



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
NÚCLEO DE PESQUISAS DE PLANTAS MEDICINAIS – NPPM
“Professor Paulo Humberto Moreira Nunes”
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA
MESTRADO EM FARMACOLOGIA DE PRODUTOS NATURAIS

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA, ANTIVIRAL E
CITOTÓXICA DO EXTRATO PROTÉICO DE SEMENTES DE**
***Vigna unguiculata (L.) Walp* (FEIJÃO CAUPI).**

EVALDO VERÇOSA DE MACÊDO

TERESINA
2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
NÚCLEO DE PESQUISAS DE PLANTAS MEDICINAIS – NPPM
“Professor Paulo Humberto Moreira Nunes”
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA
MESTRADO EM FARMACOLOGIA DE PRODUTOS NATURAIS

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA, ANTIVIRAL E
CITOTÓXICA DO EXTRATO PROTÉICO DE SEMENTES DE**
Vigna unguiculata (L.) Walp (FEIJÃO CAUPI).

EVALDO VERÇOSA DE MACÊDO

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, do Núcleo de Pesquisa de Plantas Mediciniais, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Piauí, visando a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho

Co-Orientadora: Profa. Dra. Maria José dos Santos Soares

TERESINA
2009

Dados internacionais de catalogação na publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UFPI

Macêdo, Evaldo Verçosa de

M141e

Estudo da atividade antibacteriana, antiviral e citotóxica do extrato protéico
de sementes de *Vigna unguiculata* (L.)(Walp) (feijão caupi)

Teresina: 2009. 58 fls.

Dissertação (Mestrado em Farmacologia) UFPI.

1. *Vigna unguiculata* 2. Feijão Caupi, 3 Atividade antimicrobiana. I – Título
C.DD - 635.6592

IVALDO VERÇOSA DE MACÊDO

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO PROTÉICO DE
SEMENTES DE FEIJÃO CAUPI (*Vigna unguiculata* (L.) Walp)**

Dissertação aprovada em 09 de julho de 2009.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Maria José dos Santos Soares
(Co-Orientadora)

Universidade Federal do Piauí
(Presidente)

Prof^a. Pós Dr^a. Francisca Lúcia de Lima

Universidade Estadual do Piauí
(Membro)

Prof^a. Dr^a. Rita de Cássia Meneses de Oliveira

Universidade Federal do Piauí
(Membro)

AGRADECIMENTOS

- Em primeiro lugar a Deus, que em sua infinita bondade, proporcionou-me uma família que sempre me apoiou e me orientou nas decisões que tenho que tomar.
- Aos meus pais pelo amor que sempre me proporcionaram, e por me incentivarem nos momentos mais difíceis.
- Ao meu orientador Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho, por ter acreditado em meu esforço e pela paciência, dedicação e sabedoria com que me conduziu.
- A minha co-orientadora Dra. Maria José dos Santos Soares, por ter permitido a utilização do Laboratório de Pesquisa do Departamento de Parasitologia e Microbiologia da UFPI, pela preciosa orientação e por ter se mostrando atenciosa e solícita, sempre com excelentes contribuições e sugestões, para a finalização deste trabalho.
- Aos alunos do curso de graduação em Biologia, colegas do Laboratório de Pesquisa em Microbiologia pelas excelentes contribuições e sugestões, para a finalização deste estudo.
- A professora Silvana por ter permitido a utilização do Laboratório de Patologia do Centro de Ciências Agrárias - UFPI.
- Aos professores e alunos deste curso de Pós-Graduação, que de uma forma ou de outra contribuíram para concretização desta etapa.

Resumo

Diversas plantas da família *Leguminosae* são reconhecidas pelo seu valor econômico caracterizado pela produção de diversos alimentos mundialmente conhecidos e consumidos como a soja, o feijão, a ervilha, o grão de bico entre outros, muitas das proteínas presentes nas diversas espécies dessa família têm recebido atenção pelo seu papel no controle e combate de vários microrganismos, que infectam tanto plantas, como também agentes envolvidos em doenças humanas e animais. Este trabalho teve como objetivo avaliar a ação antibacteriana, antiviral e citotóxica do extrato protéico obtido a partir das sementes de *Vigna unguiculata L. Walp* (Feijão Caupi), cultivar BR17-Gurgéia.

O extrato protéico das sementes *Vigna unguiculata* (EPSV) foi produzido após a germinação e trituração sendo em seguida dosado pelo método de Bradford e submetido a uma eletroforese em gel de Poliacrilamida a 12% (SDS-PAGE) para caracterizar o perfil eletroforético das proteínas obtidas.

O EPSV foi avaliado quanto a sua atividade antibacteriana empregando as técnicas de difusão a partir de orifício e diluição em microplaca frente a importantes bactérias Gram positivas e Gram negativas de interesse médico. A análise da atividade citotóxica foi observada sobre célula C6/36 oriundas das larvas de *Aedes albopictus* e a antiviral foi avaliada sobre a replicação do vírus Dengue - 3.

No EPSV foi observada uma prevalência de proteínas com alto peso molecular que variaram entre 60-80 kilodaltons (kDa).

Não foi detectada nenhuma atividade antibacteriana sobre as espécies testadas. Entretanto foi observado que as bactérias Gram positivas avaliadas, quando cultivadas na presença do extrato, produzem uma substância polimérica extracelular (EPS).

Os testes de atividade citotóxica e antiviral mostraram ausência de efeito citotóxico e inibição do efeito citopático do DENV-3 (100% de inibição) quando as células C6/36 foram tratadas com 100, 10 ou 1 µg/ml do EPSV

Estudos futuros serão realizados de forma a caracterizar a composição dos EPS produzidos a partir do cultivo de bactérias Gram positivas na presença do extrato como também para isolar e caracterizar a proteína responsável pela atividade antiviral deste extrato sobre a replicação de DENV-3.

Abstract

Diverse plants of the Leguminosae family are recognized for its economic value characterized by the food production diverse world-wide known and consumed as the soy, the beans, the pea, the chickpea among others. Many of proteins gifts in the diverse species of this family have received attention for its paper in the control and combat from some microorganisms, as much the ones that can infect the plant, as well as involved agents in illnesses human beings and animals.

This work had as objective to evaluate the antibacterial, antiviral and cytotoxic action of the proteinic extract gotten from the seeds of *Vigna unguiculata* L. Walp (Caupi Beans), to cultivate BR17-Gurgéia.

The proteinic extract of the *Vigna unguiculata* seeds (EPSV) was after produced the germination and trituration being after that dosed by the method of Bradford and submitted to one eletroforese in gel of Poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) to characterize the eletroforetic profile of gotten proteins.

The EPSV was evaluated how much its antibacterial activity using the techniques of diffusion from orifice and dilution in microplate front the important Gram negative and Gram positive bacteria of medical interest. The analysis of the cytotoxic activity was observed on C6/36 cell deriving of the larvae of *Aedes albopictus* and the antiviral was evaluated on the response of the DENV - 3.

In the EPSV a prevalence of proteins with high molecular weight was observed that had varied between 60-80 kilodaltons (kDa).

No antibacterial activity on the tested species was not detected. However it was observed that the Gram positive bacteria, when cultivated in the presence of the extract, they produce extracellular polimeric substance (EPS).

The tests of cytotoxic and antiviral activity had shown absence of cytotoxic effect and inhibition of the citopátic effect of the DENV-3 (100% of inhibition) when the C6/36 cells had been dealt with 100, 10 or 1 µg/ml of the EPSV

Future studies will be carried through of form to characterize the composition of the EPS produced from the culture of Gram positive bacteria in the presence of the extract as well as to isolate and to characterize the responsible protein for the antiviral activity of this extract on the DENV-3 response.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01** Aspectos morfológicos de *Vigna unguiculata* L. Walp (Feijão Caupi): (A) vagem, (B) folhas, (C) caule e (D) sementes. 14
- Figura 02** Perfil Eletroforético de proteínas do EPSV em gel de poliacrilamida a 12% (SDS-PAGE). 27
- Figura 03** Análise da atividade antibacteriana do EPSV sobre *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 pelo método de difusão em Agar. 29
- Figura 04** Análise da atividade antibacteriana do EPSV pelo método de microdiluição. 30
- Figura 05** Perfil macroscópico das culturas bacterianas na presença e na ausência do EPSV. 32
- Figura 06** Aspecto microscópico do caldo MH e de bactérias Gram Positivas cultivadas na ausência (-) e na presença (+) do EPSV. 33
- Figura 07** Aspecto microscópico do caldo MH e de bactérias Gram negativas cultivadas na ausência (-) e na presença (+) do EPSV. 34
- Figura 08** – Análise microscópica da Inibição do ECP na presença do EPSV em monocamadas de células C6/36 infectadas com DENV-3. 36

LISTA DE TABELAS

- Tabela 01** – Obtenção do EPSV a partir de sementes de *Vigna unguiculata* L. Walp (Feijão Caupi) e quantificação pelo método de Bradford 26
- Tabela 02** – Atividade antibacteriana do ESPV sobre bactérias Gram Positivas e Gram Negativas pelo método de difusão em ágar, realizado em triplicata. 28
- Tabela 03** – Determinação da CIM do ESPV sobre bactérias Gram Positivas e Gram Negativas 29
- Tabela 04** – Análise da Citotoxicidade e da Inibição do ECP na presença do EPSV em monocamadas de células C6/36 infectadas com DENV-3 35

LISTA DE SIGLAS

- AIDS** - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
- ATCC** - American Type Culture Collection
- BHI** - Brain Heart Infusion (Infusão de Cérebro e Coração)
- BOD** - Estufa tipo Biologic Oxygen Demand
- CABMV** - *Cowpea Aphid Borne Mosaic Virus*
- CCPs** - Cys cluster proteins (Proteínas Contendo Resíduos de Cisteína)
- CGMV** - *Cowpea Golden Mosaic Virus*
- CMNT** - Concentração Máxima Não Tóxica
- CMV** - *Cucumber Mosaic Virus*
- CSMV** - Cowpea Severe Mosaic Virus
- DENV** - Dengue Vírus
- DENV-1** - Dengue vírus sorotipo 1
- DENV-2** - Dengue vírus sorotipo 2
- DENV-3** - Dengue vírus sorotipo 3
- DENV-4** - Dengue vírus sorotipo 4
- ECP** - Efeito Citopático
- EPIs** - Inibidores da bomba do efluxo
- EPS** - Substância Polimérica Extracelulares
- EPSV** - Extrato Protéico de Sementes de *Vigna unguiculata*
- HIV-1** - Vírus da Imunodeficiência do Tipo 1
- LTPs** - Proteínas de Transferência de Lipídeos
- MARSA** - *Staphylococcus aureus resistente a metilina e aminoglicosídeos*
- CIM** - Concentração Inibitória Mínima
- OMS** – Organização Mundial da Saúde
- PBS** – Solução Fosfato Tamponada
- SFB** - Soro Fetal Bovino
- UFC** – Unidade Formadora de Colônia

LISTA DE SÍMBOLOS

°C – Grau Celsius
cm – Centímetro
g – Grama
kg – Quilograma
L – Litro
μ – Microlitro
mg – Miligrama
min – Minuto
mL – Mililitro
mm – Milímetro
N° – Número
pH – Potencial de hidrogênio
V – Volume

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.	VIII
LISTA DE TABELAS	IX
LISTA DE SIGLAS	X
LISTA DE SÍMBOLOS	XI
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Plantas Medicinais e o desenvolvimento de novos fármacos.	1
1.2 As doenças infecciosas e os desafios da terapêutica	.3
1.3 O vírus da dengue (DENV)	5
1.3.1 Morfologia, ciclo de replicação e estrutura do DENV	5
1.3.2 Patogenia da infecção pelo DENV	7
1.3.3 Aspectos epidemiológicos do DENV	7
1.3.4 Medidas preventivas e tratamento da Dengue	8
1.3.5 Estudos de plantas medicinais com ação anti-infecciosa	9
1.4 Família <i>Leguminosae</i> - Características, Sistemática e Ação Antimicrobiana.	10
1.5 <i>Vigna unguiculata (L.) Walp</i> (Feijão Caupi)	13
2 OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL	17
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	17
3 MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 Preparação do EPSV.	18
3.2 Determinação da concentração protéica do EPSV	18
3.3 Estudo da atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> do EPSV	19
3.3.1 Atividade Anti-Bacteriana	19
3.3.1.1 Cepas bacterianas	19
3.3.1.2 Técnica de difusão do EPSV..em meio sólido a partir de orifício	20
3.3.1.3 Determinação da Concentração inibitória mínima do EPSV	21
3.3.1.4 Cultivo em caldo na presença do EPSV.	22
3.3.2 Avaliação da Atividade Citotóxica do EPSV sobre células C6/36	23
3.3.2.1 Cultivo de células C6/36	23

3.3.2.2 Identificação do efeito citotóxico do EPSV sobre células C6/36	23
3.3.4 Avaliação da Atividade Antiviral do EPSV	23
3.3.4.1 Produção e Titulação do Dengue vírus 3	23
3.3.4.2 Análise in vitro do efeito antiviral do EPSV	25
4 RESULTADOS	26
4.1 Obtenção e caracterização do EPSV	26
4.2 Avaliação da Atividade antibacteriana do EPSV	27
4.3 Avaliação da Atividade citotóxica e antiviral do EPSV	35
5 DISCUSSÃO	37
6 CONCLUSÕES	43
7 REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

1.1 Plantas Medicinais e o desenvolvimento de novos fármacos

As plantas medicinais além de seu uso na medicina popular têm contribuído consideravelmente para a obtenção de vários fármacos, amplamente utilizados na clínica. Não é de hoje que os produtos naturais obtidos a partir de plantas servem como moldes para a produção de substâncias antimicrobianas (GIBBONS, 2008). Em meados da década de 1980, a pesquisa de fármacos derivados de produtos naturais foi inibida, principalmente a partir dos avanços da Genética e da Biologia Molecular somados aos avanços da Química e das Ciências da Computação. Estes avanços têm como objetivo a modificação de substâncias em laboratório, transformando-as em drogas com atividade terapêutica mais eficaz. Porém, com a necessidade de investimentos cada vez mais altos, os produtos obtidos a base de materiais modificados quimicamente têm se tornados economicamente inviáveis. Esta característica desencadeou, portanto, a busca de novos materiais de origem natural, principalmente a partir das plantas, sem a necessidade de vultosos investimentos em pesquisa (TEMPESTH; STEVEN, 1994).

Em praticamente todos os países existe um paralelo entre a medicina convencional e a medicina popular ou tradicional, assim denominada pela própria Organização Mundial de Saúde OMS (1991), Essa medicina surgiu a partir das tradições, muitas das vezes fundadas no conhecimento ou experiência popular, nas superstições ou mesmo a partir de crenças religiosas, que terminaram por ser comprovadas através da verificação e comprovação pela comunidade científica (UNANDER et al., 1995). A OMS, afirma que a prática da medicina popular e o conhecimento empírico dos povos devem ser respeitados, mas ao mesmo tempo testados, tendo como finalidade a validação, para que possa haver maior segurança e eficácia na sua utilização. Quando se está buscando substâncias ativas a partir de plantas, as informações obtidas da medicina popular se mostram mais eficazes em direcionar a pesquisa de componentes com atividades biológicas do que quando se tenta escolher plantas ao acaso (UNANDER et al., 1995). Desta forma é aconselhável que os estudos se iniciem com a parte da planta que é empregada na

medicina popular e posteriormente com as outras partes. Partes diferentes (raiz, caule, casca, flores, frutos e folhas) podem conter os mesmos princípios ativos, porém na maioria dos casos a constituição química da planta muda nas suas diferentes partes (TORTORIELLO et al., 1995).

A ação medicamentosa de uma planta é composta dos produtos de seu metabolismo, que são denominados de metabólitos especiais. Uma planta pode conter centenas de metabólitos secundários, os quais podem estar presentes em grande concentração (HORWITZ, 1994). No entanto, os compostos presentes em menor proporção na planta podem apresentar os melhores efeitos biológicos. Assim, toda substância, independente de sua proporção na planta, pode ser um princípio ativo, sendo de grande importância a análise das frações e das substâncias puras. Desta forma pode-se conhecer o principal componente químico responsável pela atividade farmacológica do extrato obtido da planta estudada. Para se obter substâncias puras com determinados efeitos biológicos, são necessárias dedicação e determinação por parte dos pesquisadores, assim como colaboração interdisciplinar (HAMBURGER; HOSTETTMANN, 1991).

