas foi de $0,567 \pm 0,02$ mgP/g de semente ($52 \mu\text{g/mL}$). Os perfis eletroforéticos dos exsudatos mostraram predominância de bandas correspondentes a massas superiores a 29 kDa (FIGURA 5). Como já foi dito anteriormente a moringa é uma planta muito resistente e com ampla distribuição, uma vez determinado o tempo de exsudação, foram realizadas exsudações em tampões com diferentes pHs para verificar se em solos com diferentes pHs a quantidade de proteínas exsudadas seria diferente daquela observada em água destilada. Dentre todos os tampões testados na exsudação de sementes, o exsudato obtido utilizando-se acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2 foi o que apresentou a menor concentração de proteínas ($20 \mu\text{g/mL}$). O grupo de sementes exsudadas em água foi aquele do qual se obteve a maior concentração de proteínas ($52 \mu\text{g/mL}$), embora as exsudações pelos demais tampões não tenham apresentado diferenças significativas entre si e entre a água (FIGURA 6). Com exceção do exsudato obtido com acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2, que não apresentou boa visualização, os demais exsudatos mostraram perfis eletroforéticos semelhantes (FIGURA 7). Diante de tais fatos e, levando-se em conta a maior facilidade e menor custo de se trabalhar com água, esta foi escolhida como o meio de exsudação no decorrer dos experimentos. Assim sendo, nos experimentos descritos a seguir foi utilizado o exsudato de sementes embebidas em água destilada, no intervalo de tempo de 24 horas.

6.2 Determinação qualitativa de metabólitos secundários no exsudato de sementes de moringa

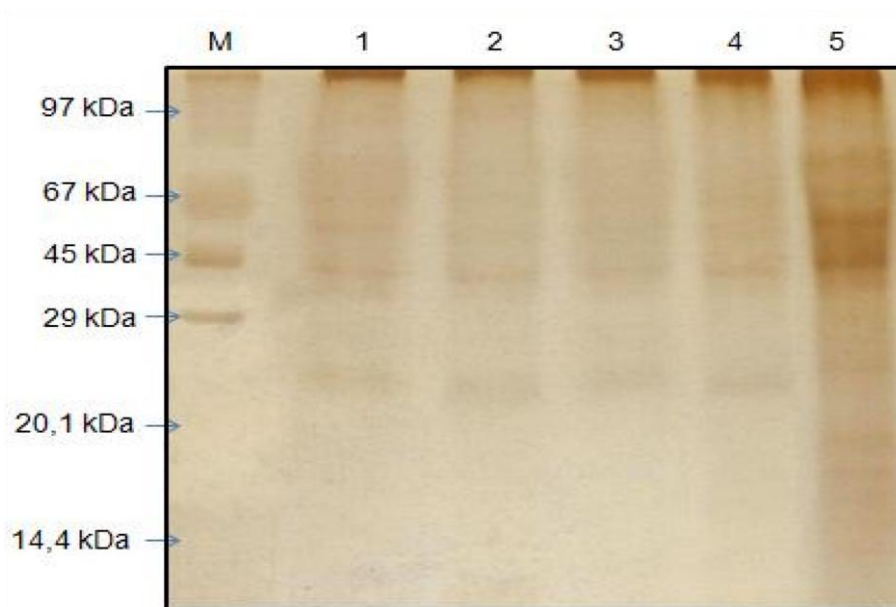
Figura 4 – Teores de proteínas exsudadas por semente de moringa após diferentes tempos de contato com água destilada



Fonte: Próprio autor

Dez sementes de moringa foram colocadas em contato com água destilada. O exsudato foi coletado a cada intervalo de tempo assinalado no gráfico. A dosagem de proteínas foi realizada através do método colorimétrico de Bradford (1976). As colunas verticais representam a média \pm desvio padrão de três ensaios realizados com três repetições e em triplicata. Letras diferentes indicam valores que diferiram significativamente ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

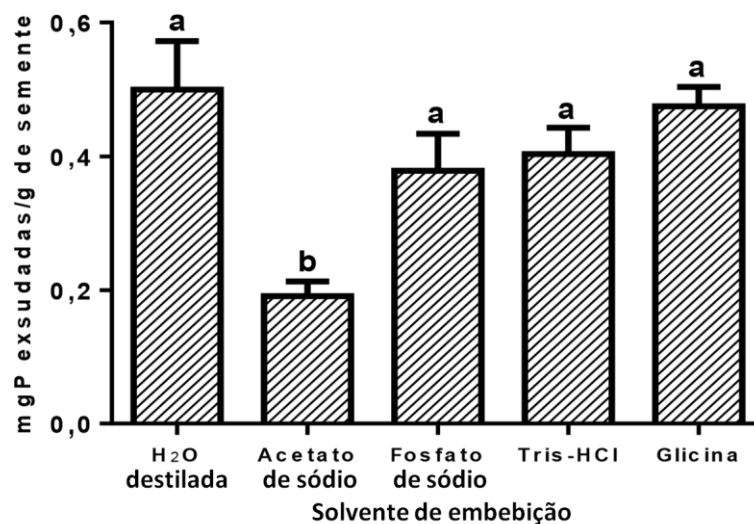
Figura 5 – Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condição desnaturante (PAGE-SDS; 12,5%) de exsudatos de sementes de moringa obtidos em diferentes tempos de contato com água destilada



Fonte: Próprio autor.

Os exsudatos de sementes de moringa obtidos após diferentes tempos foram precipitados com TCA 20% e submetidos a PAGE-SDS. M - marcadores de massa molecular (fosforilase B - 97,0 kDa; albumina sérica bovina - 67,0 kDa; albumina do ovo - 45,0 kDa; anidrase carbônica bovina - 29,0 kDa; inibidor de tripsina de soja tipo Kunitz - 20,1 kDa; α -lactalbumina - 14,4 kDa); 1 - exsudato de 1 hora (16 µgP); 2 - exsudato de 6 horas (27 µg); 3 - exsudato de 12 horas (31 µgP); 4 - exsudato de 18 horas (42 µgP) e 5 - exsudato de 24 horas (59 µgP).

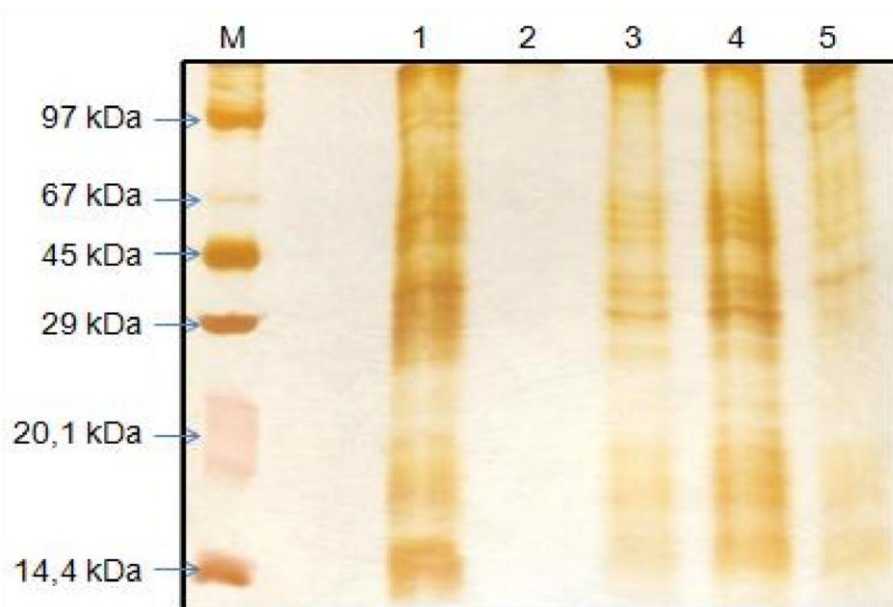
Figura 6 – Teores de proteínas exsudadas por semente de moringa quando postas em diferentes condições por 24 horas



Fonte: Próprio autor

Dez sementes de moringa foram colocadas em contato com cada um dos seguintes solventes: água destilada; acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2; fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,0; Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0 e glicina 0,05 M, pH 9,0, sendo o exsudato coletado após 24 horas. A dosagem de proteínas foi realizada através do método colorimétrico de Bradford (1976). As colunas verticais representam a média \pm desvio padrão de três repetições. O ensaio foi realizado em triplicata. Letras diferentes indicam valores que diferiram significativamente ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Figura 7 – Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condição desnaturante (PAGE SDS; 12,5%) das proteínas exsudadas de sementes de moringa quando postas em contato com diferentes solventes por 24 horas



Fonte: Próprio autor.

Amostras (10 µgP) dos exsudatos precipitados com TCA 20% foram preparadas em tampão Tris-HCl 0,125 M, contendo glicerol 12% e SDS 1%. M - marcadores de massa molecular (fosforilase B - 97,0 kDa; albumina sérica bovina - 67,0 kDa; albumina do ovo - 45,0 kDa; anidrase carbônica bovina - 29,0 kDa; inibidor de tripsina de soja tipo Kunitz - 20,1 kDa; α-lactalbumina - 14,4 kDa); 1, 2, 3, 4 e 5 correspondem a exsudatos de sementes embebidas em água destilada, acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2, fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,0, Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0 e glicina 0,05 M, pH 9,0, respectivamente.

A natureza dos metabólitos secundários detectados no exsudato de sementes de moringa está mostrada na tabela 2. Nas condições em que foram realizados os ensaios foram detectadas duas classes de metabólitos secundários: saponinas e esteroides. Os metabólitos encontrados se mantiveram no exsudato mesmo após diálise em membrana com *cut-off* de 12,4 kDa.

6.3 Detecção de proteínas bioativas relacionadas à defesa vegetal no exsudato de sementes de moringa

6.3.1 Atividade hemaglutinante

Nas condições em que os ensaios foram realizados, o exsudato de sementes de moringa não foi capaz de aglutinar eritrócitos de coelho ou de camundongo, mesmo após o tratamento do sangue com tripsina, ou com a adição de cátions divalentes ao sistema de reação (TABELA 3).

6.3.2 Atividade inibitória de protease serínica

O exsudato de sementes de moringa foi capaz de inibir a hidrólise do substrato BApNA pela enzima tripsina, indicando a presença de inibidor(es) de tripsina em sua composição. A atividade específica apresentada pela amostra foi de $168,02 \pm 2,55$ UI/mgP, como pode ser visto na Tabela 3.

6.3.3 Atividade inibitória de protease cisteínica

O exsudato de sementes de moringa foi capaz de inibir a ação da enzima papaína sobre o substrato BANA, o que significa dizer que há inibidor de protease cisteínica em sua composição. A atividade específica apresentada pela amostra foi de $74,05 \pm 1,10$ UA/mgP (TABELA 3).

6.3.4 Atividade proteolítica

O exsudato de sementes de moringa apresentou atividade proteolítica, com valor de atividade específica de $213,33 \pm 7,55$ UAPr/mgP (TABELA 3).

