

PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DO INPA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO
CIENTÍFICA - PIBIC

ENSAIOS ANTIFÚNGICOS COM EXTRATOS PROTEICOS
TOTAIS DE SEMENTES DE ESPÉCIES DA FAMÍLIA FABACEAE

BOLSISTA: Aline Bastos Brilhante de Sousa

ORIENTADOR (A): Andreia Varmes Fernandes

COORIENTADOR: José Francisco de Carvalho Gonçalves

Relatório Final apresentado ao
Instituto Nacional de Pesquisas da
Amazônia - INPA, como parte das
exigências do PIBIC/CNPQ .

Manaus – Amazonas

2014 - 2015

PIBIC
1743

Título do Projeto do Orientador: Moléculas com potencial antifúngico em sementes, folhas e casca de espécies arbóreas: bioprospecção, uso e sustentabilidade da flora amazônica.


Título do Plano de Trabalho do Bolsista: Ensaios antifúngicos com extratos proteicos totais de sementes de espécies da família Fabaceae da Amazônia.

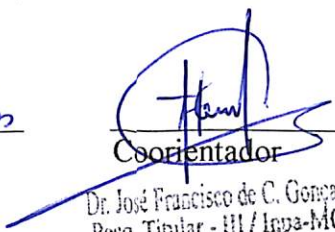
Resumo do trabalho

A Floresta Amazônica é uma fonte rica de espécies vegetais que contém diversas moléculas de interesse biotecnológico. Estas moléculas bioativas podem ser alternativas promissoras no controle de fitopatógenos. O objetivo deste trabalho foi investigar a capacidade antifúngica de extratos proteicos provenientes de sementes de 50 espécies pertencentes à família Fabaceae da Amazônia. As maiores taxas de inibição do crescimento fúngico foram observadas nas espécies pertencentes à subfamília Mimosoideae, onde *Enterolobium schomburgkii*, *Macrosamanea spruceana*, *Zygia cauliflora*, *Z. inaequalis* e *Z. trunciflora*, todas da tribo *Ingeae*, exibiram efeito significativo na inibição do crescimento micelial de todos os fungos testados. Os extratos proteicos das espécies pertencentes à subfamília Caesalpinioideae apresentaram os menores percentuais de inibição do crescimento fúngico. Espécies da subfamília Faboideae pertencentes ao gênero *Swartzia* inibiram, em média, 50% do crescimento de hifas de seis fungos analisados. Espécies do gênero *Ormosia* apresentaram perfil de atividade diversificado. Os resultados demonstram que cada extrato apresenta características distintas diretamente associadas à sua especificidade, que podem estar relacionadas às características genéticas próprias de cada subfamília, tribo e/ou gênero tanto da planta quanto do patógeno. Isso foi observado dentre as tribos, como *Ingeae*, *Parkieae*, *Swartzieae* e *Sophoreae*, e os gêneros *Zygia*, *Ormosia*, *Swartzia* e *Parkia*, que comparando as diferentes espécies de cada tribo/gênero, apresentaram perfil de inibição do crescimento fúngico similar. Além disso, com os percentuais de inibição do crescimento fúngico por extratos proteicos das espécies distribuídas dentro de cada subfamília, é possível observar que a subfamília Caesalpinioideae, mais ancestral dentre as subfamílias, apresenta menores percentuais, podendo possuir proteínas de defesa menos evoluídas, ao passo que as subfamílias Mimosoideae e Faboideae podem possuir proteínas mais evoluídas associadas à atividade antifúngica presente. Os resultados revelaram novas espécies botânicas da família Fabaceae com potencial para o controle de fungos fitopatogênicos, uma vez que extratos proteicos diminuíram o crescimento micelial de fungos, tornando promissora a investigação de moléculas de origem proteica responsáveis pela atividade antifúngica.

Palavras Chaves: atividade antifúngica, proteínas vegetais, Fabaceae.

Data 12 / 06 / 2015


Orientador
Andreia Varmes Fernandes
MAT.: 1359661
INPA- MCTI


Coorientador
Dr. José Francisco de C. Gonçalves
Pesq. Titular - III / Inpa-MCTI.
Mat. 1311752-CDAM-INPA


Bolsista

1. INTRODUÇÃO

A floresta Amazônica é uma rica fonte de moléculas e substâncias bioativas e, suas espécies vegetais vem se destacado em pesquisas de bioprospecção de compostos com aplicabilidade na indústria biotecnológica (Silva *et al.* 2014). Uma grande diversidade de moléculas vegetais é encontrada e estas possuem uma alta especificidade e importância no funcionamento dos sistemas biológicos, e quando comparadas a moléculas obtidas de forma sintética, apresentam maior complexidade estrutural, química e funcional (Specian *et al.* 2014).

