



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

LUCAS PINHEIRO DIAS

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM INIBIDOR DE TRIPSINA DAS
FLORES DE *Cassia fistula* Linn. COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

**FORTALEZA
2012**

LUCAS PINHEIRO DIAS

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM INIBIDOR DE TRIPSINA DAS
FLORES DE *Cassia fistula* Linn. COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

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.

Orientador: Profa. Dra. Ilka Maria Vasconcelos

FORTALEZA
2012

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

D53p

Dias, Lucas Pinheiro.

Purificação e caracterização de um inibidor de tripsina das flores de *Cassia fistula* Linn. com atividade antimicrobiana / Lucas Pinheiro Dias. – 2012.

101 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, 2012.

Área de Concentração: Bioquímica e Química de Macromoléculas.

Orientação: Profª. Dra. Ilka Maria Vasconcelos.

1. Inibidor de tripsina. 2. Flores – bioquímica. 3. Atividade antimicrobiana. I. Título.

CDD 574.192

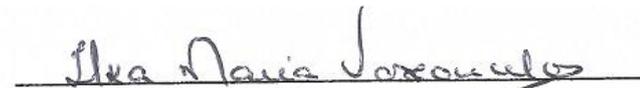
LUCAS PINHEIRO DIAS

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM INIBIDOR DE TRIPSINA DAS
FLORES DE *Cassia fistula* Linn. COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

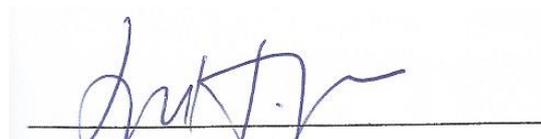
Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Aprovado em: 09 de Agosto de 2012

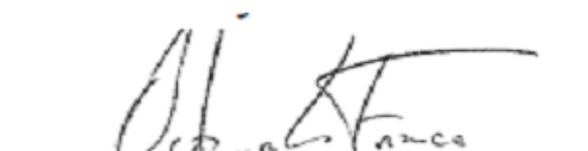
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dra. Ilka Maria Vasconcelos (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof. Dr. José Tadeu de Oliveira
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof. Dr. Octávio Luiz Franco (Examinador)
Universidade Católica de Brasília (UCB)

A minha família, pelo apoio incondicional.

*Aos amigos, que contribuíram para a realização
deste trabalho.*

*A força maior que controla tudo em nossas vidas,
por abençoar cada passo meu.*

Dedico.

“Liberte-se da necessidade de culpar quem quer que seja, inclusive você mesmo. Todos nós estamos fazendo o melhor possível com a compreensão, o conhecimento e a consciência que temos.”

(Autor desconhecido)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre estar ao meu lado, sempre disposto a ajudar e tornar as coisas mais simples e fáceis. Com o tempo aprendi a ter paciência e saber esperar: Deus sempre tem uma solução para tudo. Tendo isso em mente, a vida fica bem mais leve. Fé e Paciência são elementos essenciais para quem deseja ter sucesso na vida.

Agradeço imensamente a meu Pai (Raimundo) e a minha mãe (Lúcia) pelo apoio INCONDICIONAL durante toda minha formação. Fico sem palavras para agradecer a essas duas pessoas, mas acho que isso é normal, afinal, é sempre muito difícil agradecer aos nossos pais. Enfim, eu nunca teria chegado onde estou hoje se não tivesse o apoio, a dedicação e o amor de vocês. Obrigado por tudo!

Agradeço a minha família, em especial a minha Tia Rosa, Tio Carlos, Minha Madrinha (Maria do Rosário) e meus primos e primas: Thiago, Angelo, Anderson, Juciane, Juciara, Jucy e Ary. Obrigado por fazerem um “carnaval fora de época” toda vez que eu retorno a Teresina. Família é a base de tudo e sem o carinho, a força e as palavras de incentivo de vocês tudo ficaria mais difícil.

Agradeço a Professora Dra. Ilka Maria Vasconcelos, por ter aceitado ser minha orientadora, mesmo não tendo nenhuma referência a meu respeito. Agradeço pela oportunidade de fazer parte dessa Grande Família que é o LabTox. Agradeço pela atenção, pelo carinho, pelos ensinamentos e pelo exemplo de força, superação, caráter e honestidade. Aprendi muitas lições nesses dois anos, não apenas a dosar proteínas ou fazer cromatografia, acho que me tornei uma pessoa melhor, amadureci como ser humano, e a Senhora foi parte crucial desse processo de crescimento.

Agradeço ao Professor Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira pelas críticas e sugestões para melhoria do presente estudo. Agradeço ainda pelas lições repassadas ao longo do curso. E não poderia deixar de agradecer pelo exemplo de Pesquisador e Professor que o Senhor é, saiba que daqui a alguns anos, vários doutores mundo a fora terão a honra de dizer que um dia foram alunos do Professor Tadeu!

Agradeço ao Professor Dr. Octávio Luiz Franco pela honra de tê-lo como membro da minha banca examinadora. Muito obrigado pelas críticas e sugestões.

Agradeço imensamente a todos os integrantes da “Grande Família LabTox” pelo carinho e amizade ao longo dos dois últimos anos. Muito obrigado Raquel Rocha, Raquel Coelho, Yara Dias, Bella Giselle, Hélio Job, Juliana Gifoni, Clidia Eduarda, Henrique Pinho, Paulo Carvalho

e Vanessa Duarte. Agradeço ainda a Mariana Reis pela ajuda nas coletas e nas etapas iniciais do trabalho e a Marina Gabrielle por estar sempre disponível para ajudar no que for preciso. Vocês são minhas IC's preferidas!

Devo um agradecimento especial a Mirella Pereira e a Helen Costa, não apenas pela ajuda com os experimentos e resultados, mas também pela amizade, pelas palavras de incentivo e pela dedicação que as duas sempre tiveram comigo. Agradeço ainda a Adelina Braga, pela ajuda na revisão do trabalho, pelo carinho, amizade e por me encorajar sempre que estava sem ânimo. Não posso deixar de agradecer a mais nova professora da UFC, Dra. Daniele de Oliveira, muito obrigado pelo apoio em todos os momentos, pela amizade, carinho e pelos momentos de descontração.

Agradeço aos amigos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular: Claudener Souza, Anna Lídia, Rodolpho Guedes e Gabriela Almeida. Um agradecimento especial ao Pedro Filho, pela ajuda com os experimentos e pela força nos momentos finais do trabalho.

Agradeço aos amigos que estão longe, em especial a Ana Carolina Dias, André Lopes e Laísa Castro. Muito obrigado pelos telefonemas, por escutar meus desabafos, pelas palavras de consolo e força. Vocês sempre tiveram as palavras certas pra dizer, sempre me entenderam como ninguém. Amizade quando é verdadeira, nem o tempo e nem a distância separa. Somos prova disso.

Agradeço aos professores do mestrado, pelos conhecimentos repassados ao longo do curso. Agradeço a todos os funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

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

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ - através das atividades de capacitação no ensino e pesquisa em Bioquímica realizadas em parceria com o **Laboratório de Toxinas Vegetais - LABTOX**, sob a coordenação da Dra. Ilka Maria Vasconcelos.

CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO (CNPq), CORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL E DE ENSINO SUPERIOR (CAPES) 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.

RESUMO

As plantas sintetizam proteínas que possuem propriedades antimicrobianas, podendo ser utilizadas em substituição aos defensivos químicos no campo e como fonte de novas drogas para o controle de infecções bacterianas em humanos. Dentre as diversas estruturas vegetais, órgãos reprodutivos como as flores parecem ser uma fonte promissora de tais moléculas ativas contra patógenos, particularmente se considerado o seu relevante papel fisiológico, o qual deve ser preservado. Nesse contexto, a presente pesquisa experimental teve como objetivos a prospecção de proteínas com ação antimicrobiana em flores silvestres e posterior purificação, caracterização bioquímica e avaliação da atividade antimicrobiana de um inibidor de tripsina presente em flores de *Cassia fistula* Linn. (Chuva-de-ouro). O extrato total das flores de *C. fistula* foi preparado em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,5. Esse extrato apresentou atividade inibitória de tripsina ($42,41 \pm 0,35$ UI/mgP) e de papaína ($27,10 \pm 0,23$ UI/mgP), além de mostrar a presença de peroxidase ($20,0 \pm 0,18$ UAP/mgP) e quitinase ($1,70 \pm 0,21$ η katal/mgP), estando ausentes as atividades hemaglutinante, β -1,3-glucanásica, ureásica e proteásica. O inibidor de tripsina de *C. fistula*, denominado CfTI, foi purificado do extrato total por fracionamento com ácido tricloroacético (2,5%), seguido de cromatografias de afinidade (anidrotripsina-Sepharose-4B) e fase reversa (Vydac C-18TP 522). CfTI é uma glicoproteína com massa molecular aparente de 22,2 kDa, pI 5,0 e sequência NH₂-terminal exibindo alta similaridade com o inibidor de tripsina da soja do tipo Kunitz (SBTI). O inibidor mostrou-se pouco estável ao calor, reduzindo sua atividade inibitória para 23,4% quando incubado a 60 °C, durante 15 minutos. No entanto, ele se mostrou bastante estável a variações no pH. CfTI (100 μ g/mL) retardou o crescimento dos fungos fitopatogênicos de importância agrícola, *Colletotrichum lindemuthianum* e *Fusarium solani*, além de apresentar atividade antibacteriana frente às bactérias patogênicas ao homem, *Staphylococcus aureus* e *Enterobacter aerogenes*. Os resultados obtidos demonstram o potencial das flores como fonte diversificada de proteínas bioativas, evidenciando o inibidor de tripsina presente em flores de *C. fistula*, fomentando sua aplicação biotecnológica frente a fungos e bactérias de relevância para a Agricultura e Saúde.

Palavras-chaves: Inibidor de tripsina, flores, atividade antimicrobiana

ABSTRACT

Plants synthesize proteins that have antimicrobial properties, which can be used to substitute chemical pesticides in agriculture and as new drugs for the control of bacterial infections in humans. Among the various plant structures, the flowers seem to be a promising source of active molecules against pathogens, particularly if considered its important physiological role, which should be preserved. Therefore, this experimental research aimed at the prospection of novel proteins with antimicrobial activity in wild flowers and to subsequent purification, biochemical characterization and evaluation of antimicrobial activity of a trypsin inhibitor present in flowers of *Cassia fistula* Linn (the golden shower tree). The total extract of *C. fistula* flowers was prepared in 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.5. This extract presented trypsin inhibitory activity (42.41 ± 0.35 IU/mgP) and papain (27.10 ± 0.23 IU/mgP), besides to the presence of peroxidase (20.0 ± 0.18 UAP/mgP) and chitinase (1.70 ± 0.21 η katal/mgP). On the other hand, the hemagglutinating, β -1,3-glucanase, protease and urease activities were not detected. The trypsin inhibitor of *C. fistula*, named CfTI, was purified by fractionating the crude extract with trichloroacetic acid (2.5%) followed by affinity (anidrotipsina-Sepharose-4B) and reverse phase (Vydac C-18TP 522) chromatographies. CfTI is a glycoprotein with an apparent molecular mass of 22.2 kDa, pI 5.0 and NH₂-terminal sequence showing high similarity with Kunitz soybean trypsin inhibitor (SBTI). The inhibitor was not stable to heat, and loss 23.4% when incubated at 60 °C for 15 minutes. However, it proved to be stable to changes of pH. CfTI (100 μ g/mL) slowed the growth of pathogenic fungi of agricultural importance, *Colletotrichum lindemuthianum* and *Fusarium solani*, and also presented antibacterial activity against the human pathogenic bacteria, *Staphylococcus aureus* and *Enterobacter aerogenes*. The results demonstrate the potential of the flowers as a source of diverse bioactive proteins, as the trypsin inhibitor present in *C. fistula* flowers, promoting its biotechnological potential application against fungi and bacteria of relevance to Agriculture and human health.

Key words: trypsin inhibitor, flowers, antimicrobial activity

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-------------|--|----|
| Figura 1 - | Dois diferentes tipos hifas observadas em fungos filamentosos. Hifa asseptada ou cenocítica (A) e hifa septada (B) | 5 |
| Figura 2 - | Plantas de interesse comercial atacadas por fungos fitopatogênicos. A – Bananeira infectada por <i>Fusarium oxysporum</i> (Mal-do-Panamá ou Fusariose); B – Maracujá com sintomas de antracnose (<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>); C – Podridão vermelha da raiz da soja ocasionada por <i>Fusarium solani</i> ; D – Antracnose em vagens de feijão (<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>) | 6 |
| Figura 3 - | Bactérias mais associadas às infecções hospitalares. A – <i>Enterobacter aerogenes</i> ; B – <i>Klebsiella sp.</i> ; C – <i>Proteus vulgaris</i> e D – <i>Staphylococcus aureus</i> | 9 |
| Figura 4 - | Aspectos morfológicos da <i>Cassia fistula</i> Linn. Inflorescência, folha e fruto | 17 |
| Figura 5 - | Esquema de obtenção dos extratos protéicos totais de flores silvestres | 23 |
| Figura 6 - | Protocolo de extração das proteínas solúveis de flores de <i>C. fistula</i> | 26 |
| Figura 7 - | Esquema de purificação do inibidor de tripsina presente nas flores de <i>C. fistula</i> | 33 |
| Figura 8 - | Atividade dos extratos totais dialisados (100 µgP) de flores silvestres sobre a germinação dos esporos de <i>Fusarium solani</i> | 41 |
| Figura 9 - | Atividade dos extratos totais dialisados (100 µgP) de flores silvestres sobre a germinação dos esporos de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> | 42 |
| Figura 10 - | Curvas de crescimento dos fungos <i>Fusarium solani</i> (A) e <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> (B) na presença do extrato total dialisado de flores de <i>C. fistula</i> e da fração obtida a partir de sua precipitação com TCA 2,5% (FTCA 2,5). Legenda: ● - controle | |

| | | |
|-------------|--|----|
| | negativo (água destilada); ■ - extrato total (50 µg); ▲ FTCA 2,5 (50 µg) | 43 |
| Figura 11 - | Curvas de crescimento das bactérias <i>Staphylococcus aureus</i> (A) e <i>Enterobacter aerogenes</i> (B) na presença do extrato total dialisado das flores de <i>C. fistula</i> e da fração obtida a partir de sua precipitação com TCA 2,5% (FTCA 2,5). Legenda: ●: controle negativo (água destilada); ■ extrato total (50 µg); ▲ FTCA 2,5 (50 µg) | 45 |
| Figura 12 - | Cromatografia de afinidade em coluna de anidrotripsina-Sepharose 4B. Amostra de FTCA 2,5 (20 mg), obtida após fracionamento do extrato total com ácido tricloroacético (2,5%), foi aplicada em coluna (2,2 x 11,5 cm) de anidrotripsina-Sepharose 4B, equilibrada com tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,5, contendo NaCl 200 mM. As proteínas retidas foram eluídas com HCl 100 mM. Fluxo: 60 mL/h; Fração: 2,0 mL | 52 |
| Figura 13 - | Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) na presença de SDS do material retido na matriz de anidrotripsina-Sepharose 4B. M: marcadores de massa molecular; FRS: Fração retida na matriz de anidrotripsina-Sepharose 4B. Foram aplicados 15 µg de proteína por poço | 53 |
| Figura 14 - | Cromatografia de fase reversa em coluna µRPC C2/C18-ST-4.6/100 acoplada em sistema de HPLC. Amostra da fração retida na matriz de anidrotripsina-Sepharose 4B (1 mg) foi aplicada na coluna de fase reversa (1,6 mL). No procedimento cromatográfico, um gradiente linear de acetonitrila (0-100%) foi aplicado para eluição do material retido. O inibidor de tripsina de <i>C. fistula</i> (CfTI) foi eluído em torno de 35% de acetonitrila. Fluxo: 30 mL/h | 55 |
| Figura 15 - | Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) na presença de SDS do inibidor purificado de flores de <i>C. fistula</i> (CfTI). M: marcadores proteicos de massas moleculares. Foram aplicados 15 µg de proteína por poço | 56 |

- Figura 16 - Eletroforese bidimensional do inibidor de tripsina purificado das flores de *C. (CfTI)*, revelada pela prata. *Immobiline dry strip* (11 cm, pH 4-11). Focalização isoeletrica (1ª dimensão): 0,5 h a 500 V, 6 h a 3000 V e 2 h a 9500 V, a 20 °C). PAGE-SDS (2ª dimensão): 25 mA, 6 h. A seta mostra o *spot* da amostra correspondente ao potencial isoeletrico de 5,0. MM: marcador de massa molecular 58
- Figura 17 - Alinhamento da sequência NH₂-terminal do inibidor de tripsina presente em flores de *C. fistula (CfTI)* com outras sequências similares de proteínas depositadas no NCBI. As sequências de aminoácidos alinhadas com *CfTI* foram as do inibidor de tripsina de soja do tipo Kunitz (SBTI), inibidor de tripsina de *Glycine tomentella* do tipo Kunitz (GTTI) e a da cadeia B do complexo formado entre a tripsina pancreática do porco e o inibidor de tripsina da soja (PSBTI). O alinhamento foi gerado usando o programa *CLC Sequence viewer 6.5.4*. Aminoácidos conservados entre as sequências são denotados usando a mesma cor, sendo o grau de conservação (0-100%) dos aminoácidos mostrado através de barras 59
- Figura 18 - Detecção de glicoproteína em PAGE-SDS corada com reagente de Schiff. SBTI: inibidor de tripsina de soja (proteína não glicosilada); *CfTI*: inibidor de tripsina de flores de *C. fistula* (proteína glicosilada). Foram aplicadas 10 µg de proteínas por poço 61
- Figura 19 - Avaliação da estabilidade da atividade do inibidor de tripsina de flores de *C. fistula (CfTI)* quando submetido a diferentes temperaturas (20, 40, 60, 80 e 100 °C), por 15 minutos. Os valores plotados representam a média das atividades inibitórias de tripsina, estando os desvios omitidos por terem sido irrelevantes 62
- Figura 20 - Avaliação da estabilidade da atividade do inibidor de tripsina de flores de *C. fistula (CfTI)* quando submetido a diferentes pHs (2, 4, 6, 8, 10 e 12). Os valores plotados representam a média das

| | | |
|-------------|--|----|
| | atividades inibitórias de tripsina, estando os desvios omitidos por terem sido irrelevantes | 63 |
| Figura 21 - | Curvas de crescimento dos fungos <i>Fusarium solani</i> (A) e <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> (B) na presença do inibidor de tripsina purificado de flores de <i>C. fistula</i> (CfTI). - ● - Controle negativo: água destilada; - ▲ - Tratamento: CfTI (10 µg) | 64 |
| Figura 22 - | Curvas de crescimento das bactérias <i>Staphylococcus aureus</i> (A) e <i>Enterobacter aerogenes</i> (B) na presença do inibidor de tripsina purificado de flores de <i>C. fistula</i> (CfTI). - ● - Controle negativo: água destilada; - ▲ - Tratamento: CfTI (10 µg) | 65 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|------------|--|----|
| Tabela 1 - | Classificação das endopeptidases ou proteinases | 12 |
| Tabela 2 - | Famílias de inibidores de proteinases de plantas | 14 |
| Tabela 3 - | Extração de proteínas de flores silvestres | 40 |
| Tabela 4 - | Proteínas solúveis presentes nos extratos de flores de <i>C. fistula</i> obtidos com diferentes solventes | 46 |
| Tabela 5 - | Influência do tempo de extração na concentração de proteínas solúveis no extrato de flores de <i>C. fistula</i> | 47 |
| Tabela 6 - | Detecção e quantificação de proteínas bioativas presentes no extrato total de flores de <i>C. fistula</i> | 49 |
| Tabela 7 - | Concentração de proteínas e atividade inibitória de tripsina do extrato total e das frações proteicas obtidas a partir de sua precipitação com diferentes teores de ácido tricloroacético (TCA) | 51 |
| Tabela 8 - | Purificação e rendimento do inibidor de tripsina presente em flores de <i>C. fistula</i> (<i>CfTI</i>) | 57 |

SUMÁRIO

| | | |
|-------|--|----|
| 1. | INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2. | FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA | 4 |
| 2.1. | Fungos e a atividade agrícola | 4 |
| 2.2. | Bactérias patogênicas ao homem e sua resistência aos antibióticos | 7 |
| 2.3. | Proteínas vegetais: prospecção e avaliação do seu potencial biotecnológico no controle de patógenos de planta e do homem | 8 |
| 2.4. | Proteases e inibidores de tripsina | 11 |
| 2.5. | Flor – uma potencial fonte de proteínas ativas contra patógenos | 15 |
| 2.6. | <i>Cassia fistula</i> Linnaeus | 16 |
| 3. | OBJETIVOS | 19 |
| 3.1. | Objetivos gerais | 19 |
| 3.2. | Objetivos específicos | 19 |
| 4. | MATERIAIS | 20 |
| 4.1. | Flores silvestres | 20 |
| 4.2. | Eritrócitos | 20 |
| 4.3. | Fungos | 20 |
| 4.4. | Bactérias | 20 |
| 4.5. | Reagentes químicos | 21 |
| 5. | MÉTODOS | 22 |
| 5.1. | Coleta e processamento das flores silvestres | 22 |
| 5.2. | Prospecção de atividade antifúngica em extratos proteicos de flores silvestres | 22 |
| 5.2.1 | <i>Preparação dos extratos</i> | 22 |
| 5.2.2 | <i>Dosagem de proteínas solúveis</i> | 22 |
| 5.2.3 | <i>Avaliação da atividade antifúngica frente à germinação dos esporos ..</i> | 24 |

| | | |
|---------|--|----|
| 5.3. | Obtenção e caracterização do extrato proteico de flores de <i>Cassia fistula</i> | 24 |
| 5.3.1 | <i>Estabelecimento das melhores condições para extração de proteínas ..</i> | 24 |
| 5.3.2 | <i>Detecção e dosagem de proteínas bioativas</i> | 25 |
| 5.3.2.1 | <i>Determinação da atividade hemaglutinante</i> | 25 |
| 5.3.2.2 | <i>Determinação da atividade inibitória de tripsina</i> | 27 |
| 5.3.2.3 | <i>Determinação da atividade inibitória de papaína</i> | 27 |
| 5.3.2.4 | <i>Determinação da atividade β-1,3-glucanásica</i> | 28 |
| 5.3.2.5 | <i>Determinação da atividade peroxidásica</i> | 29 |
| 5.3.2.6 | <i>Determinação da atividade quitinásica</i> | 29 |
| 5.3.2.7 | <i>Determinação da atividade ureásica</i> | 30 |
| 5.3.2.8 | <i>Determinação da atividade proteásica</i> | 30 |
| 5.4. | Purificação de um inibidor de tripsina presente no extrato total de flores de <i>C. fistula</i> (CfTI) | 31 |
| 5.4.1 | <i>Fracionamento do extrato total com ácido tricloroacético</i> | 31 |
| 5.4.2 | <i>Cromatografia de afinidade em matriz de anidrotripsina-Sepharose 4B</i> | 31 |
| 5.4.3 | <i>Cromatografia de fase reversa em sistema de HPLC (High Performance Liquid Chromatography)</i> | 32 |
| 5.5. | Caracterização do CfTI | 34 |
| 5.5.1 | <i>Eletroforese em gel de poliacrilamida</i> | 34 |
| 5.5.2 | <i>Eletroforese bidimensional</i> | 34 |
| 5.5.3 | <i>Determinação da sequência NH₂-terminal</i> | 35 |
| 5.5.4 | <i>Avaliação da presença de carboidratos (natureza glicoproteica)</i> | 35 |
| 5.5.5 | <i>Avaliação da estabilidade do CfTI frente a diferentes fatores</i> | 36 |
| 5.5.5.1 | <i>Calor</i> | 36 |
| 5.5.5.2 | <i>pH</i> | 36 |

| | | |
|-------|---|----|
| 5.6. | Avaliação da atividade antimicrobiana de proteínas presentes em flores de <i>C. fistula</i> | 37 |
| 5.6.1 | <i>Atividade antifúngica</i> | 37 |
| 5.6.2 | <i>Atividade antibacteriana</i> | 37 |
| 5.7 | Análise estatística | 38 |
| 6. | RESULTADOS | 39 |
| 6.1. | Prospecção de atividade antifúngica nos extratos totais de flores silvestres | 39 |
| 6.2. | Estabelecimento das melhores condições para extração de proteínas das flores de <i>C. fistula</i> | 44 |
| 6.3. | Detecção e dosagem de proteínas bioativas no extrato total de flores de <i>C. fistula</i> | 48 |
| 6.4. | Purificação do inibidor de tripsina presente no extrato total de flores de <i>C. fistula</i> (CfTI) | 48 |
| 6.4.1 | <i>Fracionamento do extrato total com ácido tricloroacético</i> | 48 |
| 6.4.2 | <i>Cromatografia de afinidade em matriz de anidrotripsina-Sepharose 4B</i> | 50 |
| 6.4.3 | <i>Cromatografia de fase reversa em sistema de HPLC (High Performance Liquid Chromatography)</i> | 54 |
| 6.5. | Caracterização bioquímica do CfTI | 54 |
| 6.5.1 | <i>Massa molecular e ponto isoelétrico</i> | 54 |
| 6.5.2 | <i>Sequência NH₂-terminal</i> | 54 |
| 6.5.3 | <i>Presença de carboidratos</i> | 60 |
| 6.5.4 | <i>Estabilidade frente ao calor e pH</i> | 60 |
| 6.6. | Atividade antimicrobiana do CfTI | 60 |
| 6.6.1 | <i>Atividade antifúngica</i> | 60 |
| 6.6.2 | <i>Atividade antibacteriana</i> | 60 |
| 7. | DISCUSSÃO | 66 |
| 8. | CONCLUSÕES | 73 |
| | REFERÊNCIAS | 74 |

1. INTRODUÇÃO

Doenças em plantas têm levado a uma diminuição na produção de alimentos, reduzindo seu fornecimento à população. Os fungos são responsáveis por 70% das doenças que causam danos em várias culturas, diminuindo a sua produtividade (SALUSTIANO *et al.*, 2006). No combate às doenças causadas por fungos fitopatogênicos, os agricultores têm utilizado diversos compostos químicos tóxicos, os defensivos agrícolas, a exemplo dos fungicidas. Anualmente, são usados no mundo, aproximadamente, 2,5 milhões de toneladas de defensivos agrícolas. Apenas no Brasil, o consumo anual desses compostos tem sido superior a 300 mil toneladas de produtos comerciais, representando um aumento no consumo de agrotóxicos de 700% nos últimos quarenta anos, contrapondo-se a um aumento de apenas 78% na área agrícola nesse período (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2012).