A OMS (1991) definiu que planta medicinal é toda e qualquer planta de uso popular, que tem como fim amenizar ou curar uma doença ou um processo patológico, podendo servir ainda como medicamento ou matéria prima para o desenvolvimento de novos fármacos. Essa prática, que se caracteriza pela utilização dos recursos naturais como forma de tratamento e cura de doenças, é tão antiga quanto à espécie humana (REIS, 1996). Os estudos químicos de plantas medicinais que visam obter novos compostos com propriedades farmacológicas tem sido o foco da grande maioria dos trabalhos publicados em congressos e revistas internacionais. Estudos interdisciplinares têm conseguido elucidar rapidamente estruturas moleculares de muitos constituintes naturais, graças ao desenvolvimento de novas técnicas físico-químicas de espectroscopia, o que favorece os estudos farmacológicos posteriores (CORDELL, 1995). Os estudos de plantas medicinais devem se iniciar com a obtenção de extratos brutos utilizando-se modelos experimentais simples (COWAN, 1999). Após a confirmação da atividade biológica e/ou elucidação dos componentes químicos neste extrato, o mesmo deve ser submetido a ensaios mais específicos, como a cromatografia em coluna, visando à obtenção de substâncias puras com potencial ação biológica (CIRILO, 1993).

No mundo, 25 % dos medicamentos prescritos são de origem vegetal, onde

dos 252 medicamentos básicos e essenciais considerados pela OMS, 11 % são exclusivamente de origem vegetal (TOLEDO et al., 2003). O uso de plantas medicinais é um dos poucos recursos terapêuticos que as comunidades menos assistidas, de países da África e da América do Sul, disponibilizam como forma de tratamento e cura de muitas enfermidades (DIAS; SHARAPIN, 1996). Assim, os medicamentos obtidos de extratos vegetais devem ser utilizados em benefício da população e incorporados, sempre que possível, a programas de promoção, prevenção e assistência primária à saúde (BUFFON, 2002). Nos últimos anos têm ocorrido grandes avanços nos estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais, visando obter novos compostos com propriedades terapêuticas, que estejam ao alcance de comunidades menos favorecidas (FILHO; YUNES, 1998).

Várias linhas de pesquisas estão sendo desenvolvidas no sentido de se isolar substâncias a partir de plantas medicinais que têm sido usadas empiricamente há milhares de anos no tratamento de doenças infecciosas (CALIXTO, 2000), muitas dessas substâncias possuem ação bacteriostática, ou seja, não chegam a destruir as bactérias, mas inibem o crescimento bacteriano, diminuindo assim a ocorrência de mutações (BROEKAERT et al., 1997).

1.2 As doenças infecciosas e os desafios da terapêutica

Hoje em dia a resistência bacteriana tem sido a causa de muitos problemas terapêuticos, sendo, portanto um problema de saúde pública (HAMBURGER; HOSTETTMANN, 1991). Isso se deve em parte ao uso indiscriminado dos antibióticos. Assim, a procura por novas substâncias que tenham atividade antimicrobiana que não induza o aparecimento de resistência, com poucos efeitos colaterais e com baixos custos, tem suscitado interesse crescente nos estudos envolvendo produtos naturais, principalmente os de origem vegetal (SARTORI et al., 2003). Mas, os desafios são muitos, pois são necessários muitos investimentos até se descobrir produtos naturais com os efeitos desejados e com mínimos efeitos colaterais (GIBBONS, 2008).

A resistência aos antimicrobianos é um fenômeno natural nos microrganismos em que ocorre a substituição de patógenos suscetíveis por outros mais resistentes (FRENCH, 2005). O conhecimento do fenômeno da resistência a agentes físicos e

químicos entre os microrganismos data do início da era microbiana. O advento do uso clínico de sulfonamidas, em 1933, e, em seguida, da penicilina, em 1941, levou à constatação de que a resistência bacteriana aos agentes antimicrobianos podia ser uma característica natural das espécies de bactérias ou ser adquirida por cepas individuais dentro de uma população sensível (MOREIRA, 2004).

As doenças infecciosas estão entre as principais causas de morte da população humana (LOHNER; STAUDEGGER, 2001). Nos países em desenvolvimento, as doenças infecciosas como malária, tuberculose e AIDS são as enfermidades que mais afetam as populações menos favorecidas. Além de serem as populações mais acometidas por essas doenças, são justamente as que menos têm acesso ao tratamento apropriado (BATES et al., 2004). A capacidade que os microrganismos têm de desenvolver resistência aos antibióticos tem surpreendido os microbiologistas, o que tem exigido dos pesquisadores a necessidade de estarem em constante vigilância no que diz respeito ao aparecimento de novos mecanismos de resistência, principalmente por parte das bactérias patogênicas, tanto a nível ambulatorial como no ambiente hospitalar (HARDY et al., 2004).

Até bem pouco tempo as infecções bacterianas podiam ser tratadas com drogas de baixo custo, mas com o advento de microrganismos multi-drogas resistentes, que se apresentam resistentes à maioria dos antibióticos em uso, o tratamento dessas enfermidades vem se tornando um desafio devido ao encarecimento dos medicamentos em uso. Além de tentarem evitar o aparecimento de resistência aos antibióticos atualmente usados, é essencial o estudo de novas substâncias com atividades antimicrobianas (MARTÍNEZ et al., 2007).

1.3 O vírus da dengue (DENV)

1.3.1 Morfologia, ciclo de replicação e estrutura do DENV

A dengue é uma doença de distribuição global, causada por um arbovírus pertencente à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, sendo classificado em quatro sorotipos antigênicos distintos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) (ROTHMAN, 2004). A partícula viral é composta por um capsídeo icosaédrico, recoberto por um envelope lipídico contendo as proteínas do envelope e da membrana, medindo

aproximadamente 50 nanômetros (CLERQ, 2004). O genoma do DENV é, na verdade, uma fita simples de RNA de polaridade positiva, com cerca de 10,2 kilobases (kb) e que codifica uma poliproteína, que após processamento origina as três proteínas estruturais (capsídeo, membrana e envelope) e sete proteínas não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (ROTHMAN, 2004).

Como todos os vírus o DENV multiplicam-se apenas em células vivas. A célula hospedeira deve fornecer a energia e o mecanismo de síntese, bem como os precursores de baixo peso molecular para a síntese de proteínas e do material genômico do vírus. O genoma viral transporta a especificidade genética para codificar todas as macromoléculas específicas do vírus de uma forma altamente organizada. A replicação do DENV começa com a interação e adsorção com a célula hospedeira através da ligação com um receptor existente na membrana celular. Logo após ocorre a posterior penetração do vírion infectante por endocitose, com a captação das partículas virais no interior de endossomas. Este processo culmina com o desnudamento e liberação do RNA viral no citoplasma da célula infectada. Nesta etapa ocorre a perda da infectividade do vírus paterno (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006).

A fase de síntese do ciclo de replicação viral ocorre após o desnudamento do genoma viral. Onde serão transcritos os mRNA a partir do RNA viral, uma vez concluída esta etapa, o DENV utiliza os componentes celulares para a tradução do mRNA. Após a replicação do genoma viral ocorre a montagem das partículas virais no retículo endoplasmático, as quais serão transportadas pelo complexo de golgi, onde sofrerão o devido amadurecimento. Sendo a partícula viral, por fim, liberada por exocitose (BARTENSCLAGER; MILLER, 2008).

A proteína C (proteína do capsídeo) tem um peso molecular em torno de 13,5 kDa e é o primeiro polipeptídeo sintetizado durante a tradução (CLERQ, 2004). Existem duas formas de proteínas M: prM (pré-membrana) contida em vírions intracelulares imaturos e a proteína M (membrana) contida em vírions maduros extracelulares. A clivagem específica de prM (22 kDa) durante a maturação viral resulta na formação da proteína M (8 kDa) (YU et al., 2008). Essa clivagem é uma etapa importante, pois precede a liberação do vírus da célula, resultando na reorganização do vírus e conseqüente aumento da infectividade viral (HENCHAL; PUTNAK, 1990). A glicoproteína do envelope (E) é a maior proteína do envelope do vírus (51-60 kDa), essa proteína tem um importante papel na ligação ao receptor na

célula hospedeira, indução de resposta imune protetora, fusão específica de membrana e montagem da partícula viral (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006).

A glicoproteína NS1 (46 kDa) é a segunda proteína mais imunogênica do DENV e atua na fase precoce da infecção viral (CLERQ, 2004) e é expressa em três formas: uma forma residente no retículo endoplasmático (RE), uma forma ancorada na membrana e uma forma secretada (sNS1) (HENCHAL; PUTNAK, 1990). A proteína NS2A (22 kDa) é importante para o processamento proteolítico de NS1. A proteína NS2B (14,5 kDa) está envolvida na função protease do complexo NS2B-NS3 (DE PAULA; FONSECA, 2004). A proteína NS3 (70 kDa) é importante na interação com a proteína que modula o transporte intracelular do retículo endoplasmático para o complexo de Golgi nas células humanas, sendo assim considerada essencial na replicação viral (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006). NS4 além de atuar no processo de replicação, age também como potente inibidor do interferon β (IFN- β) e interferon γ (IFN- γ), importantes no processo de sinalização da resposta imune celular (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006). A proteína NS5 (105 kDa) é a maior dentre as proteínas não estruturais e serve como RNA polimerase viral RNA-dependente. NS5 também pode induzir a transcrição e tradução de interleucina-8 (IL-8) (DE PAULA; FONSECA, 2004).

1.3.2 Patogenia da infecção pelo DENV

A Organização Mundial da Saúde define as formas clínicas da dengue em: Dengue Clássica (CD) e Febre Hemorrágica da Dengue (FHD) (OMS, 1987).

A Dengue Clássica (CD) se caracteriza pelo desenvolvimento de um estado febril seguido dos seguintes sintomas: dor de cabeça, dor retro-orbital, mialgia, erupções na pele e leucopenia (OMS, 1987).

A Febre Hemorrágica da Dengue (FHD) se evidencia pelo desenvolvimento de hemorragia, sendo caracterizada pelas seguintes manifestações: aparecimento de petéquias, equimose ou púrpura, sangramento de mucosa (sangramento de gengivas), hematêmese ou melena, trombocitopenia (contagem de plaquetas abaixo de $100.000/\text{mm}^3$) e evidência de extravasamento do líquido plasmático, que corresponde a um aumento relativo do hematócrito maior ou igual a 20% (OMS, 1987).

O extravasamento do líquido plasmático é conseqüência do aumento da permeabilidade vascular e tem como agravante a hemoconcentração e o derrame pleural ou peritoneal, resultando em hipotensão e choque, algumas vezes acompanhados de coagulação intravascular disseminada e hemorragia, sangramentos ocorrem devido à fragilidade capilar e acentuada trombocitopenia (ROTHMAN; ENNIS, 1999). A trombocitopenia ocorre devido a supressão da medula óssea, destruição periférica, mediada pelo sistema imunológico e demanda aumentada das plaquetas (HALSTEAD, 2007). Portanto quanto mais rápido o diagnóstico, mais eficaz será a realização do pronto atendimento, conseqüentemente maior será a redução do índice de mortalidade pela dengue hemorrágica (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006).

1.3.3 Aspectos epidemiológicos do DENV

O DENV é transmitido ao homem através da picada de mosquitos do gênero *Aedes*, sendo o *Aedes aegypti* considerado seu principal vetor (DE PAULA; FONSECA, 2004). As infecções pelo DENV, como a febre hemorrágica do dengue, constituem um problema de saúde pública em mais de 100 países e acometendo cerca de 2,5 bilhões de pessoas. Apesar de ser de distribuição global a epidemia de febre hemorrágica do dengue manteve-se localizada no Sudeste da Ásia, devido principalmente aos programas de erradicação do *Aedes aegypti* nas Américas, para controle da febre amarela urbana, nas décadas de 50 e 70 (GUBLER, 2002). No entanto ao final da década de 70 o *Aedes aegypti* re-infestou a maioria dos países americanos (GUBLER, 2002).

O número de países com epidemia de dengue aumentou significativamente nos anos 80 e 90, à medida que novos sorotipos e diferentes genótipos do vírus foram introduzidos (RIGAU-PÉREZ et al., 1998). Estima-se que ocorram anualmente cerca de 50 a 100 milhões de casos de dengue clássica e centenas de milhares de casos de febre hemorrágica da dengue pelo mundo (OMS, 2002). O Brasil permaneceu livre do mosquito *Aedes aegypti* até 1976. Com o ressurgimento de uma onda de epidemias começando em 1981, em Roraima, resultando na circulação endêmica e epidêmica do vírus por todo o país. Atualmente, os sorotipos 1, 2, 3 e 4 do vírus dengue circulam simultaneamente em todos os estados do Brasil (DE PAULA; FONSECA, 2004). A incidência da dengue varia com o período chuvoso e

aumento de temperatura. Os casos de dengue têm sido registrados, predominantemente onde há uma alta densidade demográfica, que favorece a transmissão viral (HALSTEAD, 2007). O *Aedes aegypti* está ligado ao habitat humano. Sendo as larvas encontradas em locais contendo água estagnada, tais como: recipientes plásticos, pneus velhos, vasos de plantas, latas, cisternas, buracos em árvores, troncos de palmeiras (GUBLER, 2002).

1.3.4 Medidas preventivas e tratamento da Dengue

O governo brasileiro, através dos órgãos competentes, tem usado de vários recursos com o objetivo de diminuir o aumento dos casos de dengue, bem como evitar o surgimento de epidemias. Os materiais informativos produzidos e divulgados nas campanhas de saúde pública têm sido de grande relevância no esclarecimento da população sobre a forma de transmissão da doença e sua prevenção, orientando sobre sintomas relativos à Dengue Clássica (DC) e a Febre Hemorrágica do Dengue, além dos cuidados a serem tomados quanto à eliminação de focos domésticos, através da divulgação de informações científicas em linguagem popular, possibilitando a compreensão da etiologia, sintomatologia e medidas de controle (CORDEIRO, 2008).

Apesar dos bons resultados obtidos com as campanhas de conscientização ainda há muito a se fazer, não só quanto à prevenção, como também no que diz respeito ao tratamento dessa doença. Não existe nenhum tratamento específico para a DC. É recomendável repouso e ingestão abundante de líquido. O tratamento disponível é referente aos sintomas. Fazendo-se uso de analgésicos, antitérmicos e antieméticos, um dos medicamentos mais difundidos é o paracetamol, outra medida importante é evitar a ingestão de medicamentos à base de ácido acetil salicílico (AAS), que têm ação anticoagulante, podendo assim exacerbar o quadro clínico da FHD (BRASIL, 2002).

Quanto ao desenvolvimento de uma vacina ainda não existe um modelo animal que possa simular os sintomas da dengue em humanos, demandando vários anos de pesquisa, inclusive para a realização dos testes em seres humanos (CORDEIRO, 2008; GIBBONS; VAUGHN, 2002). Enquanto não houver uma vacina efetiva disponível, assim como o controle efetivo do mosquito é essencial a pesquisa de novas drogas com ação antiviral (DE SIMONE et al., 2004).

1.3.5 Estudos de plantas medicinais com ação anti-infecciosa

Com o desenvolvimento de novas técnicas de estudos fitoquímicos, os químicos orgânicos têm conseguido elucidar rapidamente estruturas moleculares complexas de uma infinidade de constituintes obtidos a partir de produtos naturais, que até bem pouco tempo eram difíceis de serem identificados (TOLEDO et al., 2003). Cada vez mais rápido são encontradas na literatura relatos do descobrimento de novas moléculas, algumas de relevante ação antimicrobiana como a azadiractina, os polissacarídeos e os peptídeos antimicrobianos (TEMPESTH; STEVEN, 1994).

