

EFEITO DE EXTRATOS PROTÉICOS DE SEMENTES DE ESPÉCIES LEGUMINOSAS ARBÓREAS DA AMAZÔNIA SOBRE O CRESCIMENTO DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

Stephany Anry KUDO¹; José Francisco de Carvalho GONÇALVES²; Larissa Ramos CHEVREUIL³; Rogério Eiji HANADA⁴

¹Bolsista PIBIC/CNPq; ²Orientador INPA/CPST; ³Co-orientadora/CPST; ⁴ Colaborador - Pesquisador INPA/CPCA

1. Introdução

As espécies de leguminosas arbóreas representam importante recurso florestal no bioma Amazônico. Numericamente são bastante representativas e, estão presentes nas três sub-famílias botânicas, Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae (Lewis *et al.* 2005). As leguminosas tem como importância econômica seu alto valor comercial madeireiro. No entanto, seus produtos não madeireiros também tem contribuído como alternativas para agregar maior valor a estas espécies. Recentemente, estudo prospectando produtos bioativos confirmaram a presença de moléculas com propriedades antifúngica e antimicrobiana dessas espécies (Abder-kader *et al.* 2000). Dentre essas moléculas com ação bioativa, encontradas nas leguminosas, sugere-se que as proteínas antifúngicas tem participação na defesa das plantas contra o ataque de patógenos, como por exemplo, a atividade dos inibidores de proteinases, que têm sido extensivamente isolados a partir de sementes de leguminosas. A classe dos inibidores proteolíticos apresenta alto conteúdo nos tecidos de estocagem, compreendendo de 2 a 15% do teor de proteínas totais e, são considerados metabólitos importantes, pois além de sua função de reserva, podem atuar no mecanismo de defesa das plantas contra o ataque de insetos e microorganismos, por meio da inibição de enzimas digestivas ou de enzimas proteolíticas extracelulares (Chrispeels e Raikhehl 1991; Selitrennikoff 2001).

Considerando que estudos demonstram resultados satisfatórios quanto à presença e especificidade antifúngica de extratos protéicos de sementes de espécies da família Fabaceae (Bariani, 2008) e, que poucos estudos com inibidores proteolíticos tem sido realizados a partir de espécies pertencentes à flora Amazônica, este estudo teve como objetivo investigar o efeito dos extratos protéicos de sementes de leguminosas arbóreas da Amazônia sobre o crescimento de fungos fitopatogênicos.

2. Material e Métodos

Os experimentos foram realizados nos Laboratórios de Fisiologia e Bioquímica Vegetal (CPST) e no Laboratório de Fitopatologia (CPCA).

2.1 Material biológico

Sementes inteiras e maduras de seis espécies de leguminosas, *Campsiandra comosa* Benth; *Dinizia excelsa* Ducke; *Parkia discolor* Benth; *Parkia nitida* Miq; *Parkia pendula* (Willd) Benth e *Swartzia polyphyla* DC., coletadas em diferentes sítios florestais do Estado do Amazonas foram utilizadas para extração de proteínas.

2.2 Determinação de proteína bruta

O material pulverizado, após seco em estufa à 65°C, foi submetido à digestão por via úmida. Em seguida, procedeu-se a destilação e a titulação com ácido sulfúrico a 0,01 N. O teor de proteína bruta foi determinado pela conversão dos teores utilizando-se o fator 5,71, para obtenção da estimativa do teor de proteínas brutas (Ezeagu *et al.*, 2002).

2.3 Extração de proteínas solúveis

Sementes inteiras foram trituradas em moinho analítico e homogeneizadas em solução de NaCl 0,15 M (10% p/v) sob leve agitação durante duas horas e centrifugadas (5.000 g, 20 min., 4°C). O sobrenadante foi submetido à diálise durante 48, resultando no extrato protéico. A quantificação de proteínas solúveis nos extratos protéicos foi realizada pelo método de Bradford (1976).

2.4 Detecção de inibidores de tripsina e quimotripsina bovina

Os ensaios de detecção de inibição da tripsina e quimotripsina bovina foi preparada a partir de uma mistura de pré incubação, constituída de tampão, enzima (tripsina e quimotripsina, Sigma) e dos extratos protéicos, durante 10 minutos a 37°C. Em seguida, para o ensaio com tripsina, foi adicionado o BAPNA (Benzoil-arginina-p-nitroanilida, Sigma) e, para a quimotripsina, o BTPNA (Benzoil-tirosina-p-nitroanilida, Sigma), prosseguindo-se a incubação por mais 30 minutos, a 37°C. A reação foi interrompida pela adição de ácido acético e, a hidrólise do substrato pela enzima monitorada a $\lambda = 410$ nm, procedendo-se leituras espectrofotométricas (Ultraspec 2100 pro, Amersham Biosciences).