Como consequências do aumento do consumo e do uso indiscriminado de agrotóxicos, há a contaminação do solo, da água e dos alimentos, o surgimento de populações de fitopatógenos resistentes aos compostos químicos, a intoxicação de agricultores e a redução de organismos benéficos e da biodiversidade, além de desequilíbrios ambientais, alterando a ciclagem de nutrientes e da matéria orgânica (BETTIOL; MORANDI, 2009). Em decorrência dos malefícios que os pesticidas causam ao homem e à natureza, torna-se imprescindível buscar medidas alternativas de controle de pragas e doenças, com o uso de produtos naturais, eficientes e de baixo impacto ambiental. A exploração da atividade biológica de compostos do metabolismo primário e secundário de plantas constitui, ao lado da indução da resistência, uma forma efetiva de controle de doenças em plantas cultivadas (COLIN, 2006).

Similarmente à perspectiva de uso na Agricultura, muitas plantas podem ser utilizadas como fonte de moléculas bioativas de relevância na Saúde, subsidiando a produção de novos medicamentos para o tratamento de infecções bacterianas. Os mecanismos de ação dessas biomoléculas obtidas a partir das plantas são diversificados, em contraste com os antibióticos convencionais, representando, dessa forma, uma fonte promissora de novas drogas (ALMEIDA, 2010).

Em consonância ao exposto, a ação de vários extratos brutos, óleos essenciais e compostos isolados de extratos de plantas sobre o desenvolvimento de diversos microrganismos, como fungos filamentosos, leveduras e bactérias já foi avaliada (TEGEGNE; PRETORIUS; SWART, 2008). Dentre os diversos compostos químicos produzidos pelas plantas, as proteínas constituem um grupo especial de moléculas bioativas, apresentando grande potencial para aplicações biotecnológicas no combate a pragas no campo, bem como no

controle de bactérias patogênicas a humanos. Várias são as proteínas vegetais com propriedades bioativas, incluindo lectinas, inibidores de proteases e de alfa-amilases, proteínas inativadoras de ribossomos e toxinas (MORAIS *et al.*, 2010; FREIRE *et al.*, 2012). De modo geral, essas proteínas têm sido detectadas em todos os tecidos vegetais, tendo sido isoladas de raízes, caules, bulbos, folhas, frutos, sementes e flores.

Embora as sementes tenham sido alvo maior de investigação, devido à prevalência em quantidade proteica comparativamente às outras partes vegetais (LIN *et al.*, 2005), as outras estruturas da planta são também bastante atrativas quando pensado em termos de repositórios de moléculas bioativas, particularmente se considerados os seus papéis fisiológicos. Exemplo são as flores, estruturas de extrema importância para a perpetuação dos vegetais, estando envolvidas no processo de reprodução. Nesse contexto, é suposto que tais estruturas precisam de um sistema de defesa que garanta a sua fecundação e evolução até a geração das sementes, permitindo, assim, a reprodução e a dispersão dos vegetais. Apesar da suposição de que os órgãos reprodutivos sejam uma fonte promissora de moléculas bioativas, ainda é muito restrito o número de estudos investigando proteínas de flor, em função, principalmente, do baixo rendimento protéico e da disponibilidade sazonal de material para estudo (ALMEIDA, 2010).

Diante do exposto, o nosso grupo de pesquisa se propôs a avaliar a ação antimicrobiana, contra fungos fitopatogênicos e cepas de bactérias patogênicas ao homem, de extratos proteicos de flores silvestres, visando o posterior isolamento e a caracterização de proteína relacionada com essa atividade. Tais objetivos tiveram como cerne a seguinte hipótese: *“Tendo como base a relevante função da flor na reprodução vegetal e, particularmente, a baixa incidência de doenças e de ataque por insetos em flores silvestres é suposto que tal órgão representa uma fonte de proteínas com potencial para aplicação na Agricultura e Saúde”*. Alguns questionamentos levantados no sentido de validar ou não essa hipótese incluem:

- Extratos de flores silvestres teriam atividade contra fungos fitopatogênicos e/ou bactérias causadoras de infecções hospitalares?
- Compostos de natureza proteica estariam relacionados com a atividade antimicrobiana?
- As atividades protéicas detectadas sofreriam influência sazonal?
- As atividades antifúngicas e/ou antibacterianas detectadas resistiriam aos procedimentos de purificação de proteína?
- A proteína purificada apresentaria propriedades compatíveis a de outros compostos antimicrobianos?

Na perspectiva de responder aos questionamentos apresentados, foram selecionadas as seguintes espécies: *Ipomoea asarifolia* R. et Schult (Salsa), *Cassia fistula* L. (Chuva-de-ouro), *Turnera ulmifolia* L. (Chanana), *Pachira aquatica* Aubl. (Munguba) e *Plumeria rubra* L. (Jasmim). Para o monitoramento da atividade antimicrobiana foram usados como modelos experimentais os fungos fitopatogênicos *Fusarium solani* e *Colletotrichum lindemuthianum* e as bactérias patogênicas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048). Em adição, foram empregadas várias técnicas de purificação e caracterização de proteínas no intuito de obter um composto puro e biologicamente ativo contra fungos e/ou bactérias.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Fungos e a atividade agrícola

Os fungos são conhecidos popularmente como mofos e bolores. Durante muito tempo, os fungos foram confundidos com vegetais. No entanto, eles são organismos aclorofilados e, portanto, não realizam fotossíntese. Atualmente, estão agrupados em um reino próprio, *Fungi*, dividido em seis filos. Mais de 70 mil espécies de fungos já foram descritas e, a cada ano, são descobertas entre 1,5 e 2 mil novas espécies. Segundo estimativas, existem mais de 1,5 milhões de espécies de fungos (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 1992).

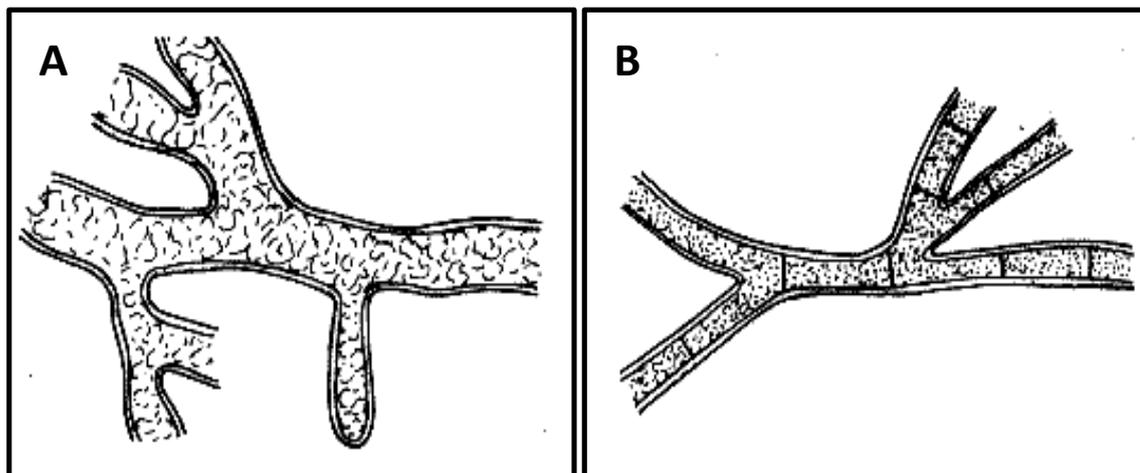
Todos os fungos são eucariotos e podem ser unicelulares, a exemplo das leveduras e quitrídias, ou multicelulares, como o bolor negro do pão (*Rhizopus stolonifer*). Normalmente, suas células são binucleadas e agrupam-se em filamentos, podendo ou não apresentar septos entre elas (FIGURA 1). A presença de septos, entretanto, não altera as funções metabólicas entre as células. Esses filamentos celulares são denominados hifas e o agrupamento intenso de hifas constitui o micélio (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996).

Os fungos são organismos fundamentais para o equilíbrio da natureza. As espécies saprofágicas, juntamente com as bactérias heterotróficas, constituem os principais decompositores da biosfera. Além da importância ambiental, os fungos também possuem valor econômico e aplicações na produção de alimentos e medicamentos (AZEVEDO, 2004). No entanto, na maior parte das vezes, os fungos são lembrados somente pelos danos que algumas espécies causam, seja ocasionando problemas de saúde, como alergias e micoses em animais, ou parasitando plantas (FIGURA 2).

O ataque de plantas pelas várias espécies de fungos pertencentes às três principais classes de Oomycetes, Ascomycetes, e Basidiomycetes causa sérias perdas na agricultura e, conseqüentemente, na economia de países que são produtores de alimentos, como o Brasil, tendo sérias implicações sociais. Espécies de fungos tais como *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. lindemuthianum*, *Botrytis cinerea*, *Aspergillus niger*, *A. parasiticus*, *Penicillium janthinellum*, *P. expansum*, *Trichoderma harzianum*, *Pythium aphanidermatum*, *Didymella bryoniae*, *Pyricularia grisea*, *Rhizopus stolonifer*, *Taphrina deformans*, *Thanatephorus cucumeris*, são alguns, entre centenas deles, que promovem doenças e podridões durante a produção e armazenamento de vários grãos e alimentos como, feijões,

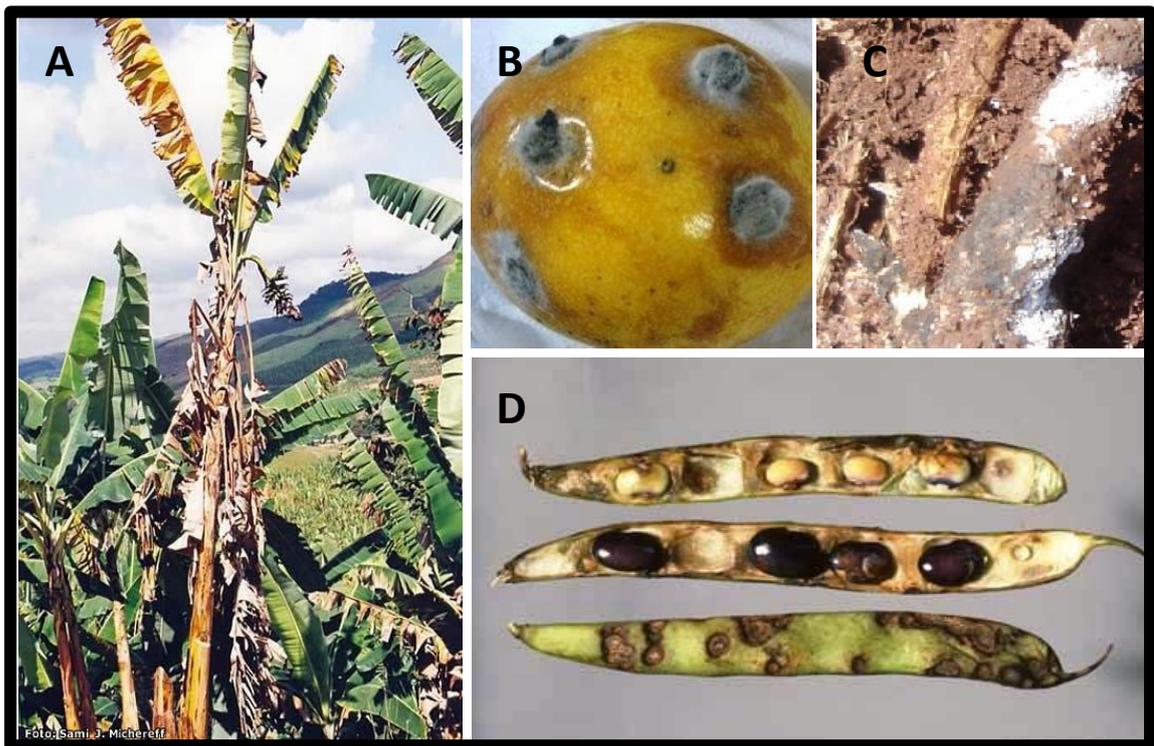
milho, amendoim tomate, melão, pepino, trigo, cevada, soja, nozes, entre outros (UTKHEDE; BOGDANOFF, 2003).

Figura 1 - Dois diferentes tipos hifas observadas em fungos filamentosos. Hifa asseptada ou cenocítica (A) e hifa septada (B)



Fonte: http://idfph.blogspot.com.br/2008_06_22_archive.html

Figura 2 - Plantas de interesse comercial atacadas por fungos fitopatogênicos. A – Bananeira infectada por *Fusarium oxysporum* (Mal-do-Panamá ou Fusariose); B – Maracujá com sintomas de antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*); C – Podridão vermelha da raiz da soja ocasionada por *Fusarium solani*; D – Antracnose em vagens de feijão (*Colletotrichum lindemuthianum*)



Fonte: http://www.ufrgs.br/agrofitossan/galeria/tipos_doencas.asp?id_doenca=275

Além disso, alguns desses fungos produzem micotoxinas que se acumulam nos alimentos, causando severas intoxicações neurológicas, gastrointestinais e câncer em pessoas que deles se alimentam.

Estima-se que cerca de 70% das doenças que acometem culturas de interesse econômico são provocadas por fungos. Na tentativa de salvar suas lavouras, os agricultores têm feito uso constante de fungicidas, compostos químicos tóxicos pertencentes ao grupo dos agrotóxicos (SALUSTIANO *et al.*, 2006). Anualmente, o total de investimento mundial em defensivos agrícolas ultrapassa a marca dos 28 bilhões de dólares. No Brasil, esse valor corresponde a 7 bilhões, sendo 38,9% dos agrotóxicos utilizados na Região Sul. Em 2008, o Brasil tornou-se o maior consumidor mundial de venenos agrícolas (733,9 milhões de toneladas), ultrapassando os Estados Unidos (646 milhões de toneladas). A cultura que mais consome agrotóxico é a soja. No total, os herbicidas representam em torno de 45% das vendas, os inseticidas 29% e os fungicidas 21% (BRASIL, 2009).

A aplicação indiscriminada de agrotóxicos tem trazido uma série de transtornos e modificações para o ambiente, tanto pela contaminação das comunidades de seres vivos que o compõe, quanto pela contaminação do solo, água e alimentos, além de contribuir para o aumento do número de pragas resistentes (BONALDO *et al.*, 2007). Uma alternativa para evitar tais danos e, dessa forma, buscar o manejo ecológico de pragas, seria a substituição dos agrotóxicos por compostos naturais obtidos de plantas (ZOTTICH *et al.*, 2011). Diversos estudos demonstram a ação de extratos brutos, óleos essenciais e compostos purificados de plantas contra fungos filamentosos, leveduras, bactérias, vírus, insetos e vermes (YE; NG, 2009; WONG *et al.*, 2012).

2.2. Bactérias patogênicas ao homem e sua resistência aos antibióticos

Na área médica, as infecções bacterianas se tornaram um importante problema de saúde pública nos últimos anos, dado o aumento significativo no número de pacientes comprometidos que, muitas vezes, evoluem para óbito. Em geral, a terapia antibacteriana é onerosa e, como agravante, pode ser ressaltado o crescimento expressivo de cepas bacterianas resistentes às drogas mais utilizadas comercialmente (PELEGRINI *et al.*, 2009). As enterobactérias resistentes a antibióticos, como a *Escherichia coli*, *Klebsiella sp* e *Proteus sp*, estão entre as maiores causadoras de infecções hospitalares (MENDES *et al.*, 1997).

O impacto da resistência bacteriana aos antibióticos é, sobretudo, preocupante. Estimativas do custo associado à perda de efetividade dos medicamentos em pacientes nos Estados Unidos alcançam US\$ 378 milhões. De maneira idêntica, um dos principais problemas enfrentados pelo Sistema Único de Saúde Brasileiro (SUS) vem sendo o uso indiscriminado de antibióticos pela população, o qual gera um aumento crescente de bactérias resistentes aos medicamentos frequentemente receitados (PELEGRINI, 2007).

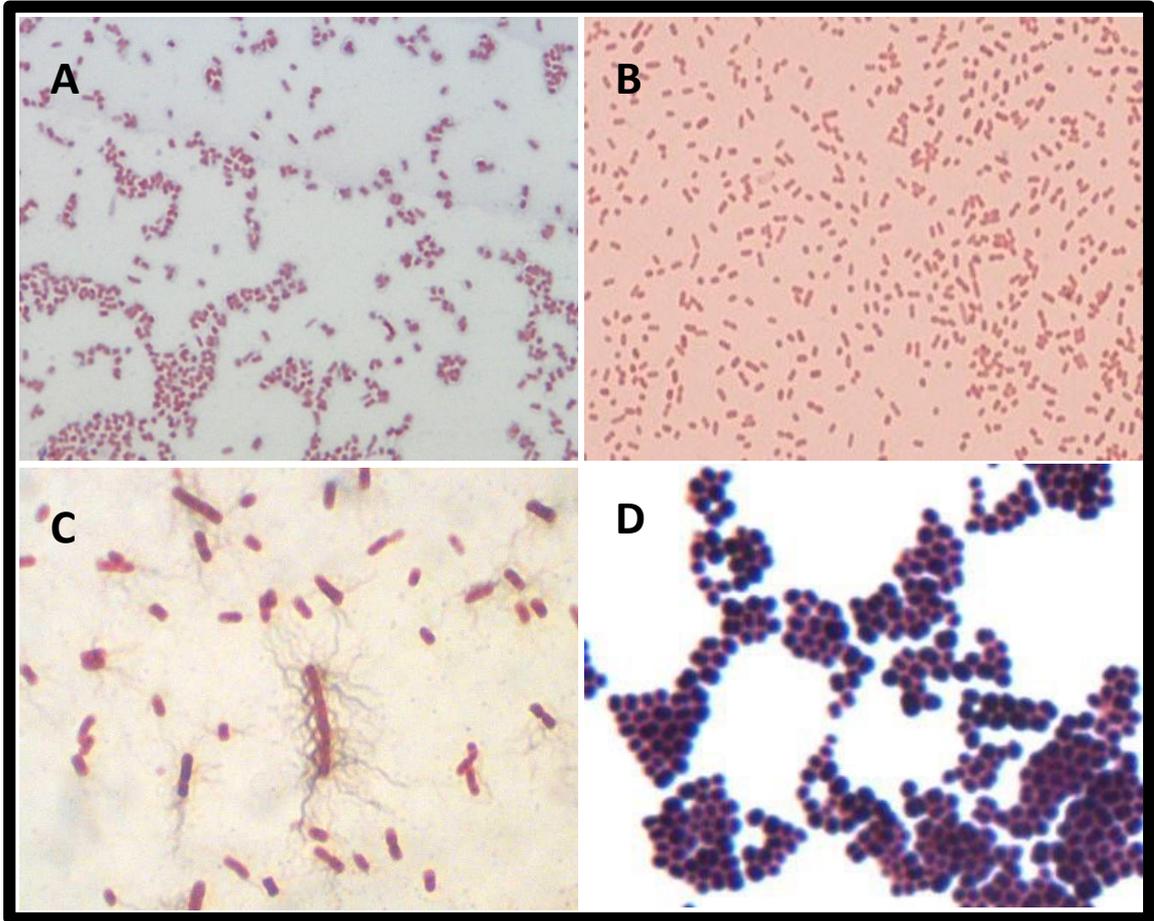
Uma das consequências mais graves desse aumento da resistência bacteriana aos antibióticos é a elevada incidência de infecções hospitalares causadas por esses organismos. Essas infecções afetam normalmente pacientes imunodeprimidos e com baixa resistência por causa da idade, pacientes com doenças subjacentes (como obesidade, diabetes, câncer ou outras doenças graves) e aqueles que passaram por tratamentos médicos e cirúrgicos. Entre os microrganismos mais comumente associados a tais infecções estão os pertencentes ao gênero *Staphylococcus* e a família Enterobacteriaceae, que inclui bactérias dos gêneros *Proteus*, *Klebsiella* e *Enterobacter* (FIGURA 3) (ALMEIDA, 2010).

Em decorrência do aumento da resistência a muitas drogas existentes no mercado, há a necessidade de se revelar novas substâncias antibacterianas, que sejam eficazes e apresentem amplo espectro de ação. Nesse sentido, a busca por substâncias antibacterianas derivadas de plantas teve um grande impulso nos últimos anos. De fato, estima-se que existam 250.000 a 500.000 espécies de plantas na Terra e apenas poucas espécies foram estudadas na busca por novos antimicrobianos. Assim sendo, é bastante provável que, nesse universo vegetal, sejam encontradas proteínas bioativas que possam substituir, ou pelo menos minimizar significativamente, o uso massivo de fungicidas e/ou bactericidas sintéticos.

2.3. Proteínas vegetais: prospecção e avaliação do seu potencial biotecnológico no controle de patógenos de planta e do homem

As plantas frequentemente estão expostas a uma série de fatores adversos que prejudicam seu crescimento, desenvolvimento e sua produtividade. Dentre os agentes causadores de estresse aos vegetais, há aqueles de natureza abiótica (temperaturas extremas), falta/excesso de água, ventos e metais pesados) e os de natureza biótica (herbívoros, fungos, bactérias, vírus e nematóides) (SOARES; MACHADO, 2007).

Figura 3 - Bactérias mais associadas às infecções hospitalares. A – *Enterobacter aerogenes*; B – *Klebsiella sp.*; C – *Proteus vulgaris* e D – *Staphylococcus aureus*



Fonte: <http://www.napavalley.edu/people/srose/Pages/Biol220.aspx>

Para assegurar a sobrevivência e perpetuação da espécie, os vegetais recorrem a diversas estratégias que, em conjunto, representam as defesas pré-formadas ou constitutivas e as defesas pós-formadas ou induzidas (NURNBERGER *et al.*, 2004). De um modo geral, todas atuam no sentido de tornar as plantas mais tolerantes às condições ambientais adversas e de dificultar, ou mesmo impedir, a alimentação ou penetração do organismo invasor nos tecidos vegetais (ANDRADE, 2008). As defesas constitutivas englobam as barreiras físicas (ceras, espinhos, tricomas, parede celular etc.) e compostos químicos pré-formados (terpenóides, glicosídeos cianogênicos, compostos fenólicos, ácidos hidroxâmicos etc.). Já as defesas induzidas compreendem mecanismos de proteção que são ativados após contato com o agressor, envolvendo, muitas vezes, a síntese de moléculas pertencentes ao metabolismo primário e/ou secundário do vegetal (XAVIER-FILHO, 1993).

Dentre as moléculas que fazem parte do metabolismo primário, merecem destaque as proteínas, estando envolvidas em vários processos biológicos como, por exemplo, biossíntese da membrana e parede celular, metabolismo de compostos primários e secundários, absorção e transporte de água e nutrientes a partir do solo, defesa vegetal, além de muitos outros (GOKULAKANNAN; NIEHAUS, 2010; VALLEDOR; JORRÍN, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2012). Incluídas na vasta classe das proteínas, há aquelas consideradas tóxicas, pois são capazes de interferirem negativamente em algum parâmetro biológico de organismos que tenham entrado em contato com quantidades determinadas dessas moléculas, através de vias específicas (SOARES *et al.*, 2012), estando representadas por lectinas, polifenoloxidasas, peroxidases, fenilalanina-amônia liase, proteínas ligantes à quitina, toxinas e inibidores de proteases serínicas e cisteínicas (CONSTABEL; RYAN, 1998; SIQUEIRA-JÚNIOR *et al.*, 2002; PELEGRINI; FRANCO, 2005; VAZ *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2010; GIFONI *et al.*, 2012). Tais classes de proteínas bioativas têm recebido atenção especial, em virtude da potencialidade de aplicações na agricultura e na saúde.

No setor agrônomo, muitas proteínas têm sido evidenciadas não somente por mostrar ação direta sobre diversos patógenos vegetais, mas, também, por apresentar capacidade de serem expressas em plantas suscetíveis, por meio de técnicas de transgenia (SHAH; ROMMENS; BEACHY, 1995; VINCENT; WONG; NG, 2007; DEO PRASAD; JHA; CHATTOO, 2008; MORAIS *et al.*, 2010; GIFONI *et al.*, 2012).

Na área clínica, diversos estudos têm sido focalizados na prospecção de proteínas antibacterianas de origem vegetal, visando à produção de novos medicamentos para o tratamento de infecções em humanos, dado ao fato de seus mecanismos de ação diversificados, em contraste com os antibióticos convencionais (ALMEIDA, 2010). Outra vantagem associada

aos produtos de origem natural para fins terapêuticos, como proteínas, por exemplo, é a alta especificidade a um conjunto de funções complexas que moléculas de pequeno tamanho são incapazes de mimetizar, interferindo pouco nos processos biológicos normais, acarretando menor quantidade de efeitos adversos (STROHL; KNIGHT, 2009). Reichert (2003), comparando a aceitação de novas drogas pela FDA no período de 1980 a 2002, demonstrou que proteínas são mais facilmente aceitas e liberadas para o mercado como fármacos, quando comparadas a drogas de baixa massa molecular de natureza não proteica, evidenciando o sucesso desta bioterapia, a proteína-terapia.