No Brasil, devido à grande riqueza da flora nativa, principalmente do Serrado e da Amazônia, é que têm surgido muitos estudos envolvendo as plantas usadas como fitoterápicos. Poderíamos citar como exemplo o *Croton cajucara*, conhecido na medicina popular por sacaca (MACIEL, 2002). Esta planta vem sendo utilizada no combate a malária, febre, intoxicações hepáticas e na insuficiência renal (VIEGAS, 2003; GOTTLIEB; BORIN, 1997). A *Tabebuia avellanae* (ipê roxo) vem sendo muito usado no tratamento da doença de chagas, da leishmaniose e no tratamento do câncer (ELISABETSKY; COSTA CAMPO, 1996). Substâncias presentes em *Artemisia annua*, a popular Artemísia, exercem potente atividade antimalárica (GOTTLIEB; BORIN, 1997).

Neste contexto é importante mencionar que as plantas, além de seu uso na medicina popular com finalidades terapêuticas, têm contribuído, ao longo dos anos para a obtenção de vários fármacos, até hoje amplamente utilizados na clínica, dentre as espécies que vêm ganhando destaque encontram-se muitas plantas pertencentes à família *Leguminoae* (LORENZI, 1982; MARK, 1999).

1.4 Família *Leguminosae* – Características, Sistemática e Ação antimicrobiana

As leguminosas são todos os grãos produzidos em vagens e incluem o feijão, a soja, a ervilha, a lentilha, o amendoim, o grão-de-bico, entre outros usados na alimentação em muitas regiões ao redor do mundo (MARK, 1999). A família *Leguminosae* compreende mais de 600 gêneros subdivididos em, aproximadamente 13.000 espécies espalhadas por todo o globo terrestre, de um pólo a outro, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais, onde são responsáveis pela grande diversidade de plantas encontradas nessas regiões. A família *Leguminosae*

compreende três subfamílias importantes: *Mimosoideae*, *Caesepinoideae*, *Papilionoideae* (HEYWOOD, 1978). Sendo que, a subfamília *Papilionoideae* é a maior dessas subfamílias e compreende cerca de 400 gêneros (CRUZ, 1982). Esta família compreende plantas de porte variável, que vão desde ervas e arbustos e de árvores a escandentes (JOLY 1966; WILLIS 1973).

As leguminosas desempenham um importante papel nutricional na dieta de várias populações, principalmente nas populações da Ásia, Índia, Américas Central, América do Sul e Oriente Médio. As leguminosas têm duas habilidades importantes para sua sobrevivência: a formação dos rizóbios e a habilidade de fixar Nitrogênio (N_2) da atmosfera e transformá-lo em compostos a base de amônia. Essas propriedades são responsáveis pela grande concentração de proteínas encontradas nas sementes dessas plantas (GRAHAM et al., 2006; EAMES, 1961).

As proteínas extraídas de Leguminosas têm chamado a atenção de um grande número de pesquisadores por desempenharem um papel fundamental na defesa contra predadores, tais como: insetos, fungos e bactérias (MURDOCK et al., 1990; YE et al., 2000a). As sementes das leguminosas possuem um papel importante na propagação destas plantas, pois são ricas em aminoácidos, lipídeos e carboidratos, que são essenciais ao processo de germinação destas sementes. Paralelamente, esta alta concentração de proteínas, pode funcionar como fonte de alimento para animais, insetos, fungos e bactérias. Como forma de defesa contra estes organismos, as leguminosas expressam inúmeras proteínas e peptídeos de defesa em suas sementes, a fim de evitar a predação por microorganismos patogênicos. Desta forma, as Leguminosas permitem a germinação do broto e conseqüentemente a perpetuação das espécies (WONG; NG, 2005a).

As variedades de feijão têm ocupado um lugar de destaque no grupo das leguminosas quanto a presença de peptídeos com atividade antimicrobiana. O Feijão Lima (*Phaseolus lunatus*), por exemplo, é uma leguminosa originária do Peru. Foi demonstrado que na semente deste feijão existe um peptídeo chamado lunatusina que possui atividade antifúngica e antibacteriana. Os ensaios antimicrobianos demonstraram atividade de supressão do crescimento micelial de *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* e *Mycosphaerella arachidicola*, fungos causadores de doenças em mais de cem espécies de plantas, além de atividade antibacteriana em bactérias patogênicas como *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Proteus vulgaris* e *Mycobacterium phlei*. Este peptídeo também possui atividade

inibitória sobre a transcriptase reversa do *Vírus da Imunodeficiência humana tipo I* (HIV-1) (WONG; NG, 2005b). Leung e colaboradores (2008) isolaram de sementes do Feijão Francês (*Phaseolus vulgaris*) um peptídeo de defesa de aproximadamente 6 kilodaltons (kDa) com atividade antifúngica, que se mantém estável a grandes variações de temperatura e pH. Essas proteínas possuem forte homologia com outros tipos de proteínas denominadas de defensinas, as quais possuem atividade antimicrobiana comprovada (MITTA et al., 2000).

Dentre as muitas classes de defensinas até o momento descobertas apenas quatro classes demonstraram possuir atividade antibacteriana contra bactérias Gram-negativas. Proteínas ou peptídeos pertencentes a estas classes agem pela formação de ligações covalentes a receptores existentes na membrana celular dos microrganismos (GARCIA-OLMEDO et al., 2001). Existe uma classe de peptídeos com baixo peso molecular, chamados gama-tioninas que possuem ação bactericida conhecida, como é o caso da CP-tionina II, um tipo de gama-tionina obtida a partir de sementes de Feijão Caupi que inibe o crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas tais como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas syringae* (BLOCH et al., 2006).

Já foi comprovada a presença de outras proteínas com atividade antimicrobiana em feijões. Dentre elas destacam-se as proteínas de transferência de lipídeos (LTPs) e as globulinas. As LTPs também são freqüentemente ligadas a mecanismos de defesa e encontradas na parede das células vegetais (XAVIER-FILHO et al., 1989). Principalmente nas sementes de leguminosas as LTPs são exsudadas no meio externo afim de inibir o desenvolvimento de fungos e bactérias que por ventura venham infectar a planta durante a germinação (KADER, 1996). Entre as globulinas identificadas, estudos apontam como as mais importantes as vigninas, as vicilinas e as quitinases (SALES et al., 1996). As globulinas são encontradas nos tecidos de reserva de grande parte das leguminosas (MURRAY et al., 1983). Essas proteínas exibem atividade antifúngica, pois se ligam fortemente às estruturas fúngicas, interferindo com a germinação de esporos e conídios de vários gêneros de fungos filamentosos e leveduras (GOMES et al., 2003).

As quitinases também possuem ação antifúngica devido a sua habilidade em afetar o crescimento micelial por meio da ruptura na parede celular e liberação de oligossacarídeos, resultando em extravasamento do citoplasma (BEMHAMOU, 1993). Foram isoladas a partir de sementes de Feijão Caupi proteínas antifúngicas

denominadas de α e β . A proteína α possui estrutura molecular semelhante às quitinases e mostrou ser mais eficaz no seu efeito antifúngico do que a proteína β . A proteína antifúngica- β exibe uma sequência N-terminal diferente de qualquer proteína com atividade antifúngica conhecida, tais como tioninas e as defensinas (YE et al., 2000 b). Além da atividade antifúngica tem sido descrita a atividade antiviral destas proteínas α e β e que foram capazes de inibir a atividade da transcriptase reversa do HIV-1. A proteína β possui também ação inibitória sobre a β -glicosidase. Essa proteína é encontrada no complexo de Golgi e que está associada ao processamento de proteínas virais, como por exemplo, a glicoproteína 120 de HIV (YE et al., 2000 b).

Recentemente proteínas de baixo peso molecular como proteínas as LTPs, mugoína e sesquina foram relacionadas como sendo parte do sistema de defesa de alguns tipos de feijão como *Vigna unguiculata*, *Phaseolus mungo* e *Vigna sesquipedalis* contra parasitas, como bactérias, fungos e vírus, respectivamente. (GOMES et al., 2003; YE et al., 2000a; WONG; NG, 2005b),

1.5 *Vigna unguiculata* (L.) Walp (Feijão Caupi)

O Feijão Caupi, também denominado feijão-de-corda, macassar, macacá, ervilha-de-vaca, feijão-verde, feijão-do-campo, é uma dicotiledônea pertencente à ordem *Rosales*, família *Leguminosae*, subfamília *Papilionoideae*, tribo *Phaseoleae*, subtribo *Phaseolinae*, gênero *Vigna*, e à espécie *Vigna unguiculata* (LIMA; NELSON, 1977; FERREIRA; HUNGRIA, 2002; LIMA; NELSON, 1977). Este feijão é representado por variedades selvagens e formas cultivadas pelo homem, ocorrendo uma variação genética de nove subespécies (FERNANDES et al., 1990).

A planta possui um porte ereto ou semi-ereto com um número variável de ramos, o que influi diretamente na arquitetura da planta e no potencial de rendimento de grãos (SANTOS; ARAÚJO, 2000). A cor do hipocótilo é geralmente pigmentada e a floração ocorre em torno do 65º dia, apresentando flores roxas ou amarelas. A largura e o comprimento dos folíolos variam de 5 a 8 cm e de 11 a 13 cm, respectivamente. A vagem madura apresenta cor amarela, tendo um número de

grãos que varia de 9 a 16 grãos/vagem. As sementes apresentam cores que variam do bege, marrom e vinho, tendo um aspecto opaco ou um brilho intermediário (PEREIRA et al., 1997).



Figura 01: Aspectos morfológicos do Feijão Caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp): (A) vagem, (B) folhas, (C) caule e (D) sementes. Fonte: www.tropicalforages.info

O *Vigna unguiculata* L. Walp é um dos tipos de feijão mais plantados nas regiões áridas do planeta, com uma produção anual em torno de três milhões de toneladas (FERNANDES et al., 1990). No Nordeste brasileiro o *Vigna unguiculata* L. Walp é conhecido por feijão-de-corda e é uma das principais culturas desta região, sendo considerado fonte de renda alternativa e alimento básico para sua população (SILVA; OLIVEIRA, 1993). Entretanto, este feijão apresenta uma baixa produtividade, devido a infecções por bactérias, fungos e, principalmente vírus, (OLIVEIRA, 2004). Este feijão tem sua importância nutricional reconhecida na África, Índia e Brasil, onde é extensamente cultivado, sendo uma grande fonte de proteínas para as populações carentes em todo o mundo (ALGHALI, 1991).

A produção de Feijão Caupi, em todas as regiões do mundo onde é cultivado, sofre uma forte pressão seletiva por parte de várias doenças causadas por patógenos tais como insetos, fungos, bactérias, nematóides e vírus (LANE et al., 1996). No entanto, na busca da sobrevivência essa leguminosa conta com um sistema de defesa que a protege da ação desses invasores, possibilitando assim seu desenvolvimento. Esse sistema de defesa é composto por vários tipos de

moléculas tais como proteínas e peptídeos, os quais têm ação antimicrobiana (MCDOWELL; DANGL, 2000).

Entre os principais vírus que dificultam o cultivo de Feijão Caupi na região Nordeste do Brasil destacam-se os *Cowpea Severe Mosaic Virus* (CSMV) do grupo Comovírus, *Cowpea Aphid Borne Mosaic Virus* (CABMV) do grupo Potyvírus, *Cucumber Mosaic Virus* (CMV) do grupo Cucumovírus e *Cowpea Golden Mosaic Virus* (CGMV) do grupo Geminivírus (LIMA; SANTOS, 1988), que causam desde o ressecamento das sementes até o apodrecimento de sementes e das folhas das plantas (ANJOS; LIN, 1984). Contudo, diversas variedades de Feijão Caupi podem produzir defesas contra muitos desses vírus, assim como contra bactérias, fungos e insetos que parasitam as sementes, folhas e outras partes da planta.

O *Vigna unguiculata L. Walp* na região nordeste é acometido por infecções bacterianas, fúngicas, nematóides e vírus (RIOS, 1983). As pesquisas para seleção de cultivares na região Nordeste iniciou-se na década de 1970, sendo consideradas recentes, uma vez que são necessários de oito a dez anos desde a realização de um cruzamento até o lançamento de uma nova cultivar, esses estudos tinham como objetivo principal o aumento da produção, no entanto hoje já existem pesquisas voltadas para a produção de plantas resistentes a doenças causadas por microorganismos fito patogênicos, principalmente vírus (LIMA, OLIVEIRA, 1986; FREIRE FILHO et al., 2009).

No estado do Piauí, as principais cultivares de *Vigna unguiculata L. Walp* reúnem características que visando à adequação aos fatores bióticos e abióticos que compõem o ambiente da região, bem como a resistência às infecções virais causadas principalmente por CpAMV (*Cowpea Aphid Borne Mosaic Vírus*), CpSMV (*Cowpea Severe Mosaic Vírus*) e CpGMV (*Cowpea Golden Mosaic Vírus*), entre elas estão a cultivar BR 1-Poti, BR 7-Parnaíba, BR 10-Piauí, BR 12-Canidé, desenvolvidas na década de 1980 que, embora tenham excelente padrão de resistência as viroses, não tiveram boa aceitação comercial. Em 1990 foi lançada a cultivar BR 14-Mulato e a BR 17-Gurguéia, que obtiveram excelentes resultados, tanto por serem resistentes as infecções por vírus como pela alta produtividade e ótima aceitação pelo mercado consumidor (FREIRE et al., 1994).

O BR 17-Gurguéia, que corresponde à linhagem TE 86-75-37E. 1, obtida do cruzamento entre as cultivares BR 10-Piauí e CE-315 (TVu 2331), é também

resistente a algumas estirpes de Potyvirus, que são vírus transmitidos por pulgão. Essas duas últimas cultivares representam um grande avanço em relação as cultivares de *Vigna unguiculata* tradicionalmente utilizadas, principalmente em termos de resistência às viroses (FREIRE et al., 1994; MATOS FILHO, 2006).

Recentemente, diversas proteínas e peptídeos antimicrobianos foram encontrados nas sementes desse feijão e estão relacionadas freqüentemente aos mecanismos de defesa dessa planta (CARVALHO et al., 2001). O Caupi cultivado tem sua resistência a certos parasitas relacionada aos seus altos níveis de flavonóides (SONNANTE et al., 1997). As variedades cultivadas IT89KD-245, TE90-180-10F, CNCx 409-12F, IT86D-716, IT89KD-260 e BR17-Gurguéia e as selvagens são ricas em três tipos de flavonóides: quercetina, kaempferol e isoramnetina (GOMES et al., 1996).

As extrações de proteínas a partir do *Vigna unguiculata L. Walp* mostram uma predominância de globulinas e albuminas (FERREIRA et al., 2004). A maioria das globulinas já foram identificadas, sendo classificadas como vigninas, vicilinas e quitinases (SALES et al., 1996). Já foi demonstrado que essas proteínas possuem atividade antifúngica conforme citado anteriormente (GOMES et al., 1998, BEMHAMOU, 1993; YE et al., 2000a). As sementes de *Vigna unguiculata L. Walp* também exsudam diversas proteínas de defesa, tais como os β -1,3 glucanases, as cistatinas, as vicilinas e as proteínas de transferência de lipídeos (GOMES et al., 1996).

A presença de proteínas e peptídeos antimicrobianos, como parte de um sistema de defesa das plantas e muitas espécies animais, inclusive seres humanos; evidenciam a importância da bioprospecção na identificação destes produtos naturais bioativos, principalmente em países em desenvolvimento e com grande potencial em termos de biodiversidade, como é o caso do Brasil (GIBBONS, 2008). Estudos relatam que proteínas e peptídeos isolados das sementes de Leguminosas apresentam grande potencial biotecnológico para a produção de fármacos com atividade antimicrobiana (YE et al., 2001).

Desta forma, diante da importância econômica do *Vigna unguiculata L. Walp* e da existência de proteínas com atividade antimicrobiana nas sementes deste feijão, e tendo em vista a necessidade da busca de novas opções terapêuticas a serem empregadas no controle e combate de diversos patógenos humanos, em especial os

emergentes e os multirresistentes, idealizou-se este trabalho que se propõem a avaliar as atividades antibacterianas e antivirais de um extrato protéico obtido a partir de sementes em germinação de *Vigna unguiculata* L. *Walp* sobre diversos patógenos humanos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL:

Estudar as atividades antibacterianas e antivirais, bem como a atividade citotóxica do extrato protéico obtido a partir de sementes de *Vigna unguiculata* (L.) Walp (EPSV).