Pesquisas relatam que a diversidade de compostos encontrados nos diferentes órgãos das plantas, quando investigadas analiticamente, exibe um elevado potencial para a prospecção de moléculas bioativas. Por exemplo, as sementes possuem reservas estocadas (proteínas, lipídeos, carboidratos e metabólitos secundários) que podem ser utilizadas como insumos na busca de novos princípios ativos para a indústria farmacêutica, cosmética, alimentícia e agrícola (Gonçalves *et al.* 2002; Marques *et al.* 2010).

A flora Amazônica possui um dos maiores índices de biodiversidade do planeta. Em especial, a família Fabaceae possui espécies que apresentam elevado valor econômico e com potencial para exploração e prospecção de biomoléculas, pois, as

sementes dessas espécies apresentam altos teores de proteínas, em torno de 20% da massa total da semente e foi relatada anteriormente a presença de várias proteínas com diversas funções biológicas (Kelemu *et al.* 2004; Kopparapu *et al.* 2011; Fernandes *et al.* 2012; Oliveira *et al.* 2014).

Dentre essas proteínas, destacam-se as lectinas, que possuem pelo menos um sítio de ligação a carboidrato e desempenham vários efeitos biológicos importantes nos organismos. As lectinas interagem seletivamente com carboidratos presentes na superfície de células sanguíneas de diferentes animais, provocando a aglutinação (Peumans e Van Damme 1995; Charungchittrak *et al.* 2011).

As proteínas vegetais, além de outros compostos orgânicos, atuam no metabolismo celular (ação catalítica das enzimas), na sinalização de respostas às condições ambientais (fatores bióticos e abióticos), além de atuarem nos mecanismos de defesa das plantas (Bariani *et al.* 2012), participando das interações contra predadores e patógenos (Croteau *et al.* 2000). Especificamente, as proteínas antifúngicas têm como alvos estruturais a parte exterior da célula fúngica, como a parede celular e a membrana plasmática e, finalmente atua em diversos alvos intracelulares (Theis e Stahl 2004).

Assim, essas proteínas exibem uma ampla variedade de mecanismos de ação, incluindo, por exemplo, inibição da síntese da parede celular ou alteração da estrutura, formação de poros e canais na membrana, danos nos ribossomos, inibição da síntese de DNA e inibição do ciclo celular, em especial no bloqueio das reações enzimáticas. Esses efeitos refletem-se na inibição da germinação e/ou redução ou inibição do crescimento micelial (Lo *et al.* 1996; Selitrennikoff 2001).

Desta maneira, buscam-se novas alternativas para o controle de fitopatógenos, tais como biofungicidas, controle biológico e indução de resistência, que substitua o uso

de fungicidas sintéticos altamente tóxicos para o meio ambiente e para os organismos vivos (Dias *et al.* 2015). Trabalhos desenvolvidos explorando a atividade biológica de extrato bruto de plantas têm indicado potencial no controle de fitopatógenos, por meio da indução de mecanismos de defesa nas plantas ou pela inibição do crescimento micelial e da germinação de esporos (Stangarlin *et al.* 1999; Schwan-Estrada *et al.* 2008). Portanto, o presente trabalho relata a bioprospecção de extratos proteicos vegetais extraídos de sementes de 50 espécies da família Fabaceae da região amazônica, com o objetivo de selecionar as espécies com maior potencial antifúngico para que posteriormente, seja possível purificar e caracterizar as proteínas possivelmente envolvidas com essa atividade biológica.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar extratos proteicos totais de sementes de espécies da família Fabaceae com a capacidade de inibir o crescimento de fungos fitopatogênicos para posteriormente, isolar e caracterizar bioquimicamente as moléculas (especificamente, lectinas) responsáveis por essa atividade.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair as proteínas totais solúveis de sementes das 50 espécies da família Fabaceae;
- Realizar os ensaios antifúngicos com os extratos das 50 espécies.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

Sementes em bom estado fitossanitário de 50 espécies pertencentes à família Fabaceae (Tabela 01), das subfamílias Caesalpinioideae, Faboideae e Mimosoideae, foram obtidas no banco de sementes do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal (LFBV/INPA – Campus III).

Tabela 1. As 50 espécies pertencentes à família Fabaceae, separadas nas respectivas subfamílias (Caesalpinioideae, Faboideae e Mimosoideae), selecionadas para testes antifúngicos a partir do extrato proteico total das sementes.