Em consonância ao exposto, a prospecção e descoberta de novas proteínas vegetais com potencial contra fungos e bactérias, aliadas às facilidades que a engenharia biotecnológica dispõe, propiciarão um novo cenário caracterizado por terapêuticas de curas mais efetivas e ecologicamente amigáveis de doenças fúngicas e bacterianas que acometem as plantas e afligem a humanidade.

2.4. Proteases e inibidores de tripsina

As proteínas com capacidade de quebrar outras proteínas são conhecidas como proteases. As proteases que hidrolisam ligações peptídicas internas são denominadas de endopeptidases ou proteinases e as que clivam ligações N-terminais e C-terminais recebem o nome de exopeptidases (DUBEY *et al.*, 2007). Em geral, as proteinases estão divididas em famílias, classificadas de acordo com o grupo reativo no sítio ativo, mecanismo de ação e estrutura tridimensional (VAN DER HOORN; JONES, 2004). As mais conhecidas compreendem as proteinases serínicas, cisteínicas, aspárticas e metaloproteinases (TABELA 1).

As proteinases desempenham importantes funções para as plantas, atuando na liberação de aminoácidos livres nos órgãos de reserva e na regulação de processos apoptóticos. São importantes, ainda, para o controle da expressão gênica, assim como para a regulação da fotossíntese (ADAM, 2000; GATEHOUSE, 2011). Em adição, algumas proteinases estão envolvidas nos mecanismos de defesa das plantas contra o ataque de patógenos e herbívoros (PALMA *et al.*, 2002).

Tabela 1 - Classificação das endopeptidases ou proteinases

| Famílias | Faixa de pH ótimo | Resíduos do sítio ativo | Enzimas |
|---|-------------------|------------------------------------|--|
| Proteinases serínicas (E.C.3.4.21) | 7,0 – 9,0 | Asparagina Serina Histidina | Tripsina Quimotripsina Elastase |
| Proteinases cisteínicas (E.C.3.4.22) | 4,0 – 7,0 | Cisteína Aspartato Histidina | Papaína Catepsinas (B, H, L) Ficina Bromelaína |
| Proteinases aspárticas (E.C.3.4.23) | < 5,0 | Aspartato | Pepsina Catepsina D Renina |
| Metaloproteinases (E.C.3.4.24) | 7,0 – 9,0 | Íons metálicos | Carboxipeptidase Termolisina |

E.C. - Código dado às enzimas pelo Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular. 3, representa a classe das hidrolases; 4, subclasse das enzimas que hidrolisam ligações peptídicas; 21, subclasse das proteinases serínicas; 22, proteinases cisteínicas; 23, proteinases aspárticas; 24, metaloproteinases.
Fonte: STOREY; WAGNER, 1986; NC-IUMBM, 1992.

Em plantas, animais e microrganismos podem ser encontradas proteínas ou peptídeos com a propriedade de inibir a ação catalítica das proteinases, ao interagir em diversos graus de afinidade com os sítios reativos dessas enzimas, formando complexos estequiométricos inativos (RICHARDSON, 1991). Tais proteínas são conhecidas como inibidores de proteinases.

No reino vegetal, as angiospermas dicotiledôneas englobam o maior número de espécies contendo essas proteínas, merecendo destaque as famílias *Leguminosae* e *Solanaceae*. Já nas monocotiledôneas, a família *Gramineae* (*Poaceae*) contém o maior número de inibidores já relatados (OLIVEIRA *et al.*, 2007). Tais inibidores podem ser expressos de forma constitutiva e induzida e sua quantidade é extremamente variável, dependendo de vários fatores, os quais englobam o estágio de maturação da planta, localização tecidual, tempo de colheita e armazenamento (JONES, 2004).

Quatro classes de inibidores de proteinases foram estabelecidas de acordo com a especificidade e mecanismo de ação, abrangendo os inibidores de proteinases serínicas, cisteínicas, aspárticas e de metaloproteinases (RYAN, 1990) (TABELA 2). Os inibidores de proteinases serínicas são os mais abundantes, sendo encontrados em várias espécies vegetais e estando distribuídos em diferentes tecidos, em particular nas sementes de leguminosas. Tais inibidores foram agrupados em sete famílias (TABELA 2), com base em suas semelhanças na estrutura primária, massa molecular e no número de resíduos de cisteína e pontes dissulfeto (RICHARDSON, 1991). As famílias dos inibidores serínicos do tipo Kunitz e Bowman-Birk são as mais estudadas (PANDO *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Os inibidores do tipo Kunitz apresentam massa molecular variando entre 18 e 26 kDa, sendo composto, em média, por 180 resíduos, dentre estes quatro resíduos de cisteína, podendo formar até duas pontes dissulfeto, contendo, em geral, apenas um sítio ativo (RICHARDSON, 1991). Entretanto, estudos recentes têm relatado para alguns desses inibidores a presença de, pelo menos, dois sítios ativos e a capacidade de inibir proteases de classes iguais ou mesmo diferentes. Um exemplo é o inibidor de tripsina isolado de *Adenantha pavonina*, capaz de inibir a tripsina e a papaína, proteases serínica e cisteínica, respectivamente (MIGLIOLO *et al.*, 2010). Já os inibidores de tripsina do tipo Bowman-Birk são, geralmente, menores, com massa molecular variando entre 8 e 10 kDa, de cadeia única, com dois sítios reativos (tripsina e quimotripsina) e 14 resíduos de cisteína, todos envolvidos em pontes dissulfeto (RICHARDSON, 1991). A participação dos inibidores tipo Kunitz e Bowman-Birk tem sido verificada em vários processos, podendo atuar como proteínas de

Tabela 2 - Famílias de inibidores de proteinases de plantas

| Proteinases | Classe de inibidores | Família de inibidores |
|-------------------|---------------------------------------|--|
| Serínicas | Inibidores de proteinases serínicas | Bowman-Birk Kunitz Batata I Batata II Cereais Taumatina Ragi I-2/milho |
| Cisteínicas | Inibidores de proteinases cisteínicas | Cistatinas de plantas (Fitocistatinas) |
| Aspárticas | Inibidores de proteinases aspárticas | Inibidores de proteinases aspárticas |
| Metaloproteinases | Inibidores de metaloproteinases | Inibidores de carboxipeptidases A e B |

Fonte: ANDRADE, 2008.

reserva, reguladores de enzimas endógenas, reguladores do processo de morte celular programada, além de fazerem parte do sistema de defesa das plantas (STOREY *et al.*, 2000; HUBER; BODE 2000; GAUT; TIFFIN, 2001). Diversos trabalhos relatam a atividade deletéria dos inibidores de tripsina no desenvolvimento de fungos (CHILOSE *et al.*, 2000; WANG; NG, 2006) e bactérias (KIM *et al.*, 2006; LIMA *et al.*, 2011).

2.5. Flor – uma potencial fonte de proteínas ativas contra patógenos

A produção de moléculas de defesa, a exemplo das proteínas, é um processo altamente dispendioso para a planta, devendo ser, preferencialmente, destinada às estruturas vegetais que possuem papéis fisiológicos relevantes, associados, sobretudo, à reprodução e perpetuação da espécie. Nessa conjuntura, as flores e frutos se inserem, estando protegidos especialmente por moléculas de natureza constitutiva (ZANGERL; BAZZAZ, 1993; HEATH, 2000; KOZUKUE *et al.*, 2004), contrastando, de certa forma, com partes vegetativas, tais como folhas, cuja defesa envolve a participação efetiva de compostos induzidos, sintetizados em resposta a danos vegetais (STRAUSS; IRWIN; LAMBRIX, 2004). Diante do exposto, as flores representam uma potencial fonte de proteínas bioativas, relativamente inexploradas, uma vez que são escassos os estudos acerca de purificação e atividade biológica dessas macromoléculas.

Quitinases e glucanases são exemplos de proteínas presentes em flores, detectadas em plantas de fumo em desenvolvimento (LOTAN; ORI; FLUHR, 1989; NEALE *et al.*, 1990). Um gene codificante para uma proteína do tipo osmotina, presente especificamente em flores de tomate (*Lycopersicon esculentum*), foi, também, reportado (CHEN; WANG; SMITH, 1996). Adicionalmente, inibidores de proteases foram detectados, havendo relatos de sua presença em flores de *Nicotiana glauca* (ATKINSON *et al.*, 1993) e de *Helianthus annuus*. Nesse último caso, o inibidor apresentou massa molecular de 16 kDa e causou completa inibição da germinação dos ascósporos de *Sclerotinia sclerotiorum* na concentração 5 µg/mL (GIUDICI; REGENTE; CANAL, 2000). Um inibidor de tripsina foi também purificado de flores de *Moringa oleifera*. Esse inibidor apresentou atividade antibacteriana e termiticida, aumentando a mortalidade de operários de cupins da espécie *Nasutitermes corniger* sem, contudo, alterar a sobrevivência dos soldados (PONTUAL *et al.*, 2009). Embora o papel fisiológico dessas proteínas em flores não tenha sido totalmente esclarecido, uma função de proteção contra o ataque de agressores (patógenos e herbívoros) tem sido sugerida, haja vista o histórico de funções creditadas às classes proteicas até então detectadas (GIUDICI; REGENTE; CANAL, 2000).

2.6. *Cassia fistula* Linnaeus

O gênero *Cassia* (*Fabaceae*) é constituído por mais de 600 espécies, incluindo arbustos, árvores e ervas, distribuídos em regiões tropicais e subtropicais de todo o Mundo. Nos ecossistemas brasileiros, particularmente na Mata Atlântica, o gênero *Cassia* é muito frequente. Na região sudeste, algumas espécies desse gênero são bastante apreciadas devido à beleza de suas flores e, por consequência, muito utilizadas como plantas ornamentais (LORENZI, 1998).

A *C. fistula* é uma árvore semi-selvagem, conhecida pelos seus belos cachos de flores. De porte médio e crescimento rápido, ela alcança cerca de 5 a 10 m de altura. Seu tronco é elegante, um pouco tortuoso, e pode ser simples ou múltiplo, com a casca cinza-esverdeada. A copa é arredondada, com cerca de 4 m de diâmetro. As folhas caducas são pinadas, alternas, com 4 a 8 pares de folíolos elípticos, acuminados e de cor verde-viva (DANISH *et al.*, 2011). No verão, despontam suas inflorescências, do tipo rácemo, pendentes e longas, com cerca de 30 cm de comprimento e numerosas flores amarelas, pentâmeras e grandes (FIGURA 4). Os frutos que se seguem são do tipo legume, cilíndricos, de cor marrom e contêm de 25 a 100 sementes lenticulares, castanhas, lustrosas, envoltas em uma polpa doce e com propriedades medicinais. Apesar de a polpa ser comestível, as sementes são tóxicas e não devem ser ingeridas (LORENZI, 1998).

Esta espécie é largamente usada na medicina tradicional com indicações no tratamento de várias doenças, incluindo micoses e outras infecções de pele ocasionadas por fungos (RAJAN *et al.*, 2001). A população da Índia utiliza suas folhas no tratamento de processos inflamatórios, as flores como purgativos e os frutos como antipiréticos, abortivos, purgativos e no tratamento de processos inflamatórios e do reumatismo (KIRTIKAR; BASU, 1975; SATYAVATI; SHARMA, 1989).

Há dados mostrando que a espécie *C. fistula* apresenta atividade antimicrobiana bastante elevada, com amplo espectro de ação, justificando o seu uso popular no tratamento de diversas infecções (KUMAR *et al.*, 2006). Phongpaichit e colaboradores (2006) avaliaram a ação do extrato metanólico das folhas de *C. fistula* sobre os fungos *Trichophyton rubrum*,

Figura 4 - Aspectos morfológicos da *Cassia fistula* Linn. Inflorescência, folha e fruto.



Fonte: <http://www.stuartxchange.org/KanyaPistula.html>

Microsporum gypseum e *Penicillium marneffe*, sendo os dois primeiros relacionados com dermatofitoses e o último estando envolvido com infecções de pele e no trato respiratório. O extrato metanólico a 10 mg/mL causou inibição total do crescimento dos fungos em estudo. Duraipandiyan e Ignacimuthu (2007) observaram também efeitos antimicrobianos em extratos de flores de *C. fistula*, obtidos com diferentes solventes, ativos contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, apresentando concentrações inibitórias mínimas variando entre 0,078 e 2,5 mg/mL.

No presente trabalho, após alguns testes preliminares, as flores de *C. fistula* foram selecionadas como objeto de trabalho, com a proposta de avaliar a ação antimicrobiana de extratos proteicos contra fungos fitopatogênicos e cepas de bactérias patogênicas ao ho visando o posterior isolamento e a caracterização de proteína relacionada com essa atividade.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

Este trabalho teve os seguintes objetivos gerais:

- A prospecção de proteínas com ação antimicrobiana em extratos proteicos de flores silvestres;
- A purificação, caracterização bioquímica e avaliação da atividade antimicrobiana de um inibidor de tripsina presente em flores de *Cassia fistula* L. (Chuva-de-ouro).

3.2. Objetivos específicos

- Prospecção de proteínas com ação contra fungos fitopatogênicos em extratos proteicos de flores silvestres;
- Estabelecimento de um protocolo de extração das proteínas de flores de *C. fistula*;
- Detecção de proteínas bioativas nos extratos proteicos de *C. fistula*;
- Estabelecimento de um protocolo de purificação de um inibidor de tripsina de flores de *C. fistula*;
- Caracterização do inibidor purificado quanto à massa molecular, ponto isoelétrico, sequência NH₂-terminal, presença de carboidrato e estabilidade ao calor e pH;
- Avaliação dos efeitos do inibidor purificado a microrganismos patogênicos a plantas (fungos) e ao homem (bactérias).

4. MATERIAIS

4.1. Flores silvestres

No presente trabalho, foram analisadas as flores das seguintes espécies vegetais: *Plumeria rubra* L. (Jasmim), *Ipomoea asarifolia* R. et Schult (Salsa), *Pachira aquatica* Aubl. (Munguba), *Cassia fistula* L. (Chuva-de-ouro) e *Turnera ulmifolia* L. (Chanana). As flores foram coletadas de plantas situadas no Campus do Pici, da Universidade Federal do Ceará (UFC), tendo sido a identificação das espécies vegetais feita pelo Herbário Prisco Bezerra.

4.2. Eritrócitos

Os eritrócitos utilizados nos ensaios de hemaglutinação foram obtidos a partir de amostras de sangue de coelho albino adulto (linhagem Nova Zelândia), mantido no biotério do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBBM) da UFC. A coleta do sangue foi efetuada através de uma pequena incisão da veia marginal da orelha, tendo sido utilizada heparina como anticoagulante.

4.3. Fungos

Os fungos fitopatogênicos *Colletotrichum lindemuthianum* e *Fusarium solani* foram provenientes da micoteca do Laboratório de Toxinas Vegetais (DBBM/UFC). Os fungos foram mantidos em meio Ágar-Batata-Dextrose (BDA) estéril, em câmara de crescimento com umidade entre 40-50%, temperatura 25-27 °C e fotoperíodo 12 h claro/12 h escuro.

4.4. Bactérias

As bactérias patogênicas Gram positiva (*Staphylococcus aureus* - ATCC 25923) e Gram negativa (*Enterobacter aerogenes* - ATCC 13048) foram fornecidas pelo Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia do Departamento de Biologia da UFC. As bactérias foram conservadas em meio ágar nutriente estéril e a 4 °C.

4.5. Reagentes químicos

Acrilamida, *N,N'*-metileno bisacrilamida, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), ácido tricloroacético (TCA), β -mercaptoetanol, albumina sérica bovina (BSA), Coomassie Brilliant Blue G-250, *N*- α -benzoil-DL-arginina-*p*-nitroanilida (BApNA), *N*- α -benzoil-DL-arginina-*p*-naftilamida (BANA), 7-dimetilaminocumarina-4-ácido acético (DMACA), azocaseína, urease, inibidor de tripsina de soja tipo Kunitz (tipo I-S), papaína, trizma-base, ditioneitol (DTT) foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EEUU).

Os marcadores de massa molecular e matrizes cromatográficas foram obtidos da GE Healthcare Life Science (NY, USA).

Os meios de cultura ágar batata, ágar nutriente, caldo Mueller-Hinton, caldo YPD (*Yeast, Potato and Dextrose*) foram obtidos da Himedia e Merk (Darmstadt, Germany).

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

5. MÉTODOS

5.1. Coleta e processamento das flores silvestres

As flores foram coletadas sempre no período da manhã (antes das 9 h), com auxílio de uma tesoura de poda, tendo sido imediatamente guardadas em caixas térmicas resfriadas e conduzidas ao Laboratório de Toxinas Vegetais, onde foram imersas em água destilada resfriada a 4 °C, por 5 minutos (FIGURA 5). Em seguida, foi procedida a retirada das sépalas, tendo sido o restante da estrutura floral secado em papel de filtro, pesado e acondicionado em recipientes plásticos a -80 °C, para posterior preparação dos extratos.

5.2. Prospecção de atividade antifúngica em extratos proteicos de flores silvestres

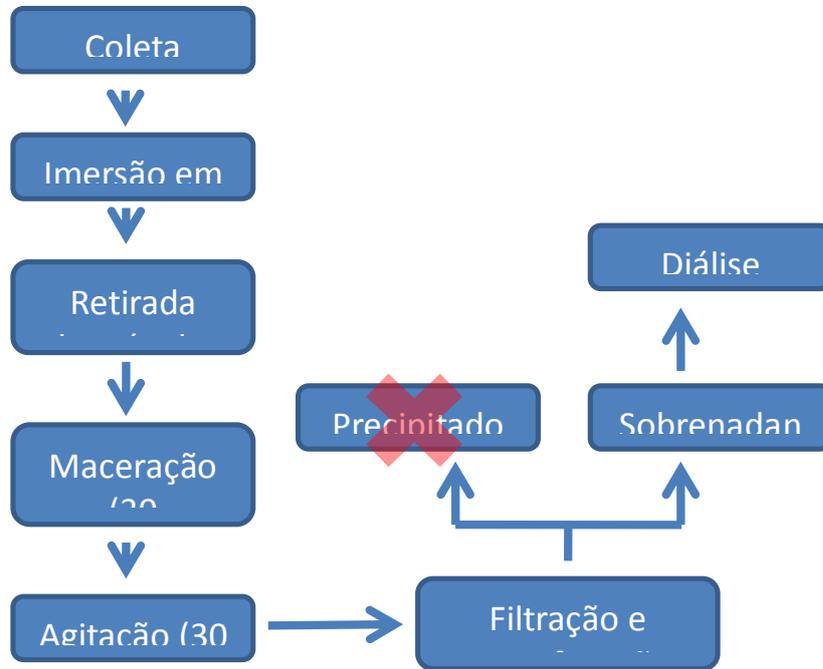
5.2.1. Preparação dos extratos

Flores sem sépalas foram maceradas durante 30 minutos em gral e, em seguida, misturadas com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, na proporção de 1:4 (m/v). A mistura foi mantida sob agitação a 4 °C, por 30 minutos, seguida de filtração em pano de trama fina e centrifugação a 10.000 x g, por 30 minutos, a 4 °C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante dialisado (*cut-off* 12 kDa) contra água destilada (FIGURA 5). Os extratos totais das flores das cinco espécies vegetais foram, então, utilizados para dosagem de proteínas solúveis e avaliação da atividade antifúngica.

5.2.2. Dosagem de proteínas solúveis

A dosagem de proteínas solúveis foi realizada seguindo a metodologia proposta por Bradford (1976). A 100 µL dos extratos, foram adicionados 2,5 mL do reagente de Bradford. A mistura foi agitada e após 10 minutos em repouso, foram feitas leituras das absorbâncias a 595 nm em espectrofotômetro. A concentração protéica foi estimada em relação a uma curva padrão obtida utilizando diferentes concentrações de BSA. Alternativamente, medidas da densidade óptica a 280 nm foram utilizadas para acompanhamento da purificação protéica nos procedimentos cromatográficos.

Figura 5 - Esquema de obtenção dos extratos protéicos totais de flores silvestres



Fonte: Próprio autor

5.2.3. Avaliação da atividade antifúngica frente à germinação dos esporos

Os fungos *F. solani* e *C. lindemuthianum* foram inicialmente repicados antes da realização dos experimentos, por meio da transferência de um *pellet*, obtido a partir de uma cultura pura retirada da micoteca, para uma placa de Petri contendo 20 mL do meio sólido BDA. O preparo da suspensão de conídios foi realizado quando o crescimento dos fungos atingiu todo o diâmetro da placa, o que ocorreu, em média, 15 dias após a repicagem. Para tanto, em cada placa foram adicionados 10 mL de água destilada estéril e, em seguida, procedida a raspagem da cultura com auxílio de uma alça de Drigalski estéril. O material obtido foi, então, filtrado em malha de nylon para eliminação de fragmentos de hifas, tendo sido denominado de suspensão padrão. Posteriormente, foi feita a contagem dos conídios em câmara de Neubauer, seguida de diluição a fim de que fosse obtido um inóculo com concentração de $2,0 \times 10^5$ conídios/mL (GIFONI, 2005).

Para avaliar o potencial antifúngico das flores silvestres, foi analisada a ação de seus respectivos extratos protéicos sobre a germinação dos conídios de *F. solani* e *C. lindemuthianum*, conforme método proposto por Ji e Kúc (1996). Alíquotas de 10 μ L da suspensão de conídios ($2,0 \times 10^5$ conídios/mL) foram incubadas com 10 μ L dos extratos (contendo 10 μ g de proteínas) ou com os controles (água destilada estéril e peróxido de hidrogênio 100 mM) em placas de germinação (placas de polietileno reticuladas). As placas foram acondicionadas em recipientes fechados contendo papel de filtro embebido de água destilada e mantidas na ausência de luz, a 30 °C durante 24 h. Após o período de germinação, os conídios foram observados em microscópio óptico (Olympus System Microscope BX 60) e fotografados com câmera digital. Aqueles que apresentaram tubo germinativo correspondente duas vezes o seu tamanho foram considerados como germinados. O extrato total que exibiu atividade contra a germinação dos esporos dos fungos em estudo, mostrando-se, portanto, mais promissor como fonte de proteínas ativas para controle desses patógenos, foi selecionado para dar continuidade aos experimentos pretendidos no presente trabalho.

5.3. Obtenção e caracterização do extrato proteico de flores de *Cassia fistula*

5.3.1. Estabelecimento das melhores condições para extração de proteínas

Dentre as espécies estudadas, apenas o extrato total das flores de *C. fistula* se mostrou capaz de inibir a germinação dos conídios de *F. solani* e *C. lindemuthianum*. Dessa forma, se

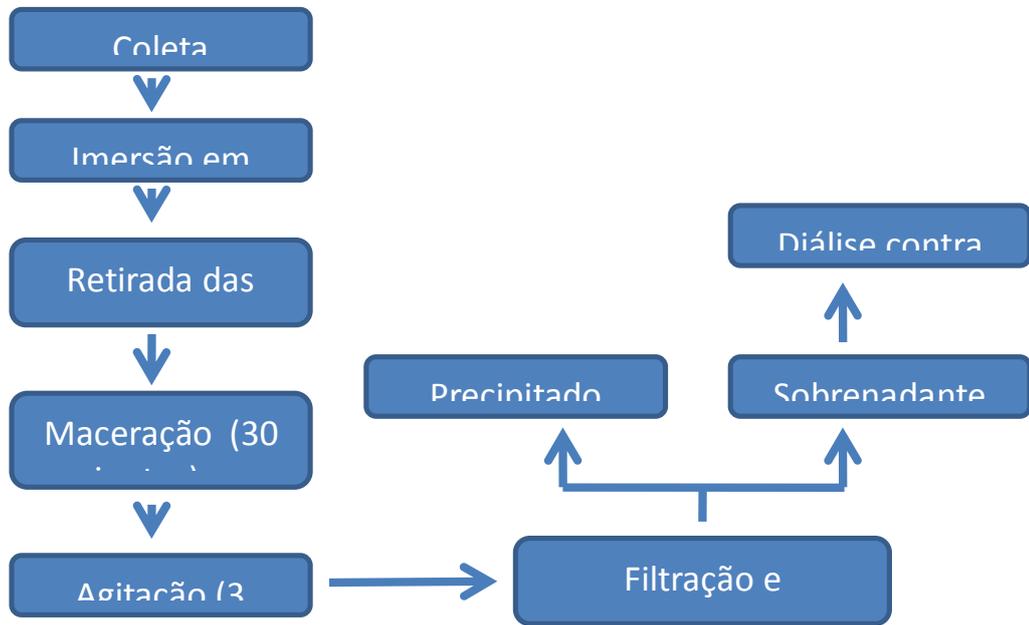
buscou determinar as melhores condições de extração das proteínas. Para tanto, as flores foram maceradas durante 30 minutos e colocadas em contato com água destilada e os seguintes tampões: Acetato de sódio 50 mM, pH 5,2; Fosfato de sódio 50 mM, pH 7,5; Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 e Glicina-NaOH 100 mM, pH 9,0, na proporção de 1:4 (m/v), durante 1 h sob agitação constante, a 4 °C. Depois, a mistura foi filtrada em pano de trama fina e o material filtrado centrifugado a 10.000 x g, por 30 minutos, a 4 °C. Os precipitados foram descartados e alíquotas do sobrenadante utilizadas para dosagem de proteínas de acordo com o descrito anteriormente. A escolha do melhor tampão de extração foi feita com base na capacidade do mesmo de solubilizar proteínas, ou seja, foi escolhido o tampão cujo extrato apresentou maior concentração de proteínas solúveis. Visando, ainda, a otimização do processo de extração, foi investigada a influência do tempo de agitação sobre a extração de proteínas, tendo sido considerados os tempos de extração de 1, 2, 3 e 4 h. A partir das análises efetuadas, o extrato protéico de flores de *C. fistula* passou a ser obtido conforme esquematizado na Figura 6.