2.5 SDS – PAGE

O gel de poliacrilamida foi realizado segundo o método de Laemmli (1970). Como marcadores de massas moleculares foram utilizados marcadores da Promega (10 kDa - 225 kDa). Após a migração das proteínas nos géis, estes foram corados com Coomassie Brilliant Blue e, estabelecida a estimativa das massas moleculares.

2.6 Efeito inibitório de extratos vegetais sobre os fungos fitopatogênicos

A análise do efeito *in vitro* dos extratos protéicos contra os fungos fitopatogênicos, foi realizada com os fungos, *Corynespora cassiicola*, *Mycosphaerella fijiensis* e *Sclerotium rolfsii*. Os ensaios foram feitos em placas de Petri esterilizadas contendo meio de cultura BDA (200 g de batata, 20 g de dextrose e 20 g de ágar e água destilada) e as atividades antifúngicas foram testadas a partir dos extratos esterilizados em quatro diferentes concentrações de proteínas (0, 50, 100, 150 e 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$). A análise do crescimento dos fungos seguiu critérios específicos para cada fungo testado. 1) Para o fungo *Mycosphaerella fijiensis* foi analisado o número de colônias. Inicialmente, o fungo foi macerado em almofariz contendo água destilada. Posteriormente, a suspensão foi diluída em água e colocada em uma câmara de Neubauer para contagem dos fragmentos de micélio, com auxílio de um microscópio de modelo Leica DM 500. 2) Para o ensaio com o fungo *Corynespora cassiicola* foi analisado o crescimento micelial, onde os dados foram mensurados a cada dois dias, determinando-se o crescimento radial das colônias em dois eixos ortogonais, com auxílio de uma régua milimetrada, sendo posteriormente calculada uma média aritmética. 3) Para o fungo *Sclerotium rolfsii* foi analisado o número de escleródios, realizando contagem diária até o 15º dia de experimentação.

3. Resultados e discussão

3.1 Teor de proteína bruta e solúvel

Os teores de proteína bruta, nas sementes das espécies estudadas, variaram de 8,7 a 17,2%, sendo o menor valor encontrado para *S. polyphylla* e o maior para *P. pendula*, ressaltando-se que dentre as espécies estudadas, as pertencentes ao gênero *Parkia* apresentaram os maiores teores protéicos. Estudos realizados com oito leguminosas da Nigéria, demonstram maiores teores de proteínas variando de 20,6 a 25,9% (Ezeagu e Gowda 2006). Contudo, esses valores para o teor de proteínas foram obtidos utilizando a conversão dos teores de nitrogênio total x 6,25 e, considerando que este fator de conversão é utilizado para a determinação de proteínas animais, o teor de proteína bruta pode ter sido superestimado.

No que diz respeito aos teores de proteínas solúveis, as concentrações variaram de 6,2 a 14,6%. De modo geral, as espécies do gênero *Parkia* e *S. polyphylla* apresentaram maiores concentrações de proteínas solúveis. Contudo, é importante ressaltar que *S. polyphylla* apresentou menor teor de proteína bruta. Os resultados demonstraram que mesmo sendo espécies pertencentes à mesma família botânica, os teores de proteínas solúveis variaram entre as espécies e dentre as subfamílias. No entanto, são semelhantes dentre o mesmo gênero.

3.2 Inibição da tripsina e quimotripsina bovina

Os percentuais de inibição da tripsina e quimotripsina bovina, pelos inibidores presentes nos extratos das espécies estudadas, variaram de 58 a 100% e 23 a 77%, respectivamente. As espécies pertencentes ao gênero *Parkia* apresentaram altos percentuais inibitórios da tripsina. Contudo, constatou-se baixa inibição da quimotripsina, exceto para *P. discolor*. Ao passo que, *C. comosa* e *D. excelsa* exibiram altos teores de inibição tanto para tripsina quanto para quimotripsina. *S. polyphylla* foi a espécie que apresentou o menor percentual antitriptico, dentre todas as espécies estudadas, além de não ter inibido a atividade da quimotripsina.

De fato, os inibidores vegetais apresentam variação quanto a especificidade inibitória, destacando-se os inibidores tipo Kunitz, que são potentes inibidores da tripsina e poucos específicos para a quimotripsina (Macedo *et al.* 2007). Estudos realizados com algumas leguminosas pertencentes à flora Amazônica relatam essa diferença de especificidade de inibição entre tripsina e quimotripsina de inibidores presentes em extratos de sementes, onde *Cassia brasselari*, *Cassia occidentalis*, *Dialium guianense*, *Inga rubiginosa*, *Inga umbratica*, *Inga velutina* e *Mimosa guilandinae* inibiram a atividade da tripsina e quimotripsina, enquanto *Cassia grandis* e *Inga fagifolia* inibiram especificamente a tripsina (Calderon *et al.* 2001).