Família Fabaceae		
Caesalpinioideae	Faboideae	Mimosoideae
<i>Cassia grandis</i>	<i>Acosmium nitens</i>	<i>Anadenanthera peregrina</i>
<i>Cassia leiandra</i>	<i>Canavalia brasiliensis</i>	<i>Dinizia excelsa</i>
<i>Caesalpinia ferrea</i> var. <i>ferrea</i>	<i>Centrosema triquetrum</i>	<i>Enterolobium schomburgkii</i>
<i>Copaifera venezuelana</i>	<i>Dalbergia spruceana</i>	<i>Inga pezzizifera</i>
<i>Crudia oblonga</i>	<i>Dioclea bicolor</i>	<i>Leucaena leucocephala</i>
<i>Cynometra bauhiniifolia</i>	<i>Mucuna urens</i>	<i>Macrosamanea spruceana</i>
<i>Dialium guianense</i>	<i>Ormosia costulata</i>	<i>Parkia decussata</i>
<i>Dicorynia paraensis</i>	<i>Ormosia discolor</i>	<i>Parkia gigantocarpa</i>
<i>Dimorphandra caudata</i>	<i>Ormosia grossa</i>	<i>Parkia multijuga</i>
<i>Dimorphandra parviflora</i>	<i>Ormosia lignivalvis</i>	<i>Parkia nitida</i>
<i>Hymenaea courbaril</i>	<i>Ormosia macrocalyx</i>	<i>Parkia pamurensis</i>
<i>Peltogyne catिंगae</i>	<i>Ormosia paraensis</i>	<i>Parkia pendula</i>
<i>Peltogyne venosa</i>	<i>Ormosia smithii</i>	<i>Stryphnodendron guianensis</i>
<i>Peltogyne paniculata</i>	<i>Swartzia recurva</i>	<i>Zygia cauliflora</i>
<i>Senna tapajonensis</i>	<i>Swartzia polyphylla</i>	<i>Zygia inaequalis</i>
	<i>Swartzia longistipitata</i>	<i>Zygia trunciflora</i>
	<i>Swartzia pendula</i>	
	<i>Swartzia sericea</i>	
	<i>Swartzia ingifolia</i>	

3.2 EXTRAÇÃO PROTEICA

As sementes de cada espécie foram trituradas em moinho analítico até a obtenção de um material finamente pulverizado e armazenado a 4 °C. Este material foi homogeneizado em solução de NaCl 0,15 M (10% p/v) e mantido sob leve agitação a

temperatura ambiente, durante 2 horas. Após este período, a amostra foi centrifugada a 11.000 g, durante 20 minutos a 10 °C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante submetido à diálise contra água destilada, durante 72 horas a 4 °C e em seguida, liofilizado até a obtenção do extrato totalmente seco.

3.3 ENSAIOS BIOLÓGICOS

3.3.1 CULTIVO DOS FUNGOS

O cultivo dos fungos foi realizado em 25 mL de meio Difco Batata Dextrose Agar (BDA) vertido em placas de Petri estéreis e mantidos em câmara de germinação do tipo B.O.D. (27 ± 2 °C). O meio de cultura foi constituído de 39 g de BDA dissolvido em 1000 mL de água destilada e em seguida foi autoclavado durante 15 minutos, a 120 °C, 1 kgf. Os isolados foram periodicamente renovados por meio de repique, que consiste na transferência de *pellets* de uma placa contendo os fungos para outra apenas com meio de cultura BDA. Todos os procedimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar com chama de fogo. Os isolados dos fungos fitopatogênicos *Aspergillus* sp., *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium* sp., *Fusarium oxysporium*, *Penicillium chysogenum*, *Phomopsis* sp., foram obtidos da micoteca mantida pelo LFBV/INPA.

3.3.2 OBTENÇÃO DA SUSPENSÃO DE CONÍDIOS

A obtenção das suspensões de conídios foi realizada segundo Melo e colaboradores (2005). Após os fungos tomarem todo o diâmetro da placa de Petri, cerca de 10 a 15 dias após o cultivo, essas placas foram abertas em câmara de fluxo laminar e foi adicionado 10 mL de água destilada estéril sob a superfície micelial do fungo. Com o auxílio de uma alça de Drigalski, previamente esterelizada, foram feitos movimentos suaves na superfície do micélio para a liberação dos esporos. A suspensão obtida foi

filtrada em gaze estéril para a retirada das hifas remanescentes. O filtrado resultante foi denominado de suspensão de conídios.

Para a realização dos ensaios de inibição de crescimento fúngico e da germinação de conídios, as suspensões de esporos foram ajustadas para a concentração de 2×10^5 esporos/mL. A contagem de esporos foi feita com auxílio de uma câmara de Neubauer em microscópio óptico (Carl Zeiss AxioLab A1), no aumento 200x.