5.3.2. Detecção e dosagem de proteínas bioativas

5.3.2.1. Determinação da atividade hemaglutinante

A presença de lectinas no extrato proteico de flores de *C. fistula* foi avaliada através de ensaio de atividade hemaglutinante conduzido segundo a metodologia descrita por Moreira e Perrone (1977), adaptada para tubos de ensaio. O extrato proteico foi submetido a diluições seriadas em tubos de ensaio na presença de NaCl 150 mM (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, etc). A 100 µL de cada diluição, foi adicionado igual volume de uma suspensão de eritrócitos (2%) de coelho, tratados ou não com tripsina (1 mg de tripsina/10 mL da suspensão, por 1 h, com agitações periódicas, seguida de centrifugações e lavagens com NaCl 150 mM). Os tubos foram incubados a 37 °C, durante 1 h. Após esse tempo, foram centrifugados a 3000 x g, durante 30 segundos. A visualização da aglutinação dos eritrócitos foi feita a olho nu e os resultados foram expressos em unidades de hemaglutinação (UH), sendo uma UH definida como o inverso da maior diluição da amostra ainda capaz de aglutinar eritrócitos.

Figura 6 - Protocolo de extração das proteínas solúveis de flores de *C. fistula*



Fonte: Próprio autor

5.3.2.2. Determinação da atividade inibitória de tripsina

A metodologia utilizada para avaliar a presença de inibidor de tripsina no extrato proteico de *C. fistula* foi a descrita por Erlanger e colaboradores (1961), com modificações. Inicialmente foi construída uma curva padrão, através das seguintes etapas: alíquotas de 10 a 30 μL de tripsina (0,3 mg/mL) foram utilizadas. Em seguida, foi adicionado o tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, contendo CaCl_2 20 mM, até o volume de 800 μL . Os tubos foram, então, incubados a 37 °C, em banho-maria, durante 10 minutos. Posteriormente, foram adicionados 500 μL da solução de BApNA 1,25 mM (substrato). Os tubos foram novamente incubados em banho-maria a 37 °C por 15 minutos e, em seguida, foi adicionada a solução de parada, 120 μL de ácido acético 30%. As leituras das absorbâncias foram realizadas em espectrofotômetro a 410 nm.

No ensaio de determinação da atividade inibitória de tripsina foi utilizado o volume de tripsina determinado pela curva, 100 μL da amostra a ser testada e o volume do tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, contendo CaCl_2 20 mM, de modo a alcançar o volume final de 800 μL . Os tubos foram incubados a 37 °C, em banho-maria, por 10 minutos. Após a incubação, foi adicionado o substrato e, novamente, os tubos foram colocados a 37 °C, por 15 minutos, em banho-maria. A reação foi interrompida pela adição de 120 μL de ácido acético 30%. As absorbâncias foram lidas no comprimento de onda de 410 nm em espectrofotômetro. A atividade inibitória de tripsina foi expressa em unidades de inibição, que representa a diminuição de 0,01 da absorbância da atividade da enzima. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e com provas em branco, onde a reação foi parada antes da adição do substrato.

5.3.2.3. Determinação da atividade inibitória de papaína

A presença de inibidores de proteases cisteínicas (papaína) no extrato foi determinada seguindo a metodologia descrita por Abe e colaboradores (1992). Inicialmente, foi preparada a solução padrão de papaína, através da dissolução de 1 mg de papaína em água grau Milli-Q e depois de diluição dessa solução 50 vezes com tampão fosfato de sódio 250 mM, pH 6,0. Alíquotas de 60 μL da solução padrão de papaína foram misturadas em tubos de ensaio com 40 μL de uma solução ativadora constituída de tampão fosfato de sódio 250 mM, pH 6,0, contendo EDTA 2 mM e DTT 3 mM. Foram adicionados, ainda, 200 μL de tampão fosfato de sódio 250 mM, pH 6,0 e 200 μL das amostras a serem analisadas quanto a presença do inibidor. Este meio reacional foi imediatamente incubado em banho-maria a 37 °C, por 10 minutos. Após

incubação, foram adicionados 200 μL do substrato BANA 1 mM (dissolvido em 1 mL de DMSO e depois acrescentado tampão fosfato de sódio 250 mM, pH 6,0, q.s.p. 700 μL). Após 20 minutos da adição do substrato, a reação foi interrompida com 500 μL de HCl 2% em etanol. Decorridos 5 minutos em temperatura ambiente, foram adicionados 500 μL do cromógeno DMACA 0,06%, dissolvido em etanol e, após 30 minutos, a absorbância foi medida a 540 nm em espectrofotômetro. Uma unidade de atividade antipapainásica (UI) foi definida como sendo a quantidade de inibidor capaz de diminuir a atividade da papaína (controle) em 0,01 da absorbância a 540 nm. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e com provas em branco, onde a reação foi parada antes da adição do substrato.

5.3.2.4. Determinação da atividade β -1,3-glucanásica

A atividade β -1,3-glucanásica foi determinada de acordo com a metodologia proposta por Boller (1992). Inicialmente, foi preparada uma solução de laminarina (2 mg/mL) em água grau Milli-Q. A solução foi exaustivamente dialisada contra água grau Milli-Q para retirada de glucose livre presente antes da reação enzimática. Nesse experimento, foram utilizadas três soluções principais, convencionalmente chamadas de A (25 g de carbonato de sódio, 25 g de tartarato de sódio e potássio, 20 g de bicarbonato de sódio, 200 g de sulfato de sódio anidro e água grau Milli-Q q.s.p 100 mL), B (15 g de sulfato de cobre pentahidratado, 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado e água grau Milli-Q q.s.p 100 mL) e C (25 g de molibdato de amônio dissolvidos em 21 mL de ácido sulfúrico e 450 mL de água grau Milli-Q e 3 g de arseniato de sódio heptahidratado dissolvidos em 25 mL de água grau Milli-Q). Uma alíquota de 100 μL do extrato foi incubada com 900 μL da solução de laminarina em tubos de ensaio, em banho-maria a 50 °C, durante 30 minutos. Foi, então, adicionado 1 mL da solução D (mistura da solução B com a solução A na proporção de 1:25, preparada no momento do ensaio) e a mistura reacional aquecida a 100 °C em banho-maria, durante 20 minutos. Após o período de incubação, as amostras foram resfriadas a 25 °C, por 5 minutos, sendo, em seguida, adicionado 1 mL da solução C. Os tubos foram agitados em vortex para remoção dos gases formados durante a reação e deixados em repouso por 5 minutos. As leituras das absorbâncias foram realizadas em espectrofotômetro a 520 nm. Para o cálculo da quantidade de açúcar liberado, foi utilizada uma curva construída a partir de concentrações variadas de glucose (7 a 240 $\mu\text{g/mL}$), preparadas em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,2. A atividade β -1,3-glucanásica foi expressa em $\eta\text{Kat/mgP}$, onde 1 ηKat equivale a 1 $\eta\text{mol/mL}$ de glucose liberado por segundo.

5.3.2.5. Determinação da atividade quitinásica

A determinação da atividade quitinásica foi conduzida segundo a metodologia descrita por Boller (1992), que teve como parâmetro a liberação de *N*-acetil-D-glucosamina (NAG), a partir da ação hidrolítica das enzimas sobre a quitina coloidal. A quitina coloidal foi preparada a partir de quitosana, segundo o protocolo descrito por Boller (1992), modificado para uso de anidrido acético não-radioativo (BARRETO, 2005). Alíquotas de 250 μ L da amostra foram incubadas com 250 μ L de quitina coloidal, a 37 °C, durante 1 h. A atividade enzimática foi interrompida pela fervura (98 °C) dos tubos, em banho-maria, por 10 minutos. Em seguida, os tubos foram resfriados em banho de gelo e, então, centrifugados a 10.000 x *g*, por 10 minutos. Após a centrifugação, alíquotas de 300 μ L foram retiradas e incubadas com 10 μ L de uma solução da enzima glucuronidase (EC 3.2.1.31), a 37 °C, durante 1 h. Essa solução de glucuronidase foi obtida através da diálise de um preparado bruto obtido de *Helix pomatia* (Sigma Chemical Co. - “Type HP-2”, 132.000 unidades/mL) com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,2, e diluição de 10 vezes com o mesmo tampão de reação.

Para determinação da quantidade de NAG liberada no ensaio, 310 μ L do hidrolisado foram acrescidos de 190 μ L de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,2, e 100 μ L de uma solução de tetraborato de sódio e potássio 0,6 M. Os tubos foram fervidos em banho-maria por 5 minutos e resfriados em banho de gelo. Foram adicionados, 1000 μ L de *p*-dimetilaminobenzaldeído (DMAB) na concentração de 0,1 g/mL, preparado em solução de ácido acético glacial contendo 12,5 % (v/v) de ácido clorídrico 11,5 M. A mistura foi mantida a 37 °C em banho-maria, por 20 minutos e, imediatamente, lida a absorbância a 585 nm. Para cálculo do teor de açúcar liberado no ensaio, uma curva padrão foi construída a partir de soluções de glucose, com concentrações variando de 0,1 a 0,5 mM em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,2 (REISSIG *et al.*, 1955). A atividade quitinolítica foi expressa em nKat/mgP, onde 1 nKat equivale a 1 η mol/mL de NAG liberado por segundo.

5.3.2.6. Determinação da atividade peroxidásica

A atividade peroxidásica foi determinada com base na metodologia descrita por Urbanek e colaboradores (1991). O guaiacol foi utilizado como substrato doador de prótons e o peróxido de hidrogênio como aceptor. Em 100 μ L do extrato, foram adicionados 500 μ L de guaiacol 20 mM, 500 μ L de peróxido de hidrogênio 60 mM e 900 μ L de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,2. Os tubos foram incubados a 30 °C, durante 10 minutos, e a absorbância

lida em espectrofotômetro a 480 nm. A variação de 1 unidade de absorbância por minuto foi assumida com sendo 1 unidade de atividade peroxidásica (UAP).

5.3.2.7. Determinação da atividade ureásica

A determinação da atividade ureásica foi realizada segundo a metodologia proposta por Kaplan (1969). Alíquota de 100 μL de uma solução de uréia 500 mM foi misturada com 700 μL de EDTA 2%, tamponado com fosfato de potássio 200 mM, pH 6,5. Após adição de 200 μL do material diluído em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,0, contendo NaCl 150 mM, para uma concentração de 0,2 mg de proteína por mL, a mistura foi incubada a 37 °C, por 15 minutos. Em seguida, foram adicionados ao meio reacional 1 mL da solução A (62 g de fenol + 0,25 g de nitropussiato de sódio/L) e 1 mL da solução B (43 mL de hipoclorito de sódio 5,25% + 20 g de hidróxido de sódio/L), sendo então, deixada a 37 °C, por mais 5 minutos. Após esse tempo, 7 mL de água deionizada foram adicionados aos tubos, sendo esses cobertos com parafilme e agitados vigorosamente. As leituras das absorbâncias foram feitas a 625 nm e a atividade enzimática foi avaliada em relação à curva padrão obtida com a urease comercial (Sigma 41H7008 – 870.000 U/g).

5.3.2.8. Determinação da atividade proteásica

A atividade proteásica foi avaliada segundo a metodologia descrita por Xavier-Filho *et al.* (1989). Azocaseína foi utilizada como substrato não específico para avaliação da atividade proteolítica total que, ao sofrer degradação por proteases, em geral, libera um corante azoico, funcionando como um cromóforo. Em tubos eppendorf, foram adicionados 200 μL da solução de azocaseína 1%, dissolvida em tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 6,0, 300 μL desse mesmo tampão, 21 μL da solução de DTT e 200 μL de amostra. Nos brancos, ao invés da amostra, foram adicionados 500 μL do tampão mencionado e os demais reagentes citados. Em seguida, a mistura foi incubada em banho-maria a 37 °C, por 1 h. Após o período de incubação, foi adicionada a solução de ácido tricloroacético (TCA) 20% para interromper a reação e, posteriormente, os tubos foram centrifugados a 10.000 x g, por 10 minutos. Foi retirada uma alíquota de 400 μL do sobrenadante e a ela foram adicionados mais 400 μL da solução de NaOH 2 M, a fim de intensificar a cor do produto da clivagem da azocaseína pela enzima. A absorbância foi lida a 420 nm. A atividade proteolítica foi expressa em unidades de atividade

por miligrama de proteína (UA/mgP). Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de proteína capaz de aumentar a absorvância em 0,01 em uma hora.

5.4. Purificação de um inibidor de tripsina presente no extrato total de flores de *C. fistula* (CfTI)

5.4.1. Fracionamento do extrato total com ácido tricloroacético

O extrato total das flores de *C. fistula* (2 mL) foi submetido à precipitação com solução aquosa de TCA 20%. Alíquotas de 2 mL do extrato total foram precipitadas com solução aquosa de TCA 20%, em banho de gelo, de modo que fossem obtidas frações proteicas com concentrações finais de TCA variando entre 0,5% e 5% . O procedimento foi realizado sob agitação constante e a 4 °C, tendo sido a adição dos respectivos volumes de TCA 20% feita de forma lenta e gradual. Após a adição do ácido, o material foi deixado em repouso por 30 minutos, a 4 °C e, em seguida, centrifugado a 10.000 x g, 30 minutos, 4 °C. Os precipitados foram descartados e os sobrenadantes submetidos à diálise contra água destilada, para retirada do ácido. As frações proteicas foram submetidas à dosagem de proteínas solúveis (BRADFORD, 1976) e à quantificação da atividade inibitória de tripsina.

5.4.2. Cromatografia de afinidade em matriz de anidrotripsina-Sepharose 4B

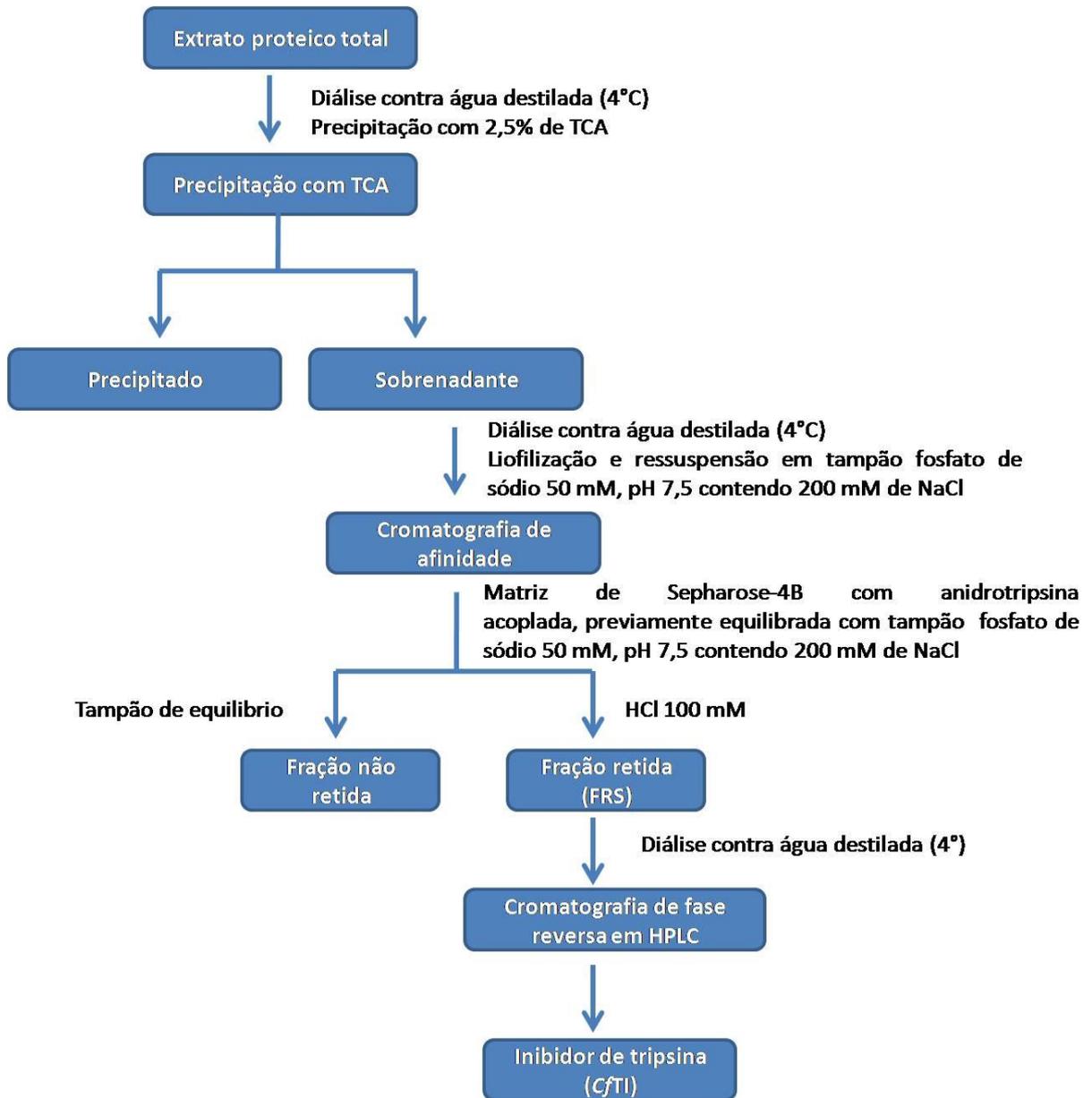
Para preparação da matriz de anidrotripsina-Sepharose 4B, foi primeiramente realizada a conversão de tripsina em anidrotripsina. Para isso, 1,0 g de tripsina foi dissolvido em 1,0 L de tampão Tris-HCl 75 mM, pH 7,2, contendo CaCl₂ 3 mM. Essa solução foi misturada com 1,0 L de uma solução de PMSF (250 mg em 100 mL de 2-propanol e 900 mL de água destilada). Após diálise exaustiva contra água destilada (4 °C), o material foi liofilizado e ressuscitado em KOH 50 mM. Após 12 minutos de repouso, a reação foi interrompida por meio da adição de HCl 1,0 M à solução até que o pH 7,0 fosse atingido. O material foi novamente dialisado exaustivamente contra água destilada (4 °C) e liofilizado. O material resultante, denominado de anidrotripsina, foi acoplado à matriz de Sepharose 4B ativada com brometo de cianogênio. Entretanto, para isso, a matriz foi previamente ressuscitada em 50 mL de HCl 1 mM e deixada em repouso durante 15 minutos, tendo sido esse procedimento repetido 10 vezes, e a anidrotripsina ressuscitada em tampão bicarbonato de sódio 100 mM, pH 8,3, contendo NaCl 500 mM. A mistura, anidrotripsina + Sepharose 4B, foi submetida à agitação durante 4 h, a 4

°C, seguida de repouso por 12 h. A anidrotripsina não acoplada foi removida pela lavagem da matriz com tampão bicarbonato de sódio 100 mM, pH 8,3, contendo NaCl 500 mM. O bloqueio dos grupos não reativos foi feito com tampão Tris-HCl 100 mM, pH 8,0. Para concluir o processo de acoplamento, a matriz foi lavada com acetato de sódio 100 mM, pH 5,2, seguida de NaCl 500 mM e Tris-HCl 100 mM, pH 8,0, contendo NaCl 500 mM.

A fração proteica (20 mg) oriunda do fracionamento do extrato total com TCA apresentando a maior atividade inibitória de tripsina, obtida com uma concentração final do ácido de 2,5% (FTCA 2,5), foi dialisada contra água destilada a 4 °C, liofilizada, ressuspensa em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,5 contendo NaCl 200 mM, e aplicada na matriz de anidrotripsina-Sepharose 4B, previamente equilibrada com esse mesmo tampão. As proteínas não retidas foram eluídas com o próprio tampão de equilíbrio e as adsorvidas na matriz após adição de HCl 100 mM. A fração retida na cromatografia de afinidade (FRS – Fração Retida na Sepharose 4B) foi dialisada contra água destilada e liofilizada. Frações de 2,0 mL foram coletadas a um fluxo constante de 60 mL/h e o perfil proteico foi acompanhado por espectrofotometria a 280 nm.

5.4.3. Cromatografia de fase reversa em sistema de HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

A FRS (1,0 mg) foi submetida à cromatografia de fase reversa em coluna analítica de HPLC (Vydac C-18TP 522). As proteínas foram eluídas com um gradiente linear de acetonitrila (5-80%). O pico proteico encerrando atividade inibitória de tripsina foi denominado de *CfTI* (Inibidor de Tripsina de *C. fistula* ou *C. fistula* Trypsin Inhibitor). O esquema contendo as etapas de purificação do *CfTI* está representado na Figura 7.

Figura 7 - Esquema de purificação do inibidor de tripsina presente nas flores de *C. fistula*

Fonte: Próprio autor

5.5. Caracterização bioquímica do CfTI

5.5.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida

O perfil eletroforético do CfTI foi observado em gel de poliacrilamida, em presença de SDS, segundo metodologia descrita por Laemmli (1970) adaptada ao uso de placas. Para montagem das placas, foram usados gel de aplicação, encerrando 3,5% de acrilamida e 1% de SDS preparados em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, e gel de separação contendo 15% de acrilamida e 1% de SDS em tampão Tris-HCl 3,0 M, pH 8,8. As amostras foram primeiramente dissolvidas em tampão de amostra (Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8, contendo 1% de SDS e 20% de glicerol). Em seguida, as mesmas foram aquecidas a 100 °C durante 10 minutos e centrifugadas a 10.000 x g, por 5 minutos, à temperatura ambiente. Aos sobrenadantes, foi adicionado azul de bromofenol para o acompanhamento da corrida eletroforética. Em seguida, alíquotas de cada amostra foram aplicadas em poços e a corrida foi conduzida a uma corrente de 20 mA, por aproximadamente 4 h. Após corrida eletroforética, as proteínas do gel foram fixadas com solução aquosa de etanol 30% e ácido fosfórico 2% e, então, coradas com Coomassie G-250 (“*Blue silver*”) (CANDIANO *et al.*, 2004). Já o descoramento do gel foi feito com solução de metanol, ácido acético e água (1,0:3,5:8,0 v/v/v). Como padrões de massa molecular foram usados 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 2-lactoalbumina (14,4 kDa). A massa molecular aparente das amostras foi estimada a partir de uma curva padrão construída com os Rfs dos marcadores de massa molecular utilizados.

5.5.2. Eletroforese bidimensional

CfTI foi solubilizado em solução de uréia 7 M e tiouréia 2 M (1 mg/mL). Foram utilizadas tiras de gel imobilizado (*DryStrip* IPG, Amersham Bioscience), com gradiente de pH de 4 a 11, medindo 11 cm de comprimento. As tiras foram postas em contato com 240 µL de tampão de reidratação (uréia 8 M, CHAPS 2%, DTT 0,3% e pequenas quantidades de azul de bromofenol) e 10 µL da amostra por, aproximadamente, 16 h, em bandeja de reidratação (*Immobiline DryStrip Reswelling Tray*), à temperatura ambiente. Em seguida, as tiras foram submetidas à focalização isoeétrica (primeira dimensão) a uma temperatura constante de 20 °C, em um sistema Multiphor II (Pharmacia Biotech). A voltagem foi aumentada progressivamente: 500 V por 30 minutos; 3000 V por 6 horas e 9500 V por 2 h. Após a

focalização isoeletrica, as tiras foram equilibradas por 20 minutos com DTT 1% em tampão de equilíbrio (Tris-HCl 50 mM, pH 8,8, uréia 6 M, glicerol 30%, SDS 2% e pequenas quantidades de azul de bromofenol) e, posteriormente, com iodoacetamida 2,5% no mesmo meio, por mais 20 minutos, à temperatura ambiente, sob leve agitação. Após equilíbrio, as tiras foram lavadas com tampão de corrida para retirar o excesso de tampão e seladas com agarose 5% no topo do gel de poliacrilamida (15%). A eletroforese (segunda dimensão) foi realizada em sistema de eletroforese vertical SE 600 Ruby (Amersham Bioscience) (LAEMMLI, 1970), tendo sido conduzida a 15 mA, por 15 minutos e, em seguida, a uma corrente de 25 mA até o azul de bromofenol atingir o final do gel (aproximadamente, 6 h). Foi utilizado gel de dimensão de 160 x 180 x 1,5 mm. Após corrida eletroforética, as proteínas do gel foram fixadas com solução aquosa de etanol 30% e ácido fosfórico 2% e reveladas com prata (BLUM ; BEIER; GROSSA, 1987). Juntamente com a amostra, foi aplicada uma mistura de proteínas com massas moleculares conhecidas: fosforilase B (97 kDa), albumina sérica bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e 2-lactoalbumina (14,4 kDa).

5.5.3. Determinação da sequência NH₂-terminal

A sequência de aminoácidos da região NH₂-terminal do CfTI foi obtida utilizando um sequenciador automático de proteínas (Shimadzu PPSQ-23A), baseado no princípio de degradação de Edman. Os derivados feniltioidantoina dos aminoácidos (PTH-aminoácidos) foram detectados a 269 nm, após separação em coluna de fase reversa C₁₈ (4,6 x 2,5 mm), conduzida sob condições isocráticas de acordo com as instruções do fabricante. A sequência de aminoácidos obtida foi submetida ao alinhamento automático através do sistema NCBI-BLAST.