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Obter e caracterizar parcialmente através do perfil eletroforético do EPSV.
- Avaliar a atividade antibacteriana do EPSV sobre bactérias Gram positivas e Gram negativas de interesse médico.
- Determinar a atividade citotóxica do EPSV em células C6/36.
- Investigar a atividade antiviral do EPSV sobre a replicação de Dengue vírus tipo 3 em células C6/36.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Preparação do EPSV.

As sementes de *Vigna unguiculata* (L.) Walp utilizadas neste estudo pertencem ao cultivar BR/17 Gurgéia. As sementes são originadas do Município de Timon (Maranhão) e foram doadas ao Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Piauí pela Secretaria Estadual da Agricultura do Piauí.

Para a preparação do extrato protéico total, 50 gramas de sementes foram lavadas exaustivamente com água destilada com o objetivo de retirar as impurezas. Após este processo de lavagem, as sementes foram colocadas de molho em um béquer contendo 100 mililitros (ml) de água destilada por 24 horas para dar início ao processo de germinação. Após este tempo, o sobrenadante e as sementes foram trituradas em liquidificador comum previamente esterilizado com álcool etílico a 70%. Este macerado foi centrifugado a 5100 rpm por 30 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante obtido foi coletado, aliquotado e armazenado a -20°C até o seu uso. Para os ensaios de atividade antimicrobiana, o extrato protéico foi esterilizado através da filtração em membranas de 0,22 µm (micrômetros) (RAO et al., 2004).

3.2 Determinação da concentração protéica do EPSV

A concentração de proteínas totais do sobrenadante foi determinada por espectrofotometria através do método de Bradford. A quantificação foi determinada utilizando uma curva padrão de albumina sérica bovina nas concentrações de 1, 10 e 100 mg/ml. Depois de realizada a quantificação, o extrato foi submetido à eletroforese em gel Poliacrilamida a 12% contendo Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE) 10% m/v (LAMMELI, 1973). Um volume de 100 microlitros (µL) do extrato protéico e dos marcadores moleculares [albumina bovina (66kDa) e lisozima (14kDa)] foram separadamente misturados com 100 µL do tampão da amostra (200 mM de Tris-HCl pH 6,8; 400 mM de ditiotreitol, 8% Dodecil Sulfato de Sódio (SDS); 0,1% azul de bromofenol, 50% glicerol). Em seguida essa mistura foi submetida a fervura por 5 minutos e então aplicada em diferentes cavidades do gel de poliacrilamida nos volumes de 2, 5 e 10 µL do extrato e 15 µL do padrão de peso

molecular. O tempo transcorrido para realização da eletroforese foi de 3 horas. A visualização do perfil de proteínas existentes na amostra foi observada após a coloração do gel em Coomassie Brilliant Blue a 0,1% por 12 horas e descoloração em solução de álcool etílico a 20 % por mais 12 horas.

3.3 Estudo da atividade antimicrobiana *in vitro* do EPSV

3.3.1 Atividade Antibacteriana

3.3.1.1 Cepas bacterianas

Os testes para determinar a atividade antibacteriana foram realizados com bactérias Gram positivas e Gram negativas de importância médica. Todas as cepas utilizadas em nosso estudo foram obtidas a partir de culturas estoque conservadas no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia, do Departamento de Parasitologia e Microbiologia da Universidade Federal do Piauí, sob congelamento a -20°C . As cepas utilizadas neste estudo foram submetidas a testes bioquímicos específicos para a confirmação da pureza e identificação da espécie, através de procedimentos recomendados por Konemam e colaboradores (1999), antes de sua utilização nos ensaios de atividade antimicrobiana.

As bactérias Gram positivas utilizadas foram *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina MR-98 (cepa de origem clínica pertencente ao Clone Epidêmico Brasileiro, Soares et al 2000), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e *Enterococcus faecalis* resistente Vancomicina (VAN-A 7426) (cepa resistente à vancomicina e que contém o gene *vanA*; cepa de origem clínica; SOARES et al., 2000). As bactérias Gram negativas utilizadas foram *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Escherichia coli* (ATCC 35218), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Stenotrophomonas maltophilia* EM 0104 (cepa de origem clínica, isolada de processo infeccioso de origem hospitalar).

3.3.1.2 Técnica de difusão do EPSV em meio sólido a partir de orifício

O teste de susceptibilidade das cepas bacterianas ao EPSV foi realizado, inicialmente, através do teste de difusão em meio sólido, a partir de orifício como descrito por Alves e colaboradores (2000), com algumas modificações e observando as recomendações do National Committee for Clinical and Laboratory Standards (NCCLS; 2003a). As suspensões bacterianas, cultivadas em caldo Mueller-Hinton (MH) (Difco) por 24 horas a 35°C em estufa bacteriológica, foram padronizadas em solução salina estéril (0,85%) para uma concentração de 10^8 unidades formadoras de colônia por ml (UFC/mL), utilizando a escala 0.5 de McFarland. Em seguida, foram semeadas com o auxílio de swab estéril, sobre a superfície das placas de Petri, contendo Ágar MH (Difco). Decorrido 10 minutos para a secagem dos inóculos bacterianos, foram feitos quatro orifícios de 7 milímetros (mm) de diâmetro, com auxílio de um molde e sucção. Em seguida adicionou-se 100 µL do EPSV na concentração de 1273,25 µg/ml. As outras cavidades foram preenchidas com fármacos controles (vancomicina 30 µg/mL, oxacilina 1 µg/mL, meropenem 10 µg/mL, ampicilina 10 µg/mL, minociclina 30 µg/mL e levofloxacina 5 µg/mL), de acordo com a sensibilidade bacteriana, servindo como controle positivo e com solução salina fosfato tamponada (PBS) pH 7,4 0,01 M como controle negativo.

Os resultados da susceptibilidade ao extrato foram expressos em termos de tamanho de diâmetro do halo de inibição do crescimento microbiano. Cada teste para verificar a atividade antimicrobiana foi sempre realizado em triplicata.

Paralelamente, placas de ágar MH contendo discos de antimicrobianos usados na clínica (oxacilina, vancomicina, sulfametoxazol-trimetoprim, quinupristina+dalfopristina e imipenem) e utilizados na verificação da susceptibilidade para terapêutica, foram empregados para monitorar a estabilidade gênica das espécies bacterianas avaliadas e para fornecer as comparações da eficiência ou não do extrato. O tamanho dos halos de inibição utilizados como padrão foram os recomendados pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (2008).

3.3.1.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima do EPSV

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do EPSV pela técnica de microdiluição em caldo foi realizada segundo protocolo padronizado

NCCLS (2003b).

Neste ensaio foram utilizadas microplacas estéreis de 96 cavidades (INLAB) com fundo em forma de “U”, sendo que a placa é organizada em 8 linhas identificadas por letras (A, B, C, D, E, F, G e H) e 12 colunas numeradas. Cada placa foi dividida em duas partes, sendo a primeira parte formada pelas colunas 1 até a coluna 6 e a segunda parte da coluna 7 à coluna 12. Em cada parte foi realizado um ensaio para uma das espécies bacterianas avaliadas.

Inicialmente, todos os poços da microplaca foram preenchidos 100,0 µL de caldo MH (2 vezes concentrado) e em seguida somente nos poços da primeira e da sétima coluna das linhas F, G e H foram adicionados 100,0 µL do extrato protéico na concentração de 1000 µg/ml, obtendo assim a concentração inicial de 500 µg/ml neste. A partir desta concentração foi realizada uma diluição seriada, homogeneizando e transferindo 100,0 µL dos poços da primeira coluna para os poços da segunda coluna e assim sucessivamente, até a sexta coluna, desprezando-se após homogeneização o excesso da diluição, e obtendo-se assim concentrações decrescentes do extrato (500 µg/mL- coluna 1; 250 µg/mL- coluna 2, 125 µg/mL- coluna 3, 62,5 µg/mL- coluna 4, 31,25 µg/mL- coluna 5, 15,62 µg/mL- coluna 6). Idêntico procedimento foi realizado para os poços da sétima coluna até o da décima coluna.

Após a diluição do extrato, foram depositados os inóculos microbianos previamente preparados. Para a preparação dos inóculos bacterianos cerca de cinco colônias crescidas em ágar triptona de soja (TSA), com incubação de 18 horas sob temperatura de 35 °C, em estufa bacteriológica, foram suspensas em solução salina estéril (NaCl a 0,85 %). As suspensões obtidas de turbidez compatível com a escala 0,5 de McFarland (10^8 UFC/mL), foram posteriormente diluídas 1/5 em solução salina estéril (0,85 %) e desta diluição (10^7 UFC/mL) um volume de 5 µL (10^5 UFC/µL) foi aplicado nos orifícios.

Nas linhas A e B foram depositados, fármacos que apresentavam atividade antibacteriana sobre cada espécie bacteriana ensaiada e em concentrações compatíveis com a concentração inibitória mínima (CIM) já relatada para cada cepa (CLSI 2008), monitorando, assim, a qualidade destas cepas e servindo de controle positivo do experimento. As linhas C, D e E, foram utilizadas, respectivamente, para os controles da viabilidade bacteriana, da esterilidade do extrato e da pureza do

meio de cultura. Nas linhas F, G e H como acima descrito foi realizado o teste propriamente dito. As microplacas foram incubadas em estufa a 35 °C por 20 horas.

Decorrido este intervalo de tempo foi acrescentado a cada um dos orifícios 20 µL de uma solução aquosa de TTC (2,3,5 cloreto de trifênil tetrazólio; VETEC) a 0,5% e as microplacas foram novamente reincubadas por mais três horas a 35 °C. Após esta última incubação a presença de uma coloração vermelha nos orifícios era interpretada como prova negativa do efeito inibitório do extrato, enquanto a ausência da coloração vermelha era considerada prova positiva da ação inibitória do extrato. A CIM foi definida como a menor concentração do extrato em µg/mL capaz de impedir o crescimento microbiano. Cada teste foi realizado em triplicata.

3.3.1.4 Cultivo em caldo na presença do EPSV

Neste ensaio, duas séries de 8 tubos de ensaio, contendo 0,5 mL de caldo MH foram inoculados com 5 µL das suspensões bacterianas (10^8 UFC/mL) das espécies Gram positivas e Gram negativas. Em seguida, em uma das séries dos tubos de ensaio foram adicionados 100 µL do extrato protéico preparado na concentração de 1000 µg/mL. Os tubos contendo ou não o extrato protéico foram incubados a 37°C por 24 horas. A leitura do teste foi realizada detectando-se a presença ou ausência da formação de uma turvação de cor branca. Após o crescimento, uma alíquota de 10 µl de cada cultura foi retirada e depositada em lâmina de vidro para a realização de uma coloração de Gram.

3.3.2 Avaliação da Atividade Citotóxica do EPSV sobre células C6/36.

3.3.2.1. Cultivo de células C6/36

Neste teste foram utilizadas células C6/36 que são derivadas de larvas de mosquito *Aedes albopictus*, e foram gentilmente cedidas pela Professora Erna Geessien Kroon da UFMG. Estas células foram cultivadas em meio Leibowitz-15 (L-15, Cultilab, Brasil), contendo 20 µg/ml de gentamicina, 50 µg/ml de fungizona, 20

µg/ml de ciprofloxacina e 10% de soro fetal bovino (SFB). As células foram mantidas em estufa tipo “Biologic Oxigen Demand” (B.O.D.) à 28°C. Para repiques das monocamadas fechadas, o meio de cultivo foi desprezado e as células lavadas com solução salina fosfato tamponada (PBS) pH 7,0 e homogeneizadas. Em seguida, as células foram ressuspensas em meio de cultivo celular e distribuídas em garrafas de 25 cm².

3.3.2.2. Identificação do efeito citotóxico do EPSV sobre as células C6/36.

O teste de citotoxicidade do EPSV foi realizado para determinar a concentração máxima não tóxica (CMNT) em células C6/36. CMNT foi determinada através da observação de alterações morfológicas nas células e/ou na morte celular. Para isto, as células cultivadas em placas de 6 poços (10.000 células /poço) foram expostas as seguintes concentrações de 100, 10 e 1 µg/mL (SIMONI *et al.*, 1997). Durante 7 dias registraram-se as alterações celulares através da análise microscópica.

3.3.4 Avaliação da Atividade Antiviral do EPSV

Neste estudo foi utilizada uma amostra de Dengue vírus 3 (DENV-3 Am25) isolada a partir de soro de um paciente com febre hemorrágica da dengue. Esta amostra foi gentilmente cedida pela Professora Dra. Erna Geessien Kroon do Laboratório de Vírus da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

3.3.4.1 Produção e Titulação do Dengue vírus 3

A amostra *Dengue vírus 3* (DENV-3) foi inoculada com uma multiplicidade de infecção (M.O.I) de 0,1 em células C6/36. Após a infecção, as células foram visualizadas diariamente, ao microscópico óptico, até apresentarem efeito citopático (ECP) quando comparadas com as células controle. O sobrenadante destas células

foi coletado e clarificado por centrifugação a 4°C, 15 minutos e 2000 rotações por minuto (rpm). Após a centrifugação para remoção do debris celular, o sobrenadante foi coletado novamente, aliquotado e congelado a - 70°C.

Para a determinação do título viral a ser empregada nos ensaios da atividade antiviral do EPSV, inicialmente foi determinada a dose infectante para 50% das câmaras ou TCID₅₀ (“Tissue Culture Infective Dose”), empregando-se a técnica de microdiluição. O sobrenadante contendo as partículas virais foi descongelado e diluído seriadamente na razão de 10 até a diluição de 10⁻⁵. Estas diluições foram utilizadas para a infecção de células C6/36 cultivadas em placas de 96 poços contendo monocamadas confluentes deste tipo celular (10.000 células/poço). A infecção de cada poço foi realizada com 100 µL das diluições do vírus, sendo que para cada diluição foram utilizados oito poços (octoplicata). No controle do experimento foram também preparadas oito câmaras com células não infectadas. As placas permaneceram incubadas a 28°C em estufa B.O.D. por cerca de 7 dias até o aparecimento do efeito citopático característico de DENV nestas células (sincícios). Para cada diluição foi determinado o número de poços positivos (apresentaram ECP) e negativos (ausência de ECP). Com base nestes dados o TCID₅₀ foi calculado segundo o método de REED e MUENCH (REED e MUENCH, 1938) descrito por LENNETT e SCHMIDT (1979). Inicialmente é necessário calcular a distância proporcional (DP) entre os dados referentes às diluições utilizadas e posteriormente corrigir pelo logaritmo do fator da diluição empregado. Como a diluição foi realizada na razão de 10, o fator de correção é 1 (log¹⁰= 1). O cálculo da TCID₅₀ foi determinado através da soma do logaritmo negativo da diluição que rendeu a taxa de infecção mais próxima de 50% e a distância proporcional. Esta soma deve ser multiplicada pelo logaritmo do fator de diluição (no caso 1).

$$DP = \frac{(\% \text{ de poços positivos na diluição mais próxima de } 50\%) - 50\%}{\left(\frac{\% \text{ de poços positivos na diluição mais próxima de } 50\%}{\% \text{ de poços positivos na diluição abaixo da que obteve um valor próximo a de } 50\% \text{ de positividade}} \right)}$$

$$\text{Log TCID}_{50} = (DP + \log \text{ da diluição mais próxima de } 50\%) \times (\log \text{ do fator de diluição})$$

3.3.4.2 Análise *in vitro* do efeito antiviral do EPSV

A análise *in vitro* do efeito antiviral do EPSV foi realizado também em células C6/36. Após a obtenção de placas de 24 poços contendo monocamadas confluentes de células C6/36 (100.000 células/poço), estas foram infectadas com 10.000 TCID₅₀ de DENV-3 por 1 hora. Após este tempo, o meio contendo o vírus foi retirado, a monocamada lavada e então foi adicionado à esta, diluições seriadas do extrato. As monocamadas foram visualizadas diariamente até a formação de efeito citopático no controle de vírus (câmaras infectadas somente com o DENV-3). A atividade antiviral foi medida através da comparação do efeito citopático nas células tratadas com o extrato e o controle de vírus sendo expressa como porcentagem de inibição do efeito citopático em relação ao controle de vírus.