Tabela 2 – Detecção de metabólitos secundários em exsudato de sementes de moringa após contato com água por 24 horas

Metabólitos Secundários	Exsudato
Fenóis	-
Saponinas	+
Antocianinas e antocianidinas	-
Flavonas, Flavonóis e Xantonas	-
Chalconas e Auronas	-
Flavononóis	-
Leucoantocianidinas	-
Catequinas (Taninos catéquicos)	-
Flavononas	-
Alcaloides	-
Esteroides	+
Triterpenoides	-

Fonte: Próprio autor

Exsudato de sementes de moringa, não dialisado, foi avaliado quanto à composição de metabólitos secundários. Detecção baseada em observação a olho nu através de modificação de cor ou formação de precipitado, após a adição de reagentes específicos segundo Matos (1999). Sinais (+) ou (-) indicam presença ou ausência, respectivamente, do metabólito secundário.

Tabela 3 – Detecção e quantificação de proteínas bioativas presentes no exsudato de sementes de moringa após contato com água por 24 horas

Atividade	Exsudato
Hemaglutinante ^a (UH/mgP)	Não detectada
Inibitória de tripsina ^b (UI/mgP)	168,02 ± 2,55
Inibitória de papaína ^c (UI/mgP)	74,05 ± 1,10
Proteolítica ^d (UA/mgP)	213,33 ± 7,55
Quitinásica ^e (nkatal /mgP)	0,15 ± 0,00
β-1,3-glucanásica ^f (nkatal/mgP)	Não detectada
Peroxidásica ^g (UAP/mgP)	Não detectada

Fonte: Próprio autor

^aUma unidade hemaglutinação (UH) correspondente ao valor recíproco da maior diluição na qual ainda se visualiza aglutinação de eritrócitos; ^b Uma unidade de inibição da atividade de protease serínica (UI) corresponde a quantidade de inibidor capaz de reduzir a atividade da tripsina em 0,01 da absorbância a 410 nm; ^c Uma unidade de inibição da atividade antipapainásica (UI) corresponde a quantidade de inibidor que reduz a atividade da papaína em 0,01 da absorbância a 540 nm; ^d Quantidade de radicais “azo” liberados, necessários para aumentar a absorbância a 420 nm, em 0,01 unidade de absorbância; ^e nKat representa a quantidade, em nanomol, de N-acetil-D-glucosamina liberada por hidrólise da quitina coloidal, nas condições do ensaio; ^f nKat representa a quantidade, em nanomol, de glucose liberada por hidrólise da laminarina, nas condições do ensaio; ^g Uma unidade de atividade peroxidásica (UAP) foi definida como a variação de uma unidade de absorbância a 470 nm; Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

6.3.5 Atividade quitinásica

O exsudato de sementes de moringa apresentou atividade quitinásica, uma vez que foi capaz de promover a hidrólise do polímero quitina nas condições experimentais empregadas. A atividade apresentada foi de 0,15 nkatal/mgP (TABELA 3).

6.3.6 Atividade β -1,3-glucanásica

O exsudato de sementes de moringa não apresentou atividade β -1,3-glucanásica (TABELA 3).

6.3.7 Atividade peroxidásica

O exsudato de sementes de moringa não apresentou atividade peroxidásica (catalase, peroxidase do ascorbato e peroxidase de fenóis) nas condições testadas.

6.4 Imunodeteção da proteína *Mo*-CBP₃ no exsudato de sementes de moringa

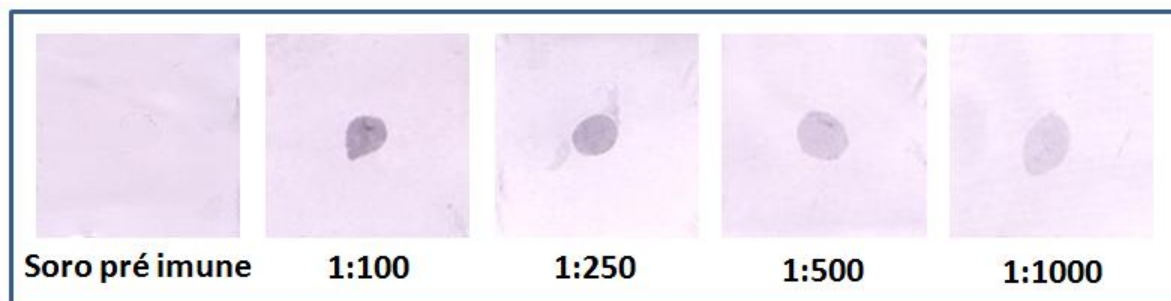
6.4.1 Produção de anticorpos policlonais anti-*Mo*-CBP₃

A Figura 8 mostra os resultados do ensaio de dot blotting usado para determinar o título dos anticorpos primários anti-*Mo*-CBP₃. Os anticorpos policlonais foram capazes de reconhecer a proteína *Mo*-CBP₃ nas quatro diluições utilizadas no ensaio, até mesmo na diluição 1:1000.

6.4.2 Presença de *Mo*-CBP₃ nos exsudatos de sementes de moringa obtidos em diferentes tempos

Mo-CBP₃ se mostrou presente nos exsudatos obtidos em diferentes tempos (1, 6, 12, 18 e 24 horas). A sua exsudação acompanhou a de outras proteínas, conforme quantificação pela técnica de ELISA, tendo sido detectada uma

Figura 8 – *Dot blotting* para determinação do título do anticorpo primário anti-*Mo-CBP₃*



Fonte: Próprio autor.

Dot blotting utilizando anticorpos policlonais anti-*Mo-CBP₃* produzido em coelho, nas diluições de 1:100, 1:250, 1:500 e 1:1000 (v/v). Em cada membrana de nitrocelulose, 2 μ gP de *Mo-CBP₃* purificada de sementes de moringa foram imobilizados.

maior exsudação após 24 horas de contato das sementes com a água, cujo valor foi $0,93 \pm 0,09 \mu\text{gP/g}$ de semente) (TABELA 4).

6.5 Purificação de *Mo-CBP*₃ a partir do exsudato de sementes

6.5.1 Cromatografia em matriz de quitina

A aplicação do exsudato obtido após contato das sementes de moringa com água por 24 horas resultou na obtenção de um material proteico não retido, retirado em um único pico com o tampão de equilíbrio, e de uma fração proteica retida eluída com ácido clorídrico 0,1 M (FIGURA 9). Para designar a fração proteica eluída com ácido clorídrico foi adotada a sigla P_{HCl} que será a partir de agora empregada neste trabalho. P_{HCl} foi reconhecido pelo anticorpo anti-*Mo-CBP*₃ conforme mostra a Figura 10, confirmando a exsudação dessa proteína ligante à quitina pelas sementes de moringa. O rendimento médio de P_{HCl} foi de $1,47 \mu\text{gP/g}$ de semente, correspondendo a 0,26% do total de proteínas exsudadas.

6.5.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS

Os perfis eletroforéticos das frações proteicas resultantes da cromatografia em matriz de quitina estão representados na Figura 11. O material retido na matriz, proveniente do exsudato de sementes após 24 horas, apresentou perfil semelhante ao da proteína purificada das sementes, *Mo-CBP*₃, tanto na ausência como na presença do agente redutor, sobressaindo-se as bandas com massas moleculares aparentes de 18,0 e 9,0 kDa, respectivamente

6.6 Avaliação de atividades biológicas do exsudato frente a fitopatógenos

6.6.1 Atividade antifúngica

O exsudato (10 μg) de sementes de moringa não se mostrou capaz de inibir a germinação de esporos de quaisquer das espécies de fungos fitopatogênicos testadas, nas condições em que os ensaios foram realizados (FIGURA 12). Quando analisada a atividade do exsudato em outra fase de desenvolvimento do fungo, fase

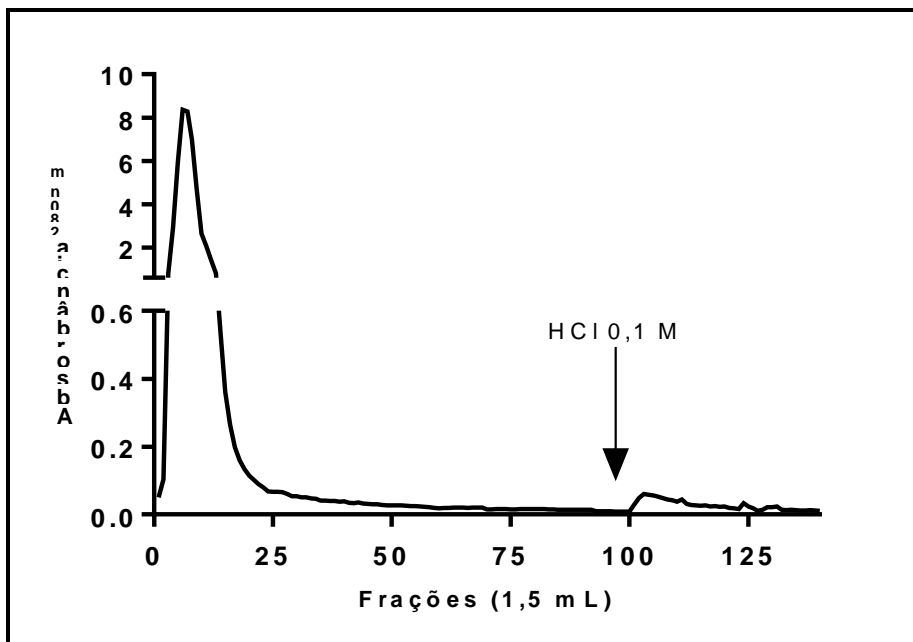
Tabela 4 – Teores de *Mo*-CBP₃ exsudados por sementes de moringa ao longo de 24 horas

Amostra	Proteínas totais	<i>Mo</i>-CBP₃
Exsudato 1 h	73,92 ± 5,05	0,03 ± 0,01a
Exsudato 6 h	176,56 ± 36,25	0,21 ± 0,04b
Exsudato 12 h	241,32 ± 13,00	0,13 ± 0,06ab
Exsudato 18 h	390,42 ± 23,99	0,13 ± 0,05ab
Exsudato 24 h	485,78 ± 39,79	0,93 ± 0,09c

Fonte: Próprio autor

A quantificação de proteínas totais do exsudato foi determinada através de técnica descrita por Bradford (1976). A quantificação de *Mo*-CBP₃ foi determinada através da técnica de ELISA indireto, usando anticorpos policlonais produzido em coelho contra a *Mo*-CBP₃ (diluição 1:1000 v/v). Os ensaios foram realizados em triplicata e três repetições. Letras diferentes indicam teores significativamente diferentes de *Mo*-CBP₃ ($p < 0,05$, teste de Tukey).