5.5.4. Avaliação da presença de carboidratos (natureza glicoproteica)

A natureza glicoproteica ou não do CfTI foi avaliada através de coloração pelo ácido periódico de Schiff (PAS), seguindo metodologia descrita por Zacharius e colaboradores (1969). Primeiramente, o CfTI foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida, em presença de SDS, segundo metodologia descrita por Laemmli (1970), como mostrada anteriormente. Depois da corrida, o gel foi fixado em solução de ácido acético 7,5%, por 2 h. Após esse período, o gel foi imerso em solução de ácido periódico 0,2%, 4 °C, por 45 minutos.

Em seguida, o gel foi posto em contato com o reagente de Schiff, a 4 °C, por mais 45 minutos. Visando a revelação específica de glicoproteínas, o gel foi transferido para uma solução de metabissulfito de potássio 0,5% em HCl 50 mM. Para conservação do gel, este foi deixado em solução de ácido acético 5%.

5.5.5. Avaliação da estabilidade do CfTI frente a diferentes fatores

5.5.5.1. Calor

A estabilidade térmica do CfTI foi avaliada seguindo os procedimentos descritos por Klomklao e colaboradores (2011). Alíquotas de 500 µL de uma solução de inibidor (0,035 mgP/mL), preparada em água destilada e com capacidade de inibição de 60-70%, foram incubadas em banho-maria a diferentes temperaturas (20, 40, 60, 80 e 100 °C) durante 15 minutos. Posteriormente, os tubos foram resfriados até a temperatura ambiente. Em seguida, a atividade inibitória foi determinada conforme metodologia descrita anteriormente, tendo sido as atividades relativas correspondentes aos diferentes tratamentos comparadas à atividade original, ou seja, determinada nas condições descritas no item 5.2.2.2.

5.5.5.2. pH

A estabilidade do CfTI frente a diferentes valores de pH foi avaliada segundo metodologia descrita por Klomklao e colaboradores (2011). Amostras de 0,5 mg do inibidor foram solubilizadas em 500 µL das soluções tampão: glicina-HCl 50 mM, pH 2,2; acetato de sódio 50 mM, pH 5,2; fosfato de sódio 100 mM, pH 7,8; Tris-HCl 100 mM, pH 8,0 e borato de sódio 100 mM, pH 10,0. Após incubação da proteína em diferentes pHs, por 30 minutos à temperatura ambiente, foi avaliada a atividade inibitória de tripsina conforme metodologia descrita anteriormente, tendo sido as atividades relativas correspondentes aos diferentes tratamentos comparadas à atividade original, ou seja, determinada nas condições descritas no item 5.2.2.2.

5.6. Avaliação da atividade antimicrobiana de proteínas presentes em flores de *C. fistula*

5.6.1. Atividade antifúngica

A atividade do extrato total, da fração proteica precipitada com TCA 2,5% e do CfTI sobre a germinação de esporos e/ou crescimento micelial dos fungos *F. solani* e *C. lindemuthianum* foi investigada. A avaliação da inibição da germinação dos esporos foi conduzida conforme metodologia descrita por Ji e Kuc (1996), apresentada no item 5.2.3. Quanto à metodologia para avaliar a ação das amostras sobre o crescimento dos fungos em meio líquido, foi seguida a metodologia descrita por Freire e colaboradores (2002), com algumas modificações. Para tanto, alíquotas de 10 µL da suspensão de conídios ($2,0 \times 10^5$ conídios/mL) dos fungos mencionados foram incubadas com 100 µL de meio YPD (*Yeast Peptone Dextrose*) em placas de microtitulação de poliestireno de fundo chato (estéreis), contendo 96 poços. Após um período de incubação de 16 h a 27°C, na ausência de luz, foram adicionados 100 µL das amostras a diferentes concentrações e dos controles (água destilada estéril e peróxido de hidrogênio 100 mM), todos previamente filtrados em filtro Millex® GV (0,22 µm). O crescimento dos fungos foi acompanhado por meio de leituras da absorbância a 620 nm, em intervalos de 4 ou 12 h, até um total de 96 h, em leitor de microplacas (Biotrak II Plate Reader, Amersham Biosciences). A atividade antifúngica das amostras foi determinada através da análise das curvas de crescimento dos fungos, quando comparadas àquelas dos controles.

5.6.2. Atividade antibacteriana

Para avaliar a atividade antibacteriana das amostras, foram utilizadas as bactérias patogênicas *Staphylococcus aureus* e *Enterobacter aerogenes*. As bactérias, previamente repicadas em meio de cultura ágar nutriente, foram transferidas para caldo Mueller-Hinton (5 mL) e incubadas em estufa a 37 °C, por 18-24 h. Suspensão de células ($D.O_{600\text{ nm}} = 0,08$ a $0,1$) encerrando 10^5 - 10^6 UFC/mL foi utilizada no ensaio, realizado de acordo com a metodologia proposta por Hancock (2000). O ensaio foi conduzido em placas de microtitulação (96 poços), onde foram adicionados 100 µL da suspensão de células e 100 µL das amostras em diferentes concentrações. O crescimento bacteriano foi acompanhado por meio de leituras da absorbância a 630 nm, a cada 1 h durante 5 h, em leitor de microplacas (Biotrak II Plate Reader, Amersham Biosciences). Como controle negativo e positivo foram utilizados tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,5, e formaldeído 0,4% (v/v), respectivamente.

5.7. Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo Teste de Tukey a 5% ($p < 0,05$). O programa utilizado para os referidos cálculos foi o *software Graphpad Prism*.

6. RESULTADOS

6.1. Prospecção de atividade antifúngica nos extratos totais de flores silvestres

Foram preparados extratos totais das flores das seguintes espécies vegetais: *Plumeria rubra* (Jasmim), *Ipomoea asarifolia* (Salsa), *Pachira aquatica* (Munguba), *Cassia fistula* Linn. (Chuva-de-ouro) e *Turnera ulmifolia* (Chanana). Após a preparação dos extratos, foi feita a dosagem das proteínas solúveis (TABELA 3). Os extratos de flores de *C. fistula* (0,28 mgP/mL) e *I. asarifolia* (0,39 mg/mL) foram os que tiveram concentrações proteicas mais baixas. Em contrapartida, o extrato de *P. rubra* apresentou uma maior concentração proteica (0,98 mg/mL). Em relação aos extratos de flores de *P. aquatica* e *T. ulmifolia*, não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre eles, com concentração proteica em torno de 0,60 mgP/mL.

Quando submetidos à avaliação da atividade antifúngica frente à germinação de esporos de fungos fitopatogênicos, extratos dialisados e liofilizados de algumas das flores estudadas mostraram efeitos inibitórios. As Figuras 8 e 9 mostram os resultados obtidos com *F. solani* e *C. lindemuthianum*, respectivamente, na presença dos extratos das flores em estudo (100 µg). Dentre as espécies testadas, apenas os extratos de *P. rubra* e *C. fistula* se mostraram capazes de interferir na germinação dos esporos dos fungos, quando comparados ao controle. No caso do extrato de *P. rubra*, resultados inibitórios da germinação foram observados apenas com *F. solani*, diferentemente do extrato de *C. fistula* que apresentou capacidade de retardar a germinação dos conídios de *F. solani*, bem como de inibir completamente a germinação dos esporos de *C. lindemuthianum*.

Como no presente trabalho foi priorizada a busca de proteínas bioativas em flores silvestres, foi dada continuidade aos experimentos apenas com as flores de *C. fistula* devido à sua habilidade de inibir a germinação de conídios dos dois fungos fitopatogênicos selecionados como modelos experimentais.

No intuito de verificar se o extrato total das flores de *C. fistula* seria capaz de interferir em outro estágio do desenvolvimento dos fungos, foram analisados seus efeitos sobre o crescimento micelial dos fitopatógenos. Com base nas curvas de crescimento de *F. solani* e *C. lindemuthianum*, na presença do extrato total das flores de *C. fistula*, foi observado que os dois fungos tiveram seu crescimento retardado durante as 60 h iniciais do experimento, quando incubados com 50 µg do extrato total (FIGURA 10).

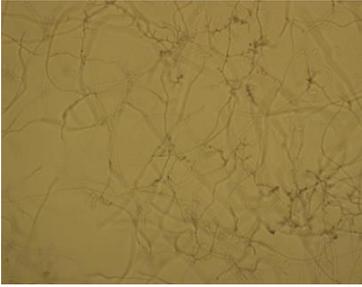
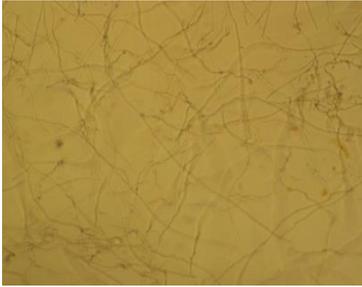
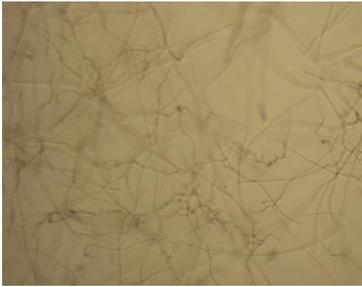
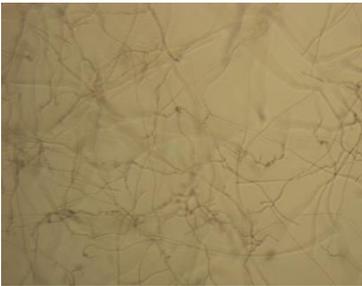
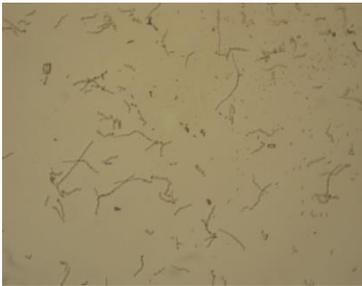
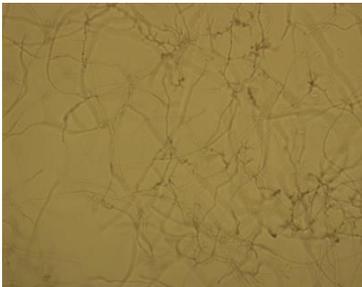
Tabela 3 - Extração de proteínas de flores silvestres

| Espécies das flores | Concentração proteica (mgP/mL) |
|---------------------------|-----------------------------------|
| <i>Plumeria rubra</i> | 0,98 ± 0,19 ^a |
| <i>Ipomoea asarifolia</i> | 0,39 ± 0,10 ^c |
| <i>Pachira aquatica</i> | 0,58 ± 0,04 ^b |
| <i>Cassia fistula</i> | 0,28 ± 0,09 ^d |
| <i>Turnera ulmifolia</i> | 0,61 ± 0,10 ^b |

Os valores representam médias de triplicatas ± desvio padrão.

Letras iguais representam valores que não diferiram significativamente ($P > 0,05$) pelo teste de Tukey.

Figura 8 - Atividade dos extratos totais dialisados (100 µgP) de flores silvestres sobre a germinação dos esporos de *Fusarium solani*

| Espécies de flores | Controle: Água destilada | Tratamento: Extrato |
|---------------------------|---|---|
| <i>Plumeria rubra</i> |  |  |
| <i>Ipomoea asarifolia</i> |  |  |
| <i>Pachira aquatica</i> |  |  |
| <i>Cassia fistula</i> |  |  |
| <i>Turnera ulmifolia</i> |  |  |

Fonte: Próprio autor

Figura 9 - Atividade dos extratos totais dialisados (100 µgP) de flores silvestres sobre a germinação dos esporos de *Colletotrichum lindemuthianum*

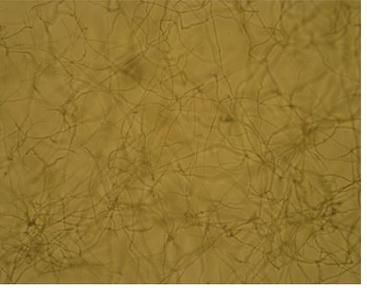
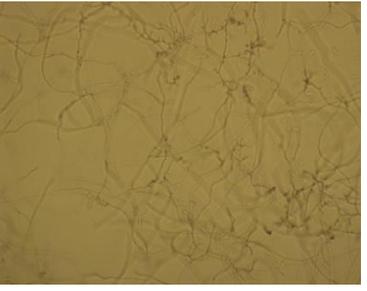
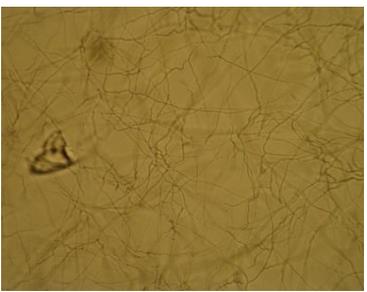
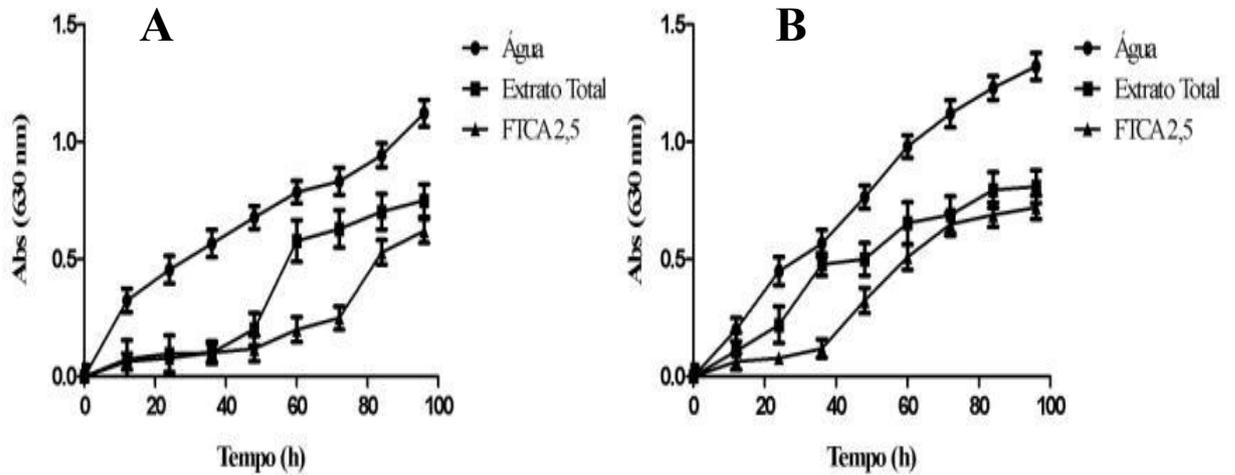
| Espécies de flores | Controle: Água destilada | Tratamento: Extrato |
|---------------------------|---|---|
| <i>Plumeria rubra</i> |  |  |
| <i>Ipomoea asarifolia</i> |  |  |
| <i>Pachira aquatica</i> |  |  |
| <i>Cassia fistula</i> |  |  |
| <i>Turnera ulmifolia</i> |  |  |

Figura 10 - Curvas de crescimento dos fungos *Fusarium solani* (A) e *Colletotrichum lindemuthianum* (B) na presença do extrato total dialisado de flores de *C. fistula* e da fração obtida a partir de sua precipitação com TCA 2,5% (FTCA 2,5)



Legenda: ● - controle negativo (água destilada); ■ - extrato total (50 µg); ▲ FTCA 2,5 (50 µg).

Fonte: Próprio autor

Adicionalmente, visando ampliar o conhecimento do espectro de ação do extrato total de *C. fistula*, foi investigado os seus efeitos sobre bactérias patogênicas ao homem, tendo sido verificada inibição do crescimento de *S. aureus* e *E. aerogenes* na dose de 50 µg (FIGURA 11).

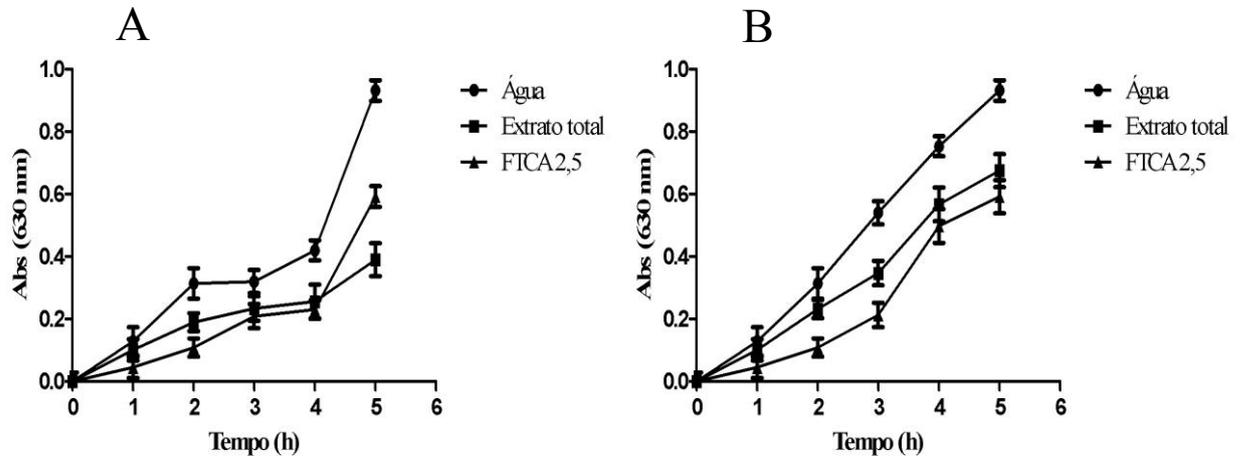
Diante das atividades antimicrobianas detectadas no extrato total das flores de *C. fistula*, foi dado prosseguimento com a busca das melhores condições para extração de proteínas das flores dessa espécie, visando identificar quais as classes de proteínas que poderiam estar envolvidas com as atividades antifúngica e antibacteriana detectadas e, em uma etapa mais avançada, purificar e caracterizar essa (s) proteína (s).

6.2. Estabelecimento das melhores condições para extração de proteínas das flores de *C. fistula*

A Tabela 4 mostra a concentração de proteínas de extratos de flores de *C. fistula* utilizando-se diferentes solventes. Os extratos obtidos com água destilada e tampão glicina-NaOH 100 mM, pH 9,0, foram os que apresentaram a menor concentração de proteínas (0,19 mgP/mL). Já o extrato preparado com tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,5, foi o que mostrou a maior concentração proteica (0,61 mgP/mL), tendo sido, por essa razão, escolhido para preparação do extrato proteico das flores de *C. fistula*.

Após ter selecionado o fosfato de sódio 50 mM, pH 7,5, como tampão de extração, o estudo ficou centrado na avaliação da influência do tempo sobre a concentração de proteínas solúveis presentes no extrato total. De acordo com os resultados obtidos (TABELA 5), a concentração de proteínas com 1 h de extração não diferiu daquela verificada com 2 h. Contudo, com uma duração de extração maior, de 3 h, por exemplo, diferença significativa ($P < 0,05$) foi detectada. O aumento do tempo de extração para 4 h não promoveu incremento na quantidade de proteína extraída em relação ao tempo de 3 h. Portanto, o tempo de extração por 3 h foi selecionado e acrescentado ao protocolo de preparação do extrato proteico de flores de *C. fistula*.

Figura 11 - Curvas de crescimento das bactérias *Staphylococcus aureus* (A) e *Enterobacter aerogenes* (B) na presença do extrato total dialisado das flores de *C. fistula* e da fração obtida a partir de sua precipitação com TCA 2,5% (FTCA 2,5)



Legenda: ●: controle negativo (água destilada); ■ extrato total (50 µg); ▲ FTCA 2,5 (50 µg).

Fonte: Próprio autor

Tabela 4 - Proteínas solúveis presentes nos extratos de flores de *C. fistula* obtidos com diferentes solventes

| Solventes de extração | Concentração proteica (mgP/mL) |
|---------------------------------------|-----------------------------------|
| Água destilada | 0,19 ± 0,07 ^a |
| Tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,2 | 0,23 ± 0,11 ^b |
| Tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 | 0,31 ± 0,05 ^c |
| Tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,5 | 0,61 ± 0,16 ^d |
| Tampão glicina-NaOH 100 mM, pH 9,0 | 0,19 ± 0,10 ^a |

Os valores representam médias de triplicatas ± desvio padrão.

Letras iguais representam valores que não diferiram significativamente ($P > 0,05$) pelo teste de Tukey.

Tabela 5 - Influência do tempo de extração na concentração de proteínas solúveis no extrato de flores de *C. fistula*

| Tempo de extração (horas) | Concentração proteica (mgP/mL) |
|---------------------------|--------------------------------|
| 1 | 0,60 ± 0,12 ^a |
| 2 | 0,61 ± 0,05 ^a |
| 3 | 0,68 ± 0,05 ^b |
| 4 | 0,68 ± 0,14 ^b |

Os valores representam médias de triplicatas ± desvio padrão.

Letras iguais representam valores que não diferiram significativamente ($P > 0,05$) pelo teste de Tukey.

6.3. Detecção e dosagem de proteínas bioativas no extrato total de flores de *C. fistula*

Os procedimentos usados para preparação do extrato total de flores de *C. fistula* renderam 135,2 mgP/50 g de flores. Nesse extrato, foram detectadas várias atividades, conforme mostradas na Tabela 6. Dentre as atividades detectadas, sobressaíram-se as atividades inibitórias de tripsina (42,41 UI/mgP), de papaína (27,10 UI/mgP) e peroxidásica (20,0 UAP/mgP). Atividade quitinásica foi, também, encontrada ($1,7 \pm 0,21$ ηkatal/mgP). Por outro lado, o extrato proteico não apresentou atividade hemaglutinante, mesmo após o tratamento dos eritrócitos com tripsina, nem atividades β-1,3-glucanásica, proteásica e ureásica.

Com base nas atividades detectadas, a atividade inibitória de tripsina foi a que mais se destacou. Associada a esse fato, a sua detecção foi uma constante nas extrações realizadas a partir das diversas coletas de flores no decorrer do ano. Tais resultados direcionaram o presente estudo para o isolamento e caracterização desse inibidor, não deixando de lado, entretanto, de monitorar a atividade antimicrobiana anteriormente detectada.

6.4. Purificação do inibidor de tripsina presente no extrato total de flores de *C. fistula* (CfTI)

A estratégia de purificação seguida para obtenção do inibidor de tripsina foi mostrada na figura 7, em Métodos. Como critérios para estabelecimento do protocolo de purificação, foram adotados a realização do ensaio de atividade inibitória de tripsina, teste antifúngico e/ou análise do perfil eletroforético após cada passo de purificação. Em adição, foi testada a presença de atividade contra bactérias patogênicas ao homem.

6.4.1. Fracionamento do extrato total com ácido tricloroacético

Para definir a primeira etapa de purificação, o extrato total de flores de *C. fistula* foi precipitado com concentrações crescentes de TCA (0,5 a 5%). As denominações das frações obtidas após essa precipitação foram decorrentes dos teores de TCA adicionados. Dessa maneira, as frações resultantes após adição de TCA ao extrato total foram nomeadas de FTCA 0,5, FTCA 1,0, FTCA 2,5 e FTCA 5,0, correspondendo às concentrações de TCA de 0,5%,

Tabela 6 - Detecção e quantificação de proteínas bioativas presentes no extrato total de flores de *C. fistula*

| Atividade | Extrato total |
|--|-----------------|
| Hemaglutinante (UH/mgP) ^a | ND ^h |
| Inibitória de tripsina (UI/mgP) ^b | 42,41 ± 0,35 |
| Inibitória de papaína (UI/mgP) ^c | 27,10 ± 0,23 |
| β-1,3-glucanásica (ηkatal/mgP) ^d | ND |
| Quitinásica (ηkatal/mgP) ^f | 1,70 ± 0,21 |
| Peroxidásica (UAP/mgP) ^e | 20,0 ± 0,18 |
| Proteásica (UA/mgP) ^g | ND |
| Ureásica | ND |

Os dados representam valores médios encontrados em diferentes coletas ± desvio padrão.

^a Uma unidade de hemaglutinação (UH) corresponde ao valor recíproco da maior diluição capaz de provocar aglutinação visível dos eritrócitos.

^b Uma unidade de inibição da atividade da tripsina (UI) corresponde à quantidade de inibidor que reduz a atividade da tripsina em 0,01 da absorbância a 410 nm.

^c Uma unidade de atividade antipapainásica (UI) corresponde à quantidade de inibidor que reduz a atividade da papaína em 0,01 da absorbância a 540 nm.

^d 1 ηkatal corresponde a 1ηmol/mL de glicose liberado por segundo.

^e Uma unidade de atividade peroxidásica (UAP) foi definida como a variação de uma unidade de absorbância a 470 nm.

^f 1 ηkatal corresponde a 1ηmol/mL de *N*-acetil-D-glucosamina liberado por segundo.

^g Quantidade de radicais “azo” liberados e medidos a 420 nm.

^h ND – Atividade não detectada.

1,0%, 2,5% e 5,0%, respectivamente. A adição de até 1% de TCA manteve a mesma concentração de proteínas detectada no extrato total. No entanto, quando quantidades mais elevadas do ácido foram acrescentadas, uma queda na concentração de proteínas ocorreu.

Em relação à atividade inibitória de tripsina, a mais alta atividade específica foi encontrada quando o fracionamento incluiu TCA 2,5%, com um valor de 873,9 UI/mgP. Notoriamente, à medida que se aumentou a concentração final de TCA, as frações mostraram maiores atividades específicas, tendo isso sido verificado até o acréscimo de 2,5% de TCA. No entanto, com a adição de 5,0% de TCA, ocorreu uma diminuição dessa atividade em relação àquela observada na concentração anterior de TCA (TABELA 7).