3.3.3 ENSAIO DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO FÚNGICO EM MEIO LÍQUIDO

Os ensaios de inibição do crescimento fúngico foram realizados conforme a metodologia descrita por Broekaert e colaboradores (1990), com algumas adaptações. Os ensaios foram desenvolvidos em placas de microtitulação de poliestireno de fundo chato (estéreis) de 96 poços. Em cada poço foi adicionado 10 μ L da suspensão de esporos (2×10^5 esporos/mL) de um determinado fungo e 90 μ L de meio YPD (“Yeast Peptone Dextrose”). Após 16 horas, na ausência de luz a 27 °C, foi adicionado 100 μ L do extrato. Os controles negativos e positivos foram o tampão Tris HCl 50 mM pH 7,5 e o peróxido de hidrogênio 200 mM, respectivamente. Os ensaios foram realizados na concentração de 5,0 mg/mL do extrato em tampão. Todas as amostras foram filtradas em membranas de 0,22 μ m. O monitoramento do crescimento fúngico foi feito por meio das leituras de absorbância a 630 nm, em intervalos de 12 horas, até um total de 72 horas, em leitora de microplacas (Thermo Plate Reader). Para a análise estatística dos dados, foram realizadas análises de variância simples (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, sendo utilizado o programa estatístico GraphPad Prism 6.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade antifúngica dos extratos proteicos totais de 50 espécies de Fabaceae, divididos de acordo com as respectivas subfamílias (Caesalpinioideae, Mimosoideae e Faboideae), foram testadas contra sete fungos fitopatogênicos de interesse agrícola.

Os resultados mais significativos foram observados nas espécies da subfamília Mimosoideae, especialmente na tribo *Ingeae*. Os extratos proteicos de *Enterolobium schomburgkii*, *Macrosamanea spruceana*, *Zygia cauliflora*, *Z. inaequalis* e *Z. trunciflora*, exibiram efeito significativo na inibição do crescimento micelial de todos os fungos testados. O extrato total de *Z. trunciflora* apresentou percentual de inibição de 91,1% e 44,5% contra o fungo *Aspergillus flavus*. e *F. oxysporum*, respectivamente. Todos os fungos testados foram inibidos pelo extrato de *Z. cauliflora* com percentual de inibição superior a 34,7% (contra *Fusarium* sp.) até 85,7% (contra *F. oxysporium*) (Tabela 2).

Macrosamanea spruceana exibiu atividade antifúngica para todos os fungos testados, apresentando maior percentuais de inibição contra os fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus* sp., inibindo 79,3% e 83,9%, respectivamente, porém o efeito antifúngico foi reduzindo para os fungos *Phomopsis* sp. e *Fusarium oxysporum*, inibindo 33,0% e 34,5%, respectivamente. O extrato proteico de *Enterolobium schomburgkii* apresentou inibição do crescimento fúngico contra seis fungos dos testados. Com relação aos seis extratos pertencentes ao gênero *Parkia*, tribo *Parkieae*, da subfamília Mimosoideae, as espécies *P. niitida*, *P. pamurensise* e *P. pendula* inibiram cinco espécies de fungos (Tabela 2).

As sete espécies pertencentes ao gênero *Ormosia* da tribo *Sophoreae* (subfamília Faboideae) apresentaram perfil de atividade antifúngica diversificado. No caso,

Ormosia costulata e *O. discolor* atingiram a inibição máxima do crescimento micelial de *Fusarium* sp., ao passo que *Ormosia lignivalvis* exibiu 79,7% de inibição contra este mesmo fungo. As demais espécies apresentaram efeito deletério contra os fungos, porém em percentuais inferiores a 30%, com exceção a *O. discolor* contra o fungo *Aspergillus flavus* (49,1%), *O. lignivalvis* e *O. macrocalyx* contra o fungo *Penicillium chrysogenum* (64,6 e 52,9%, respectivamente) e *O. costulata* e *O. discolor* contra o fungo *Phomopsis* sp. (33,5 e 38,3%, respectivamente) (Tabela 3).

Os extratos proteicos das espécies pertencentes à subfamília Caesalpinioideae (Tabela 4), apresentaram os menores percentuais de inibição do crescimento fúngico. Dentre as 15 espécies selecionadas, 8 extratos foram considerados com atividade antifúngica moderada, no qual apresentaram efeito contra 1 a 3 fungos testados, com percentual entre 30 a 50%. Não foi constatada atividade antifúngica significativa em 7 extratos testados, onde, a inibição do crescimento micelial foi inferior a 30%.

Tabela 2: Atividade antifúngica de extratos proteicos de sementes de espécies da subfamília Mimosoideae, família Fabaceae, contra fungos fitopatogênicos.