4 RESULTADOS:

4.1 Obtenção e Caracterização do EPSV

Após o processo de maceração e centrifugação para produção do extrato protéico, as proteínas presentes no extrato foram quantificadas pelo método de Bradford. A quantificação do extrato indica, que o procedimento de extração produziu um concentrado protéico com cerca de 1273,25 µg/mL (Tabela 01). Este extrato protéico foi submetido a uma eletroforese em SDS-PAGE para caracterização parcial das proteínas presentes no extrato. Após a eletroforese e coloração das proteínas por Coomassie Brilliant Blue foi verificado que o extrato possui em sua composição várias proteínas com peso moleculares variados, sendo as proteínas com peso molecular próximas a 66 kilodaltons (kDa) são as mais abundantes no extrato (Figura 02).

Tabela 01: Obtenção do EPSV a partir de sementes do feijão caupi e quantificação do extrato pelo método de Bradford.

Total de feijão utilizado (g)	Total de macerado obtido (mL)	Concentração (µg/mL)	Quantidade total de Proteínas (mg)
50	155	1273,25	197,35

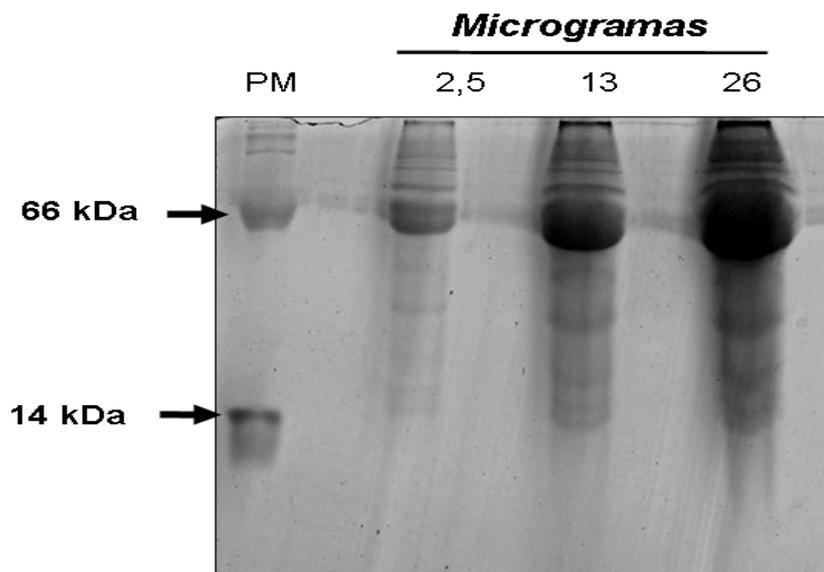


Figura 02 – Perfil Eletroforético de proteínas em gel de poliacrilamida a 12% (SDS-PAGE) do EPSV. Legenda: PM: Padrão de peso molecular – albumina (66 kDa) e lisozima (14 kDa).

4.2 Avaliação da Atividade antibacteriana do EPSV

Após a obtenção do EPSV o mesmo foi esterilizado com filtro de acetato de celulose de 0,22 μm (FRILABO), antes da realização dos testes de atividade antimicrobiana. Inicialmente, foi realizado a técnica de difusão em meio sólido com orifício para verificar a presença de atividade anti-bacteriana no extrato estudado. Conforme observado após incubação das placas, análise e comparação da ação do extrato protéico com a ação dos fármacos controles utilizados, verificou-se que as proteínas presentes no extrato não apresentaram atividade antibacteriana contra nenhuma das bactérias testadas (Tabela 02). No entanto, nas bactérias Gram positivas verificou-se sempre o surgimento de um halo branco em volta da cavidade onde o extrato foi depositado. Interessantemente, o surgimento deste halo branco foi mais evidente nas placas em que fora semeada a bactéria *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (Figura 03).

Tabela 02: Atividade antibacteriana do ESPV sobre bactérias Gram Positivas e Gram Negativas pelo método de difusão em ágar

Bactérias	Atividade Anti-bacteriana	Halo branco
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)	ND	Presente
<i>Enterococcus faecalis</i> (VAN-A 7426)	ND	Presente
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 29213)	ND	Presente
<i>Staphylococcus aureus</i> MR 98	ND	Presente
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228)	ND	Presente
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	ND	Ausente
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	ND	Ausente
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 35218)	ND	Ausente
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (700603)	ND	Ausente
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> EM 0104	ND	Ausente

ND: Não determinado. Experimento realizado em triplicata

A figura 03 ilustra o mesmo comportamento observado para as demais cepas bacterianas avaliadas. O precipitado branco foi sempre observado nas placas com bactérias Gram positivas. Para a confirmação da ausência de atividade antibacteriana do extrato, foi realizada também a técnica de microdiluição em caldo para determinação da Concentração Inibitória Mínima. Assim como observado no teste de difusão em ágar, também não foi verificada inibição do crescimento bacteriano por parte do extrato de Feijão Caupi em nenhuma das diluições testadas (Tabela 03 e Figura 04). Entretanto, houve a formação de um precipitado de cor branca nos poços contendo as bactérias Gram Positivas, principalmente as pertencentes ao gênero *Enterococcus*.

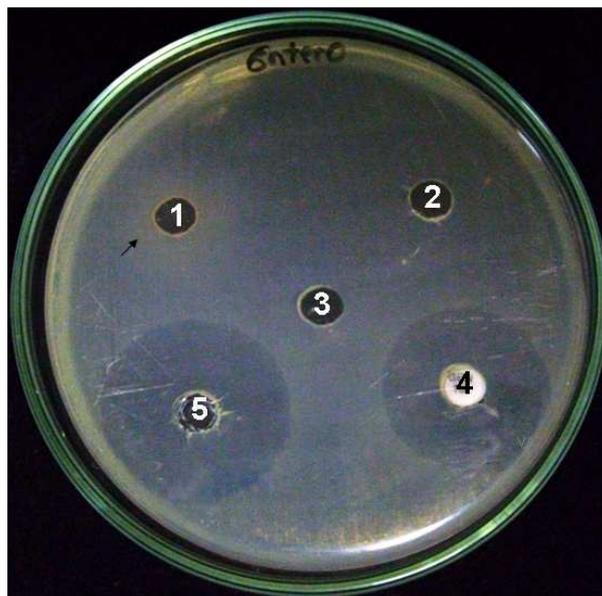


Figura 03 – Atividade anti-bacteriana do EPSV sobre *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 pelo método de difusão em ágar. Legenda: 1- extrato protéico de Feijão Caupi; 2- Controle negativo (Tris-HCl pH 6,8), 3- Controle negativo antibiótico (oxacilina 1 µg/ml), 4- Controle positivo (disco de vancomicina 30 µg) e 5- Controle positivo (Vancomicina 5 µg/mL).

Tabela 03 – Determinação da CIM do ESPV sobre bactérias Gram Positivas e Gram Negativas.

Bactérias	CIM	Precipitado branco
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)	ND	Presente
<i>Enterococcus faecalis</i> (VAN-A 7426)	ND	Presente
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 29213)	ND	Presente
<i>Staphylococcus aureus</i> MR 98	ND	Presente
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228)	ND	Presente
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	ND	Ausente
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	ND	Ausente
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 35218)	ND	Ausente
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (700603)	ND	Ausente
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> EM 0104	ND	Ausente

ND: Não determinado.

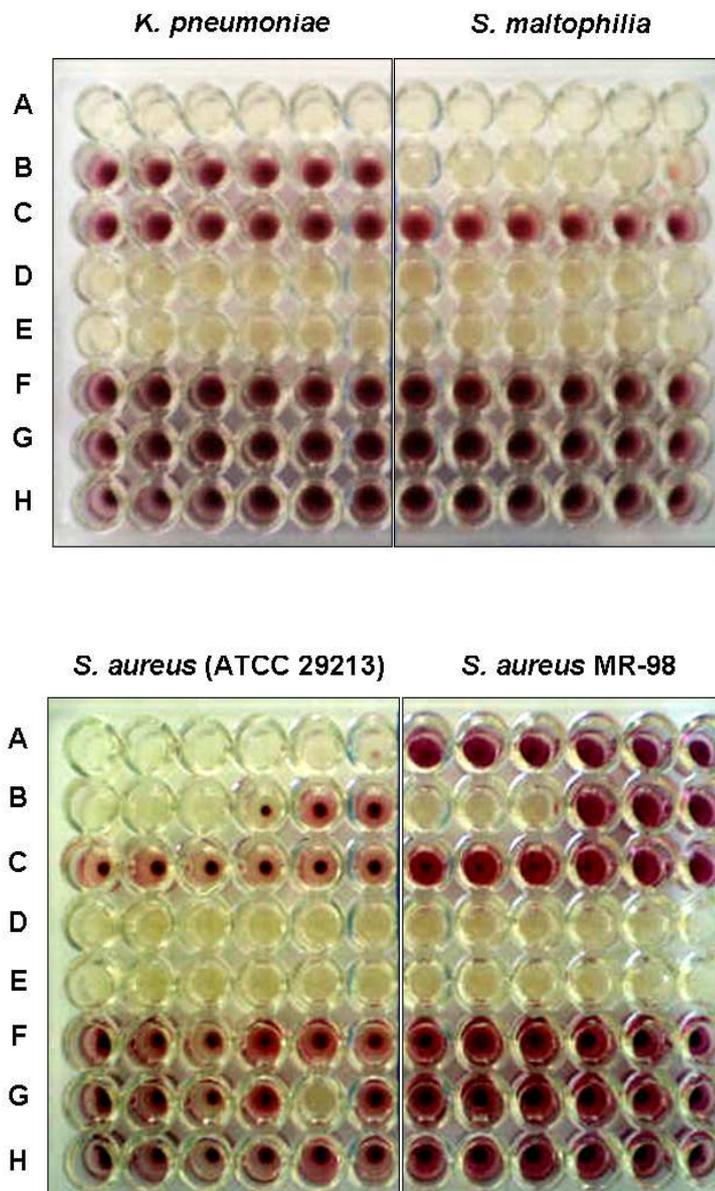


Figura 04 – Análise da atividade antibacteriana do EPSV pelo método de microdiluição em microplaca.

Legendas: linhas A e B – controles de drogas, C – controle de crescimento bacteriano, D – controle de esterilidade do extrato, E - controle de esterilidade do caldo, F, G, H - teste.

Para investigar a natureza deste precipitado esbranquiçado, observados nos testes de atividade antibacteriana para as cepas Gram positivas, foram realizados experimentos, nos quais as bactérias Gram positivas e Gram negativas foram semeadas em tubos de vidro contendo caldo MH na presença ou ausência de extrato protéico a uma concentração de 100 µg/ml.

Após incubação, foi verificado que todas as bactérias Gram positivas que foram incubadas no caldo MH contendo o EPSV apresentaram uma coloração esbranquiçada se comparada ao crescimento bacteriano destas bactérias somente em caldo e na ausência do extrato proteico. Interessantemente, este fenômeno não se repetiu para as bactérias Gram negativas analisadas (Figura 05).

A visualização microscópica da cultura mostrou que este precipitado consistia em um polímero extracelular, onde as bactérias Gram positivas permaneciam associadas a esta estrutura extracelular (Figura 06). Não foi observada a presença deste polímero nem no caldo MH incubado somente com o extrato (controle negativo) nem nas culturas de bactérias Gram negativas (Figura 07).

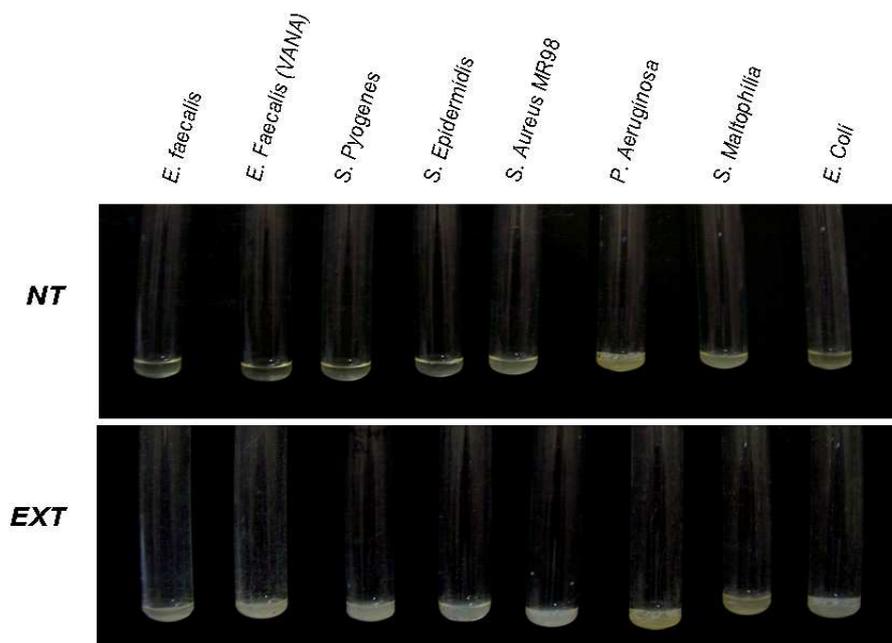


Figura 05 – Perfil macroscópico das culturas bacterianas na presença e na ausência do EPSV. A figura acima ilustra o comportamento observado para as demais cepas bacterianas avaliadas.

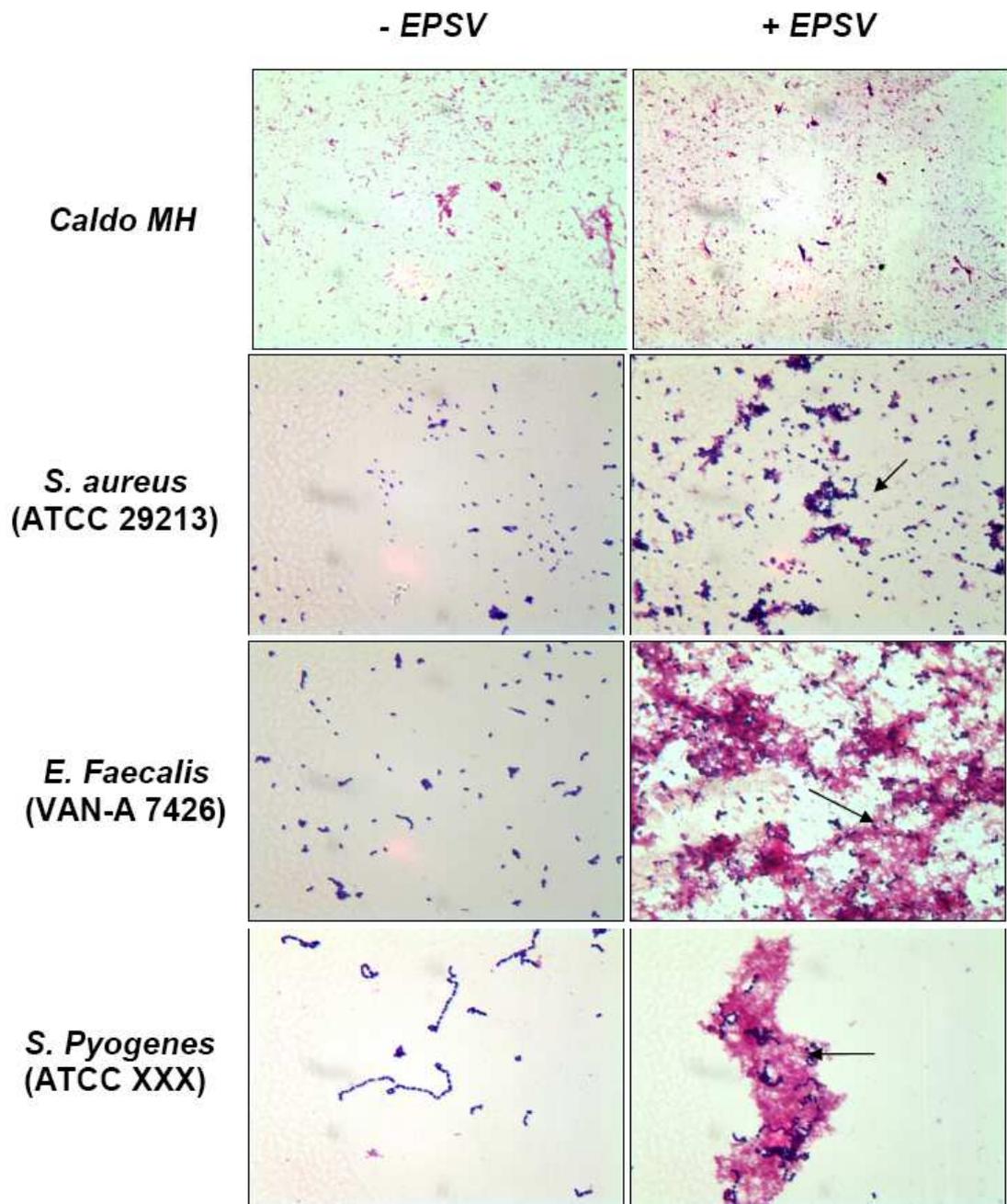


Figura 06 – Aspecto microscópico do caldo MH e de bactérias Gram Positivas cultivadas na ausência (-) e na presença (+) do EPSV. Bactérias Gram positivas foram semeadas em tubos de vidro contendo caldo MH na presença ou ausência de EPSV, a uma concentração de 100 µg/ml. Após 24 horas de incubação uma alíquota de 10 µL da cultura foi retirada e corada pelo método de Gram. Setas: polímeros extracelulares.