Com base nesses achados, FTCA 2,5 foi escolhida para dar continuidade ao processo de isolamento da (s) proteína (s) com atividade inibitória de tripsina. Porém, antes de ter dado prosseguimento à purificação com a FTCA 2,5, foi averiguado se ela era biologicamente ativa, a exemplo do verificado com o extrato total. Efeitos inibitórios sobre o crescimento microbiano foram encontrados tanto nos testes realizados com os fungos fitopatogênicos (*F. solani* e *C. lindemuthianum*), como naqueles conduzidos com bactérias patogênicas ao homem (*S. aureus* e *E. aerogenes*), conforme mostrados nas Figuras 10 e 11, respectivamente, mostradas anteriormente.

6.4.2. Cromatografia de afinidade em matriz de anidrotripsina-Sepharose 4B

A FTCA 2,5 (20 mg), após diálise contra água destilada e liofilização, foi ressuspensa em 6 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,5 e aplicada na matriz de anidrotripsina-Sepharose 4B, previamente equilibrada com esse mesmo tampão, acrescido de NaCl 200 mM, estando o perfil cromatográfico obtido representado na Figura 12. O material não retido, eluído com o próprio tampão de equilíbrio, foi composto por um único pico destituído de atividade inibitória de tripsina. O material retido, eluído após a adição de HCl 100 mM, apresentou atividade inibitória de tripsina de 2.398,7 UI/mgP.

O perfil eletroforético obtido em gel de poliacrilamida do pico retido na coluna de anidrotripsina-sepharose 4B exibiu uma proeminente banda proteica com massa molecular aparente de 22,2 kDa (FIGURA 13).

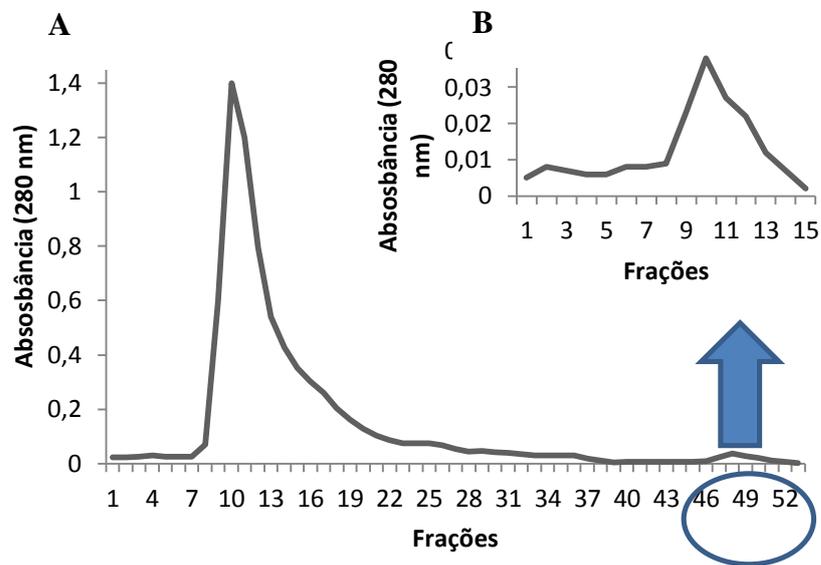
Tabela 7 - Concentração de proteínas e atividade inibitória de tripsina do extrato total e das frações proteicas obtidas a partir de sua precipitação com diferentes teores de ácido tricloroacético (TCA)

| Amostras | Proteína (mgP/mL) | Atividade inibitória de tripsina (UI/mgP) |
|---------------|--------------------------|--|
| Extrato total | 0,68 ± 0,06 ^a | 247,7 |
| FTCA 0,5 | 0,65 ± 0,07 ^a | 307,1 |
| FTCA 1,0 | 0,68 ± 0,09 ^a | 506,9 |
| FTCA 2,5 | 0,40 ± 0,03 ^b | 873,9 |
| FTCA 5,0 | 0,16 ± 0,12 ^c | 617,3 |

Os valores representam médias de triplicatas ± desvio padrão.

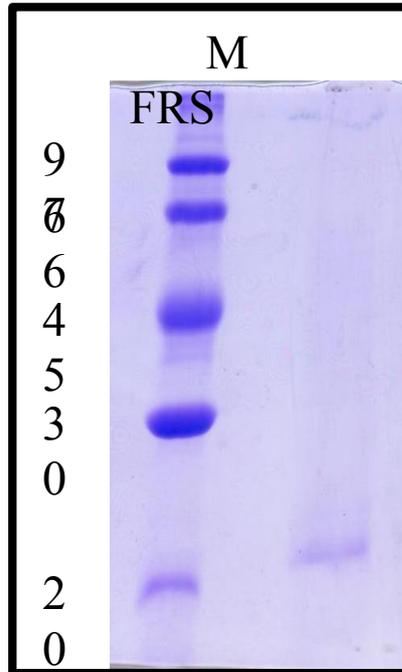
Letras iguais representam valores que não diferiram significativamente ($P > 0,05$) pelo teste de Tukey.

Figura 12 - (A) Cromatografia de afinidade em coluna de anidrotripsina-Sepharose 4B. Amostra de FTCA 2,5 (20 mg), obtida após fracionamento do extrato total com ácido tricloroacético (2,5%), foi aplicada em coluna (2,2 x 11,5 cm) de anidrotripsina-Sepharose 4B, equilibrada com tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,5, contendo NaCl 200 mM. As proteínas retidas foram eluídas com HCl 100 mM. Fluxo: 60 mL/h; Fração: 2,0 mL. (B) Zoom do pico representando o material retido



Fonte: Próprio autor

Figura 13 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) na presença de SDS do material retido na matriz de anidrotipsina-Sepharose 4B. M: marcadores de massa molecular; FRS: Fração retida na matriz de anidrotipsina-Sepharose 4B. Foram aplicados 15 µg de proteína por poço



Fonte: Próprio autor

6.4.3. Cromatografia de fase reversa em sistema de HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

A fração retida na matriz de anidrotripsina-Sepharose 4B (1 mg), denominada FRS, quando dialisada contra água destilada, liofilizada e submetida à cromatografia de fase reversa em sistema de HPLC, revelou ser constituída de um componente proteico majoritário, estando ainda presente alguns contaminantes (FIGURA 14). Por eletroforese em gel de poliacrilamida, esse material se mostrou puro (FIGURA 15), representando o inibidor de tripsina de *C. fistula*, abreviadamente *CfTI* (*C. fistula Trypsin Inhibitor*). A estratégia de purificação adotada para obtenção do *CfTI* resultou num índice de purificação de 64,3 vezes, com rendimento proteico de 0,5% (TABELA 8).

6.5. Caracterização bioquímica do *CfTI*

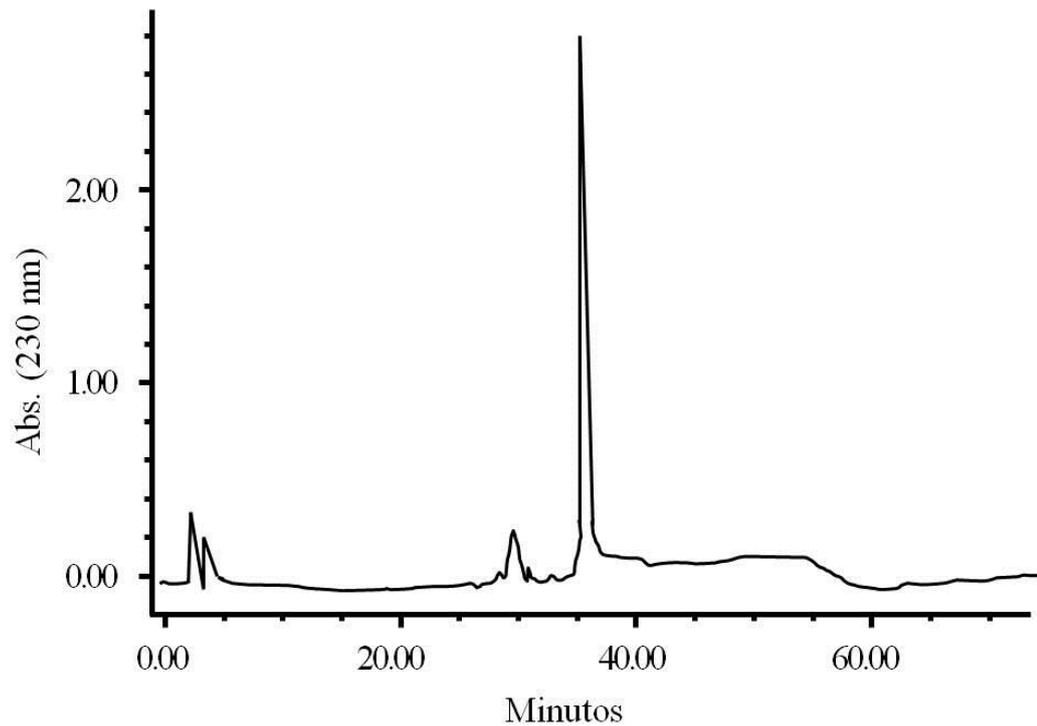
6.5.1. Massa molecular e ponto isoelétrico

O *CfTI* apresentou uma massa molecular aparente de 22,2 kDa, determinada por PAGE-SDS (FIGURA 15), e ponto isoelétrico em torno de 5,0, conforme resultados obtidos na eletroforese bidimensional (FIGURA 16).

6.5.2. Sequência NH_2 -terminal

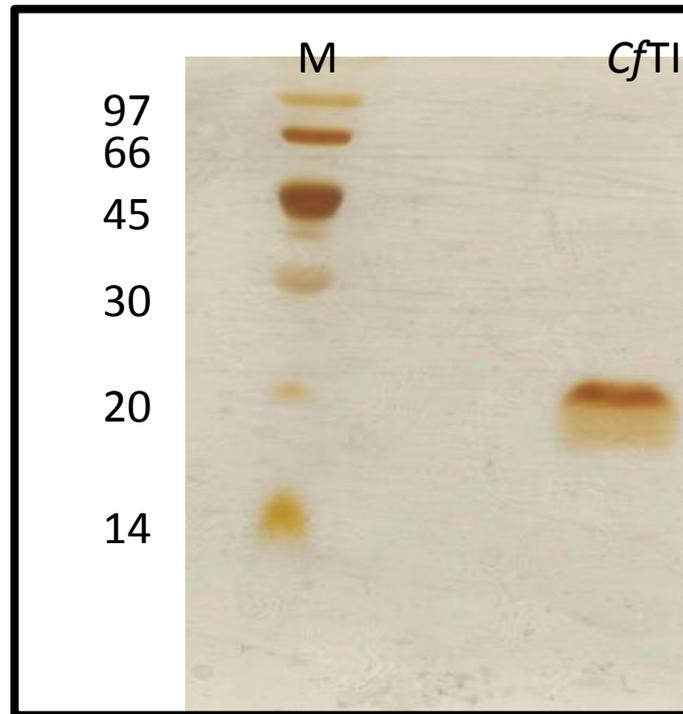
O sequenciamento automático por degradação de Edman do *CfTI* revelou uma sequência de 50 aminoácidos, representada por DFVIDNEGNPLENGGTYIYILSDITAFGGIRAAPTGNERCPLTVVQSRNEL. Ao ser submetida ao alinhamento automático com outras sequências já depositadas em banco de dados (NCBI/BLAST), a sequência NH_2 -terminal do *CfTI* apresentou 98% de identidade com a do inibidor de tripsina de soja do tipo Kunitz (SBTI) e com a da cadeia B do complexo formado entre a tripsina pancreática de porco e o inibidor de tripsina da soja (PSBTI) e de 92% com o inibidor de tripsina de *Glycine tomentella* do tipo Kunitz (GTTI) (FIGURA 17).

Figura 14 - Cromatografia de fase reversa em coluna μ RPC C2/C18-ST-4.6/100 acoplada em sistema de HPLC. Amostra da fração retida na matriz de anidrotripsina-Sepharose 4B (1 mg) foi aplicada na coluna de fase reversa (1,6 mL). No procedimento cromatográfico, um gradiente linear de acetonitrila (5-80%) foi aplicado para eluição do material retido. O inibidor de tripsina de *C. fistula* (CfTI) foi eluído em torno de 35% de acetonitrila. Fluxo: 30 mL/h.



Fonte: Próprio autor

Figura 15 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) na presença de SDS do inibidor purificado de flores de *C. fistula* (CfTI). M: marcadores proteicos de massas moleculares. Foram aplicados 15 µg de proteína por poço



Fonte: Próprio autor

Tabela 8 - Purificação e rendimento do inibidor de tripsina presente em flores de *C. fistula* (CfTI)^a

| Etapa | Proteína total (mg) | Atividade total (UI) | Atividade específica (UI/mgP) | Índice de purificação ^b | Rendimento proteico (%) ^c |
|---|------------------------|-------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|---|
| Extrato total | 135,20 | 5.732,48 | 42,40 | 1,0 | 100 |
| FTCA 2,5 (Precipitação com TCA 2,5%) | 15,39 | 10.367,43 | 673,65 | 15,9 | 11,4 |
| Fração retida (Cromatografia em anidrotripsina-Sepharose 4B) | 1,35 | 3.466,80 | 2.568,00 | 60,6 | 1,0 |
| CfTI (Cromatografia em Vydac C-18TP 522) | 0,64 | 1.744,07 | 2.725,11 | 64,3 | 0,5 |

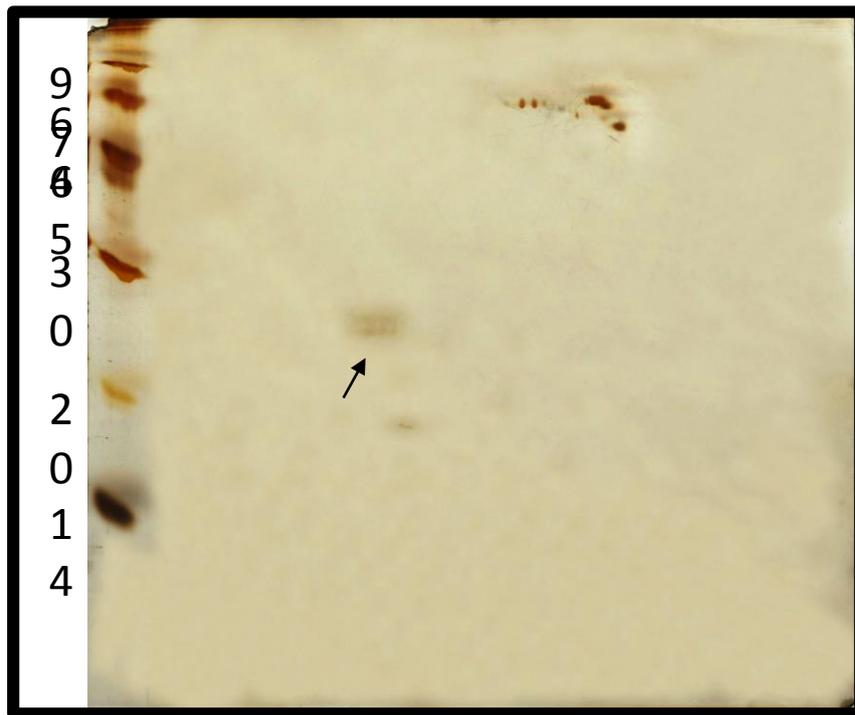
Os valores representam média de seis partidas de purificação.

^a Os cálculos foram realizados considerando-se como material 50 g de flores.

^b O índice de purificação obtido em cada etapa foi calculado como sendo a razão entre a sua atividade específica e aquela do extrato bruto.

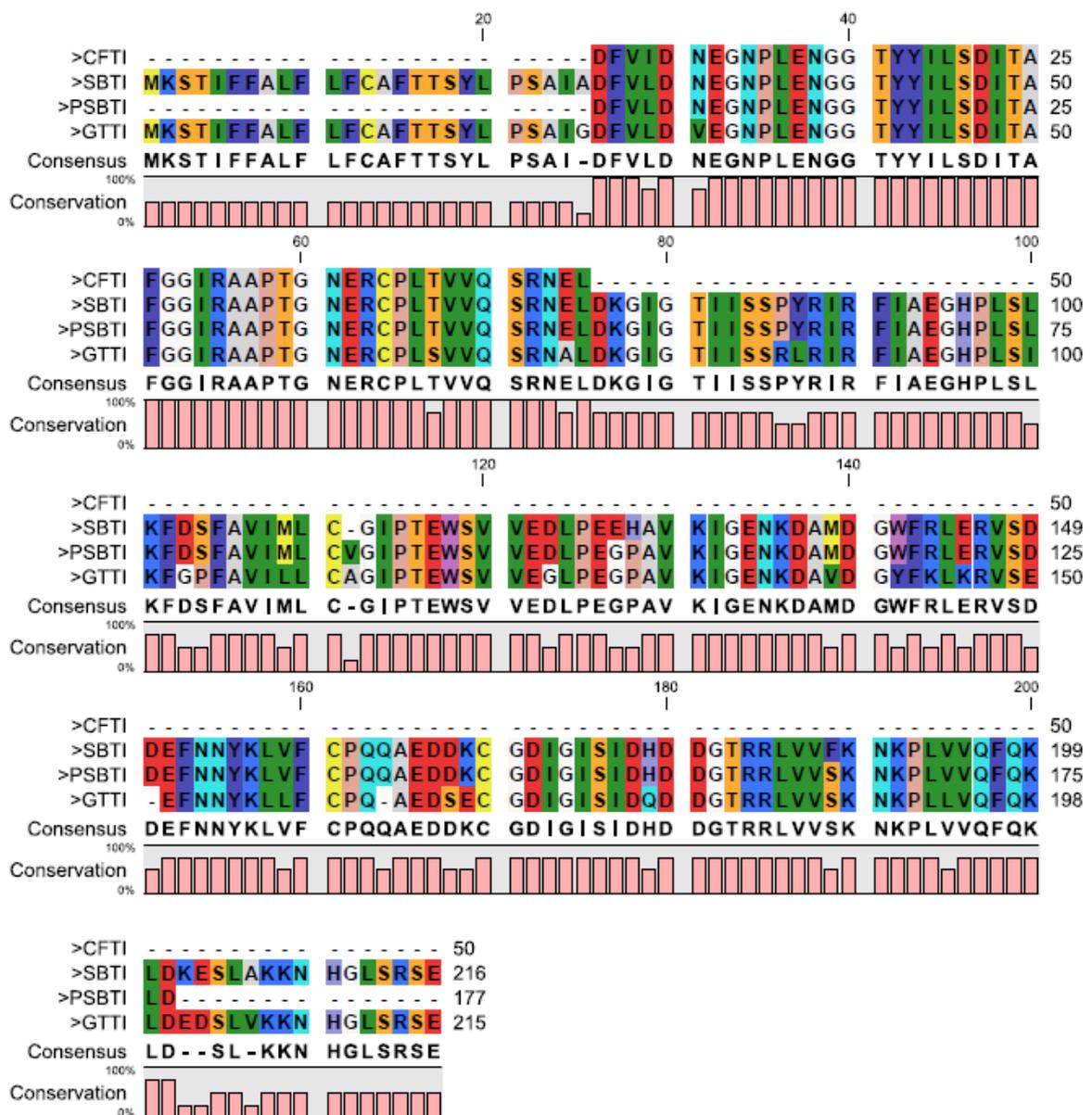
^c O rendimento proteico foi calculado como sendo a razão entre a quantidade de proteína total em cada etapa e aquela do extrato bruto, multiplicado por 100.

Figura 16 - Eletroforese bidimensional do material retido na coluna de anidrotripsina-Sepharose-4B, revelada pela prata. *Immobiline dry strip* (11 cm, pH 4-11). Focalização isoeétrica (1ª dimensão): 0,5 h a 500 V, 6 h a 3000 V e 2 h a 9500 V, a 20 °C). PAGE-SDS (2ª dimensão): 25 mA, 6 h. A seta mostra o *spot* da amostra correspondente ao potencial isoeétrico de 5,0. MM: marcador de massa molecular



Fonte: Próprio autor

Figura 17 - Alinhamento da sequência NH₂-terminal do inibidor de tripsina presente em flores de *C. fistula* (CfTI) com outras sequências similares de proteínas depositadas no NCBI. As sequências de aminoácidos alinhadas com CfTI foram as do inibidor de tripsina de soja do tipo Kunitz (SBTI), inibidor de tripsina de *Glycine tomentella* do tipo Kunitz (GTTI) e a da cadeia B do complexo formado entre a tripsina pancreática do porco e o inibidor de tripsina da soja (PSBTI). O alinhamento foi gerado usando o programa *CLC Sequence viewer 6.5.4*. Aminoácidos conservados entre as sequências são denotados usando a mesma cor, sendo o grau de conservação (0-100%) dos aminoácidos mostrado através de barras



Fonte: *CLC Sequence viewer 6.5.4*

6.5.3. Presença de carboidratos

A revelação do gel de poliacrilamida de acordo como método do ácido periódico de Schiff (PAS) indicou que *CfTI* é uma glicoproteína (FIGURA 18).

6.5.4. Estabilidade frente ao calor e pH

O *CfTI* se mostrou sensível aos efeitos do calor, tendo sido sua atividade inibitória reduzida para 23,4%, quando incubado a 60 °C, por 15 minutos. Essa redução foi, ainda, mais acentuada, a 100 °C com tempo de incubação de 15 minutos, tendo sido a taxa de inibição restringida para 15,2% (FIGURA 19). Diferentemente do observado com a temperatura, a incubação do *CfTI* em pHs que variaram 2 a 12 não resultou na perda de sua atividade inibitória de tripsina (FIGURA 20).

6.6. Atividade antimicrobiana do *CfTI*

6.6.1. Atividade antifúngica

A Figura 21 mostra o efeito do *CfTI* sobre o crescimento micelial dos fungos *F. solani* e *C. lindemuthianum* quando testado a 100 µg/mL. Para ambos os fitopatógenos, houve redução no crescimento das hifas, tendo sido os efeitos inibitórios mais proeminentes nas primeiras 60 h de experimento.

6.6.2. Atividade antibacteriana

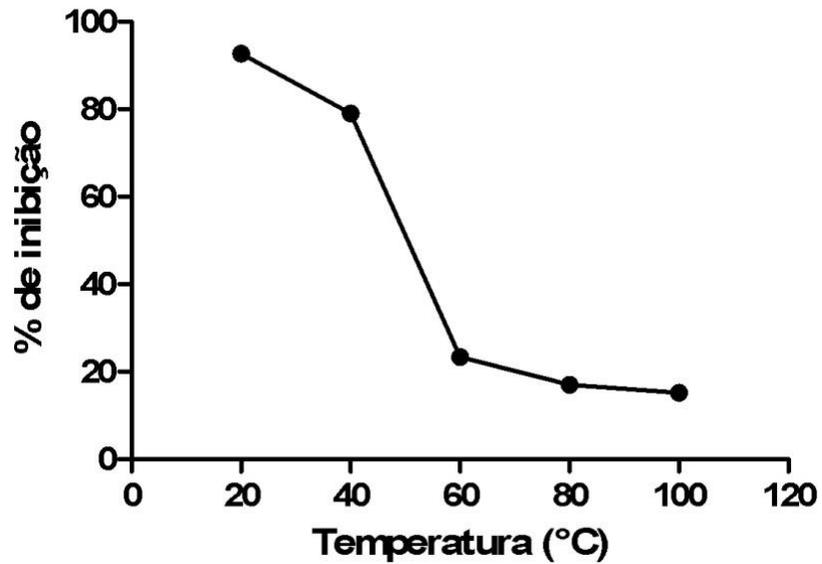
As bactérias *S. aureus* e *E. aerogenes* mostraram-se suscetíveis ao *CfTI* a 100 µg/mL (FIGURA 22). Para ambas as bactérias, os efeitos inibitórios foram inequívocos, tendo sido detectada inibição do crescimento bacteriano por todo tempo de duração do ensaio, que foi de 5 h.

Figura 18 - Detecção de glicoproteína em PAGE-SDS corada com reagente de Schiff. SBTI: inibidor de tripsina de soja (proteína não glicosilada); CfTI: inibidor de tripsina de flores de *C. fistula* (proteína glicosilada). Foram aplicadas 10 µg de proteínas por poço



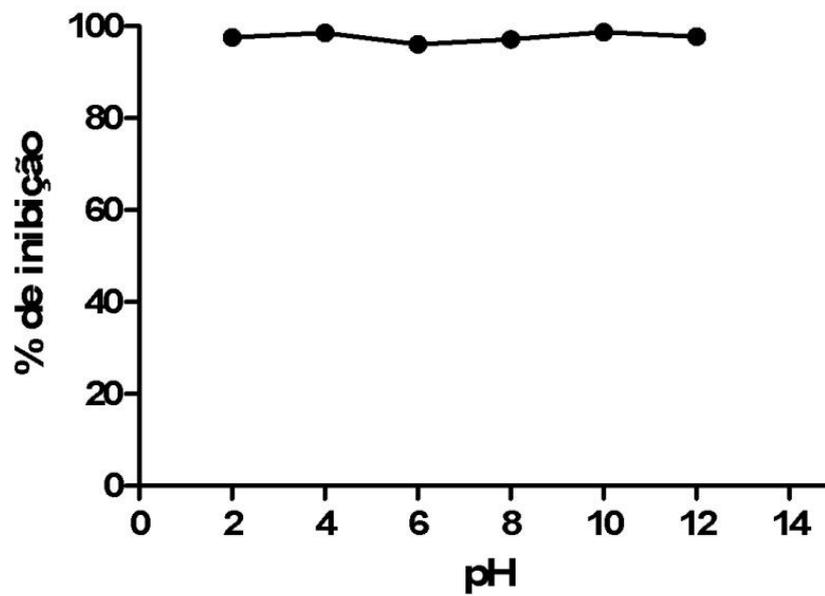
Fonte: Próprio autor

Figura 19 - Avaliação da estabilidade da atividade do inibidor de tripsina de flores de *C. fistula* (CfTI) quando submetido a diferentes temperaturas (20, 40, 60, 80 e 100 °C), por 15 minutos. Os valores plotados representam a média das atividades inibitórias de tripsina, estando os desvios omitidos por terem sido irrelevantes



Fonte: Próprio autor

Figura 20 - Avaliação da estabilidade da atividade do inibidor de tripsina de flores de *C. fistula* (CfTI) quando submetido a diferentes pHs (2, 4, 6, 8, 10 e 12). Os valores plotados representam a média das atividades inibitórias de tripsina, estando os desvios omitidos por terem sido irrelevantes



Fonte: Próprio autor

Figura 21 - Curvas de crescimento dos fungos *Fusarium solani* (A) e *Colletotrichum lindemuthianum* (B) na presença do inibidor de tripsina purificado de flores de *C. fistula* (CfTI).