Tribo	Esp	Inibição do crescimento fúngico (%)						
		<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Penicillium chrysogenum</i>	<i>Phomopsis</i> sp.
Ingeae	E.s.	64,7±4,8aA	79,2±0,6aA	63,7±5,7aA	NC*	44,5±4,1aB	44,6±14,6aB	16,9±2,5aC
	I.p.	-	11,3±3,3bA	-	-	16,5±5,3bA	-	24,5±6,0aB
	M.s.	79,3±2,4aA	ND	83,9±3,7aA	34,5±5,9aB	67,0±3,4cC	NC*	33,0±1,7bB
	Z.c.	80,7±1,96aA	79,7±2,0aAD	94,5±0,6bB	85,7±5,2bA	34,7±1,3aC	69,7±6,6bD	69,2±1,7cD
	Z.i.	82,0±6,04aA	85,9±1,1aA	96,9±9,2bB	NC*	45,4±0,5aC	20,9±2,7cD	76,4±2,1cdA
	Z.t	91,1±1,83bA	87,9±2,3aA	68,9±16,2aBD	44,5±2,3ac	90,6±1,8dA	75,3±1,5bAD	85,3±1,9dA
Mimoseae	A.p.	-	-	-	-	-	-	-
	D.e.	61,9±3,2a	22,6±0,6bc	-	-	-	-	-
	L.l.	18,9±7,6c	-	-	-	45,8±6,4a	-	-
	S.g.	47,7±5,3adA	53,7±10,7dA	-	-	20,6±8,8bB	21,6±0,1cB	59,9±2,3cA
	Parkieae	P.d.	50,9±7,3adA	27,4±1,15cBC	-	-	31±10,5abAC	-
	P.g.	15,4±9,6c	-	-	-	42,5±3,86a	-	-
	P.m.	-	-	-	-	-	-	-
	P.n.	56,7±7,5adA	-	-	-	31,9±5,6abB	-	47,0±1,6cA
	P.pa	42,7±12dA	25,7±1,9bcAC	-	-	37,1±4,0aA	15,6±1,1cBC	30,1±3,8bA
	P.pe	18,7±2,5cA	85,1±1,6aB	-	-	61,6±4,1cC	20,4±1,5cA	22,7±7,0aA

*NC: Não conclusivo. - : Não apresentou inibição do crescimento fúngico na concentração testada (5 mg/mL). Esp.: Espécie. E.s.: *Enterolobium schomburgkii*. I.p.: *Inga pezizifera*. M.s.: *Macrosamanea spruceana*. Z.c.: *Zygia cauliflora*. Z.i.: *Z. inaequalis*. Z.t.: *Z. trunciflora*. A.p.: *Anadenanthera peregrina*. D.e.: *Dinizia excelsa*. L.l.: *Leucaena leucocephala*. S.g.: *Stryphnodendro guianensis*. P.d.: *Parkia decussata*. P.g.: *P. gigantacarpa*. P.m.: *P. multijuga*. P.n.: *P. nitida*. P.pa.: *P. panurensis*. P.pe.: *P. pendula*. Os valores de médias seguidos pela mesma letra minúscula nas colunas e a mesma letra maiúscula nas linhas não diferem entre si, de acordo com teste de Tukey ($p > 0,05$).

Tabela 3: Atividade antifúngica de extratos proteicos de sementes de espécies da subfamília Faboideae, família Fabaceae, contra fungos fitopatogênicos.

Tribo	Esp.	Inibição do crescimento fúngico (%)						
		<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Penicillium chrysogenum</i>	<i>Phomopsis</i> sp.
Dalbergieae	A.n	-	40,6±3,5a	-	-	-	-	-
	D.s	-	-	-	-	-	-	-
Phaseoleae	C.b	37,7±7,6aA	82,7±2,7bB	-	-	45,2±2,2aA	-	26,9±0,7aAC
	C.t	52,7±5,6aA	17,9±9,8cB	-	-	22,4±6,7bB	-	-
	D.b	-	-	-	-	-	-	-
	M.u	-	-	-	-	77,6±1,3c	-	-
Sophoreae	O.c	-	-	-	-	100d	-	33,5±6,1a
	O.d	49,1±2,5aA	-	-	-	100dB	9,0±3,3Ac	38,3±3,8aD
	O.l	24,3±10,0aA	-	-	-	79,7±2,3cB	64,6±1,1bC	26,7±2,4aA
	O.g	-	-	-	-	-	-	-
	O.m	-	27,5±2,6aA	-	-	14,8±2,9bB	52,9±5,6cC	-
	O.p	-	-	-	-	17,2±3,6b	-	-
	O.s	-	-	-	-	11,3±6,0b	-	-
Swartzieae	S.i	-	-	-	-	45,0±4,5aA	44,9±10,3cA	28,3±9,0aA
	S.l	64,7±4,9bA	60,0±2,1dA	-	-	51,1±2,8aB	22,5±1,1dC	-
	S.pe	61,3±4,9bA	17,5±5,6cB	-	-	26,0±4,4bB	21,8±0,8dB	52,9±9,4bA
	S.po	59,5±8,8bA	90,5±0,7bB	60,9±13,8A	-	49,3±4,7aA	21,7±2,5dC	60,4±2,2bA
	S.r	-	17,2±5,4cA	-	-	50,7±5,1aB	22,2±0,6dA	56,4±4,9bB
	S.s	78,8±2,5cA	87,0±3,3bA	85,0±9,1A	-	52,5±1,4aB	22,2±0,5dC	67,9±1,6bD