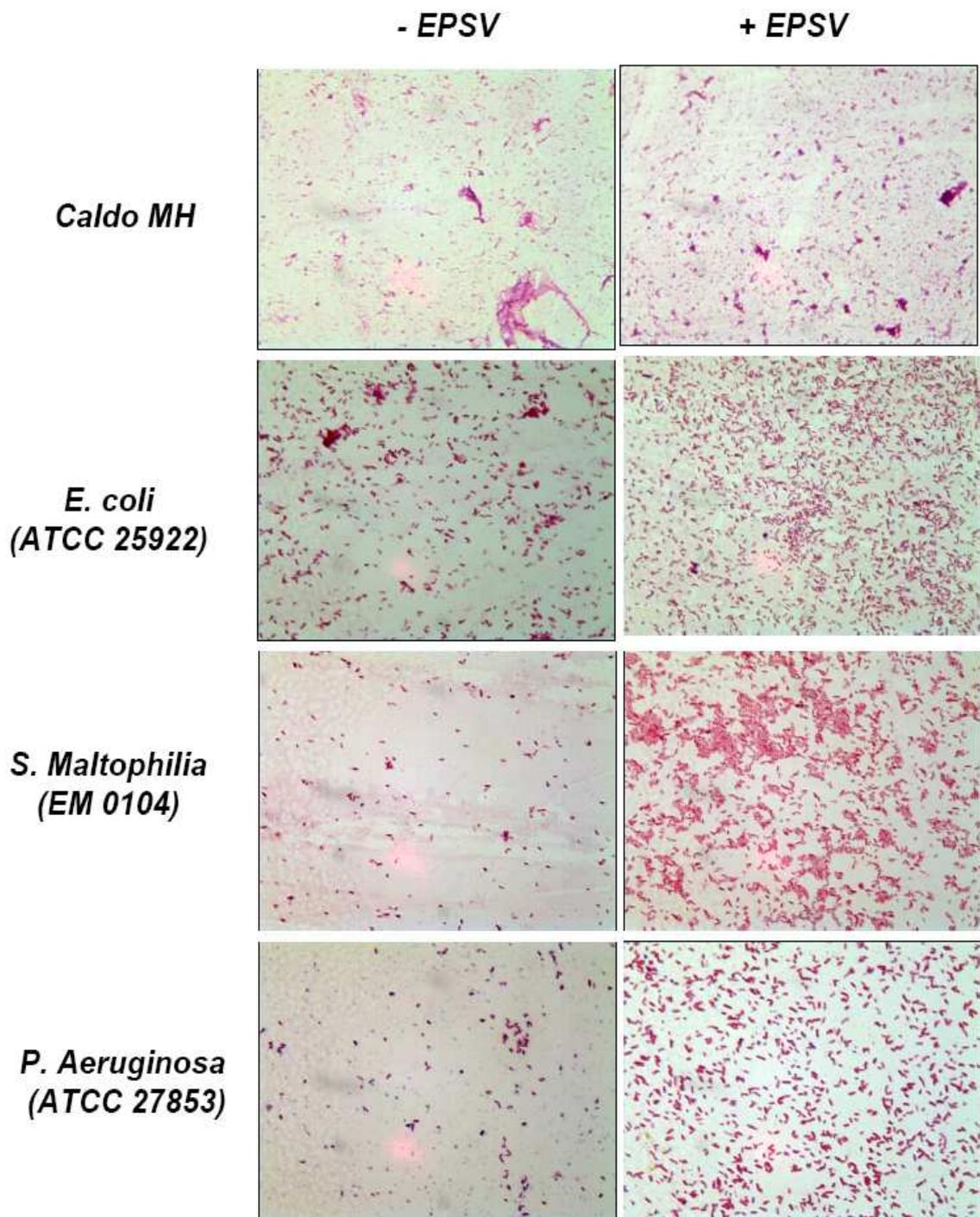


Figura 07 – Aspecto microscópico do caldo MH e de bactérias Gram negativas cultivadas na ausência (-) e na presença (+) do EPSV. Bactérias Gram Negativas foram semeadas em tubos de vidro contendo caldo MH na presença ou ausência de extrato protéico a uma concentração de 100 mg/ml. Após 24 horas de incubação uma alíquota de 10 uL da cultura foi adicionada a uma lâmina de vidro e corada pelo método de Gram.

4.3 Avaliação da Atividade citotóxica e antiviral do EPSV.

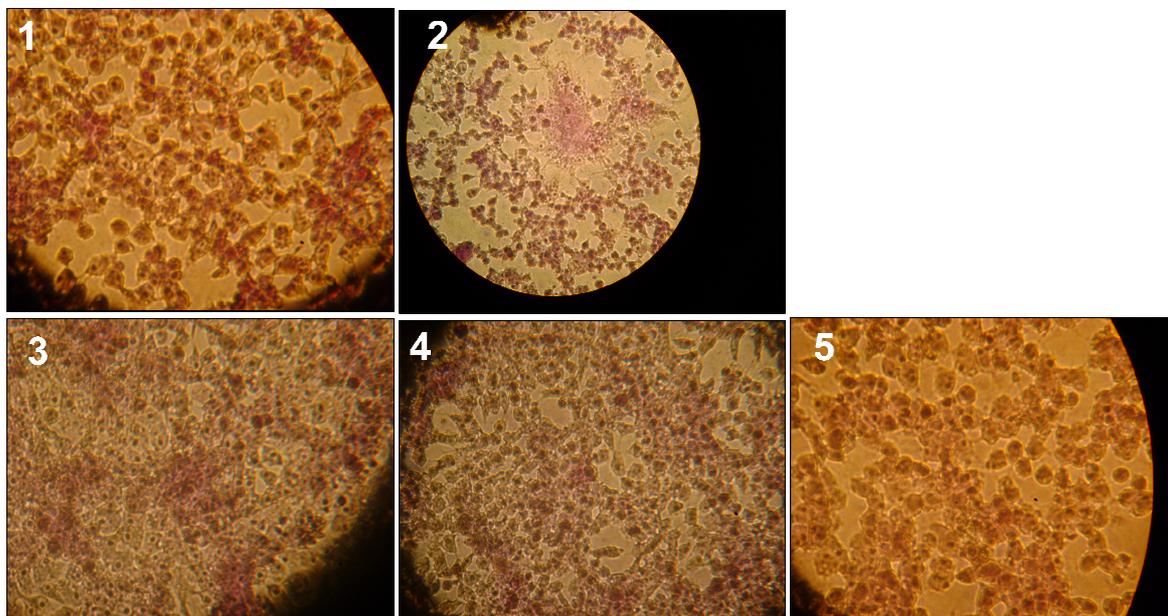
Para o estudo da atividade antiviral do extrato protéico produzido a partir de sementes de feijão caupi, foi inicialmente realizado ensaios de citotoxicidade em células C6/36. Após a adição do extrato protéico às monocamadas de células C6/36, não foi verificado nenhuma alteração celular nas células tratadas com 100, 10 ou 1 µg/ml de extrato (Tabela 04).

A análise *in vitro* do efeito antiviral do EPSV foi então realizada nas células C6/36 nas concentrações de 100, 10 e 1 µg/ml. Após a obtenção das monocamadas confluentes de células, estas foram infectadas com 10.000 TCID₅₀ de DENV-3 por 1 hora. Posteriormente, o meio contendo o vírus foi retirado, a monocamada lavada e então foi adicionado à esta, diluições seriadas do extrato. Após a incubação das placas, foi verificado que todas as concentrações do extrato foram capazes de inibir completamente o surgimento do efeito citopático de DENV-3 (formação de sincícios) (Tabela 04 e Figura 08).

Tabela 04 – Análise da Citotoxicidade e da Inibição do ECP na presença do EPSV em monocamadas de células C6/36 infectadas com DENV-3.

Concentração µg/ml	Citotoxicidade (%)	Inibição do ECP (%)
100	0	100
10	0	100
1	0	100

Figura 08 – Análise microscópica da Inibição do ECP na presença do EPSV em monocamadas de células C6/36 infectadas com DENV-3.



1: controle de células, 2: controle de vírus, 3, 4, 5: Ação do macerado nas doses de 10 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL respectivamente.

5 DISCUSSÃO

Para estudar a atividade antimicrobiana no extrato protéico de Feijão Caupi, as sementes foram submetidas a uma etapa de pré-germinação (imersão em água por 24 horas) de forma a induzir a expressão de genes ligados ao processo de defesa e conseqüentemente, aumentar a concentração de proteínas com atividade antimicrobiana nas sementes (POWERS; WHITAKER, 1977). Muitas dessas proteínas são encontradas nas sementes e são importantes na proteção durante a germinação (BROEKAERT et al., 1995). Durante o processo de germinação as sementes de Feijão Caupi exsudam várias proteínas ligadas ao sistema de defesa, tais como glucanases, cistatinas, vicilinas e proteínas transportadoras de lipídeos (LTPs). Essas proteínas demonstraram atividade antimicrobiana *in vitro* contra *Fusarium oxysporum*, um tipo de fungo que parasita os vasos condutores de água da planta (BROEKAERT et al., 1997; AGRIOS, 1998).

A obtenção do extrato seguiu os mesmos protocolos usados nos estudos das atividades antimicrobianas de peptídeos de defesa encontrados em plantas da família das leguminosas (RAO et al., 2004). Após a extração das proteínas e eletroforese em gel de poliacrilamida, foi observado uma predominância de proteínas com peso molecular entre 14 e 66 kDa, sendo as proteínas com peso próximo a 66 kDa as mais abundantes (Figura 02). Este perfil protéico é bem semelhante ao perfil encontrado por Ferreira e colaboradores (2004), onde foi demonstrada uma grande concentração de proteínas pertencentes ao grupo das globulinas (51%) e das albuminas (45%) nas sementes de Feijão Caupi com a predominância de proteínas de peso molecular de 80 a 60 kDa.

Assim, a comparação do perfil eletroforético do extrato protéico apresentado na Figura 02 com os dados descritos por Ferreira e colaboradores (2004) nos sugeriu que provavelmente as proteínas presentes no extrato utilizado pertencem aos grupos das globulinas e/ou albuminas. Entretanto para uma melhor caracterização e identificação das proteínas presentes no extrato estudado, devem ser conduzidos estudos de fracionamento como a precipitação com Sulfato de Amônio a 70% ou cromatografia em coluna, para obtenção de diferentes partições do extrato protéico além de estudos mais profundos baseados em técnicas avançadas de proteômica para identificação precisa das proteínas presentes neste extrato.

Posterior a obtenção e caracterização parcial do EPSV foram conduzidos, testes para a determinação da atividade antibacteriana, antiviral e citotóxica deste extrato. Os resultados indicaram que este extrato não apresentou nenhuma atividade antimicrobiana contra as bactérias testadas (Tabelas 02 e 03 e Figuras 03 e 04). No entanto, Franco e colaboradores (2006) purificaram de sementes de Feijão Caupi a CP-tionina II, um peptídeo de 5 kDa, com uma atividade bactericida na concentração inibitória mínima (MIC) de 128 µg/mL para *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e 64 µg/mL para *Escherichia coli* (ATCC 25922).

Sabe-se, que os componentes presentes num extrato são decorrência dos métodos e reagentes químicos utilizados para a sua obtenção, além do que geralmente o(s) componente(s) ativo(s) encontra(m)-se em baixas concentrações e ainda num extrato bruto este(s) pode(m) estar mais diluído(s) (REIS, 1996; POWERS; WHITAKER, 1997).

O fato do EPSV utilizado neste trabalho não ter demonstrado ações antibacterianas pode estar relacionado ao fato de as proteínas que exibem este tipo de atividade estar em menor concentração no extrato de sementes da variedade de Feijão Caupi estudado. Outros estudos envolvendo peptídeos isolados de sementes de feijão, bem como de sementes de outras leguminosas, também mostraram sucesso na determinação da atividade antimicrobiana de peptídeos e proteínas isolados por processos cromatográficos (GOMES et al., 1996).

Campos e colaboradores (2004) identificaram várias proteínas com atividade antibacteriana, como é o caso das glucanases, que possuem ação comprovada contra *Xanthomonas campestris* e *Ralstonia solanacearum*, bactérias fitopatogênicas que costumam causar doenças em leguminosas; Outros exemplos de proteínas com atividade antimicrobiana comprovada são as proteínas de transferência de lipídeos (LTPs), que agem inibindo o crescimento do *Staphylococcus aureus*, um conhecido patógeno humano (FERREIRA et al., 2004).

Outras proteínas possuem tanto atividade antibacteriana como antifúngica, como as sesquinas e as vigninas, que atuam inibindo o desenvolvimento dos fungos fitopatógenos *Fusarium oxysporum* e *Mycosphaerella arachidicola* e das bactérias *Escherichia coli* e *Proteus vulgaris* (GOMES et al., 2003, BLOCH et al, 2006; XAVIER-FILHO et al., 1989). Algumas possuem ação antifúngica e antiviral, como a liminina, esse peptídeo suprime o crescimento micelial de *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* e *Mycosphaerella arachidicola* e também reduz a atividade da

transcriptase reversa do vírus HIV 1 (WONG; NG, 2006).

O fato de não se observar nenhuma atividade antibacteriana pode estar relacionado a escolha do cultivar, uma vez que existem algumas cultivares de caupi, como por exemplo VITA-7 (EPACE 1), BR 3-Tracuateua, BR 5-cana verde, BR 7-Parnaíba, CE 315 (Tvu 2331), BR 1-Poty, BR 10-Piauí e BR 14-Mulato; que apresentam resistência contra alguns tipos de fungos e bactérias causadores de doenças na lavoura de feijão (CARDOSO, 2000).

Apesar da falta de atividade antibacteriana por parte EPSV, foi verificado nos testes para determinação da atividade antibacteriana sobre bactérias Gram Positivas, pelo método de difusão em ágar e determinação da CIM em caldo, a presença de um precipitado branco. A análise microscópica da cultura de várias espécies de bactérias Gram Positivas na presença do extrato detectou a presença de uma substância polimérica extracelular (EPS) (Figura 06).

As EPS são polímeros constituídos principalmente de polissacarídeos ou proteínas e tem como função proteger as bactérias do dessecamento, concentrar minerais e nutrientes, reduzir contato com moléculas hidrofóbicas, além de aumentar a fixação bacteriana na superfície colonizada (FLEMMING & WINGENDER, 2001).

Interessantemente, somente as bactérias Gram Positivas testadas neste estudo apresentaram a produção de quantidades significativas de EPS após a adição do extrato, o que provavelmente indica a presença de um mecanismo conservado de produção de EPS frente ao extrato protéico de Feijão Caupi nestas bactérias. Apesar da produção de EPS por todas as bactérias Gram positivas, não podemos afirmar que as EPS produzidas são idênticas.

Estudos químicos e/ou bioquímicos são necessários para a identificação da composição das EPS produzidas por estas bactérias. Certos grupos específicos de estreptococos, isolados de roedores e seres humanos foram reconhecidos como capazes de induzir a formação de placas gelatinosas, que são tipos de polímeros muito importantes na etiologia da cárie dental, placa gengival e doença periodontal (FRANK; BRENDDEL, 1966).

Os polissacarídeos funcionam como carboidratos de reserva, que são posteriormente catabolizados na ausência da fonte exógena de energia. Esses polímeros podem ser intracelulares e extracelulares. Dextranos e levanos são exemplos de polímeros extracelulares sintetizados por bactérias da flora bucal e parecem ser responsáveis pela aderência de grandes massas bacterianas as

superfícies dos dentes (SNYDER et al., 1995).