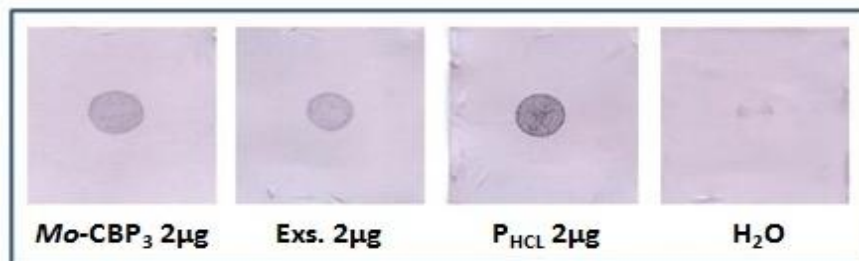
Figura 9 – Cromatografia do exsudato de sementes de moringa, obtido após contato com água por 24 horas, em matriz de quitina



Fonte: Próprio autor

Exsudato liofilizado (18 mgP) obtido após embebição de sementes de moringa com água foi posto em contato com matriz de quitina, seguido de cromatografia em coluna (6,2 x 1,4 cm). A matriz foi previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0, contendo NaCl 0,15 M. O primeiro pico representa o material não retido, eluído com tampão de equilíbrio, e o segundo pico (P_{HCl}) corresponde à fração proteica eluída com ácido clorídrico 0,1 M. Fluxo: 30 mL/h, frações: 1,5 mL.

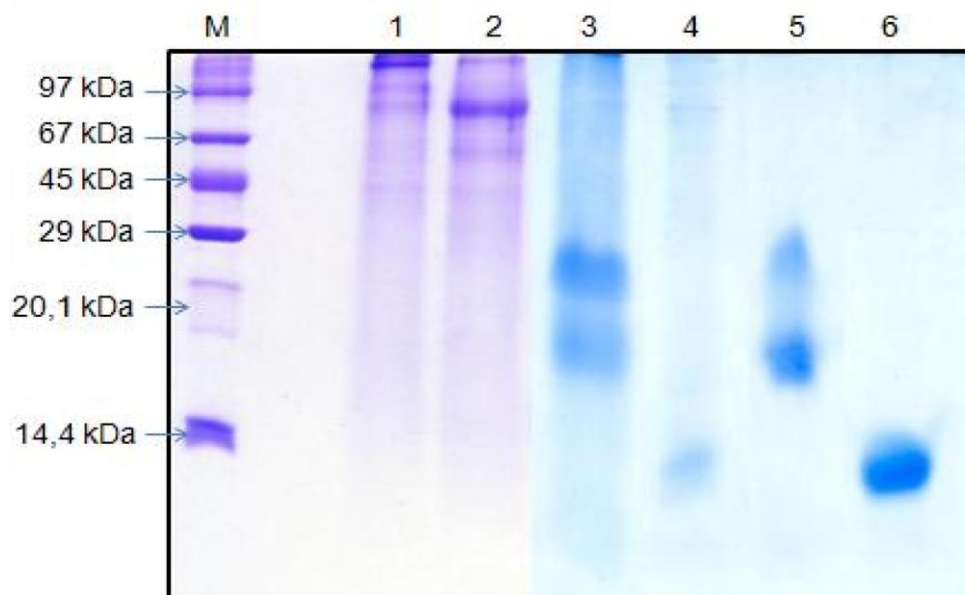
Figura 10 – Imunodeteccção de $Mo-CBP_3$ na fração retida em matriz de quitina usando o anticorpo primário anti- $Mo-CBP_3$



Fonte: Próprio autor.

Dot blotting utilizando anticorpos policlonais anti- $Mo-CBP_3$ (1:1000; v/v). $Mo-CBP_3$: proteína ligante à quitina purificada das sementes de moringa; Exs: exsudato de sementes de moringa após contato com água por 24 horas; P_{HCl}: fração proteica retida na matriz de quitina, eluída com ácido clorídrico 0,1 M e H₂O: controle negativo.

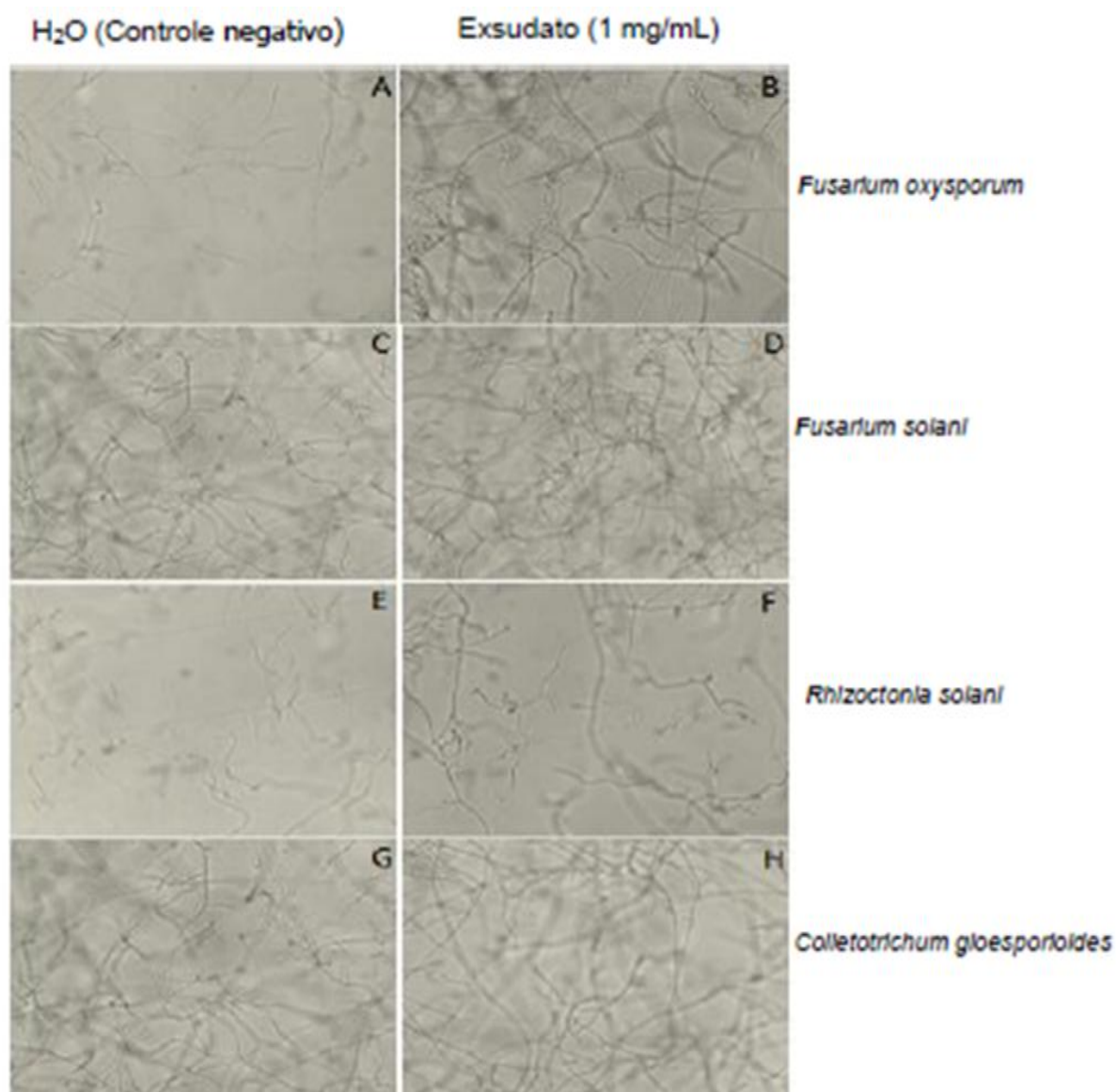
Figura 11 – Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (PAGE-SDS; 12,5%), na ausência e presença de β -mercaptoetanol, das frações resultantes do exsudato de sementes de moringa após cromatografia em matriz de quitina



Fonte: Próprio autor

O gel foi revelado com “Coomassie Brilliant Blue” R-250 a 0,05%. M - marcadores de massa molecular (fosforilase B - 97,0 kDa; albumina sérica bovina - 67,0 kDa; albumina do ovo - 45,0 kDa; anidrase carbônica bovina - 29,0 kDa; inibidor de tripsina de soja tipo Kunitz - 20,1 kDa; α -lactalbumina - 14,4 kDa); 1 e 2: Fração não retida (PnR) na matriz de quitina sem e com β -mercaptoetanol, respectivamente; 3 e 4: Fração eluída com ácido clorídrico 0,1 M (P_{HCl}) sem e com β -mercaptoetanol, respectivamente; 5 e 6: $Mo-CBP_3$ purificada de sementes de moringa na ausência e presença de β -mercaptoetanol, respectivamente.

Figura 12 – Fotomicrografia em microscópio óptico da germinação de conídios de diferentes fungos fitopatogênicos incubados com exsudato de sementes de moringa, obtido após contato com água destilada, por 24 horas



Fonte: Próprio autor.

de crescimento, dessa vez usando leveduras como modelo, resultados inibitórios não foram observados, com exceção do teste realizado com *C. parapsilosis*, cujo crescimento foi menor em relação ao controle, particularmente quando considerado o exsudato não dialisado e o tempo de 24 horas (FIGURA 13).

6.6.2 Atividades nematicida e nematostática

O exsudato de sementes de moringa, na concentração de 4 µgP/J2, causou um percentual de mortalidade de cerca de 97% da população de J2. A amostra foi ainda capaz de inibir os movimentos da totalidade dos indivíduos sobreviventes (cerca de 3%). Na concentração de 8 µgP/J2, o exsudato causou um percentual de mortalidade de 100%, tal como pode ser observado na Tabela 5. Após fervura a 100 °C, por 30 minutos, na concentração de 4 µgP/J2, o exsudato manteve ainda uma atividade nematicida, tendo atingido um percentual de cerca de 64% de J2 mortos e 7% de indivíduos imóveis. Para o grupo controle (água destilada), praticamente não foi verificada mortalidade (0,5%).

6.7 Detecção de *Mo*-CBP₃ em raízes de plântulas de moringa

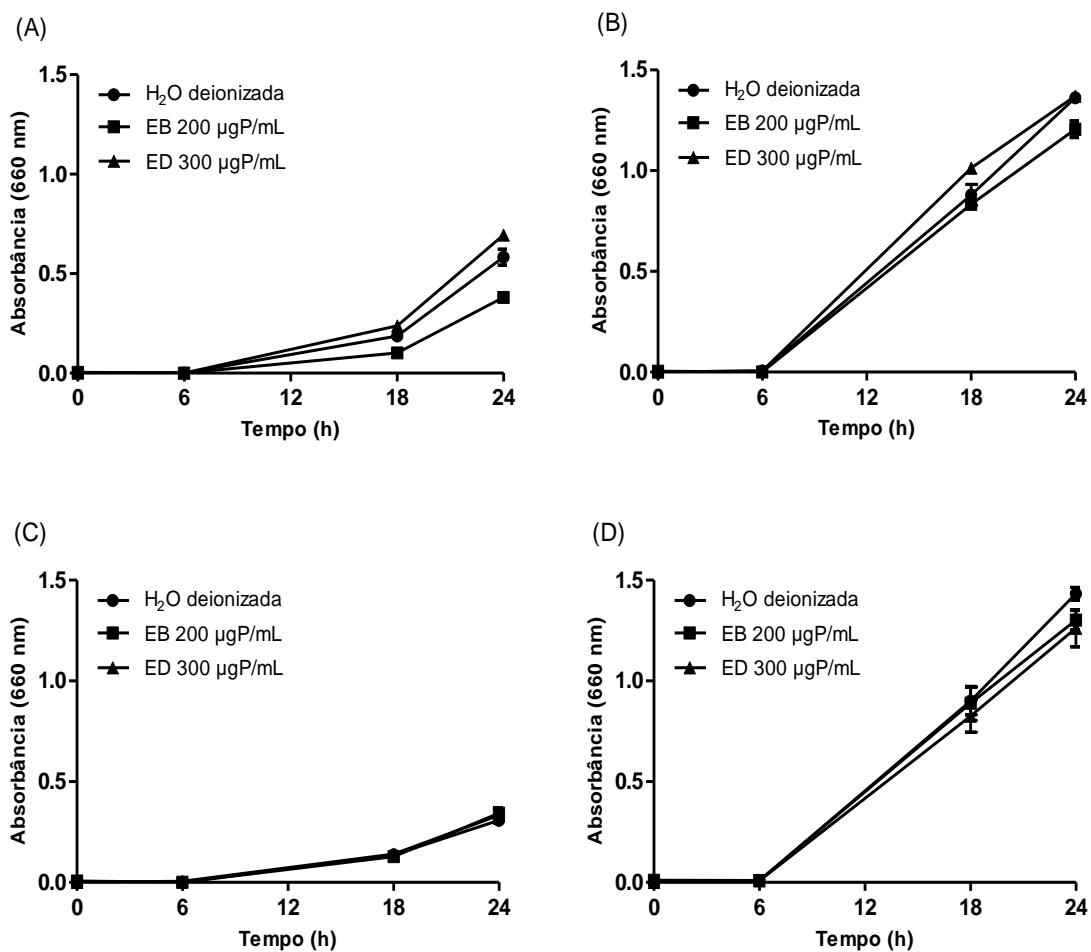
6.7.1 Extração de proteínas das raízes de plântulas