- : Não apresentou inibição do crescimento fúngico na concentração testada (5 mg/mL). Esp.: Espécie. A.n.: *Acosmium nitens*. D.s.: *Dalbergia spruceana*. C.b.: *Canavalia brasiliensis*. C.t.: *Centrosema triquetrum*. D.b.: *Dioclea bicolor*. M.u.: *Mucuna urens*. O.c.: *Ormosia costulata*. O.d.: *O. discolor*. O.l.: *O. lignivalvis*. O.g.: *O. grossa*. O.m.: *O. macrocalyx*. O.p.: *O. paraenses*. O.s.: *O. smithii*. S.i.: *Swartzia ingifolia*. S.l.: *S. longistipitata*. S.pe.: *S. pendula*. S.po.: *S. polyphylla*. S.r.: *S. recurva*. S.s.: *S. sericea*. Os valores de médias seguidos pela mesma letra minúscula nas colunas e a mesma letra maiúscula nas linhas não diferem entre si, de acordo com teste de Tukey ($p > 0,05$).

Tabela 4: Atividade antifúngica de extratos proteicos de sementes de espécies da subfamília Caesalpinioideae, família Fabaceae, contra fungos fitopatogênicos.

Tribo	Esp.	Inibição do crescimento fúngico (%)						
		<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus sp.</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium sp.</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>	<i>Phomopsis sp.</i>
<i>Caesalpinieae</i>	C.f	54,7±5,7ac	-	-	-	-	-	-
	D.c	59,7±4,2a	-	-	-	-	-	-
	D.p	37,2±5,5bA	25,3±1,6aB	-	-	-	-	25,8±4,7aB
<i>Cassieae</i>	C.l	68,1±1,0bc	NC*	-	-	-	NC*	-
	C.g	-	-	-	-	-	-	-
	D.g	-	-	-	-	-	-	-
	D.p	-	-	-	-	-	-	-
	S.t	53,4±5,5bcA	NC*	-	-	40,2±6,4aB	NC*	36,6±2,8bB
<i>Detarieae</i>	C.v	10,5±0,6d	-	-	-	-	-	-
	C.o	-	17,8±3,3b	-	-	-	-	-
	C.b	22,1±4,1d	-	-	-	-	-	11,0±2,4c
	H.c	-	-	-	-	24,8±6,3ab	-	-
	P.c	-	10,2±2,8cA	14,1±1,8a	-	52,9±8,1aB	20,0±2,5aC	70,1±2,8dB
	P.p	-	-	-	-	61,3±9,9cA	17,8±2,2aB	42,7±3,6bC
	P.v	-	-	-	-	-	23,7±1,2*	60,9±5,4d

*NC: Não conclusivo. -: Não apresentou inibição do crescimento fúngico na concentração testada (5mg/mL). Esp.: Espécie. C.f.: *Caesalpinia ferrea*. D.c.: *Dimorphandra caudata*. D.p.: *D. parviflora*. C.l.: *Cassia leiandra*. C.g.: *C. grandis*. D.g.: *Dialium guianense*. D.p.: *Dicorynia paraenses*. S.t.: *S. tapajonensis*. C.v.: *Copaifera venezuelana*. C.o.: *Crudia oblonga*. C.b.: *Cynometra bauhiniifolia*. H.c.: *Hymenaea courbaril*. P.c.: *Peltogyne catinae*. P.p.: *P. paniculata*. P.v.: *P. venosa*. Os valores de médias seguidos pela mesma letra minúscula nas colunas e a mesma letra maiúscula nas linhas não diferem entre si, de acordo com teste de Tukey ($p > 0,05$).

Os resultados sugerem que cada extrato apresenta características distintas diretamente associadas à sua especificidade, que podem estar relacionadas às características genéticas próprias de cada gênero e/ou espécie tanto da planta quanto do patógeno (Bariani *et al.* 2012). Isso é observado dentre as tribos, como *Ingeae*, *Parkieae*, *Swartzieae* e *Sophoreae*, e os gêneros *Zygia*, *Ormosia*, *Swartzia* e *Parkia*, que comparando as diferentes espécies de cada tribo/gênero, apresentaram perfil de inibição do crescimento fúngico similar.