Bactérias fitopatogênicas produzem os EPS para proteger as bactérias do dessecação, reduzindo o contato com moléculas hidrofóbicas ou carregadas, também aumentam a fixação das bactérias aos tecidos da planta infectada (BREWIN, 1991).

Muito pouco é conhecido sobre o atual mecanismo de polimerização, mas acredita-se que ocorre na membrana citoplasmática e depois o EPS é transportado para fora da célula (SUTHERLAND, 1988). Os EPS são polímeros ácidos, compostos de arranjos lineares de repetições de unidades de carboidratos neutros e ácidos urônicos, bem como outros constituintes, tais como acetato, piruvato e succinato (WHITFIELD, 1988).

Antes da determinação da atividade antiviral realizou-se o teste de citotoxicidade para determinação da CMNT do EPSV, que seria caracterizado por morte celular, aumento no volume nuclear e celular ou extravasamento por lise da membrana citoplasmática. Os testes para determinação da citotoxicidade demonstraram que o EPSV não foi tóxico à cultura de células de *Aedes albopictus* C6/36 nas concentrações testadas. A ausência de citotoxicidade pode ser devido a baixa concentração substâncias tóxicas, como por exemplo, alcalóides, taninos e flavanóides, geralmente presentes em extratos brutos obtidos a partir de plantas (DI STASI, 1995).

Além da ausência de citotoxicidade, estas mesmas concentrações foram capazes de inibir a formação do efeito citopático induzido pela replicação de *Dengue vírus* nestas células (Tabela 04). Vários trabalhos relatam a presença de substâncias com atividade antiviral em extratos protéicos de feijões (ANJOS; LIN, 1984; WANG et al., 2001). Estudos com extratos obtidos a partir de plantas leguminosas apontam para substâncias tais como proteínas, peptídeos e dissacarídeos que irão inibir ou interferir com a replicação viral através da ligação com proteínas envolvidas na replicação viral (WONG; NG, 2005a; YE et al., 2000b).

Sierakowski e colaboradores (2003) isolaram dois dissacarídeos denominados de galactomananas, por conterem uma molécula de galactose e outra de manose, sendo um extraído a partir de sementes de *Mimosa scabrella* e o outro de sementes de *Leucaena leucocephala*. Ambos, após passarem por um processo de sulfatação, mostraram atividade antiviral contra o *Vírus da febre Amarela* (cepa YFV; BeH111) e contra o *Dengue vírus tipo I* (cepa Hawaii DEN-1) em testes

realizados tanto *in vivo* como *in vitro*. Já o estudo conduzido por Wang e colaboradores (2001) isolou a partir de sementes de *Phaseolus vulgaris* uma lectina homodimérica com peso molecular de 67kDa, que apresentou atividade antiviral contra o HIV-1, ao inibir a ação de duas proteínas importantes na fase de replicação, a transcriptase reversa e alfa-glicosidase. Essa lectina tem como característica o fato de possuir uma porção N-terminal diferente de outras lectinas encontradas na composição protéica das sementes de *Phaseolus vulgaris*, no entanto mostrou semelhanças com as proteínas da classe das chitinases.

Linhares e colaboradores (2007) testaram uma lectina extraída das sementes de *Parkia pendula* em células embrionárias de pulmão humano infectadas com o *Citomegalovirus Humano* (CMV). Esta lectina demonstrou atividade antiviral contra o CMV, uma vez que inibiu o efeito citopático produzido durante a replicação destes vírus, com uma redução da infectividade celular de aproximadamente 95%, com baixa citotoxicidade (25%). A redução na infectividade foi observada mesmo depois da pré-adsorção do vírus às células, o que sugere que esta ação ocorre após a penetração do vírus, na fase intracelular da replicação. Dias-Filho e colaboradores (2008) ao estudarem as propriedades de plantas da família das gramíneas isolaram um peptídeo de 2 kDa, extraído das sementes de *Sorghum L. bicolor*, que apresentou atividade antiviral contra *Herpesvírus Humano tipo 1* (HSV-1) e *Herpesvírus bovino* (BHV).

Os experimentos demonstram que o EPSV exerce sua atividade antiviral contra o mecanismo de entrada, desnudamento, replicação e/ou exocitose do DENV, uma vez que o extrato foi adicionado sempre após a adsorção viral do DENV. Sabe-se que os vírus do dengue têm tropismo por monócitos/macrófagos e essas células são os maiores sítios de replicação viral (ALLISON, 1995; CHAMBERS, 1990). O vírus se liga às células hospedeiras permissivas via endocitose mediada por receptor. A internalização e acidificação no endossomo e fusão das membranas viral e vesicular permitem a entrada do nucleocapsídeo no citoplasma e desempacotamento do genoma. O próximo passo é a replicação do genoma e montagem de novas partículas virais (MUKHOPADHYAY et al., 2005).

Dentre as proteínas virais a mais importante é a glicoproteína E (51-60 kDa), que é uma proteína do envelope viral e tem um papel chave nos processos de ligação ao receptor nas células hospedeiras, hemaglutinação de células sangüíneas, indução de resposta imune protetora, fusão específica de membrana e montagem

viral (GUZMÁN; KOURÍ, 2004). Estudos posteriores deverão ser conduzidos para o fracionamento do extrato protéico e identificação de proteínas por proteômica para verificar quais proteínas do Feijão Caupi estão envolvidas na inibição da replicação do DENV nestas células. Assim como identificar em qual etapa da replicação viral ocorre esta interrupção, bem como o sítio de ação dessas proteínas.

Apesar da ausência de atividade antibacteriana no EPSV, este ainda apresenta duas aplicações biotecnológicas. A primeira é a caracterização da composição dos EPS produzidos a partir do cultivo de bactérias Gram positivas na presença do extrato. A partir desta caracterização é possível inferir uma possível aplicação industrial ou médica destes EPS. A segunda é o isolamento e caracterização da proteína responsável pela atividade antiviral deste extrato sobre a replicação de DENV. Portanto, o extrato protéico de Feijão Caupi pode ser uma alternativa barata e eficaz tanto para o desenvolvimento de novos biopolímeros quanto para o desenvolvimento de novos fármacos anti-dengue.

6 CONCLUSÕES

- O EPSV apresenta atividade antiviral contra a replicação de DENV-3 em células C6/36.
- O EPSV não apresenta atividade antibacteriana sobre as bactérias Gram positivas, e Gram negativas testadas no presente trabalho.
- Bactérias Gram Positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina MR-98, *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e *Enterococcus faecalis* resistente Vancomicina (VAN-A 7426), cultivadas na presença do EPSV produzem uma substância extracelular polimérica.

7 REFERÊNCIAS

AGRIOS, G. N.; **Plant Pathology 3ed**, Academic Press, New York, p.803, 1998.

ALGHALI, A. M.; Integrated pest management strategy for cowpea production under residual soil moisture in the Bida area of northern Nigeria. **Tropical Pest Management**. v.33 p.224-227, 1991.

ALLISON SL et al. Oligomeric rearrangement of tick-borne encephalitis virus envelope proteins induced by an acidic pH. **Journal of Virology**, v.69, p.695-700, 1995.

ANJOS, J. R. N.; LIN, M. T.; Bud Blight of soybeans caused by cowpea severe mosaic virus. **Plant Disease**, v.68, p.405-407, 1984.

BARTENSCLAGER, R.; MILLER, S. Molecular aspects of Dengue virus replication. **Future Microbiology**, London, v. 3, n. 2, p. 155-165, 2008.

BATES, I.; FENTON, C.; GRUBER, J.; LALLOO, D.; MEDINA LARA, A.; SQUIRE, S. B.; THEOBALD, S.; Vulnerability to malaria, tuberculosis, and HIV/AIDS infection and disease. Part 1: determinants operating at individual and household level. **Lancet Infect Disease**, v. 4, p.267-77. 2004.

BEMHAMOU, N.; BROGLIE, K.; BROGLIE, R.; CHET, I.; Antifungal effect of bean endochitinase on *Rhizoctonia solani*: ultrastructural changes and cytochemical aspects of chitin breakdown. **Canadian Journal of Microbiology**. v.39, p.318-328, 1993.

BLOCH, C.; PRATES, M. V.; MENDES, P. A. M.; LEITE, J. R.; MURAD, A. M.; FRANCO, O. L.; Identification of a cowpea c-thionin with bactericidal activity **FEBS Journal**., v.273, p.3489-3497, 2006.

- BREWING, N. J.; Development of the legume root nodule. **Annual Review Cell Biology**, v.7, p.191-226, 1991.
- BROEKAERT, W. F.; TERRAS, F. R. G.; CAMMUE, B. P. A.; OSBORN, R. W.; Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system, **Plant Physiology**. v.108, p.1353- 358, 1995.
- BROEKAERT, W. F.; CAMMUE, B. P. A.; DE BOLLE, M. F. C.; THEVISSSEN, K.; DE SAMBLANX, G.; OSBORN, R. W.; Antimicrobial peptides from plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v.16, p.297-323, 1997.
- BUFFON, M. C. M.; **A saúde bucal e a fitotecnia: Ações interdisciplinares do odontólogo e do engenheiro agrônomo**. Curitiba, 96f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Setor de Ciências Agrárias, UFPR, 2002.
- CALIXTO, J. B.; Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal and Biological Research**, V. 33, p. 179-189, 2000.
- CAMPOS, A. D.; FERREIRA, A. G.; HAMPE, M. M. V.; ANTUNES, I. F.; BRANÇÃO, N.; SILVEIRA, E. P.; OSÓRIO, V. A.; AUGUSTIN, E.; Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v.39, n.7, p.637-643, 2004.
- CARDOSO, M. J.; **A cultura de Feijão Caupi no Meio-Norte do Brasil**. Teresina Embrapa meio-Norte. P.55-64, Embrapa Meio-Norte. Circular técnica, n.28, 2000.
- CARVALHO AO, TAVARES OLM., SANTOS IS, CUNHA M, GOMES VM. Antimicrobial peptides and immunolocalization of a LTP in *Vigna unguiculata* seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.39, p.137-146, 2001.
- CHAMBERS T. J.; HAHN, C. S.; GALLER, R.; RICE, C. M.; Flavivirus Genome

Organization, Expression, and Replication. **Annual Review of Microbiology** v.44, p.649-688, 1990.

CIRILO, V. K.; **Manual de Plantas Mediciniais**; Ed. Assessorar, Francisco Beltrão, Paraná, p. 12, 1993.

CLERQ, E.; Antivirals and antiviral strategies. **Nature reviews microbiology**. v.2, p.704-720, 2004.

CLYDE, K.; KYLE, J. L.; HARRIS, E.; Recent Advances in Deciphering Viral and Host Determinants of Dengue Virus Replication and Pathogenesis. **Journal of Virology**, Baltimore, v.80, n. 23, p. 11418-11431, 2006.

CORDEIRO, M. T. **Evolução da dengue no estado de Pernambuco**, 1987 – 2006: epidemiologia e caracterização molecular dos sorotipos circulantes. 2008. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2008.

CORDELL, G. A.; Changing strategies in natural products chemistry. Oxford, **Phytochemistry**., v.40, p.1585, 1995.

COWAN, M. M.; Plants products as antimicrobials agents. 1999. **Clinicals Microbiology Reviews**, v.12, p.564-582, 1999.

CRUZ, G. L.; Dicionário de Plantas Úteis do Brasil. Rio de Janeiro, **Civilização Brasileira**, 2 ed. 1982.

DE PAULA, S. O.; FONSECA, B. A. L.; Dengue: A Review of the Laboratory Tests a Clinician Must Know to Achieve a Correct Diagnosis. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 8, n. 6, p. 390-398, 2004.

DE SIMONE, T. S. et al. Dengue virus surveillance: the co-circulation of DENV-1, DENV-2 and DENV-3 in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.98, p. 553-562,

2004.

DIAS, L. C. P.; SHARAPIN, N.: **Comércio exterior de matérias-primas farmacêuticas de origem vegetal** – Panorama da situação brasileira, p. 20, 1996.

DIAS-FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V.; UEDA-NAKAMURA, T.; CORTEZ, D. A.; CAMARGO-FILHO, I.; Antiviral activity and mode of action of a peptide isolated from Sorghum bicolor. **Phytomedicine.**, v.15, p.202-208, 2008.

DI STASI, L.C. **Plantas medicinais: Arte e ciência.** São Paulo, Ed. Unesp, p.108-119, 1995.

EAMES, A. J., **Morphology of the Angiosperms.** McGraw Hill Books Co., New York, 1961.

ELISABETSKY, E.; COSTA CAMPO, C.; Medicinal plant genetic resources and international cooperation: the Brazilian perspective. **Journal of ethnopharmacology**, v.51, p.110-115, 1996.

FERNANDES, J. B.; HOLANDA, J. S.; SIMPLICIO, A. A.; BEZERRA NETO, F.; TORRES, J. & REGO NETO, J. Comportamento ambiental e estabilidade produtiva de cultivares de caupi no Rio Grande do Norte. **Pesquisa Agropecuária Brasileira.**, v.25, p.1555-1560, 1990.

FERREIRA, R. B.; FREITAS, R. M.; TEIXEIRA, A. R.; Characterization of the Proteins from Vigna unguiculata Seeds. *Journal of Agric. And F. Chem.*, v.52, p.1682-1687, 2004.

FERREIRA, M. G.; HUNGRIA, M.; Recovery of soybean inoculant strains from uncropped soils in Brazil. **Field Crops Research**, v.79, p.139-152, 2002.

FILHO, V. C.; & YUNES, R. A.; Estrategies for obtaining pharmacologically active compounds from medicinal plants. concepts about structural modification for

improve the activity. **Química Nova**, v.21, p.99-105, 1998.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J.; Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPS) – part 1: structural and ecological aspects. **Water Science Technology**, v.43, p.1-8, 2001.

FRENCH, G. L.; Clinical impact and relevance of antibiotic resistance. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v.57: p.1514-1524, 2005.

FRANCO, O. L.; MURAD, A. M.; LEITE, J. R.; MENDES, P. A.; PRATES, M V.; BLOCH, C. Jr.; Identification of a cowpea γ -thionin with bactericidal activity. **FEBS Journal**, v. 273, p. 3489-3497, 2006.

FRANK, R. M.; BRENDEL, A.; Ultrastructure of the approximal plaque and the underlying normal and carious enamel. **Archives of Oral Biology**, v.11, p.883, 1966.

FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; BARRETO, P. D.; SANTOS, C. A. F.; **Melhoramento genético de caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] na região do Nordeste**. Disponível em: <<http://www.cpatsa.embrapa.br>>. Acesso em: 23 jul. 2009.

FREIRE FILHO, F. R.; SANTOS, A. A.; CARDOSO, M. J.; SILVA, P. H. S.; RIBEIRO, V. O.; **BR 17 Gurguéia: nova cultivar de caupi com resistência a vírus para o Piauí**. Teresina : Embrapa-CPAMN comunicado técnico, 61, p.6, 1994.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (Brasil). **Dengue**: Aspectos Epidemiológicos, Diagnóstico e Tratamento. Brasília, DF, p.1-20, série A, Normas e Manuais Técnicos, n. 176, 2002.

GARCIA-OLMEDO, F.; RODRIGUEZ-PALENZUELA, P.; MOLINA, A.; ALAMILO, J.M.; LÓPEZ-SOLANILLA, E.; BERROCAL-LOBO, M.; POZA-CARRIÓN, C.; Antibiotic activities, hydrogen peroxide and peroxytrite in plant defense. **FEBS**, v.498, p.219- 222, 2001.