Na Tabela 6, estão apresentadas as concentrações proteicas de extratos de raízes de moringa, as quais correspondem, em média, a 119,36 e 139,33 µgP/mL para plântulas de 15 e 30 dias, respectivamente.

6.7.2 Imunodetecção de *Mo*-CBP₃ nas raízes das plântulas

Dentre as diferentes proteínas presentes nos extratos de raízes de plântulas com 15 e 30 dias após o plantio, está a *Mo*-CBP₃, identificada através do uso de anticorpos anti-*Mo*-CBP₃, pela técnica de Elisa. As concentrações de *Mo*-CBP₃ no extrato bruto foram estimadas em 6,44 e 6,52 µgP/mL, o que corresponde a 18,02 e 18,26 µg de *Mo*-CBP₃/mg de tecido (raízes) de plântula de 15 e 30 dias respectivamente. Tais valores representam em torno de 5,4% e 4,7%, respectivamente, das proteínas totais extraídas das raízes de plântulas de moringa (TABELA 6).

Figura 13 – Efeito do exsudato de sementes de moringa, obtido após contato com água destilada, por 24 horas, sobre o crescimento de leveduras



Fonte: Próprio autor

(A): *Candida parapsilosis*; (B): *C. tropicalis* (B); (C) *C. albicans* e (D) *Saccharomyces cerevisiae* meio “yeast potato dextrose” (YPD), na presença de exsudato bruto (EB) e exsudato dialisado (ED). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Tabela 5 – Porcentagem de J2 de *Meloidogyne incognita* mortos e inativos após 24 horas de exposição ao exsudato de sementes de moringa e a Mo-CBP₃ pura

Tratamentos	J2 mortos	J2 imoveis
Controle (H ₂ O)	0,5 ± 0,9a	0a
Exsudato ^a (4 µgP/J2)	96,5 ± 0,7b	3,0 ± 0,1b
Exsudato aquecido ^b 4 µgP/J2	63,6 ± 1,5c	7,2 ± 0,9d
Exsudato ^a (8 µgP/J2)	100,0b	0a
Exsudato aquecido ^b (8 µgP/J2)	100,0b	0a

Fonte: Próprio autor

Exsudato de sementes de moringa após contato com água destilada por 24 horas; Exsudato, obtido nas mesmas condições e fervido (98 °C), por 30 minutos; ^a Proteína ligante à quitina, Mo-CBP₃, purificada de sementes de moringa. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Letras diferentes indicam valores que diferiram significativamente (p < 0,05) pelo Teste de Tukey.

Tabela 6 – Concentração proteica e detecção de *Mo*-CBP₃ em raízes de plântulas de moringa

Amostra	Proteínas totais	<i>Mo</i> -CBP ₃ ^a
	(µgP/g de sementes)	
Raízes 15 dias após plantio	334,21 ± 30,77	18,03 ± 0,98
Raízes 30 dias após plantio	390,12 ± 66,61	18,26 ± 0,87

Fonte: Próprio autor

^aA presença de *Mo*-CBP₃ nos extratos proteicos de raízes de *M. oleifera* foi detectada através da técnica de ELISA indireto, usando anticorpos policlonais produzidos em coelho contra a proteína MoCBP₃ (diluição 1:750; v/v). Os ensaios foram realizados em triplicata, com três repetições. Letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes de *Mo*-CBP₃ ($p < 0,05$, Teste de Tukey).

6.7.3 Detecção de transcritos de RNA para Mo-CBP₃ em raízes de plântulas

A massa de RNA total extraídos a partir de 100 mg de raízes de plântulas com 15 e de 30 dias após o plantio foi 1719 µg e 759 µg, respectivamente (TABELA 7). O perfil eletroforético das amostras de RNA obtidas revelou, para cada uma delas, o aparecimento de duas bandas nas alturas correspondentes a 28S e 18S. Após o tratamento com a enzima DNase e purificação, como descritos na seção Métodos, as quantificações de RNA total purificado das raízes de plântulas com 15 e 30 dias após a germinação corresponderam a 390 µg e 202 µg de RNA, respectivamente (TABELA 8). Quando utilizados iniciadores específicos desenhados para o gene da MoCBP₃, foram detectados transcritos de RNA em raízes de plântulas de moringa com 15 e 30 dias após o plantio, representados pelas três bandas predominantes, em torno de 412 pb (FIGURA 14).

Tabela 7 – Rendimento de RNA total obtido de raízes de plântulas de moringa

Amostra (100 mg)	Concentração ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	A_{260}	A_{260}/A_{280}	Fator	RNA/ g de tecido (μg)
Raízes 15 DAP	5,73	2,87	1,62	40	1719
Raízes 30 DAP	2,53	1,26	1,68	40	759

Fonte: Próprio autor

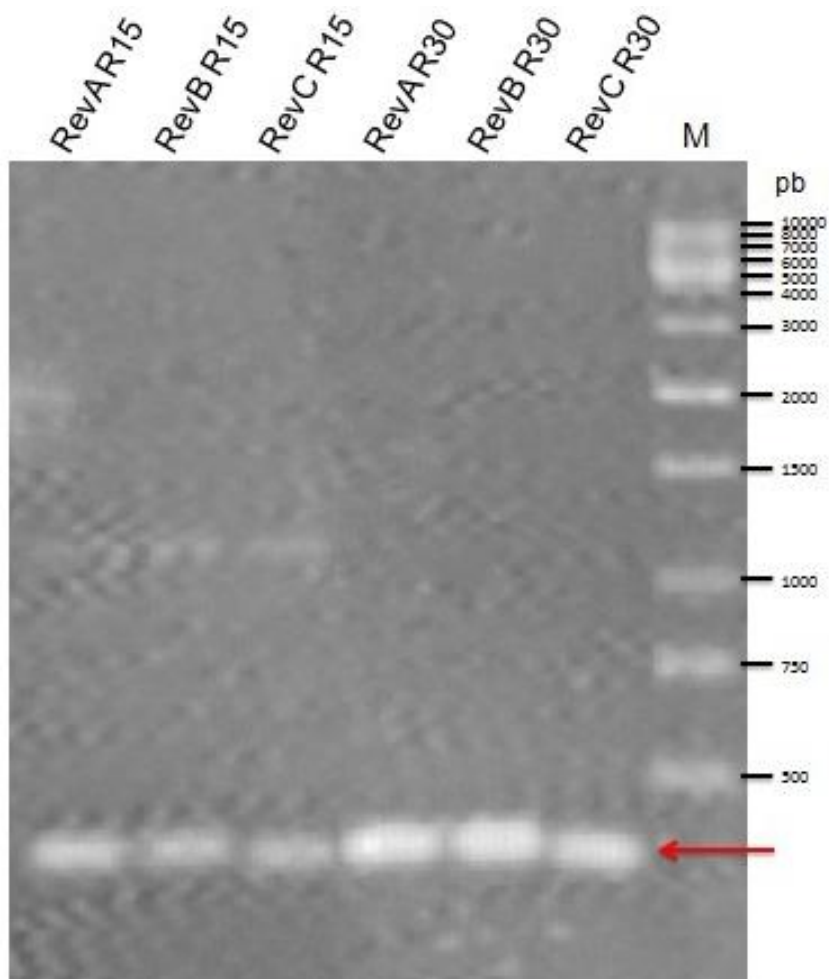
RNA foi obtido utilizando o Concert Plant Reagent.

Tabela 8 – Rendimento de RNA purificado de raízes de plântulas de moringa

Amostra (100 mg)	Concentração ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	A₂₆₀	A₂₆₀/A₂₈₀	Fator	RNA/g de tecido (μg)
Raízes 15 DAP	1,30	0,65	1,84	40	390
Raízes 30 DAP	0,67	0,34	1,93	40	202

Fonte: Próprio autor.

Figura 14 – Eletroforese em gel de agarose (1,2%) dos produtos de PCR usando iniciadores específicos para o gene da *Mo-CBP₃*



Fonte: Próprio autor

As siglas RevA, RevB e RevC foram adotadas em referência aos iniciadores antisense usados. Os números 15 e 30 são abreviações de 15 e 30 dias após o plantio. A seta vermelha indica o produto amplificado (412 pb), confirmando a presença de *Mo-CBP₃* nas raízes das plântulas de moringa. M: Marcadores de massa molecular.

7 DISCUSSÃO

7 DISCUSSÃO

Moringa oleifera é uma espécie arbórea muito cultivada em diversas partes do mundo, que apresenta elevada resistência a patógenos. Existem vários trabalhos científicos que relatam a atividade deletéria da moringa contra diversos herbívoros e patógenos, incluindo bactérias (RAHMAN; ALAM, 2009; WALTER et al., 2011), fungos (JABEEN et al., 2008; GIFONI et al., 2012), nematoides (CLAUDIUSCOLE; AMINU; FAWOLE, 2010; ISMAIL, 2013) e insetos (RACE et al., 2012). Entretanto, são escassos, ou mesmo inexistentes, pelo menos até a presente data, trabalhos com foco na avaliação da composição e atividades biológicas do exsudato de sementes de moringa. Em consonância com tais fatos, o conhecimento das propriedades do exsudato de sementes de moringa torna-se relevante, pelo fato da exsudação ser um processo vegetal que consiste na externalização de alguns constituintes químicos, capazes de inibir a proliferação de parasitas e a predação durante a germinação (NELSON, 1990). Assim sendo, o presente trabalho tem como ênfase a caracterização do exsudato de sementes de moringa quanto à presença de compostos relacionados à defesa vegetal e atividade inibitória frente à fitopatógenos. Um destaque será dado aos componentes de natureza proteica, em particular MoCBP₃, por suas propriedades ligantes à quitina e atividade antifúngica e, também, por ser objeto de estudo do nosso grupo de pesquisa.