- ● - Controle negativo: água destilada; - ▲ - Tratamento: CfTI (10 µg)

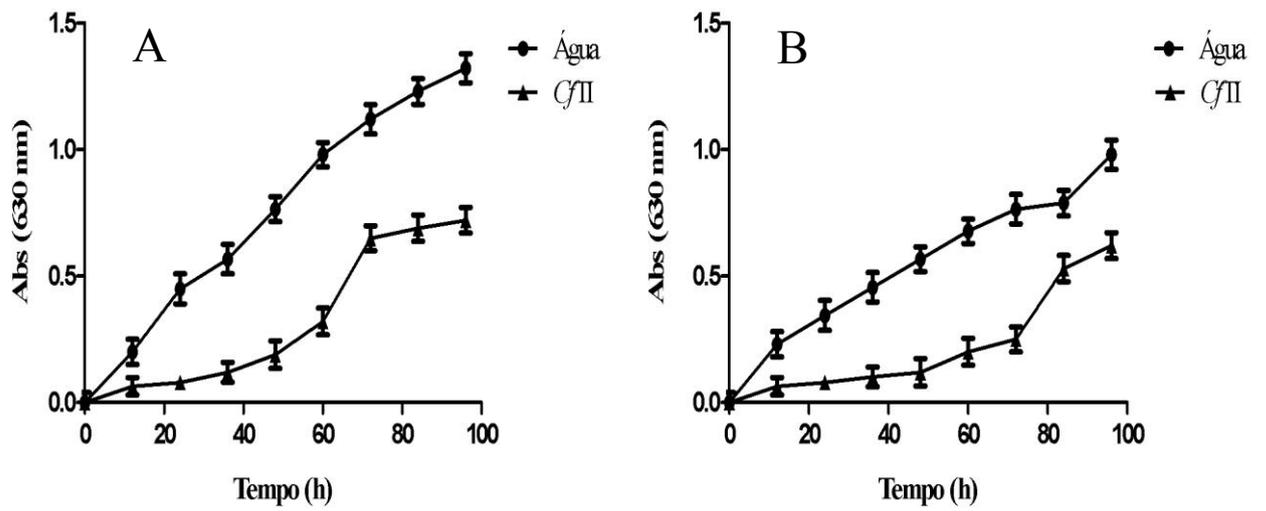
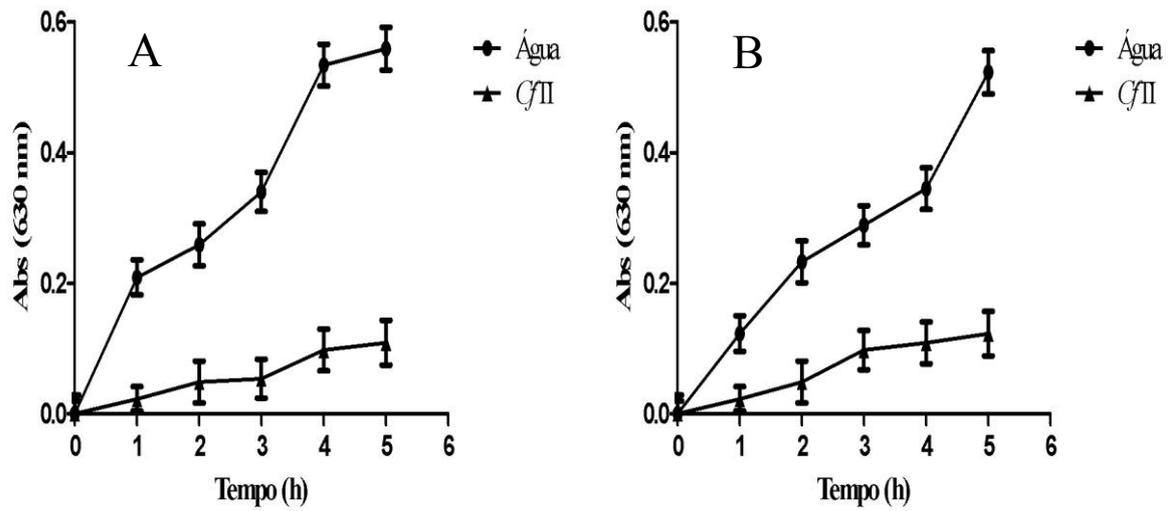


Figura 22 - Curvas de crescimento das bactérias *Staphylococcus aureus* (A) e *Enterobacter aerogenes* (B) na presença do inibidor de tripsina purificado de flores de *C. fistula* (CfTI). - ● - Controle negativo: água destilada; - ▲ - Tratamento: CfTI (10 µg)



7. DISCUSSÃO

No presente estudo, foi purificado e caracterizado um inibidor de tripsina presente em flores de *Cassia fistula* Linn., tendo sido avaliada, também, a ação do inibidor purificado sobre o desenvolvimento de fungos fitopatogênicos e bactérias causadoras de infecções hospitalares.

As flores foram selecionadas como objeto de estudo, por serem estruturas de extrema importância para a sobrevivência dos vegetais, devendo possuir um sistema de defesa que garanta sua fecundação e desenvolvimento até o surgimento das sementes, justificando grande potencial na produção de proteínas com propriedades antimicrobianas. Nesse sentido, há dados que reforçam o potencial de flores como fonte de proteínas bioativas. Damle e colaboradores (2005), por exemplo, avaliaram a distribuição de inibidores de tripsina em diferentes tecidos de plantas de tomate e observaram que as flores acumulavam teores de inibidores de tripsina cerca de 300 e 1000 vezes mais elevados do que aqueles detectados nas folhas e frutos, respectivamente. Essa discrepância na distribuição dos inibidores, com acúmulo expressivo nas flores, foi defendido pelos respectivos autores que poderia estar relacionada ao papel de defesa dos inibidores. Esse argumento era tão provável de estar correto que larvas de *Helicoverpa armigera* se alimentavam de folhas e frutos e, no entanto, não atacavam os tecidos florais.

A investigação aqui conduzida teve início com a prospecção de atividade antifúngica nos extratos totais de cinco espécies de flores silvestres: *Plumeria rubra* L. (Jasmim), *Ipomoea asarifolia* R. et Schult (Salsa), *Pachira aquatica* Aubl. (Munguba), *Cassia fistula* L. (Chuva-de-ouro) e *Turnera ulmifolia* L. (Chanana). Para avaliação dessa atividade, foram selecionados os fungos *Fusarium solani* e *Colletotrichum lindemuthianum*, dois fitopatógenos de suma relevância agrícola, por atacarem culturas importantes nos aspectos nutricional e econômico, causando as doenças conhecidas como podridão vermelha da raiz e antracnose, respectivamente. Das cinco espécies avaliadas, apenas o extrato total das flores de *C. fistula* se mostrou capaz de inibir a germinação dos conídios de ambos os fitopatógenos. No entanto, o efeito inibitório do extrato se manifestou de modo mais intenso sobre os conídios de *C. lindemuthianum*, tendo sido mantido mesmo após 48 h de incubação do fungo com a amostra teste, diferentemente do observado para os conídios de *F. solani* que, passadas as primeiras 24 h de incubação, recuperaram a capacidade de germinar (FIGURAS 8 e 9). Esses resultados foram observados mesmo após a diálise dos extratos, sugerindo a natureza proteica do princípio bioativo contra fungos. Dessa forma, o foco do estudo foi direcionado para as flores de *C. fistula*, com ênfase nas proteínas.

Para dar continuidade ao estudo, se buscou o estabelecimento das melhores condições de extração das proteínas das flores de *C. fistula*, avaliando diferentes solventes e, posteriormente, o tempo de extração. Para tanto, foram utilizados solventes com pH entre 5,2 e 9,0. As maiores concentrações proteicas foram obtidas quando utilizado tampões com valores de pH próximos da neutralidade, ou seja, 7,5 (TABELA 4). Entretanto, diferenças significativas ($p < 0,05$) foram verificadas entre tampões com o mesmo pH e composições distintas, uma vez que o tampão fosfato de sódio 50 mM (0,61 mgP/mL) praticamente extraiu o dobro de proteínas daquela verificada com o tampão Tris-HCl 50 mM (0,31 mgP/mL). Ainda em relação ao pH, embora no caso de *C. fistula* o maior poder de extração tenha sido verificado em pH neutro, não se pode considerar que isso seja uma regra, em se tratando de extração de proteínas de flores. Almeida (2010), por exemplo, realizando extração de flores de *Hibiscus rosa-sinensis* L., observou que uma maior concentração proteica era obtida quando utilizada solução extratora ácida, pH 1,98, composta de NaCl 0,6 M e HCl 0,1%. Além do solvente, o tempo de contato da amostra com o solvente extrator foi avaliado, por ser um fator importante, capaz de interferir na quantidade de proteína extraída (EVRANUZ; SIDDIQ; AHMED, 2011). Nas condições avaliadas no presente estudo, o melhor tempo de extração foi de 3 h, uma vez que o a prorrogação por mais 1 h não resultou no aumento da quantidade de proteína extraída (TABELA 5).

Após o conhecimento das condições ideais de extração, a investigação de proteínas bioativas presentes no extrato total das flores de *C. fistula* foi procedida, buscando a detecção de atividades que pudessem ser relacionadas à atividade antifúngica preliminarmente detectada. Nesse contexto, foram detectadas atividades vinculadas às seguintes proteínas: peroxidase ($20,0 \pm 0,18$ UAP/mgP), quitinase ($1,7 \pm 0,21$ η katal/mgP), inibidor de tripsina ($42,41 \pm 0,35$ UI/mgP) e inibidor de papaína ($27,10 \pm 0,23$ UI/mgP) (TABELA 6). Para todas essas proteínas, há evidências de envolvimento na defesa de plantas.

Em relação às quitinases, há dados mostrando que a superexpressão de seus genes em plantas foi capaz de aumentar a resistência a patógenos, uma vez que tais enzimas catalisam a hidrólise da quitina, um dos principais componentes da parede celular de fungos (VAN LOON; REP; PIETERSE, 2006). Um exemplo de quitinase com atividade antifúngica foi aquela purificada a partir de sementes de *Vicia fabas*. Essa proteína apresentou potente atividade contra os fungos *Pythium aphanidermatum*, *Fusarium solani*, *Physalospora piricola*, *Alternaria alternate*, *Botrytis cinérea* e *Fusarium oxysporum* (WANG *et al.*, 2012).

Quanto às peroxidases, é conhecida sua ação na lignificação dos tecidos, que conduz à polimerização da lignina a partir da oxidação de hidroxilas de grupos fenólicos. A lignificação e seus precursores tóxicos exercem um papel direto no que diz respeito à resistência de plantas (PASCHOLATI; LEITE, 1995). A peroxidase purificada de grãos de trigo foi capaz de reduzir a elongação do tubo germinativo dos fungos *Botrytis cinerea*, *Fusarium culmorum* e *Trichoderma viride* (CARUSO *et al.*, 2001).

No que diz respeito aos inibidores de proteinases (serínicas e cisteínicas), há muitos estudos relatando o seu envolvimento com as estratégias naturais de defesa das plantas contra insetos e patógenos (LAWRENCE; KOUNDAL, 2002; CHOI *et al.*, 2002; LOPES *et al.*, 2009). O inibidor de tripsina purificado das sementes do ingá branco (*Inga laurina*) mostrou-se ativo contra larvas dos insetos *Diatraea saccharalis* e *Heliothis virescens* (RAMOS *et al.*, 2012). O inibidor obtido a partir de extratos de cascas de maçã inibiu as proteases do fungo *Colletotrichum acutatum* (GREGORI; GUIDARELLI; MARI, 2010).

Após a descoberta de proteínas bioativas no extrato total dialisado de flores de *C. fistula*, o estudo prosseguiu dando ênfase ao isolamento e purificação do inibidor de tripsina. Essa decisão foi baseada na elevada atividade inibitória de tripsina presente no extrato, além de ter sido sempre detectada nos extratos preparados a partir de flores de diferentes coletas realizadas ao longo da pesquisa, mostrando a expressão contínua dessa proteína. Tal fato não foi observado com as demais proteínas encontradas, cujas atividades variaram muito com as coletas. Realmente, os inibidores de proteases são proteínas que podem ser expressas constitutivamente e, ainda, ser induzidas em resposta ao ataque de patógeno ou herbívoro (VALUEVA; MOSOLOV, 2004), podendo sua concentração variar dependendo de diversos fatores, a exemplo da localização tecidual (JONES, 2004).

Os inibidores de tripsina são normalmente moléculas pequenas, com massa molecular variando entre 6 e 50 kDa, sendo os mais frequentes aqueles com massa molecular na faixa de 18 a 25 kDa (RICHARDSON, 1991). Portanto, foi instituído como etapa inicial do processo de purificação do inibidor de tripsina o fracionamento do extrato total com o ácido tricloroacético (TCA), uma vez que a adição desse ácido promove a precipitação de proteínas de alta massa molecular (ARISTOY; TOLDRÁ, 1991). Essa estratégia experimental já foi utilizada como etapa inicial na purificação de outros inibidores. Um inibidor de tripsina ativo contra as enzimas digestivas de *Zabrotes subfasciatus* e *Callosobruchus maculatus* foi purificado das sementes de *Piptadenia moniliformis*, onde a primeira etapa do processo de purificação foi o fracionamento do extrato total com uma solução aquosa de TCA 20% (CRUZ, 2008).

Dentre as concentrações de TCA usadas no presente trabalho (0,5% a 5,0%), a fração obtida pela precipitação do extrato total encerrando 2,5% de TCA (FTCA 2,5) foi escolhida para dar continuidade ao processo de purificação do inibidor (TABELA 7). Essa fração apresentou a maior atividade inibitória específica (873,9 UI/mgP) e, na análise em gel de poliacrilamida, se mostrou com um número bem reduzido de bandas, sendo composta, basicamente, por proteínas com massa molecular abaixo de 45 kDa (dados não mostrados). Quando avaliada a presença de atividade biológica nessa fração, foi encontrada ação inibitória do crescimento dos fungos *F. solani* e *C. lindemuthianum*, na concentração de 500 µg/mL (FIGURA 10). Além disso, a FTCA 2,5 mostrou atividade contra bactérias causadoras de infecções em humanos, reduzindo o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Enterobacter aerogenes*, na mesma concentração utilizada com fungos (FIGURA 11). Nessa etapa do estudo, foi sugerido que as atividades contra patógenos detectadas na FTCA 2,5 estariam relacionadas à presença do inibidor de tripsina, tendo em vista a ocorrência de vários outros relatos de atividade antimicrobiana, vinculados a essa classe de proteínas (YANG *et al.*, 2006; AUGUSTIN; SIEBERT; BOSCH, 2009).

Dando continuidade ao procedimento de purificação do inibidor de tripsina, a FTCA 2,5 foi submetida à cromatografia de afinidade em matriz de anidrotripsina-Sepharose-4B. Dada à possibilidade de digestão do inibidor pela tripsina imobilizada durante a cromatografia (MACEDO *et al.*, 2000), foi acoplada à matriz a forma inativa da enzima, a anidrotripsina. Toda atividade inibitória de tripsina ficou concentrada na fração retida na matriz (FRS), que foi eluída com HCl 100 mM em um único pico (FIGURA 12). A FRS apresentou uma atividade inibitória de tripsina de 2.568 UI/mgP e um rendimento proteico de 1%, em relação à proteína do extrato total (TABELA 8).

Embora o material proteico retido na anidrotripsina-Sepharose 4B aparentasse estar puro na avaliação feita por PAGE-SDS, quando tentado o sequenciamento através de degradação de Edman, foi verificado que a proteína não estava pura. Assim sendo, foi adicionada outra etapa ao processo de purificação do inibidor de tripsina. A FRS foi, então, submetida à cromatografia de fase reversa em coluna analítica, sistema de HPLC, tendo sido constatada a presença de contaminantes (FIGURA 14). Essa etapa foi crucial para obtenção do inibidor de tripsina puro, denominado de CfTI (inibidor de tripsina de *C. fistula* ou *C. fistula trypsin inhibitor*). O índice de purificação do CfTI foi 64,3 e o rendimento proteico de 0,5%, calculado em relação à proteína detectada no extrato total (TABELA 8). Esse rendimento foi abaixo daqueles obtidos para inibidores purificados de sementes de *Dimorphandra mollis* e *Entada acaciifolia*, que apresentaram rendimentos proteicos de 7,6% e 40,7%, respectivamente

(MACEDO *et al.*, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2012). Esse baixo rendimento pode ser atribuído ao reduzido teor de proteínas encontrado em flores, particularmente se comparado às sementes. Embora tanto as flores quanto as sementes sejam estruturas que estão envolvidas diretamente nos processos de reprodução e perpetuação dos vegetais e que, portanto, necessitam de um arsenal bioquímico para garantir sua defesa contra a ação de agentes agressores, não se pode descartar que as sementes são, também, órgãos vegetais de reserva, apresentando, naturalmente, quantidades bem maiores de proteínas do que outros tecidos vegetais (KOZUKUE *et al.*, 2004).

Por PAGE-SDS, o *CfTI* mostrou uma massa molecular aparente de 22,2 kDa, confirmada por eletroforese bidimensional (FIGURA 16). Essa massa molecular é similar à massa de muitos outros inibidores de tripsina da família Kunitz, com predominância na faixa de 18 a 26 kDa, independentemente do tecido vegetal de origem (RICHARDSON, 1991). Um inibidor de tripsina purificado de sementes de uma espécie do mesmo gênero ao que aqui está sendo estudado, *Cassia leptophylla*, mostrou massa molecular aparente de 20 kDa, sendo constituído por duas cadeias polipeptídicas, uma de 16 kDa e outra de 4 kDa (ALESSANDRO, 2005). Outro inibidor de tripsina, dessa vez purificado de uma variedade de soja preta, apresentou massa molecular aparente de 20 kDa (FANG; WONG; NG, 2010). De flores também já foi purificado um inibidor de tripsina, como é o caso daquele presente em flores de *Helianthus annuus*, entretanto, a massa molecular aparente se apresentou um pouco mais baixa, de 16 kDa (GIUDICI; REGENTE; CANAL, 2000).

O *CfTI* apresentou ponto isoelétrico de 5,0, parecendo possuir isoformas (FIGURA 16). Diversos inibidores de tripsina apresentam pI ácido, como é o caso do inibidor purificado das sementes de *Acacia victoriae*, que apresentou ponto isoelétrico igual ao observado para o *CfTI* (EE *et al.*, 2008). A natureza ácida e a presença de isoformas são características comumente associadas aos inibidores da família Kunitz, não estando, portanto, elucidada a importância fisiológica dessas isoformas para a planta (KALUME; SOUSA; MORPHY, 1995; MACEDO *et al.*, 2000).

O sequenciamento NH₂-terminal do *CfTI* mostrou um alto grau de similaridade com inibidores da família Kunitz, em particular com o inibidor de tripsina de soja do tipo Kunitz (SBTI) e com a cadeia B do complexo formado entre a tripsina pancreática de porco e o inibidor de tripsina da soja (PSBTI), com 98% de similaridade para ambos (FIGURA 17). O inibidor purificado mostrou ainda 92% de similaridade com o inibidor de tripsina de *Glycine tomentella*, do tipo Kunitz (GTTI). Na sequência NH₂-terminal do *CfTI*, foi observada a presença de quatro resíduos de asparagina, que são conservados em vários inibidores de tripsina da família Kunitz

(MACEDO *et al.*, 2003; BHATTACHARYYA *et al.*, 2006), os quais estão envolvidos na interação entre tripsina-inibidor (IWANAGA *et al.*, 2005).

Apesar da alta similaridade detectada na sequência de aminoácidos, diferentemente do SBTI, que não possui carboidratos ligados covalentemente (KUNITZ, 1947), o CfTI mostrou ser uma proteína glicosilada (FIGURA 18). Resultado semelhante ao encontrado para o inibidor purificado do látex de *Carica papaya*, uma glicoproteína com massa molecular de 24 kDa (AZARKAN *et al.*, 2006). Outro exemplo de inibidor de tripsina glicosilado foi aquele purificado a partir de sementes de *Acacia victoriae* que, apresentou 2,06% de glicosilação (EE *et al.*, 2011).

O CfTI, ao contrário da maioria dos inibidores tipo Kunitz, mostrou baixa estabilidade térmica, conservando apenas 23,4% de sua atividade inibitória quando incubado a 60 °C, por 15 minutos (FIGURA 19). Entretanto, comportamento diferente foi observado quando considerado o pH, tendo o CfTI se mantido estável quando incubado numa faixa de pH variando de 2 a 12 (FIGURA 20). Os inibidores de tripsina da família Kunitz geralmente exibem considerável estabilidade frente ao calor e a variações de pH (BHATTACHARYYA *et al.*, 2006). O inibidor de tripsina purificado das sementes de *Entada acaciifolia* se mostrou termoestável até a temperatura de 70 °C e numa ampla faixa de pH (2 a 12) (OLIVEIRA *et al.*, 2012). Da mesma forma, o inibidor de tripsina purificado das sementes de *Putranjiva roxburghii* se mostrou altamente estável em um gradiente de pH de 2 a 12, além de manter sua atividade mesmo após o aquecimento a 80 °C, durante 30 minutos (CHAUDHARY *et al.*, 2008). Um inibidor de tripsina da família Kunitz purificado de uma variedade de *Glycine max* apresentou estabilidade térmica quando incubado a temperaturas que variaram de 0 a 100 °C, por 30 minutos e, também, mostrou ser estável a variações de pH entre 2 e 12, exibindo apenas uma pequena perda de atividade quando incubado nos extremos de pH (2 e 12) (FANG; WONG; NG, 2010).

O CfTI mostrou uma potente atividade contra fungos fitopatogênicos, reduzindo de forma considerável o crescimento de *F. solani* e *C. lindemuthianum*, quando testado na concentração de 100 µg/mL. Para ambos os fitopatógenos, foi observada inibição do crescimento, da ordem de 60%, principalmente nas primeiras 60 h após incubação do fungo com o inibidor (FIGURA 21). A ação de inibidores tripsina sobre o crescimento de fungos fitopatogênicos tem sido bastante explorada. Um inibidor de tripsina de sementes de milho impediu a germinação de conídios e o crescimento das hifas de vários fungos fitopatogênicos, entre eles *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *F. moniliforme* (CHEN *et al.*, 1999). O inibidor de tripsina de sementes de trigo também causou comprometimento em fases distintas do

desenvolvimento de fungos, interferindo negativamente na germinação dos esporos e no crescimento micelial de *A. alternata* e *F. oxysporum* (DUNAEVSKY *et al.*, 1994). Atividade antifúngica foi ainda encontrada para o inibidor de tripsina purificado de sementes de *Psoralea corylifolia*, que foi capaz de reduzir o crescimento micelial de *Alternaria brassicae*, *A. niger*, *F. oxysporum* e *Rhizoctonia cerealis*, sugerindo o seu envolvimento nos mecanismos de defesa da planta contra patógenos (YANG *et al.*, 2006). Uma atividade expressiva foi detectada no inibidor de tripsina purificado de flores de *Helianthus annuus*, que aboliu completamente a germinação dos esporos de *Sclerotinia sclerotiorum* a 5 µg/mL, e o crescimento das hifas numa concentração ainda menor, de 3 µg/mL (GIUDICI; REGENTE; CANAL, 2000).

Além de exibir atividade antifúngica, o CfTI foi capaz de reduzir o crescimento de bactérias causadoras de infecções no homem. Uma inibição da ordem de 80% do crescimento de *S. aureus* e *E. aerogenes* foi observada, quando utilizados 10 µg de CfTI (FIGURA 22). Atividade antibacteriana já havia sido relatada para extratos de flores de *C. fistula*, preparados com diferentes solventes, tendo sido creditado a metabólitos secundários. A atividade inibitória do crescimento foi observada para bactérias Gram-positivas (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *Bacillus subtilis* e *Enterococcus faecalis*) e Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*) (DURAI PANDIYAN; IGNACIMUTHU, 2007).

Os inibidores de proteases são extensivamente estudados como fontes de novos bioinseticidas (ABDEEN *et al.*, 2005). No entanto, as atividades antifúngica e antibacteriana ressaltadas aqui fomentam uma aplicação biotecnológica mais decisiva desses inibidores frente aos fungos e bactérias. Na verdade, a participação de inibidores de proteases na defesa contra patógenos já foi colocada há bastante tempo, quando ressaltada sua capacidade de suprimir a atividade enzimática de microrganismos fitopatogênicos. Isso estaria relacionado ao fato de que um dos possíveis papéis das proteases durante a invasão do patógeno no tecido vegetal seria facilitar a sua penetração, provavelmente pela hidrólise de proteínas dentro e entre paredes celulares (VALUEVA; MOSOLOV, 1994).

8. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesse trabalho demonstram o potencial quase inexplorado de proteínas bioativas presentes em flores, aqui evidenciado pela habilidade de um inibidor de tripsina (*CfTI*) de *Cassia fistula* de interferir negativamente no crescimento dos fungos fitopatogênicos *Colletotrichum lindemuthianum* e *Fusarium solani* e das bactérias patogênicas ao homem, *Staphylococcus aureus* e *Enterobacter aerogenes*. Essa propriedade antimicrobiana do *CfTI* tem relevância biotecnológica, podendo ser explorada para aplicação na agricultura e saúde humana, visando a substituição de agrotóxicos e de antibióticos ineficazes devido a resistência bacteriana, respectivamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEEN, A.; VIRGOS, A.; OLIVELLA, E.; VILLANUEVA, J.; AVILE´S, X.; GABARRA, R.; PRAT, S. Multiple insect resistances in transgenic tomato plants over-expressing two families of plant proteinase inhibitors. **Plant Molecular Biology**, v. 57, p. 189-202, 2005.

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

ADAM, Z. Chloroplast proteases: possible regulator of gene expression? **Biochimie**, v. 82, p. 647-654, 2000.

Agência de Informações Embrapa: Agricultura e Meio Ambiente. **Agrotóxicos no Brasil**. Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agricultura_e_meio_ambiente/arvore/CONTAG01_40_210200792814.html. Acesso em 07/07/2012.

ALESSANDRO, F. Purificação e caracterização estrutural de um inibidor de serinoprotease isolado de sementes de *Cassia leptophylla*. **Dissertação de Mestrado**. Universidade de São Paulo. 2005.

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. 3 ed. New York: John Wiley; Sons, 1996. 632p.

ALMEIDA, R. G. Avaliação de proteínas antimicrobianas de flores de *Hibiscus rosa-sinensis* L. ativas contra microrganismos patogênicos. **Monografia de Conclusão do Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas**. Universidade Católica de Brasília, 2010.

ANDRADE, L. B. S. Inibidores de proteases cisteínicas de raízes de *Crotalaria pallida*: Isolamento, purificação, caracterização e avaliação de sua ação contra *Meloidogyne incógnita*. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal do Ceará. 2008.

ARISTOY, M.; TOLDRÁ, F. Desproteinization techniques for HPLC amino acids analysis in fresh pork muscle and dry-cured ham. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, p. 1792-1795, 1991.

ATKINSON, A. H.; HEATH, R. L.; SIMPSON, R. J.; CLARKE, A. E.; ANDERSON, M. A. Proteinase inhibitors in *Nicotiana alata* stigmas are derived from a precursor protein which is processed into five homologous inhibitors. **Plant Cell**, v. 5, p. 203-213, 1993.

AUGUSTIN, R.; SIEBERT, S.; BOSCH, T. C. G. Identification of a kazal-type serine protease inhibitor with potent anti-staphylococcal activity as part of hydra's innate immune system. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 33, p. 830-837, 2009.

AZEVEDO, J. L. **Fungos - Uma Introdução à Biologia, Bioquímica e Biotecnologia**. São Paulo: Educs, 2004. 512 p.

BETTIOL, W; MORANDI, M. A. B. Controle Biológico de Doenças de Plantas no Brasil. In: BETTIOL, W; MORANDI, M. A. B. (Org.). **Biocontrole de Doenças de Plantas: Uso e Perspectivas**. Jaguariúna-SP: Embrapa Meio Ambiente, 2009. p. 7-14.

BHATTACHARYYA, A.; MZUNDAR, S.; LEIGHTON, S. M.; BABU, C. R. A Kunitz proteinase inhibitor from *Archidendron ellipticum* seeds: Purification, characterization, and kinetic properties. **Phytochemistry**, v. 67, p. 232-241, 2006.

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

BOLLER, T. Biochemical analysis of chitinases and β -1,3-glucanases. **Molecular Plant Pathology**. New York: IRL, 1993.

BONALDO, S. M.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S.; FIORI-TUTIDA, A. C. G. Contribuição ao estudo das atividades antifúngica e elicitora de fitoalexinas em sorgo e soja por eucalipto (*Eucalyptus citriodora*). **Summa Phytopathologica.**, v. 33, n. 4, p. 383-387, 2007.

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

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Reavaliação dos Agrotóxicos: 10 Anos de Proteção à População**, Brasília, DF. Publicado em 2 de abril 2009. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias>.

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

CHAUDHARY, N. S.; SHEE, C.; ISLAM, A.; AHMAD, F.; YERNOOL, D.; KUMAR, P.; SHARMA, A. K. Purification and characterization of a trypsin inhibitor from *Putranjiva roxburghii* seeds. **Phytochemistry**, v. 69, p. 2120-2126, 2008.

CHEN, R.; WANG, F.; SMITH, A. G. A flower-specific gene encoding an osmotin-like protein from *Lycopersicon esculentum*, **Gene**, v.179, p. 301-302, 1996.

CHEN, Z. Y.; BROWN, R. L.; LAX, A. R.; CLEVELAND, T. E.; RUSSIN, J. S. Inhibition of plantpathogenic fungi by a corn trypsin inhibitor overexpressed in *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 1320-1324, 1999.

CHILOSE, G.; CAPORALE, C.; LEONARD, L.; BERTINI, L.; BUZI, A.; NOBILE, M.; MAGRO, P.; BUONOCORE, V. Antifungal activity of a Bowman-Birk type trypsin inhibitor from wheat kernel. **Journal of Phytopathology**, v. 148, p. 477-481, 2000.

CHOI, D.; KIM, S. G.; KIM, K. W.; PARK, E. W. Silicon-induced cell wall fortification of rice leaves: a possible cellular mechanism of enhanced host resistance to blast. **Phytopathology**. v. 92, p. 1095-1103, 2002.

COLIN, B. Produtos orgânicos tóxicos. **Química Ambiental**, 2 ed. Porto Alegre: Bookman, 2006.

CONSTABEL, C. P.; RYAN, C. A. A survey of wound- and methyl jasmonate-induced leaf polyphenol oxidase in crop plants. **Phytochemistry**, v. 47, p. 507-511, 1998.

CRUZ, A. C. B. Purificação, caracterização e análise da atividade bioinseticida de um inibidor de tripsina em sementes de catanduva (*Piptadenia moniliformis*). **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 2008.

DAMLE, M. S.; ASHOK, P. G.; MOHINI, N. S.; VIDYA, S. G. Higher accumulation of proteinase inhibitors in flowers than leaves and fruits as a possible basis for differential feeding preference of *Helicoverpa armigera* on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill, Cv. Dhanashree). **Phytochemistry**, v. 66, p. 2659-2667, 2005.

DANISH, M.; SINGH, P.; MISHRA, G.; SRIVASTAVA, S.; JHA, K. K.; KHOSA, R. L. *Cassia fistula* Linn. (Amulthus) - An important medicinal plant: a review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacological properties. **Journal of Natural Product and Plant Resources**, v. 1, n. 1, p. 101-118, 2011.

DEO PRASAD, B.; JHA, S.; CHATTOO, B. B. Transgenic indica rice expressing *Mirabilis jalapa* antimicrobial protein (Mj-AMP2) shows enhanced resistance to the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. **Plant Science**, v. 175, p. 364-371, 2008.

DUBEY, V. K.; PANDE, M.; SINGH, B. K.; JAGANNADHAM, M. V. Papain-like proteases: Applications of their inhibitors. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 1077-1086, 2007.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

DUNAEVSKY, Y. E.; PAVLYUKOVA, E. B.; BELIAKOVA, G. A.; BELOZERSKY, M. A. Properties of buckwheat seed inhibitors of trypsin and serine proteases from micromycetes. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, v. 20, p. 297-302, 1994.

DURAIKANDIYAN, V.; IGNACIMUTHU, S. Antibacterial and antifungal activity of *Cassia fistula* L.: An ethnomedicinal plant. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 590-594, 2007.

EE, K. Y.; ZHAO, A. J.; REHMAN, A. A.; AGBOOLA, B. S. Characterization of trypsin and α -chymotrypsin inhibitors in Australian wattle seed (*Acacia victoriae* Benth). **Food Chemistry**, v. 107, p. 337-343, 2008.

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

EVARANUZ, E. O.; SIDDIQ, M.; AHMED, J. **Handbook of Vegetables & Vegetable Processing**. Wiley-Blackwell, Iowa: USA. 2011.

FANG, E. F.; WONG, J. H.; NG, T. B. Thermostable Kunitz trypsin inhibitor with cytokine inducing, antitumor and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from Korean large black soybeans. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 109, p. 211-217, 2010.

FREIRE, M. G. M.; FRANCO, O. L.; KUBO, C.E. MIGLIOLO, L.; VARGAS, R. H.; OLIVEIRA, C. F.; PARRA, J. R.; MACEDO, M. L. R. Structural insights regarding an insecticidal *Talisia esculenta* protein and its biotechnological potential for *Diatraea saccharalis* larval control. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 161, p. 86-92, 2012.

FREIRE, M. G.; 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 interferes whit fungal growth. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 61-68, 2002.

GATEHOUSE, J. A. Prospect for using proteinase inhibitors to protect transgenic plants against attack by herbivorous insects. **Current Protein and Peptide Science**, v. 12, p. 409-416, 2011.

GAUT, B. S.; TIFFIN, P. Molecular evolution of the wound-induced serine protease inhibitor wip 1 in *Zea* and related genera. **Molecular Biology Evolucion**, v. 18, p. 2092-2101, 2001.

GIFONI, J. M. Proteínas ligantes à quitina de sementes de *Moringa oleifera* Lamark e seu papel na defesa da planta. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Ceará, 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 (Pept. Sci.)**, v. 98, p. 406-415, 2012.

GIUDICI, A. M.; REGENTE, M. C.; CANAL, L. L. A potent antifungal protein from *Helianthus annuus* flowers is a trypsin inhibitor. **Plant Physiology Biochemistry**, v.38, p. 881-888, 2000.

GOKULAKANNAN, G. G.; NIEHAUS, K. Characterization of the *Medicago truncatula* cell wall proteome in cell suspension culture upon elicitation and suppression of plant defense. **Journal of Plant Physiology**, v. 167, p. 1533-1541, 2010.

HANCOCK, R. E. Cationic antimicrobial peptides: toward clinical applications. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 9, p. 1723-1729, 2000.

HEATH, M. Non host resistance and nonspecific plant defenses. **Current Opinion in Plant Biology**, v.3, p.315-319, 2000.

HUBER, R.; BODE, W. Structural basis of the endoproteinases-protein inhibitor interaction. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1477, p. 241-252, 2000.

IWANAGA, S.; YAMASAKI, N.; KIMURA, M.; KOUZUMA, Y. Contribution of conserved Asn residues to the inhibitory activities of Kunitz-type protease inhibitors from plants. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 69, p. 220-223, 2005.

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

JONES, J. D. G. The plant proteolytic machinery and its role in defense. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 7, p. 400-4007, 2004.

KALUME, D. E.; SOUSA, M. W.; MORPHY, L. Purification, characterization, sequence determination, and mass spectrometric analysis of a trypsin inhibitor from seeds of the Brazilian tree *Dipteryx alata* (Leguminosae). **Journal of Protein Chemistry**, v. 14, p. 685-693, 1995.

KAPLAN, A. The determination of urea, ammonia, and urease. **Methods of Biochemistry Analysis**, v. 17, p. 311-324, 1969.

KIM, J.; PARK, S.; KIM, M.; LIM, H.; PARK, Y.; HAHM, K. Antimicrobial activity studies on a trypsin-chymotrypsin protease inhibitor obtained from potato. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 330, p. 921-927, 2005.

KIRTIKAR, K. R.; BASU, B. D.; **Indian Medicinal Plants**, v. 4, 2nd ed. Jayyed Press, New Delhi, 1975.

KLOMKLAO, S.; BENJAKUL, S.; KISHIMURA, H.; CHAIJAN, M. Extraction, purification and properties of trypsin inhibitor from Thai mung bean (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek). **Food Chemistry**, v. 129, p. 1348-1354, 2011.

KOZUKUE, N.; HANS, J. S.; LEE, K. R.; FRIEDMAN, M. Dehydrotomatine and α -tomatine content in tomato fruits and vegetative plant tissues. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 2079-2083, 2004.

KUMAR, V. P.; CHAUHAN, N. S.; PADH, H.; RAJANI, M. Search for antibacterial antifungal agents from selected Indian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, p. 182-188, 2006.

KUNITZ, M. Crystalline soybean trypsin inhibitor. **The Journal of General Physiology**, v. 30, p. 291-310, 1947.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 679-685, 1970.

LAWRENCE, P. K.; KOUNDAL, K. R. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 5-6, 2002.

LIMA, T. B.; SILVA, O. N.; MIGLIOLO, L.; SOUZA-FILHO, C. R.; GONÇALVES, E. G.; VASCONCELOS, I. M.; OLIVEIRA, J. T. A.; AMARAL, A. C.; FRANCO, O. L. A Kunitz proteinase inhibitor from corms of *Xanthosoma blandum* whit bactericidal activity. **Journal of Plant Products**, v. 74, p. 969-975, 2011.

LIN, K. F.; LIU, Y. N.; HSU, S.T. D.; SAMUEL, D.; CHENG, C. S.; BONVIN, A. M. J. J. Characterization and structural analyses of nonspecific lipid transfer protein 1 from Mung Bean. **Biochemistry**, v. 44, p. 5703-5712, 2005.

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.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas do Brasil**, 2 ed., Plantarum: Nova Odessa, 1998.

LOTAN, T.; ORI, N.; FLUHR, R. Pathogenesis-related proteins are developmentally regulated in tobacco flowers, **Plant Cell**, v.1, p. 881-887, 1989.

MACEDO, M. L. R.; FERIRE, M. G. M.; CABRINI, E. C.; TOYAMA, M. H.; NOVELLO, J. C.; MARANGONI, S. A trypsin inhibitor from *Peltophorum dubim* seeds active against pest proteases and its effect on the survival of *Anagasta kuehniella*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1621, p. 170-182, 2003.

MACEDO, M. L. R.; MATOSA, D. G. G.; MACHADO, O. L. T.; MARANGONI, S.; NOVELL, J. C. Trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds: purification and properties. **Phytochemistry**, v. 54, p. 553-558, 2000.

MENDES, C.; HSIUNG, A.; KIFFER, C.; OPLUSTIL, C.; SINTO, S.; MIMICA, I. Evaluation of the in vitro activity of nine antimicrobials against bacterial strains isolated from patients in intensive care units in Brazil: MYSTIC antimicrobial surveillance program. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 5, p. 236-44, 1997.

MIGLIOLO, L.; OLIVEIRA, A. S.; SANTOS, E. A.; FRANCO, O. L.; SALES, M. P. Structural and mechanistic insights into a novel non-competitive Kunitz trypsin inhibitor from *Adenanthera pavonina* L. seeds with double activity toward serine and cysteine proteinases. **Journal Molecular Graphics and Modelling**, v. 29, p. 148-156, 2010.

MORAIS, J. K. S.; GOMES, V. M.; OLIVEIRA, J. T. A.; SANTOS, I. S.; DA CUNHA, M.; OLIVEIRA, H. D.; OLIVEIRA, H. P.; SOUSA, D. O. B.; VASCONCELOS, I. M. Soybean toxin (SBTX), a protein from soybeans that inhibits the life cycle of plant and human pathogenic fungi. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 10356-10363, 2010.

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

NEALE, A. D.; WAHLEITHNER, J. A.; LUND, M.; BONNETT, H. T.; KELLY, A.; MEEKS-WAGNER, D. R.; PEACOCK, W. J.; DENNIS, E. S. Chitinase, β -1,3-glucanase, osmotin and extensin are expressed in tobacco explants during flower formation. **Plant Cell**, v. 2, p. 673-684, 1990.

NOMECLATURE COMMITTEE OF THE INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY (NC-IUBMB). **Enzyme Nomenclature**, Orlando: Academic Press, New York, 1992.

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

OLIVEIRA, A. S.; MIGLIOLO, L.; AQUINO, R. O.; RIBEIRO, J. K.; MACEDO, L. L.; ANDRADE, L. B. S.; BEMQUERER, M. P.; SANTOS, E. A.; KIYOTA, S.; SALES, M. P. Purification and characterization of a trypsin-papain inhibitor from *Pithecelobium dumosum* seeds and its in vitro effects towards digestive enzymes from insect pests. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 45, p. 858-865, 2007.

OLIVEIRA, C. F. R.; VASCONCELOS, I. M.; APARICIO, R.; FREIRE, M. G. M.; BALDASSO, P. A.; MARANGONI, S.; MACEDO, M. L. R. Purification and biochemical properties of a Kunitz-type trypsin inhibitor from *Entada acaciifolia* (Benth.) seeds. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 929-935, 2012.

OLIVEIRA, H. D.; SOUSA, D. O. B.; OLIVEIRA, J. T. A.; CARLINI, C. R.; OLIVEIRA, H. P.; PEREIRA, M. L.; ROCHA, R. O.; MORAIS, J. K. S.; GOMES-FILHO, E.; VASCONCELOS, I. M. *Gm*-TX, a new toxic protein from soybean (*Glycine max*) seeds with potential for controlling insect pests. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 634-640, 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.

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.

PANDO, S. C.; OLIVA, M. L. V.; SAMPAIO, C. A. M.; DI CIERO, L.; NOVELLO, J. C.; MARANGONI, S. Primary sequence determination of a Kunitz inhibitor isolated from *Delonix regia* seeds. **Phytochemistry**, v. 57, p. 625-631, 2001.

PARK, K. S.; CHEONG, J. J.; LEE, S. J.; SHU, M. C.; CHOI, D. A novel proteinase inhibitor gene transiently induced by tobacco mosaic virus infection. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1942, p. 509-512, 2000.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**. 3. ed. São Paulo-SP. Agronômica: Ceres. v. 1, p. 417-453, 1995.

PELEGRINI, P. B. Peptídeos vegetais: novas ferramentas no controle de patógenos humanos e de plantas. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Católica de Brasília, 2007.

PELEGRINI, P. B.; FRANCO, O. L. Plant gamma-thionins: novel insights on the mechanism of action of a multi-functional class of defense proteins. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 37, p. 2239-2253, 2005.

PELEGRINI, P. B.; FARIAS, L. R.; SAUDE, A. C.; COSTA, F. T.; BLOCH, C.; SILVA, L. P.; OLIVEIRA, A. S.; GOMES, C. E.; SALES, M. P.; FRANCO, O. L. A novel antimicrobial peptide from *Crotalaria pallida* seeds with activity against human and phytopathogens. **Current Microbiology**, v. 59, p. 400-404, 2009.

PHONGPAICHIT, S.; PUJENJOB, N.; RUKACHAISIRKUL, V.; ONGSAKUL, M. Antifungal activity from leaf extracts of *Cassia alata* L., *Cassia fistula* L. and *Cassia tora* L. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 26, p. 741-748, 2004.

PONTUAL, E. V.; MOURA, M. C.; NAPOLEÃO, T. H.; SANTOS, A. F. S.; PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B. Flores de moringa oleifera: detecção de atividade termiticida, antibacteriana, inibidora de tripsina e caseinólítica. Encontro Nacional de Moringa, 04 a 02 de Setembro de 2009, Aracajú-Sergipe. Disponível em: <http://linux.alfamaweb.com.br/encontromoringa.com.br/site/trabalhos/04-05-ENAM2009.pdf>.

RAJAN, S.; BABURAJ, D. S.; SETHURAMAN, M.; PARIMALA, S. Stem and stem bark used medicinally by the tribals Irulas and Paniyas of Nilgiri district, Tamilnadu. **Ethnobotany**, v. 6, p. 19–24, 2001.

RAVEN P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 5 ed. 728p. 1992.

REICHERT, J. M. Trends in development and approval times for new therapeutics in the United States. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, p. 695–702, 2003.

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

RICHARDSON, M. Seed storage proteins: The enzyme inhibitors. **Methods in Plant Biochemistry**, v. 5, p. 259-305, 1991.

RYAN, C. A. Protease inhibitor in plants: genes for improving defenses against insect and pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v.28, p. 425-449, 1990.

SALUSTIANO, M. E.; FERRAZ FILHO, A. C.; POZZA, E. A.; CASTRO, H. A. Extratos de candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) Macleish) na inibição *in vitro* de *Cylindrocladium scoparium* e de quatro espécies de ferrugens. **Cerne**, v. 12, n. 2, p. 189-193, 2006.

SATYAVATI, G. V.; SHARMA, M. **Medicinal Plant in India**. ICMR, New Delhi, 1989.

SHAH, D. M.; ROMMENS, C. M. T.; BEACHY, R. N. Resistance to diseases and insect in transgenic plants: progress and applications to agriculture. **Tibtech**, v.31, p. 362-368, 1995.

SIQUEIRA-JÚNIOR, C. L.; FERNANDES, K. V. S.; MACHADO, O. L. T.; CUNHA, M.; GOMES, V. M.; MOURA, D.; JACINTO, T. A 87 kDa tomato cystatin exhibits properties of a defense protein and forms protein crystals in prosystemin overexpressing transgenic plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 247-254, 2002.

SOARES, A. M. S.; MACHADO, O. L. T. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v.1, p.9-19, 2007.

SOARES, J. R.; CARVALHO, A. O.; SANTOS, I. S.; MACHADO, O. L. T.; NASCIMENTO, V. V.; VASCONCELOS, I. M.; FERREIRA, A. T. S.; PERALES, J. E. A.; GOMES, V. M.;

Antimicrobial Peptides from *Adenanthera pavonina* L. seeds: characterization and antifungal activity. **Protein and Peptide Letters**, v. 19, p. 520-529, 2012.

STOREY, R. D.; WAGNER, F. W. Plant proteases: A need for uniformity. **Phytochemistry**, v. 25, p. 2701-2709, 1986.

STRAUSS, S. Y.; IRWIN, R. E.; LAMBRIX, V. M. Optimal defence theory and flower petal colour predict variation in the secondary chemistry of wild radish. **Journal of Ecology**, v.92, p.132-141, 2004.

STROHL, W. R.; KNIGHT, D. M.; Discovery and development of biopharmaceuticals: current issues. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, p. 668-672, 2009.

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

URBANEK, H.; KUZNIAK-GEBAROWSKA, E.; HERKA, H. Elicitation of defense responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase. **Acta Physiologia Plantarum**, v. 31, p. 43-50, 1991.

UTKHEDE, R.; BOGDANOFF, C. Influence of lysozyme, yeast, azoxystrobin, and myclobutanil on fungal diseases of cucumbers grown hydroponically. **Crop Protection**, v. 22, p. 315-320, 2003.

VALLEDOR, L.; JORRÍN, J. Back to the basics: maximizing the information obtained by quantitative two dimensional gel electrophoresis analyses by an appropriate experimental design and statistical analyses. **Journal of Proteomics**, v. 74, p. 1-18, 2011.

VALUEVA, T. A.; MOSOLOV, V. V. Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms. **Biochemistry**, v. 69, p. 1305-1309, 2004.

VAN DER HOORN, R. A. L.; JONES, J. D. G. The plant proteolytic machinery and its role in defence. **Current Opinion In Plant Biology**, v. 7, p. 400-407, 2004.

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. 135-62, 2006.

VAZ, A. F. M.; COSTA, M. P. B.; MELO, A. M. A.; OLIVA, M. L. V.; SANTANA, L. A.; SILVA-LUCCA, R. A.; COELHO, L. C. B. B.; CORREIA, M. T. S. Biocontrol of *Fusarium* species by a novel lectin with low ecotoxicity isolated from *Sebastiania jacobinensis*. **Food Chemistry**, n. 119: 1507-1513, 2010.

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

WANG, H. X.; NG, T. B. Ganodermin, an antifungal protein from fruiting bodies of the medical mushroom *Ganoderma lucidum*. **Peptides**, v. 27, p. 27-30, 2006.

WONG, J. H.; IP, D. C. W.; NG, T. B.; CHAN, Y. S.; FANG, F.; PAN, W. L. A defensin-like peptide from *Phaseolus vulgaris* cv. 'King Pole Bean'. **Food Chemistry**, v. 135, p. 408-414, (2012).

XAVIER-FILHO, J. Sementes e suas defesas contra insetos. Projeto Multifuncional de Biotecnologia e Alimentos. **Organizações dos Estados Americanos**, p. 1-3, 1993.

XAVIER-FILHO, J.; CAMPOS, F. A. P.; ARY, M. B.; SILVA, C. P.; CARVALHO, M. M. M.; MACEDO, M. L. R.; LEMOS, F. J. A.; GRANT, G. Poor correlation between the levels of proteinase inhibitors found in some 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.

YANG, X.; LI, J.; WANG, X.; FANG, W.; BIDOCHKA, M. J.; SHE, R.; XIAO, Y.; PEI, Y. Psc-AFP, an antifungal protein with trypsin inhibitor activity from *Psoralea corylifolia* seeds. **Peptides**, v. 27, p. 1726-1731, 2006.

YE, X.; NG, T. B. Isolation and characterization of juncin, an antifungal protein from seeds of Japanese Takana (*Brassica juncea* var. *integrifolia*). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 57, p. 4366-4371, 2009.

ZACHARIUS, R. M.; ZELL, T. E.; MORRISON, J. H.; WOODLOCK, J. J. Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 30, p. 148-152, 1969.

ZANGERL, A. R.; BAZZAZ, F. A. Theory and pattern in plant defense allocation. In: R. S. Fritz; E. L. Simms. **Plant Resistance to Herbivores and Pathogens**. Chicago: University of Chicago Press, 1993.

ZOTTICH, U.; DA CUNHA, M.; CARVALHO, A. O.; DIAS, G. B.; SILVA, N. C.; SANTOS, I. S.; NASCIMENTO, V. V.; CASTRO, E. C.; MACHADO, O. L. T.; GOMES, V. M. Purification, biochemical characterization and antifungal activity of a new lipid transfer protein (LTP) from *Coffea canephora* seeds with alfa-amylase inhibitor properties. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1810, p. 375-383, 2011.