- GIBBONS, S.; Phytochemicals for bacterial resistance--strengths, weaknesses and opportunities. **Planta Medica Journal** , v.74, p.594-602, 2008.
- GIBBONS, R. V.; VAUGHN, D. W.; Dengue: an escalating problem. **BMJ (British Medical Journal)**, London, v.324, p.1563-1566, 2002.
- GIOSO, M. M.; PEREIRA, C. S.; CASSINI, S. T. A.; MESSAGE, D.; FARIA, J. E.; PINTO, M. S.; Effect of green propolis extracts on patogenic bacteria isolated from milk of cows with mastitis. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.38, n.6, p.278-283, 2001.
- GOMES V. M.; OLIVEIRA A. E. A.; XAVIER-FILHO J. A.; chitinase and a β -1,3-glucanase isolated from the seeds of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) inhibit the growth of fungi and insect pests of the seed. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.72, p.86-90, 1996.
- GOMES, V. M.; OKOROKOV, L. A.; ROSE, T. L.; FERNANDES, K. V. S.; XAVIER-FILHO, J.; Legume vicilins (7S storage globulins) inhibit yeast growth and glucose stimulated acidification of the medium by yeast cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1379, p.207-216, 1998.
- GOMES, V. M.; CARVALHO, A. O.; DIZ, M. S. S.; Purification and molecullar mass determination of a lipid transfer protein exuded from *Vigna unguiculata* sedds. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.15, p.171-175, 2003.
- GOTTLIEB, O. R.; BORIN, M. R. M. B.; Natural Products research in Brasil. **Ciência e Cultura**, v.49, n.5, p.315-320, 1997.
- GRAHAM, M. A.; RAMIREZ, M.; VALDEZ-LOPEZ, O.; LARA, M.; TESFAYE, M.; VANCE, C. P.; HERNANDEZ, G.; Identification of candidate phosphorus stress induced genes in *Paseolus vulgaris* L. through clustering analysis across several plant species. **Functional Plant Biology**, v.33, n.8, p.789-797, 2006.
- GUBLER, D. J. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health,

social and economic problem in the 21st century. **Trends in Microbiology**, Oxford, v. 10, p. 100-103, 2002.

GUZMÁN, M. G.; KOURI, G. Dengue diagnosis, advances and challenges. **International Journal of Infectious Diseases**, Hamilton, v.8, p.69-80, 2004.

HAMBURGER, M.; & HOSTETTMANN, K.; Bioactivity in plants: The link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, v.30, p.3864 -3874, 1991.

HALSTEAD, S. B. Dengue. **The Lancet**, London, v.370, p. 1644-1652, 2007.

HARDY, K. J.; HAWKEY, P. M.; GAO, F.; OPPENHEIM, B.A.; Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in the critically ill. **British Journal of Anaesthesia**. v.92, p.121- 130, 2004.

HENCHAL, E. A.; PUTNAK, J. R.; The dengue viruses. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 3, n. 4, p.376-396, 1990.

HEYWOOD, V. H.; Flowering Plants of the World. Covers angiosperm families worldwide with beautiful color paintings, distribution maps and info. on morphology & economic importance. **Mayflower Books**, New York, NY.p.330-336, 1978.

HORWITZ, S. B.; How to make taxol from scratch. **Nature.**, v.367, p.593, 1994.

JACK, H. W.; NG, T. B.; Lunatusin, a trypsin-stable antimicrobial peptide from lima beans (*Phaseolus lunatus* L.). **Peptides**, v.26, n.11, p.2086-2092, 2005.

JOLY, A. B., **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo, Companhia Editora Nacional, p.371-82, 1966.

KADER, J. C.; Lipid-transfer protein in plants. *Annu. Rev Plant Physiol.* **Plant Molecular Biology.**, v.47, p.627-654, 1996.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHERECKENBERGER, P. C.; WINN, W. J.; **Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5ed.**

Philadelphia, Pennsylvania: Lippincott & Wilkins Publication, p.98-112, 1997.

LAEMMLI, U. K.; FRAVE, M.; Gel eletrophoresis of proteins. **Journal of Molecular Biology**, v.80, p.575-599, 1973.

LANE, J. A.; MOORE, T. M. H.; CHILD, D. V.; CARDWELL, K. F.; Characterization of virulence and geographic distribution of *Striga gesnerioides* on cowpea in West Africa. 1996; **Plant Disease.**, v.80, p.299-301, 1996.

LENETT, E. H., Schmidt, N. J. **Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections.** 5.ed. Washington.: Interdisciplinary Books & Periodicals.,1979.

LEUNG, E. H.; WONG, J. H.; Ng, T. B.; Concurrent purification of two defense proteins from French bean seeds: a defensin-like antifungal peptide and a hemagglutinin. **Journal of Peptide Science**, v.14, p.349-53, 2008.

LIMA, J. A.; NELSON, M. R.; Etiology and epidemiology of mosaic of cowpea in Ceará Brasil., **Plant Disease Reports**, v.61, p.864-867, 1977.

LIMA, J. A. A.; OLIVEIRA, L. F. S.; Comportamentos de genótipos de caupi em relação aos dois principais vírus que ocorrem no Ceará. **Fitopatologia Brasileira**, n.11, p.151-161, 1986.

LIMA, J. A.; SANTOS, A. A.; Vírus que infestam o caupi no Brasil. in J.P.P. de Araújo and E.E. Watt. org O Caupi no Brasil. **EMBRAPA-CNPAF/Ibadan, IITA.** p.507-545, 1988.

LINHARES, M. I.; COELHO, L. C.; CINTRA, E. A.; FAVACHO, A. R.; In vitro activity evaluation of Parkia pendula seed lectin against human cytomegalovirus and herpes virus 6. **Bologicals**, v.35, p.189-194, 2007.

LOHNER, K.; STAUDEGGER, E.; **Are we on the threshold of the post-antibiotic era? In Development of novel antimicrobial agents: Emerging strategies.** Lohner, K. (ed), Horizon Scientific Press, England., pp 1-15, 2001.

LORENZI, H.; **Árvores brasileiras:** Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas no Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 1992.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR., V. F.; Medicinal plants: the need for multidisciplinary scientific studies. **Quimica Nova**, v.25, n.3, p.429-438, 2002.

MATOS FILHO, C. H. A.; **Análise genética de caracteres relacionadas a arquitetura de planta em Feijão-Caupi (*Vigna unguiculata (L.) Walp.*).** Dissertação – Mestrado em Produção Vegetal – Universidade Federal do Piauí, p.57, 2006.

MCDOWELL, J. M.; DANGL, J.L.; Signal transduction in the plant immune response. **Trends in Biochemical Sciences**, v.25, p.79-82, 2000.

MARK, J. M.; Legumes and soybean. Overview of their nutritional profiles and health effects. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.70, p.439-50, 1999.

MARTÍNEZ, J. L.; BAQUERO F.; ANDERSSON D. I.; Predicting antibiotic resistance. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.5, p.958-965, 2007.

MOREIRA, L. B.; Princípios para uso racional de antimicrobianos. **Revista da AMRIGS.**, v.48, p.73-152, 2004.

MITTA, G.; VANDENBULCKE, F.; HUBERT, F.; SALZET, M.; ROCH, P.; Involvement of mytilins in mussel antimicrobial defense. **Journal of Biological Chemistry**, v.275, p.12954–12962, 2000.

MUKHOPADHYAY, S.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G. A structural perspective of the Flavivirus life cycle. **Nature Reviews Microbiology**, London, v.3, p.13-22,

2005.

MURDOCK, L. L.; HUESING, J. E.; NIELSEN, S. S.; PRAT, R. C.; SHADE, R. E.;
Biological effects of plant lectins on the cowpea weevil. **Phytochemistry.**, v.29,
p.5-8, 1990.

MURRAY, D. R.; MACKENZIE, K. F.; VAIRNHOS, F.; PEOPLES, M. B.; ATKINS, C.
A.; PATE, J. S. Electrophoretic studies of the seed proteins of cowpea, *Vigna
unquiculata* (L.) Walp. **Pflanzenphysiologie.**, v.109, p.363-370, 1983.

NELSON, E. B.; HSU, J. S. T.; Nutricional factors affecting responses of sporangia of
Pythium ultimum to germination stimulants. **Phytopathology.**, v.84, p.677-683,
1994.

(NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test; Approved
Standard-Eighth Edition. NCCLS document M2-AB [ISBN 1-56238-485-6].
NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania, USA, 2003a).

(NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That
Grow Aerobically; Approved Standard-Sixth Edition. NCCLS document M7-A6
[ISBN 1-56238-486-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne,
Pennsylvania, USA, 2003b).

OLIVEIRA, J. T. A.; Peroxidase, b-1,3-glucanase, polyphenoloxidase and chitinase
activities in the Cowpea Genotypes BR 14 and BR 17, infected with *Fusarium
solani*. **XXXIII REUNIÃO ANUAL DA SBBq.** 2004.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Dengue hemorrágico:** diagnóstico,
tratamento e controle. Genebra, 1987.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Pautas para la evolución de
Medicamentos Herbarios.** Ginebra, 1991.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Dengue Prevention and control.** Geneva,
2002.

PEREIRA, R. C. A.; MARINHO, J. T. S.; COSTA, J. G.; Caracterização botânica,

morfológica e agrônômica de cultivares de caupi coletadas no Estado do Acre. Rio Branco; **EMBRAPA-CPAF/AC. 12p. (EMBRAPA-CPAF/AC. Boletim de Pesquisa, 17)**, 1997.

POWERS J. R.; WHITAKER, J. R.; Purification and some physical and chemical properties of red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) alpha-amylase inhibitor., **Journal of Food Biochemistry**. v.1, p.217, 1977.

RAO, P. F.; YE, X. Y.; NG, T. B.; WU, J. H.; WANG, S. Y.; A non-specific lipid transfer protein with antifungal and antibacterial activities from the mung bean. **Peptides**., v.25, p.1235-1242, 2004.

REED, L. J.; MUENCH, H.; A simple method of estimating fifty percent endpoints. *The American Journal of Hygiene* v.27, p.493-497, 1938.

REIS, M. S.; Manejo sustentado de plantas medicinais em ecossistemas tropicais. In: DI STASI, L. C. (Org.) **Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: UNESP, p.215-217, 1996.

ROGEROA, S.; LUGÃOA, A. B.; IKEDAB, T. I.; CRUZ, A. S.; Teste in vitro de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias. **Materials Research**, v.6, n.3, p.317-320, 2003.

RIOS, G. P.; Reação de cultivares de caupi (*Vigna unguiculata*) à *Sphaceloma sp.* **Fitopatologia Brasileira**, v.8, p.251-258, 1983.

ROTHMAN, A. L.; Dengue: defining protective versus pathologic immunity. **The Journal of Clinical Investigation, Ann Arbor**, v. 113, p. 946-951, 2004.

ROTHMAN, A. L.; ENNIS, F. A.; Immunopathogenesis of Dengue hemorrhagic fever. **Virology**, New York, v. 257, p. 1-6, 1999.

SALES, M. P.; GOMES, V. M.; FERNANDES, K. V. S.; XAVIER-FILHO, J.; Chitin-binding proteins from cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds. **Brazilian Journal of**

Medical and Biological Research, v.29, p.319-326, 1996.

SANTOS, C. A. F.; ARAUJO, F. P.; Produtividade e morfologia de genótipos de caupi em diferentes densidades populacionais irrigado e de sequeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, p.1977-1984, 2000.

SARTORI, M. R. K.; PRETTO, J. B.; BELLA CRUZ, A.; BRESCIAN, L. F. V.; YUNES, R. A.; SORTINO, M.; ZACCHINO, S. A.; CECHINEL-FILHO, V.; Antifungal activity of fractions and two pure compounds of flowers from *Wedelia paludosa* (*Acmela brasiliensis*) (Asteraceae). **Pharmazie**, v. 58, p. 567-569, 2003.

SIERAKOWSKI, M. R.; GORIN, P. A.; COIMBRA, T. L.; ROCCO, J. M.; WOLLINGER, W.; ONO, L.; In vitro and in vivo antiviral properties of sulfated galactmannans against yellow fever virus (Be H11 strain) and dengue 1 virus (Hawaii strain). **Antiviral Research**, v.60, p.201-208, 2003.

SILVA, P. S. L.; OLIVEIRA, C. N.; Rendimentos de feijão verde e maduro de cultivares de caupi. **Horticultura Brasileira, Brasília**, v.11, p.133-135, 1993.

SIMONI, I.C. *et al.* A study on the antiviral characteristics of *Persea americana* extracts against Aujeszky's disease virus. **Biomedical Letters**, v.54. p.173-181, 1996.

SNYDER, M. L.; HACKEDORN, H. M.; MARTIN, D. O.; JOHNSTON, D. D.; The synthesis of mucinous polysaccharides from Sucrose by oral bacteria, **Journal of Dental Research**, v.34, p.368, 1955.

SOARES, M. J. S.; SILVA,-CARVALHO, M. C.; FERREIRA-CARVALHO, B. T.; FIGUEIREDO, A. M. S.; Spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* belonging to the Brazilian epidemic clone in a general hospital and emergence of heterogenous resistance to glycopeptide antibiotics among these isolates. **Journal of Hospital Infection**, v.44: p.301-308, 2000.

SONNANTE, G.; SPINOSA, A.; MARANGI, A.; PIGNONE, D.; Isozymes and RAPD analysis of the genetic diversity within and between *Vigna luteola* and *V. marina*. **Annals of Botany**, v.80, p.741-746, 1997.

SUTHERLAND, I. W.; Bacterial surface polysaccharides: structure and function. **International Review of Cytology**, v. 113, p. 187-231, 1988.

TEMPESTH, M. S. & STEVEN, R. K.; Ethnobotany as a source for new drugs. **Annual Reports in Medical Chemistry**, v.33, p.325-330, 1994.

TOLEDO, A. C.; HIRATA, L. L.; BUFFON, M. C. M.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G.; Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Revista Lecta**, v.21, n.2, p.7-13, 2003.

TORTORIELLO, J.; MECKES-FISCHER, M.; VILARREAL, M. L.; BERLIN, B.; BERLIN, E.; *Evaluation of the calcium-antagonist, antidiarrhoeic and central nervous system activities of Baccharis serraefolia*. **Phytomedicine**, v.2, p.57, 1995.

UNANDER, D. W.; WEBSTER, G. L.; BLUMBERG, B. S.; Usage and bioassays in *Phyllanthus* (Euphorbiaceae). IV. Clustering of antiviral uses and other effects. **Journal of Ethnopharmacology**, v45, p.110-120, 1995.

VIEGAS Jr, C.; Terpenes with insecticidal activity: an alternative to chemical control of insects. **Quim. Nova**, v.26, n.3, p.390-400, 2003.

WANG, J.; TSANG, P. W.; NG, T. B.; YE, X. Y.; Isolation of a homodimeric lectin with antifungal and antiviral activities from red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. **Journal of Protein Chemistry**, v.20, p.367-375, 2001.

WILLIS, J. C.; **A Dictionary of the Flowering Plants and Ferns**. Cambridge, Cambridge University Press, 8ed. 1973.

WHITFIELD, C.; Bacterial extracellular polysaccharides. **Canadian Journal**

Microbiology, v.34, p.415-420,1988.

WONG, J. H.; NG, T. B.; Sesquin, a potent defensin-like antimicrobial peptide from ground beans with inhibitory activities toward tumor cells and HIV-1 reverse transcriptase. **Peptides**, v.26, p.1120–1126, 2005a.

WONG, J. H.; NG, T. B.; Lunatusin, a trypsin- stable antimicrobial peptide from lima beans (*Phaseolus lunatus L.*). **Peptides.**, v.26, p.2086-2092, 2005b.

WONG, J. H.; NG, T. B.; Limenin, a defensin-like peptide with multiple exploitable activities from shelf beans. *Journ Pept Sci.*, v.12, p.341-346, 2006.

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 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.

YE, X.Y.; NG, T.B.; RAO, P.F.; A Bowman-birk-type trypsin-chymotrypsin inhibitor from broad beans. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.289, p.91- 96, 2001.

Y.E., X.Y.; WANG, H.X.; NG, T.B.; Sativin, a novel antifungal miraculin-like protein isolated from legumes of the sugar snap *Pisum sativum* var. Macrocarpon. **Life Sciences.**, v.67, p.775-781, 2000.

YE, X.Y.; WANG, H.X.; NG, T.B.; Structurally dissimilar proteins with antiviral and antifungal potency from cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds. **Life Sciences.**, v.67 p.3199-3207, 2000.

Yu, I.; ZHANG,W.; HOLDAWAY, H. A.; LI, L.; KOSTYUCHENKO, V.; CHIPMAN, P.; KUHN, R.; ROSSMANN, M.; CHEN, J.; Structure of the immature Dengue Vírus at low pH primes proteolytic maturation. **Science**. v.319, n.5871, p.1834-1837, 2008

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)