Para caracterização do exsudato das sementes de moringa, primeiramente, buscou-se definir as melhores condições de exsudação. O primeiro parâmetro a ser testado foi o tempo, tendo sido observado que a exsudação de proteínas aumentava com o passar das horas (FIGURA 4). No entanto, até 24 horas, não era percebida deterioração do material exsudado. Já após esse tempo, os sinais de ruína (odor, precipitação, mudança de coloração etc.) tornavam-se patentes. Adicionalmente, foi avaliada a influência do solvente no teor de proteínas exsudadas. Com exceção do ocorrido com o tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2, os exsudatos obtidos com água e demais tampões testados não apresentaram diferenças significativas no seu teor de proteínas, quando coletados após 24 horas (FIGURA 6). Entretanto, com os tampões em pHs mais elevados, uma forte pigmentação foi observada nos exsudatos. Neste caso, a água foi considerada o melhor solvente, rendendo, após 24 horas, um exsudato encerrando um teor médio de proteínas de 0,567 mgP/g de semente. De acordo com Nelson (2004), a

quantidade e a qualidade do material liberado durante a exsudação podem ser influenciadas por uma série de fatores ambientais, como pH e temperatura. Além disso, teoricamente, qualquer componente de uma célula vegetal pode ser liberado durante a exsudação de sementes. Porém, nem todos eles podem estar presentes em um exsudato ao mesmo tempo, pois enquanto algumas moléculas são liberadas logo no início de embebição, outros podem ser liberados somente após um tempo considerável depois de a semente ter sido plantada. Neste caso, é complexo estabelecer padrões de coleta, análise e quantificação destes componentes, logo, tornam-se também difíceis as comparações de análises quantitativas ou qualitativas entre diferentes estudos.

Procedendo com a caracterização da composição do exsudato, a presença de metabólitos secundários foi verificada, em destaque, saponinas e esteroides (TABELA 2). Em particular, as saponinas são substâncias, geralmente, relacionadas com o sistema de defesa, podendo ser encontradas em tecidos que são mais vulneráveis ao ataque por fungos, bactérias ou insetos (WINA; MUETZEL; BECKER, 2005). O comportamento anfifílico das saponinas e a capacidade de formar complexos com proteínas, fosfolipídios e esteroides de membranas possibilitam ações biológicas variadas, podendo alterar a permeabilidade ou até mesmo destruir membranas celulares (SCHENKEL et al., 2001). A presença de saponinas foi detectada até mesmo no exsudato dialisado, usando membrana com cut-off de 12,4 KDa. É possível que as saponinas tenham se complexado com esteroides, ou mesmo com proteínas do exsudato, impossibilitando sua saída através dos poros da membrana.

Uma vez analisada a presença de compostos secundários no exsudato, foi também investigada a presença de proteínas bioativas nesse material, em particular, daquelas relacionadas à defesa vegetal. As proteínas avaliadas incluíram protease, β -1,3-glucanase, quitinase, lectina, inibidor de tripsina, inibidor de papaína e peroxidase. Nessa avaliação, foi utilizado tanto o exsudato bruto como o exsudato dialisado (dados não mostrados). Todas as atividades foram detectadas no exsudato bruto, menos a peroxidásica e a hemaglutinante (TABELA 3). Após diálise (cut-off de 12,4 kDa) contra água destilada, as atividades específicas de protease, quitinase e de ambos os inibidores de proteases foram aumentadas, provavelmente devido à saída de alguns componentes de baixa massa molecular ou mesmo de algum componente inibitório de tais atividades. No que diz respeito às propriedades dos

componentes proteicos detectados nos exsudatos, as proteases, por exemplo, são importantes não apenas para a hidrólise de proteínas de armazenamento, como também são responsáveis pela rotatividade de proteínas, modificações pós-traducionais, ativação e inativação de enzimas, além de participarem da defesa da planta (SCHALLER, 2004). Estas proteases têm sido bastante estudadas, principalmente por sua importância em processos adaptativos para sobrevivência da planta aos mais diversos tipos de estresses (SIMOVA-STOILOVA et al., 2010) e desenvolvimento vegetal (PALMA et al., 2002). Com relação às β -1,3-glucanases e quitinases, estas enzimas são consideradas proteínas genuinamente antifúngicas, pois, podem atuar diretamente na parede celular de fungos, hidrolisando os polímeros que a constituem, enfraquecendo-a, tornando as células osmoticamente sensíveis (GUZZO, 2003; VAN LOON; REP; PIETERCE, 2006) e liberando oligossacarídeos (elicitors), capazes de regular o estado de imunização da planta (AMBORABÉ et al., 2008; CAVALCANTI et al., 2008). Apesar de sua associação à atividade antifúngica, as quitinases também podem ser responsáveis por atividades nematocidas, uma vez que quitina faz parte da constituição da cutícula de nematoides (ASENSIO et al., 2000). Quanto aos inibidores de proteases, vários estudos têm sido realizados visando seu uso no controle de pragas (fungos, nematoides e insetos) que atacam plantas (BENCHABANE et al., 2008; MOSOLOV; VALUEVA, 2008; LOPES et al., 2009). Além da função protetora nas plantas, há evidências de que alguns inibidores regulam proteases endógenas durante o desenvolvimento e germinação da semente (KADOZAWA; FIGUEIRA; HIROOKA, 2002; GIANOTTI et al., 2006). Embora a moringa seja uma planta muito estudada, são poucos os estudos sobre inibidores de proteases de suas sementes e, ainda, não há relato da purificação de um inibidor de protease cisteínica.

Outro dado importante foi a imunodeteção de *Mo*-CBP₃ (“*Moringa oleifera* chitin-binding protein”) nos exsudatos de sementes de moringa, em particular naquele obtido com 24 horas (TABELA 4). *Mo*-CBP₃ apresenta massa molecular aparente de 18,0 kDa em condições não redutoras e ponto isoelétrico de 10,8. Trata-se de uma glicoproteína com 2,5% de carboidratos, que não apresenta atividades hemaglutinante, quitinásica e β -1,3 glucanásica, porém é capaz de inibir a germinação de conídios de vários fungos fitopatogênicos de relevância agrícola, em concentrações muito baixas (0,1 mgP/mL) e mesmo quando tratada termicamente a 100 °C, por 1 hora (GIFONI et al., 2012). A presença de *Mo*-CBP₃ no exsudato de

sementes de moringa foi confirmada após cromatografia em matriz de quitina e análise do material retido ou P_{HCl} por *dot blotting* e eletroforese em gel de poliacrilamida (FIGURAS 9, 10 e 11). P_{HCl} corresponde a 0,26% do total de proteínas exsudadas, é reconhecido pelo anticorpo anti-*Mo-CBP₃* e apresenta perfil eletroforético similar ao da *Mo-CBP₃* purificada de sementes de moringa.

Uma vez constatada a presença de classes de proteínas relacionadas à defesa vegetal, foi realizada a prospecção de atividades contra fungos, alguns deles capazes de atacar predominantemente raízes, bem como contra o nematoide das galhas *Meloidogyne incognita*, um fitonematoide endoparasita obrigatório que infecta várias espécies vegetais e está entre os fitopatógenos mais prejudiciais do mundo (ABAD et al., 2003; 2008).

Na avaliação da atividade antifúngica, foi investigada a ação do exsudato de sementes de moringa sobre duas fases do ciclo de vida do fungo: germinação e crescimento. No ensaio de inibição da germinação, foram selecionados os fungos, *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Rizoctonia solani* e *Coletotrichum gloesporioides*, quatro fitopatógenos responsáveis por grandes perdas econômicas, devido às doenças que causam em diversas culturas importantes. Apesar de apresentar várias atividades enzimáticas atribuídas a proteínas de defesa, o exsudato (10 µg) não foi capaz de inibir a germinação dos esporos de nenhuma das espécies de fungos testadas (FIGURA 12). Em relação ao ensaio de inibição do crescimento, foram utilizados como modelos experimentais fungos leveduriformes, tendo em vista os resultados negativos com fungos filamentosos relatados anteriormente e, principalmente, por serem de fácil manuseio e rápido desenvolvimento, sendo, portanto, ideal para esse tipo de análise. As leveduras utilizadas foram *Candida parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*. Ainda assim, resultados inibitórios não foram observados, com exceção do teste realizado com *C. parapsilosis*, cujo crescimento foi menor em relação ao controle, particularmente quando considerado o exsudato não dialisado (FIGURA 13). A falta de atividade pode ter ocorrido pelo fato de as proteínas estarem muito diluídas no exsudato. Além disso, a possível complexação das saponinas e esteróis com proteínas bioativas poderia ocasionar a perda de sua atividade, ao passo que a concentração do exsudato por liofilização também poderia ter levado à inativação de proteínas por desnaturação. Para responder a esses questionamentos, mais avaliações precisam ser realizadas.

Com relação à atividade nematicida/nematostática, o exsudato de sementes de moringa (4 µgP/J2), mesmo após fervura por 30 minutos, foi capaz de matar 63,6% dos indivíduos, perdendo apenas parte da letalidade que teve em condições normais (sem fervura), que foi de 96,5%. Esta redução na letalidade pode ser atribuída a uma desnaturação parcial das proteínas exsudadas (TABELA 5). No entanto, na concentração de 8 µgP/J2, os exsudatos, tanto fervido como não fervido, mostraram 100% de letalidade. Considerando-se que o exsudato de sementes de moringa é constituído, principalmente, por proteínas (proteases, inibidores de proteases, quitinase, β-1,3-glucanase e *Mo*-CBP₃) e compostos secundários (saponinas e esteróis), é provável que alguns destes constituintes proteicos sejam responsáveis pelo efeito negativo do exsudato sobre *M. incognita*. O fato de o exsudato conservar boa parte de sua atividade nematicida e nematostática, mesmo após 30 minutos de fervura, não descarta essa possibilidade apontada, visto que muitas proteínas podem apresentar termoestabilidade.

Dentre os poucos trabalhos que demonstram o efeito de exsudatos de sementes sobre pragas, destaca-se aquele de Rocha (2011), o qual demonstrou a atividade do exsudato de sementes de soja contra J2 de *M. incognita*. No entanto, sua ação parece se dever à redução da mobilidade dos J2, e não à mortalidade. Com foco também neste tipo de atividade, Santi-Gadelha e colaboradores (2012), testando uma proteína (0,5 mgP/mL) purificada de sementes de *Acacia farnesiana*, verificaram inibição da mobilidade de quase 50% dos J2 de *M. incognita*, ou seja, eles permaneceram imóveis mas não morreram. Este resultado apenas pôde ser visualizado depois de 48 horas de incubação. No presente trabalho, utilizando-se o exsudato de sementes de moringa na concentração de 1,3 mgP totais/mL, ou seja, proteínas de vários tipos em concentrações individuais bem menores, foi verificada uma letalidade de 96,5% em apenas 24 h de incubação. Quanto aos sobreviventes, foi verificado que a maior parte deles teve sua mobilidade prejudicada, pois quase 100% dos sobreviventes ficaram imóveis (TABELA 5).