3.3 Eletroforese em SDS – PAGE

A análise eletroforética dos extratos protéicos das seis espécies, demonstraram padrão de distribuição de bandas concentradas na faixa de 15 a 30 kDa. Resultado que aponta para a potencial presença da classe protéica dos inibidores de proteinases.

No que diz respeito às *Parkias*, observou-se a presença de uma mesma banda protéica, com massa molecular entre 15 e 25 kDa, para todas as espécies. Contudo, no extrato protéico de *P. nitida*, a banda apresenta-se menos nítida, indicando menor concentração da mesma. Estudo realizado com várias espécies pertencentes à sub-família Mimosoideae (*P. pendula*, *P. discolor*, *P. nitida*, *P. multijuga* e *Enterolobium schomburgkii*), também demonstrou a presença de uma banda protéica principal, com massa entre 15 a 25 kDa, correspondente aos inibidores de tripsina, sugerindo-se, desta forma, ser uma característica desta subfamília, podendo estar associada à evolução dessas plantas (Chevreuil, 2009).

De maneira geral, estudos indicam que existe relação entre as famílias de inibidores proteolíticos encontradas em sementes de leguminosas e o grau de evolução destas plantas, onde em espécies tropicais, por exemplo, os inibidores tipo Kunitz são encontrados principalmente nas subfamílias primitivas, como Caesalpinioideae e Mimosoideae, enquanto os inibidores Bowman-Birk são mais freqüentes na subfamília mais evoluída, a Faboideae (Norioka *et al.* 1988; Macedo *et al.* 2000; Oliveira *et al.* 2007; Bhattacharyya e Babu 2009).

3.4 Efeito inibitório de extratos vegetais sobre fungos fitopatogênicos

Efeito dos extratos protéicos sobre a formação de colônias de Mycosphaerella fijiensis

Os extratos protéicos estudados não inibiram a formação de colônias de *M. fijiensis*, nas diferentes concentrações de proteínas investigadas (0, 50, 100, 150 e 200 µg/mL). Hanada *et al.* (2004) ao estudar esse mesmo fungo observou que o óleo essencial de pimenta longa foi capaz de inibir apenas parcialmente a germinação de conídeos de *M. fijiensis*. Sugerindo que a inibição deste fitopatógeno pode estar relacionado a outras moléculas bioativas, mais especificamente, compostos do metabolismo secundário.

Efeito dos extratos protéicos sobre o crescimento micelial de Corynespora cassiicola

A inibição do crescimento micelial variaram de 2 a 17% entre as concentrações estudadas, onde a menor inibição foi do extrato de *D. excelsa* na concentração de 50 µg/mL e a maior foi para *S. polyphylla* na concentração de 200 µg/mL, respectivamente. Esses resultados demonstram que os extratos testados não foram eficazes em inibir o crescimento de *C. cassiicola*, visto que os valores de inibição foram menores que 50%. Extratos protéicos de sementes de outras leguminosas (*Caesalpinia ferrea*, *Cedrelinga cateniformis* e *Swartzia polyphylla*) também não inibiram o crescimento do fungo *Corynespora cassiicola* acima de 50%, sob as concentrações de 10, 20, 40 e 80 µg/mL (Bariani 2008). Contudo, no mesmo estudo, a autora encontrou efeito desses extratos sobre a esporulação do fungo, obtendo resultados satisfatórios, com inibição de até 74%. Destes resultados pode-se inferir que cada

extrato possui características diferentes quanto a sua especificidade, podendo esta pertencer a cada subfamília, gênero e espécie, ou até mesmo interferir na morfologia do próprio fungo.

Efeito dos extratos protéicos sobre o número de escleródios de Sclerotium rolfsii

O efeito dos extratos protéicos sobre o número de escleródios de *S. rolfsii* variou de 44,2 e 100, onde *P. nitida* na concentração 50 µg/mL obteve o menor número, enquanto que *P. discolor*, *D. excelsa* e *S. polyphylla* obtiveram os maiores números de escleródios, nessa mesma concentração. Para concentração protéica de 150 µg/mL, apenas a espécie *P. discolor* não atingiu o número de escleródios acima de 100. Domingues *et al.* (2009) ao avaliar o efeito de extratos vegetais hexânicos e etanólicos provenientes de folhas de *Ricinus communis*, *Coffea arabica*, *Allamanda cathartica* e *Lavandula augustifolia* não observou inibição da germinação de escleródios.