Além disso, o percentual de inibição do crescimento fúngico por extratos proteicos das espécies distribuídas dentro de cada subfamília (Figura 1), é menor para a subfamília Caesalpinioideae em relação às demais subfamílias. Isso se deve ao fato que a subfamília Caesalpinioideae é considerada mais ancestral, possuindo proteínas de defesa menos evoluídas (Macedo *et al.* 2000). Já as subfamílias Mimosoideae e

Faboideae possuem proteínas mais evoluídas, e estas podem estar envolvidas de forma mais efetiva na atividade antifúngica.

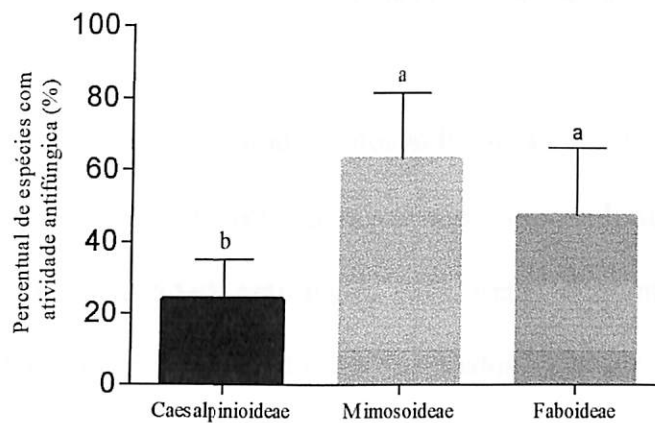


Figura 1. Percentual de inibição do crescimento fúngico por extratos proteicos das espécies distribuídas dentro de cada subfamília. A coluna com a mesma letra não diferem entre si, de acordo com teste de Tukey ($p > 0,05$).

É possível afirmar, a partir dos resultados obtidos, que alguns extratos proteicos interferem negativamente no crescimento micelial de fungos fitopatogênicos. Desta forma, a utilização de extratos proteicos para o controle de fitopatógenos pode impedir que o fungo se prolifere nas plantas. Além disso, Bariani e colaboradores (2012) demonstraram que extratos proteicos de *Caesalpinia ferrea* e *Swartzia polyphyla* podem exercer efeito e /ou dano na reprodução do fungo, devido à diminuição significativa na produção de esporos. Em campo, podem atuar na redução do inóculo, resultando na diminuição da disseminação da doença.

O potencial a atividade antifúngica de extratos brutos de espécies vegetais é relatada por diversos autores. Hadizadeh e colaboradores (2009) testou as espécies *Urtica dioica* L., *Citrullus colocynthis* L., *Ziziphusspina christi* e *Nerium oleander* L. contra os fungos fitopatogênicos *Alternaria* sp., *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* e *Rizoctonia solanie* obteve resultados de inibição do crescimento micelial em todos os

ensaios. No caso, *Fusarium oxysporum* apresentou maior resistência aos extratos adicionados aos testes. Este resultado corrobora com os encontrados no presente trabalho, onde apenas 3 dos 50 extratos testados, apresentaram atividade antifúngica contra este fungo.

A partir destes resultados obtidos e dos indícios já descritos na literatura sobre a ação eficaz de proteínas de sementes, é possível inferir que moléculas proteicas biotivas podem está associadas à atividade antifúngica dos extratos. Por tanto, a investigação por moléculas, se torna promissora, visto que os dados revelam alguns dos extratos proteicos de sementes de espécies da família Fabaceae que apresentam significantes efeitos antifúngicos.

5. CONCLUSÃO

Os resultados revelaram novas espécies botânicas da família Fabaceae com potencial para o controle de fungos fitopatogênicos, uma vez que vários extratos proteicos diminuíram o crescimento micelial de fungos, tornando promissora a investigação de moléculas de origem proteica responsáveis pela atividade antifúngica.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bariani, A.; Gonçalves, J.F.C.; Chevreuil, L.R.; Cavallazzi, J.R.P.; Souza, L.A.G.; Bentes, J.L.S.; Pando, S.C. 2012. Purificação parcial de inibidores de tripsina de sementes de *Caesalpinia ferrea* e *Swartzia polyphylla* e o efeito dos extratos proteicos sobre fungos fitopatogênicos. *Summa Phytopathologica*, 38: 131-138.
- Broekaert, W.F.; Cammue, B.P.A.; Vanderleyden, J. 1990. An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. *FEMS Microbiology Letters*, 69: 61-66.