Contrastando com a escassez de dados provenientes de estudos com proteínas exsudadas ou purificadas de sementes em testes de atividade contra nematoides, vários trabalhos têm descrito o efeito deletério de exsudatos de raízes de diversas plantas contra J2 de *M. incognita*. Awad e colaboradores (1997) constataram que o exsudato de raízes de alho, cebola e tomate causam elevada mortalidade a esses organismos. Zhao, Schmitt e Hawes (2000) demonstraram que

os exsudatos de células de extremidades de raízes de feijão, ervilha, milho e alfafa reduziram a mobilidade de mais de 80% dos nematoides, mesmo, sendo estas espécies vegetais, hospedeiras do *M. incognita*. Em outro estudo, utilizando culturas de células de tomate, alfafa, café, mostarda, cenoura, orquídea, *Crotalaria juncea*, batata doce e tabaco, Rocha e Campos (2004) verificaram que todas as culturas inibiram acentuadamente a mobilidade de J2 de *M. incognita*; porém, ao contrário dos resultados mostrados no presente trabalho, não causaram mortalidade elevada. Tendo em vista os seguintes fatos: (1) a raiz é um órgão vegetal que tem como uma de suas principais funções a absorção de água e a exsudação é um fenômeno relacionado a esse processo; (b) a ocorrência de várias proteínas, dentre elas *Mo-CBP₃*, no exsudato de sementes de moringa e a expressiva atividade deste contra nematoides; (c) a presença de quitina ocorre em nematoides, como no caso do *M. incognita* e (d) nematoides são capazes de interagir diretamente com as raízes, surgiu a indagação se *Mo-CBP₃* estaria presente em raízes de plântulas de moringa, podendo, dessa forma, contribuir para os efeitos negativos aqui relatados. Assim sendo, como abordagem inicial, a presença de *Mo-CBP₃* foi investigada já nos estágios iniciais do desenvolvimento da moringa. Os resultados obtidos por ELISA demonstram, em raízes de plântulas com 15 e 30 dias, o reconhecimento proteico pelo anticorpo anti-*Mo-CBP₃*, cujos teores dessa proteína corresponderam a 6,44 e 6,52 µgP/mL, respectivamente, não havendo, portanto diferença significativa entre eles (TABELA 6). A presença de *Mo-CBP₃* foi ratificada pela técnica de RT-PCR, que revelou a existência de RNA mensageiro referente ao gene que codifica para a *Mo-CBP₃*, indicando que o gene dessa proteína é expresso em raízes (FIGURA 14). Como etapa posterior, pretende-se testar a atividade de *Mo-CBP₃* contra nematoides.

Os dados, em conjunto, motivam à afirmativa de que a exsudação é um fenômeno relevante para a germinação da semente e o estabelecimento da plântula, em que proteínas desempenham funções essenciais já nos estágios iniciais do desenvolvimento desta planta arbórea, dentre elas a sua proteção contra patógenos.

8 CONCLUSÃO

8 CONCLUSÃO

O exsudato de sementes de *Moringa oleifera* contém diversas moléculas envolvidas na defesa vegetal, incluindo metabólitos secundários e proteínas relacionadas à defesa vegetal, dentre estas, a proteína ligante à quitina, denominada *Mo-CBP₃*. Esse exsudato apresentou potente atividade contra o nematoide das galhas *Meloidogyne incognita*, um parasita capaz de interagir diretamente com raízes vegetais. É possível que *Mo-CBP₃* tenha participação importante na interação planta-patógeno, em particular *M. oleifera-M. incognita*, uma vez que essa proteína também está presente na raiz, corroborando, assim, com o papel fisiológico de defesa que tem sido atribuído para essa proteína.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD, P.; FAVERY, B.; ROSSO, M. N.; CASTAGNONE-SERENO, P. Root-knot nematode parasitism and host response: molecular basis of a sophisticated interaction. **Molecular Plant Pathology**, v. 4, p. 217-224, 2003.

ABAD, P.; GOUZY, J.; AURY, J. M.; CASTAGNONE-SERENO, P.; DANCHIN, E. G. J.; DELEURY, E.; PERFUS-BARBEOCH, L.; ANTHOUARD, V.; ARTIGUENAVE, F.; BLOK, V. C.; CAILLAUD, M. C.; COUTINHO, P. M.; DASILVA, C.; LUCA, F.; DEAU, F. et al. Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. **Nature Biotechnology**, v. 26, p. 909-915, 2008.

ABE, M.; ABE, K.; KURODA, M.; ARAI, S. Corn kernel cysteine proteinase inhibitor as a novel cystatin superfamily member of plant origin, molecular cloning and expression studies. **European Journal of Biochemistry**, v. 209, p. 933-937, 1992.

AMBORABÉ, B. E.; BONMORT, J.; FLEURAT-LESSARD, P.; ROBLIN, G. Early events induced by chitosan on plant cells. **Journal of experimental Botany**, v. 59, p. 2317-2324, 2008.

ANWAR, F., BHANGER, M. I. Analytical characterization of *Moringa oleifera* seed oil grown in temperate regions of Pakistan. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 6558-6563, 2003.

ANWAR, F.; LATIF, S.; ASHRAF, M.; GILANI, A. H. *Moringa oleifera*: A food plant with multiple medicinal uses. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 17-25, 2007.

ASENSIO, J. L.; CAÑADA, F. J.; SIEBERT, H.-C.; LAYNEZ, J.; POVEDA, A.; NIETO, P. M.; SOEDJANAAMADJA, U. M.; GABIUS, H.-J.; JIMÉNEZ-BARBERO, J. Structural basis for chitin recognition by defense proteins: GlcNAc residues are bound in a multivalent fashion by extended binding sites in hevein domains. **Chemistry and Biology**, v. 7, p. 529-543, 2000.

AWAD, N. G. H.; EI-TOONY, A. M. E.; TADROUS, M. F. I.; KHALIL, M. A. I. Efficacy of root exudates and extracts of tomato, garlic and onion on *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*, *F. oxysporum f. sp. cepae* and *Meloidogyne incognita*. **Arabian Universities Journal of Agricultural Sciences**, v. 5, p. 105-120, 1997.

BAKER, B.; ZAMBRYSKI, P.; STASKAWICZ, B.; DINESH-KUMAR, S. P. Signaling in plant-microbe interactions. **Science**, v. 276, p. 726-733, 1997.

BARBOUR, W. M.; HATTERMANN, D. R.; STACEY, G. Chemotaxis of *Bradyrhizobium japonicum* to soybean exudates. **Applied and environmental microbiology**, v. 57, p. 2635-2639, 1991.

BENCHABANE, M.; GOULET, M. C.; DALLAIRE, C.; CÔTÉ, P. L.; MICHAUD, D. Hybrid protease inhibitors for pest and pathogen control a functional cost for the fusion partners? **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46, p. 701-708, 2008.
BEWLEY, J. D. Seed germination and dormancy. **Plant Cell**, v. 9, p. 1055-1066, 1997.

BOLLER, T. Biochemical analysis of chitinases and β -1,3-glucanase. In: **Molecular Plant Pathology: A Practical Approach**. Edited by GURR, S. J.; Mc PHERSON, M. J.; BOWLES, D. J., v.2, 1992.

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

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

BROWN, D. J. F.; ROBERTSON, W. M.; TRUDGILL, D. L. Transmission of viruses by plant nematodes. **Annual Review of Phytopathology**, v. 33, p. 223-249, 1995.

CÁCERES, A., CABRERA, O., MORALES, O., MOLLINEDO, P., MENDIA, P. Pharmacological properties of *Moringa oleifera*. 1: Preliminary screening for antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 33, p. 213-216, 1991.

CANDIANO, G.; BRUSCHI, M.; MUSANTE, L.; SANTUCCI, L.; GHIGGERI, G. M.; CARNEMOLLA, B.; ORECCHIA, P.; ZARDI, L.; RIGHETTI, P. G. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, v. 25, p. 1327-1333, 2004.

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.

CASELA, C.; FERREIRA, A.; PINTO, N. Doenças na cultura do milho. **Milho e Sorgo. Circular técnica**, v. 83, p. 1-14, 2006.

CAVALCANTI, F.; RESENDE M. L. V.; JUNIOR P. M. R.; PEREIRA R. B.; OLIVEIRA J. T. A. Induction of resistance against *Verticillium dahliae* in cacao by a *Crinipellis perniciosus* suspension. **Journal of Plant Pathology**, v. 90, p. 273-280, 2008.

CHAPAGAIN, B. P., WIESMAN, Z., LAHKIM, L. T. *In vitro* study of the antifungal activity of saponin-rich extracts against prevalent phytopathogenic fungi. **Industrial Crops and Products**, v. 26, p. 109-115, 2007.

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

CHUMARK, P., KHUNAWAT, P., SANVARINDA, Y., PHORNCHIRASILP, S., MORALES, N. P., PHIVTHONG-NGAM, L., RATANACHAMNONG, P., SRISAWAT, S., PONGRAPEEPORN, K. S. The *in vitro* and *ex vivo* antioxidant properties, hypolipidaemic and antiatherosclerotic activities of water extract of *Moringa oleifera* Lam. Leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, p. 439-446, 2008.

- CLAUDIUS-COLE, A. O.; AMINU, A. E.; FAWOLE, B. Evaluation of plant extracts in the management of root-knot nematode *Meloidogyne incognita* on cowpea [*Vigna unguiculata* (L) Walp] **Mycopath**, v. 8, p. 53-60, 2010.
- COIMBRA, J. L.; CAMPOS, V. P. Efeito de exsudatos de colônias e de filtrados de culturas de actinomicetos na eclosão, motilidade e mortalidade de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne javanica*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 1, p. 232238, 2005.
- COLOMBO, G., MELI, M., CAÑADA, J., ASENSIO, J. L., BARBERO, J. J. A dynamic perspective on the molecular recognition of chitooligosaccharide ligands by hevein domains. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 1039-1049, 2005.
- COSTA-LOTUFO, L. V.; KHAN, M. T. H.; ATHER, A.; WILKE, D. V.; JIMENEZ, P. C.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O. Studies of the anticancer potential of plants used in Bangladeshi folk medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, p. 21-30, 2005.
- DE GROOT, P. W. J., RAM, A. F., KLIS, F. M. Features and functions of covalently linked proteins in fungal cell walls. **Fungal Genetics and Biology**, v. 42, p. 657-675, 2005.
- DE PAULA, P. C.; Propriedade hipoglicemiante, hipocolesterolêmica e antioxidante de proteínas de folhas de *Moringa oleifera* lam. **Dissertação**, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFC, Fortaleza, 131 p., 2012.
- DI VITO, M.; CIANCIOTTA, V.; ZACCHEO, G. The effect of population densities of *Meloidogyne incognita* on yield of susceptible and resistant tomato. **Nematologia Mediterranea Journal**, v. 19, p. 265-268, 1991.
- DI VITO, M.; PARISI, B.; CATALANO, F. Effect of population densities of *Meloidogyne incognita* on common bean. **Nematologia Mediterranea Journal**, v. 32, p. 81-85, 2004.
- DI VITO, M.; VOVLAS, N.; INSERRA, R. N. Influence of *Meloidogyne incognita* on growth of corn in pots. **Plant Disease**, v. 64, p. 1025-1026, 1980.
- DOERGE, D. R.; DIVI, R. L.; CHUCHWELL, M. I. Identification of the colored guaiacol oxidation product produced by peroxidases. **Analytical Biochemistry**, v.250, p. 1017, 1997.
- DONG, L. Q.; ZHANG, K. Q. Microbial control of plant-parasitic nematodes: a fiveparty interaction. **Plant and Soil**, v. 288, p. 31-45, 2006.
- EMMERT, E. B.; MILNER, J. L.; LEE, J. C.; PULVERMACHER, K. L.; OLIVARES, H. A.; CLARDY, J.; HANDELSMAN, J. Effect of canavanine from alfalfa seeds on the population biology of *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 4683-4688, 1998.
- ENGLER, J. A.; POUCKE, K. V.; KARIMI, M.; GROODT, R.; GHEYSEN, G.;

ENGLER, G; GHEYSEN, G. Dynamic cytoskeleton rearrangements in giant cells and syncytia of nematode-infected roots. **The Plant Journal** : for cell and molecular biology, v. 38, p. 12-26, 2004.