Considerando que extratos não purificados são constituídos de diversas substâncias que juntas podem ser responsáveis pela ação fungitóxica ou mesmo que outros compostos podem interferir positiva ou negativamente na atividade fungicida, sugere-se que ensaios relacionados à purificação de proteínas presentes nos extratos possam produzir melhores efeitos fungicidas, confirmando ou não o potencial bioativo dos inibidores de proteinases sobre o crescimento de fungos.

4. Conclusão

No extrato protéico das sementes das seis espécies de leguminosas estudadas há inibidores de serinoproteinases, com diferente afinidade pelas enzimas tripsina e quimotripsina bovina. Contudo, nos extratos testados contra três fungos não se verificou efeitos fungicidas, havendo necessidade de purificação dos extratos protéicos e, posterior confirmação ou não de sua eficácia contra fungos fitopatogênicos.

5. Referências

- Abder-kader, M.S.; Bahler, B.D.; Malone, S.; Wekhoven, M.C.M.; Wisse, J.H.; Neddermann, K.M.; Bursuker, I.; Kingston, D.G.I. 2000. Bioactive saponins from *Swartzia schomburgkii* from the Suriname rainforest. *Journal of Natural Products*, 63(11): 1461-1464.
- Bariani, A. 2008. *Propriedade bioquímicas e biológicas de proteínas de sementes de leguminosas arbóreas da Amazônia*. Dissertação de Mestrado. Instituto nacional de Pesquisas da Amazônia/ Fundação Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 122pp.
- Bhattacharyya, A.; Babu, C.R. 2009. Purification and biochemical characterization of a serine proteinase inhibitor from *Derris trifoliata* Lour. Seeds: Insight into structural and antimalarial features. *Phytochemistry*, 70(6): 703-712.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein - dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Calderon, L.A.; Teles, R.C.L.; Leite, J.R.S.A.; Block, C. Jr.; Astolfi-Filho, S.; Freitas, S.M. 2001. Serine protease inhibitors from Amazon Leguminosae seeds: purification and preliminary characterization of two chymotrypsin inhibitors from *Inga umbratica*. *Protein and Peptide Letters*, 8(6): 485-493.
- Chevreuil, L. R. 2009. *Extração e purificação de inibidores proteolíticos em sementes de leguminosas arbóreas da Amazônia*. Dissertação de Mestrado. Instituto nacional de Pesquisas da Amazônia. 76pp.
- Chrispeels, M.J.; Raikhel, N.V. 1991. Lectins, lectins genes, and their role in plant defense. *The Plant Cell*, 3: 1-9.
- Domingues, R.J; Souza, J.D.F; Tófoli, J.G; Matheus, D.R. 2009. Ação "in vitro" de extratos vegetais sobre *colletotrichum Acutatum*, *alternaria solani* e *sclerotium rolfsii*. *Arq. Inst. Biol.* 76 (4):.643-649.

- Ezeagu, I.E.; Gowda, L.R. 2006. Protein extractability, fractionation and amino acid composition of some leguminous seeds found in Nigeria. *Journal of Food Biochemistry*, 30: 1-11.
- Ezeagu, I.E.; Petzke, J.K.; Metges, C.C.; Akinsoyinu, A.O.; Ologhobo, A.D. 2002. Seed protein contents and nitrogen-to-protein conversion factors for some uncultivated tropical plant seeds. *Food Chemistry*, 78: 105-109.
- Hanada, R.E.; Gasparotto, L.; Pereira, J.C.R. 2004. Eficiência de desinfestantes na erradicação de conídios de *Mycosphaerella fijiensis* aderidos à superfície de bananas. *Fitopatologia Brasileira*, 29 (1).
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685.
- Lewis, G.; Schrire, B.; Mackinder, B.; Lock, M. (Eds.) Legumes of the World. Royal Botanic Gardens, Kew, 2005, 577 p.
- 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.
- Macedo, M.L.R.; Garcia, V.A.; Freire, M.G.M.; Richarson, M. 2007. Characterization of a Kunitz trypsin inhibitor with a single disulfite bridge from seeds of *Inga laurina* (SW.) Willd. *Phytochemistry*, 68: 1104 - 1111.
- Norioka, N.; Hara, S.; Ikenaka, T.; Abe, J. 1988. Distribution of the Kunitz and the Bowman-Birk family proteinase inhibitors in leguminous seeds. *Agric. Biol. Chem.*, 52(5): 1245-1252;
- Oliveira, A.S.; Migliolo, L.; Aquino, R.O.; Ribeiro, J.K.C.; Macedo, L.L.P.; Andrade, L.B.S.; Bemquerer, M.P.; Santos, E.A.; Kiyota, S.; Sales, M.P. 2007. 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*, 45: 858-865.
- Selitrennikoff, C.P. 2001. Antifungal proteins. *Applied and environmental microbiology*. 67(7)2883-2894.