- Charungchitrak, S.; Petsom, A.; Sangvanich, P.; Karnchanatat, A. 2011. Antifungal and antibacterial activities of lectin from the seeds of *Archidendron jiringa* Nielsen. *Food Chem.*, 126: 1025-1032.
- Croteau, R.; Kutchan, T.M.; Lewis, N.G. 2000. Natural products (secondary metabolites). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, 4: 646-649.
- Dias, R.O.; Machado, L.S.; Migliolo, L.; Franco, O.L. 2015. Insights into Animal and Plant Lectins with Antimicrobial Activities. *Molecules*, 20: 519-541.
- Fernandes, A.V.; Ramos, M.V.; Vasconcelos, I.M.; Moreira, A.C.; Moreno, F.B.; Pereira, J.O.; Gonçalves, J.F.C. 2012. Purification and Characterization of a lectin of the Swartzieae Legume Taxa. *Protein and Peptide Letters*, 19: 1082-1088.
- Gonçalves, J.F.C.; Fernandes, A.V.; Oliveira, A.F.M.; Rodrigues, L.F.; Marengo, R.A. 2002. Primary metabolism components of seeds from Brazilia Amazon tree species. *Brazilian Journal of Plant Physiology, Londrina*, 14: 139 – 142.
- Hadizadeh, I.; Peivastegan, B.; Kolahi, M. 2009. Antifungal activity of nettle (*Urtica dioica* L.), colocynth (*Citrullus colocynthis* L. Schrad), oleander (*Nerium oleander* L.) and konar (*Ziziphus spina-christi* L.) extracts on plants pathogenic fungi. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 12: 58-63.
- Kelemu, S.; Cardona, C.; Segura G. 2004. Antimicrobial and insecticidal protein isolated from seeds of *Clitoria ternatea*, a tropical forage legume. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42: 867–873.

- Kopparapu, N.K.; Liub, Z.; Fei, F.; Yan, Q.; Jiang, Z. 2011. Purification and characterization of a chitinase (sAMC) with antifungal activity from seeds of *Astragalus membranaceus*. *Process Biochemistry*, 46: 1370–1374.
- Lo, L.C.; Weiergang, I.; Bonham, C.; Hipskind, J.; Wood, K.; Nicholson, R.L. 1996. Phytoalexin accumulation in sorghum: identification of a methyl ether of luteolinidin. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 49: 21-31.
- Macedo, M.L.R.; Matos, D.G.G.; Machado, O.L.T.; Marangoni, S.; Novello, J.C. 2000. Trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds: purification and properties. *Phytochemistry*, 54: 553-558.
- Marques, D.D.; Sartori R.A.; Lemos, T.L.G.; Machado, L.L.; Souza, J.S.N. Monte, F.J.Q. 2010. Chemical composition of the essential oils from two subspecies of *Protium heptaphyllum*. *Acta Amazonica*, 40: 227-230.
- Melo, V.M.M.; Vasconcelos, I.M.; Gomes, V.M.; Cunha, M.; Soares, A.A.; Oliveira, J.T.A. 2005. A cotyledonary agglutinin from *Luetzelburgia auriculata* inhibits the fungal growth of *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium solani* and *Aspergillus niger* and impairs glucose-stimulated acidification of the incubation medium by *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Plant Science*, 169: 629-639.
- Oliveira, T.R.; Santos, M.D.S.; Figueiredo, M.F.; Fontenelle, R.O.S.; Andrade, L.B.S. 2014. Enzimas, inibidores de proteases e atividade antibacteriana de extratos aquosos de sementes de *Caesalpinia pyramidalis* Tul. *Enciclopédia biosfera*, 18: 3251-3261.

- Peumans, W.J.; Van Damme, E.J.M. 1995. Lectins as plants defense proteins. *Plant Physiol*, 109: 347-352.
- Schwan-Estrada, K.R.F.; Fiori-Suzuki, C.C.L.; Itako, A.T. 2008. Utilização de extratos vegetais no controle de doenças de plantas. *Métodos alternativos de controle de insetos-praga, doenças e plantas daninhas: panorama atual e perspectivas na agricultura*. v.1. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, Pará, 308p.
- Selitrennikoff, C.P. 2001. Antifungal proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 2883-2894.
- Silva, W.M.C.; Rocha, E.S.; Silva, H.S.S. 2014. O extrativismo vegetal na amazônia: os desafios desta atividade diante de uma educação ambiental. *Revista Eletrônica Examãpaku*, 7: 37-40.
- Specian, V.; Orlandelli, R.C.; Felber, A.C.; Azevedo, J.L.; Pamphil, J.A. 2014. Metabólitos secundários de interesse farmacêutico produzidos por fungos endofíticos. *UNOPAR Cient. Ciênc. Biol. Saúde*, 16: 345-351.
- Stangarlin, J.R.; Schwan-estrada, K.R.F.; Cruz, M.E.S.; Nozaki, M.H. 1999. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. *Biotechnology, Ciência e Desenvolvimento*, 11: 16-29.
- Theis, T; Stahl, U. 2004. Antifungal proteins: targets, mechanisms and prospective applications. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61: 437-455.