ERLANGER, B. F.; KOKOWSKY, N.; COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 95, p. 271-278, 1961.

FAHEY, J. W. *Moringa oleifera*: A review of the medical evidence for its nutritional, therapeutic and prophylactic properties. Part 1. **Trees for Life Journal**, v. 1, p. s/n, 2005.

FERNANDES, G. S. Prospecção nutricional e bioativa de sementes de dez espécies vegetais da Caatinga. **Tese**, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFC, Fortaleza, 331 p., 2011.

FERRAZ, L. C. B.; ASMUS, G. L.; CARNEIRO, R. G.; MAZAFFERA, P.; SILVA, J. F. V. As meloidoginoses da soja: passado, presente e futuro In: *Relações parasitohospedeiro nas meloidoginoses da soja*. **EMBRAPA-Soja**, 2001.

FREIRE, M. G. M.; GOMES, V. M.; CORSINI, R. E.; MACHADO, O. L. T.; SIMONE, S. G.; NOVELLO, J. C.; MARANGONI, S.; MACEDO, M. L. R. Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds interfere with fungal growth. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 61-68, 2002.

GASSENSCHMIDT, U., JANY, K. D., TAUSCHER, B., NIEBERGALL, H. Isolation and characterization of a flocculating protein from *Moringa oleifera* Lam. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1243, p. 477-481, 1995.

GHASI, S.; NWOBODO, E.; OFILI, J. O. Hypocholesterolemic effects of crude extract of leaf of *Moringa oleifera* Lam in high-fat diet fed wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 69, p. 21-25, 2000.

GIANOTTI, A; RIOS, W. M.; SOARES-COSTA, A.; NOGAROTO, V.; CARMONA, A.; OLIVA, M. L. V.; ANDRADE, S. S.; HENRIQUE-SILVA, F. Recombinant expression, purification, and functional analysis of two novel cystatins from sugarcane (*Saccharum officinarum*). **Protein Expression and Purification**, v. 47, p. 483-489, 2006.

GIFONI, J. M. Proteínas ligantes à quitina de sementes de *Moringa oleifera* Lamarck e seu papel na defesa da planta. **Dissertação**, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFC, Fortaleza, 103 p., 2005.

GIFONI, J. M.; OLIVEIRA, J. T. A.; OLIVEIRA, H. D.; BATISTA, A. B.; PEREIRA, M. L.; GOMES, A. S.; OLIVEIRA, H. P.; GRANGEIRO, T. B.; VASCONCELOS, I. M. A novel chitin-binding protein from *Moringa oleifera* seed with potential for plant disease control. **Biopolymers**, v. 98, p. 406-415, 2012.

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

GOVERSE, A.; ENGLER, J. A.; VERHEES, J.; DER KROL, S. V.; HELDER, J.; GHEYSEN, G. Cell cycle activation by plant parasitic nematodes. **Plant Molecular Biology**, v. 43, p. 747-761, 2000.

GUEVARA, A. P.; VARGAS, C.; SAKURAI, H.; FUJIWARA, Y.; HASHIMOTO, K.; MAOKA, T.; KOZUKA, M.; ITO, Y.; TOKUDA, H.; NISHINO, H. An antitumor promoter from *Moringa oleifera* Lam. **Mutation Research**, v. 440, p. 181-188, 1999.

GUZZO, S. D. Proteínas relacionadas à patogênese. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 11, p. 283-332, 2003.

HARRIER, L. A; WATSON, C. A. The potential role of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi in the bioprotection of plants against soil-borne pathogens in organic and/or other sustainable farming systems. **Pest Management Science**, v. 60, p. 149-157, 2004.

HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of atalase in tobacco leaves. **Plant Physiol.**, v. 84, p. 450-455, 1987.

HERNÁNDEZ, M.; MARGALIDA, A. Pesticide abuse in Europe: effects on the *Cinereous vulture* (*Aegypius monachus*) population in Spain. **Ecotoxicology**, v. 17, p. 264-272, 2008.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water culture method for growing plants without soil. Berkeley: California Agricultural Experimental Station, University of California. **Circular** 347, 139p., 1950.

HOAN, L. T. DAVIDE, R. G. Nematicidal properties of root extracts of seventeen plant species on *Meloidogyne incognita* [study conducted in the Philippines]. **Phillipine Agriculturist**, v.62, p. 285-295, 1979.

HOPPE, J. M; BRUN, E. J. Produção de sementes e Mudas Florestais. Santa Maria: UFSM, 125p. **Caderno Didático**, 2004.

IQBAL, A.; FRY, S. C. Potent endogenous allelopathic compounds in *Lepidium sativum* seed exudate: effects on epidermal cell growth in *Amaranthus caudatus* seedlings. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, p. 2595-2604, 2012.

ISMAIL, A. E. Feasibility of growing *Moringa oleifera* as a mix-crop along with tomato for control of *Meloidogyne incognita* and *Rotylenchulus reniformis* in Egypt. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 60, p. 1-5, 2013.

JABEEN, R.; SHAHID, M.; JAMIL, A.; ASHRAF, M. Microscopic evaluation of the antimicrobial activity of seed extracts of *Moringa oleifera*. *Pakistan Journal of Botany*, v. 40, p.1349-1358.

- JAHN, S. A. A. The traditional domestication of a multipurpose tree *Moringa stenopetala* (Bak.f.) Cuf. in the Ethiopian Rift Valley. **Ambio**, v. 20, p. 244-247, 1991.
- JL., C., KUÉ, J. Antifungal activity of cucumber β -1,3-glucanase and chitinase. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 49, p. 257-265, 1996.
- KADOZAWA, P.; FIGUEIRA E. L. Z.; HIROOKA, E. Y. Inibidores de enzimas contra *Fusarium moniliforme* durante a germinação de milho. **Ciências Agrárias**, v. 23, p. 249-258, 2002.
- KAR, A.; CHOUDHARY, B.; BANDYOPADHYAY, N. Comparative evaluation of hypoglycaemic activity of some Indian medicinal plants in alloxan diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 84, p. 105-108, 2003.
- KARADI, R. V.; GADGE, N. B.; ALAGAWADI, K. R.; SAVADI, R. V. Effect of *Moringa oleifera* Lam. root-wood on ethylene glycol induced urolithiasis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, p. 306-311, 2006.
- KOENNING, S. R.; OVERSTREET, C.; NOLING, J. W.; DONALD, P. A.; BECKER, O.; FORTNUM, B. A. Survey of crop losses in response to phytoparasitic nematodes in the United States for 1994. **Journal of Nematology**, v. 31, p. 587-618, 1999.
- 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.
- KOSHIBA, T. Cytosolic ascorbate peroxidase in seedlings and leaves of maize (*Zea mays*). **Plant Cell Physiol.**, v. 34, p. 713-721, 1993.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LIPUN, V.; KUROKAWA, M.; SUTTISRI, R.; TAWEECHOTIPATR, P.; PRAMYOTHIN, P.; HATTORI, M.; SHIRAKI, K. Efficacy of Thai medicinal plant extracts against *herpes simplex* virus type 1 infection *in vitro* and *in vivo*. **Antiviral Research**, v. 60, p. 175-180, 2003.
- LIS, H., SHARON, N. Soybean (*Glycine max*) agglutinin. **Methods in Enzymology**, v. 28, p. 360-368, 1972.
- LOPES, L. L. M.; VALADARES, N. F.; MORAES, D. I.; ROSA, J. C.; ARAÚJO, H. S. S.; BELTRAMINI, L. M. Physical-chemical and antifungal properties of protease inhibitors from *Acacia plumosa*. **Phytochemistry**, v. 70, p. 871-879, 2009.
- MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Nutritional value and antinutritional components of whole and ethanol extracted *Moringa oleifera* leaves. **Animal Feed Science and Technology**, v. 63, p. 211-228, 1996.
- MATOS, F. J. A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**, 2ª edição. Editora UFC, 1999.

MEHTA, L. K.; BALARAMAN, R.; AMIN, A. H.; BAFNA, P. A.; GULATI, O. D. Effect of fruits of *Moringa oleifera* on the lipid profile of normal and hypercholesterolaemic rabbits. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 86, p. 191-195, 2003.

MENEZES, M., OLIVEIRA, S. M. A. **Fungos Fitopatogênicos**. UFRPE, Imprensa Universitária, 277 p., 1993.

MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. Biocontrole de doenças de plantas: Uso e perspectivas. Jaguariuna-SP: **Embrapa Meio Ambiente**, p. 7-14, 2009.

MOREIRA, R. D. A; PERRONE, J. C. Purification and partial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology**, v. 59, p. 783-787, 1977.
MOSOLOV, V. V.; VALUEVA, T. A. Proteinase inhibitors in plant biotechnology: A review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 44, p. 233-240, 2008.

NDABIGENGESERE, A., NARASIAH, K. S., TALBOT, B. G. Active agents and mechanism of coagulation of turbid waters using *Moringa oleifera*. **Water Research**, v. 29, p. 703-710, 1995.

NELSON, E. B. Exudate molecules initiating fungal responses to seeds and roots. *Plant Soil*, p. 61-71, v. 76, 1990.

NELSON, E. B. Microbial dynamics and interactions in the spermosphere. **Annual Review of Phytopathology**, v. 42, p. 271-309, 2004.

NICOL, J. M.; TURNER, S. J.; COYNE, D. L.; DENNIJS, L.; HOCKLAND, S.; TAHNA MAAFI, Z. Current nematode threats to world agriculture. In: Jones, J.; Gheysen, G.; Fenoll, C. **Genomics and Molecular Genetics of Plant Nematode Interactions**. Springer, Heidelberg, p. 21-44, 2011.

NÓBREGA, F. M.; SANTOS, I. S.; DA CUNHA, M.; CARVALHO, A. O.; GOMES, V. M. Antimicrobial proteins from cowpea root exudates: inhibitory activity against *Fusarium oxysporum* and purification of a chitinase-like protein. **Plant and Soil**, v. 272, p. 223-232, 2005.

NWOSU, M. O., OKAFOR, J. I. Preliminary studies of the antifungal activities of some medicinal plants against *Basidiobolus* and some other pathogenic fungi. **Mycoses**, v. 38, (5-6), p. 191-195, 1995.

OKUBARA, P.; PAULITZ, T. Root defense responses to fungal pathogens: A molecular perspective. *Root Physiology: from Gene to Function*, p. 215-226, 2005.

OLIVEIRA, J. T. A, SILVEIRA, S. B., VASCONCELOS, I. M., CAVADA, B. S., MOREIRA, R. A. Compositional and nutritional attributes of seeds from the multipurpose tree *Moringa oleifera* Lamarck. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, p. 815-820, 1999.

OLIVEIRA, J. T. A.; Gondim, D. M. F.; Vasconcelos, I. M. Ensaio enzimáticos de proteínas e inibidores de proteases envolvidos com a defesa de plantas a

patógenos. In: Figueiredo, M. V. B.; Burity, H. A.; Oliveira, J. P.; Rosália, C. E.; Stamford, S. S. N. P. **Biotecnologia aplicada à agricultura: textos de apoio e protocolos experimentais**. 1ed.: EMBRAPA, p. 59-92, 2010.

OLIVEIRA, J. T. A.; ANDRADE, N. C.; MARTINS-MIRANDA, A. S.; SOARES, A. A.; GONDIM, D. M. F.; ARAÚJO-FILHO, J. H.; FREIRE-FILHO, F. R.; VASCONCELOS, I. M. Differential expression of antioxidant enzymes and PR-proteins in compatible and incompatible interactions of cowpea (*Vigna unguiculata*) and the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Plant physiology and biochemistry**, v. 51, p. 145-152, 2012.

ONYEKE, C. C.; AKUESHI, C. O. Pathogenicity and reproduction of *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) chitwood on African soyam bean, *Sphenostylis stenocarpa* (Hochst Ex. A. Rich) Harms accessions. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, p. 1607-1616, 2012.

PALMA, J. M.; SANDALIO, L. M.; CORPAS, F. J.; ROMERO-PUERTAS, M. C.; MCCARTHY, I.; DEL RÍO, L. A. Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.40, p. 521-530, 2002.

PEIXOTO, P. H. P.; CAMBRAIA, J.; SANT'ANNA, R.; MOSQUIM, P. R.; MOREIRA, M. A. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Rev. Bra. Fisiol. Veg.**, v. 11, p. 137-143, 1999.

PEREIRA, M.L.; OLIVEIRA, H. D.; OLIVEIRA, J. T. A.; GIFONI, J. M.; ROCHA, R. O.; SOUSA, D. O. B.; VASCONCELOS, I. M. Purification of a chitin-binding protein from *Moringa oleifera* seeds with potential to relieve pain and Inflammation. Protein and **Peptide Letters**, v. 18, p. 1078-1085, 2011.

PERRY, R. N. Chemoreception in plant parasitic nematodes. **Annual Review of Phytopathology**, v. 34, p. 181-199, 1996.

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

RACE, M.; KARABO, O.; OBOPILE, M.; TIROESELE, B.; MMOLOTSI, R.; RAMPART, M.; TSHEGOFATSO, A. B. N. Effects of *Moringa oleifera* root and leaf powder on reproductive capacity and damage caused on stored cowpea seed by *Callosobruchus maculatus* (F). **Journal of Agricultural Technology**, v. 8, p. 23192329, 2012.

RAHMAN, M.M.; SHEIKH, M.M.I.; SHAMIMA, A.S.; ISLAM, M.S.; RAHMAN, M.A.; RAHMAN, M.M.; ALAM, M.F. Antibacterial Activity of leaf juice and extracts of *Moringa oleifera* Lam. against some human pathogenic bacteria. **Chiang Mai University Journal of Natural Science**, v. 8, p. 219-227, 2009.

RAMACHANDRAN, D.; PETER, K. V.; GOPALAKRISHNAN, P. K. Drumstick (*Moringa oleifera*): A multipurpose Indian vegetable. **Economic Botany**, v. 34, p. 276-283, 1980.

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

RIPOLL, C.; FAVERY, B.; LECOMTE, P.; VAN DAMME, E.; PEUMANS, W.; ABAD, P.; JOUANIN, L. Evaluation of the ability of lectin from snowdrop (*Galanthus nivalis*) to protect plants against root-knot nematodes. **Plant Science**, v. 164, p. 517-523, 2003.

ROCHA, R. O. Exsudatos de sementes de soja [*Glicine max* (L.) Merrill]: caracterização e efeitos contra o nematoide das galhas *Meloidogyne incognita*. **Monografia**, Departamento de Biologia, UFC, Fortaleza, 77 p., 2011.

ROCHA, F. S.; CAMPOS, V. P. Efeito de exsudatos de cultura de células de plantas em juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 3, p. 294-299, 2004.

ROSE, T. L.; CONCEIÇÃO, A. S.; XAVIER-FILHO, J.; OKOROV, L. A.; FERNANDES, K. V. S.; MARTY, F.; MARTY-MAZARS, D.; CARVALHO, A. O.; GOMES, V. M. Defense proteins from *Vigna unguiculata* seed exudates: characterization and inhibitory activity against *Fusarium oxysporum*. **Plant Soil**, v. 286, p. 181-191, 2006.

ROWHANI, A.; FALK, B. W. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Methods to certify pathogen (Virus) – free plants. In: GAMBORG, O. L.; PHILIPS, G. C. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 1995.

RUSSO, G.; GRECO, N.; D'ERRICO, F.P.; BRANDONISIO, A. Impact of the rootknot nematode, *Meloidogyne incognita*, on potato during two different growing seasons. **Nematologia Mediterranea**, v. 35, p. 29-34, 2007.

SANTI-GADELHA, T.; ROCHA, B. A. M.; GADELHA, C. A. A.; SILVA, H. C.; CASTELLON, R. E. R.; GONÇALVES, F. J. T.; TOYAMA, D.O.; TOYAMA, M. H.; SOUZA, A. J. F.; BERIAM, L. O. S.; MARTINS, J. L.; JOAZEIRO, P. P.; CAVADA, B. S. Effects of a lectin-like protein isolated from *Acacia farnesiana* seeds on phytopathogenic bacterial strains and root-knot nematode v. 103, p. 15-22, 2012.

SCARAFONI, A.; RONCHI, A.; PRINSI, B.; ESPEN, L.; ASSANTE, G.; VENTURINI, G.; DURANTI, M. The proteome of exudates from germinating *Lupinus albus* seeds is secreted through a selective dual-step process and contains proteins involved in plant defense. **The FEBS Journal**, v. 280, p. 1443-1459, 2013.

SCHALLER, A. A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. **Planta**, v. 220, p. 183-197, 2004.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M. L. Saponinas. In: SIMÕES, C. M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 3 ed. Porto Alegre: Ed. FGRS/Ed. UFSC, p. 597-619, 2001.

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

SENGUPTA, M. E.; KERAITA, B.; OLSEN, A.; BOATING, O. K.; THAMSBORG, S. M.; PÁLSDÓTTIR, G. R.; DALSGAARD, A. Use of *Moringa oleifera* seed extracts to reduce helminth egg numbers and turbidity in irrigation water. **Water Research**, v. 46, p. 3646-3656, 2012.

SIKORA, R. A.; POCASANGRE, L.; ZUM FELDE, A.; NIERE, B.; VU, T. T.; DABABAT, A. A. Mutualistic endophytic fungi and in-planta suppressiveness to plant parasitic nematodes. **Biological Control**, v. 46, p. 15-23, 2008.

SIMÕES, K. Substâncias fitotóxicas e antifúngicas em sementes de leguminosas que acumulam galactomanano e xiloglucano como carboidratos de reservas de parede celular. **Tese**, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, 220 p., 2008.

SIMOVA-STOILOVA, L.; VASEVA, I.; GRIGOROVA, B.; DEMIREVSKA, K.; FELLER, U. Proteolytic activity and cysteine protease expression in wheat leaves under severe soil drought and recovery. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, p. 200-206, 2010.

SPIRIG, C.; HIRSCHI, M.; ROTACH, M. W.; DUBROVSKY, M.; CALANCA, P.; STÖCKLI, S.; SAMIETZ, J. Agricultural pests under future climate conditions: downscaling of regional climate scenarios with a stochastic weather generator. In: **29th Conference on Agricultural and Forest Meteorology**, p. sn, 2010.

SRIVASTAVA, L. M. Seed germination, mobilization of food reserves, and seed dormancy. In: **Plant growth and development: hormones and environment**. Academic Press, p. 447-471, 2002.

STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; TOLEDO, M. V.; PORTZ, R. L.; SCHWANESTRADA, K. R. F.; PASCHOLATI, S. F. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 10, p. 18-46, 2011.

STOCKDALE, E. A.; LAMPKIN, N. H.; HOVI, M.; KEATINGE, R.; LENNARTSSON, E. K. M.; MACDONALD, D. W.; PADEL, S.; TATTERSALL, F. H.; WOLFE, M. S.; WATSON, C. A. Agronomic and environmental implications of organic farming systems. **Advances in Agronomy**, v. 70, p. 261-262, 2001.

TAHILIANI, P.; KAR, A. Role of *Moringa oleifera* leaf extract in the regulation of thyroid hormone status in adult male and female rats. **Pharmacological Research**, v. 41, p. 319-323, 2000.

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

TOWBIN, H.; STAHELINT, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : **Procedure and Some Applications**. v. 76, p. 4350-4354, 1979.

URBANEK, H.; KUZNIAK-GEBAROWSKA, E.; HERKA, K. Elicitation of defense responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonidase. **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.; REP, M.; PIETERSE, C. M. J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, v. 44, p. 135-162, 2006.

WALTER, A.; SAMUEL, W.; PETER, A.; JOSEPH, O. Antibacterial activity of *Moringa oleifera* and *Moringa stenopetala* methanol and n-hexane seed extracts on bacteria implicated in water borne diseases. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, p. 153-157, 2011.

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

WILLIAMSON, V. M.; HUSSEY, R. S. Nematode pathogenesis and resistance in plants. **The Plant Cell**, v. 8, p. 1735-1745, 1996.

WINA, E.; MUETZEL, S.; BECKER, K.; The impact of saponins or saponin-containing plant materials on ruminant production: a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 8093-8105, 2005.

XAVIER-FILHO, J.; CAMPOS, F. A. P.; ARY, M. B.; SILVA, C. P.; CARVALHO, M. M.; MACEDO, M. L. R.; LEMOS, F. J. A.; GRANT, G. 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 Agricultural and Food Chemistry**, v. 37, p. 1139-1143, 1989.

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, p. 1031-1039, 2002.

ZEKINS, A.; SCHREMPF, H. Visualization of alpha-chitin with a specific chitin-binding protein (CHB1) from *Streptomyces olivaceoviridis*. **Analytical Biochemistry**, v. 231, p. 287-294, 1995.

ZHAO, X.; SCHMITT, M.; HAWES, C. M. Species-dependent effects of border cell and root tip exudates on nematode behavior. **Phytopathology**, v. 90, p. 1239-1245, 2000.