

GILENO VITOR MOTA LIMA

METABOLISMO ANTIOXIDATIVO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE LÁTEX DE  
MANGABEIRA (*Hancornia speciosa* Gomes)

RECIFE, 2014

GILENO VITOR MOTA LIMA

METABOLISMO ANTIOXIDATIVO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE LÁTEX DE DE  
MANGABEIRA (*Hancornia speciosa* Gomes)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal Rural de Pernambuco como parte dos requisitos para obtenção do grau de doutor.

ORIENTAÇÃO: Dr<sup>a</sup> Ana Lúcia Figueiredo Porto

CO-ORIENTAÇÃO: Dr<sup>a</sup> Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares

Dr<sup>a</sup> Terezinha Rangel Camara

RECIFE, 2014

## Ficha catalográfica

L732m Lima, Gileno Vitor Mota  
Metabolismo antioxidativo e atividade biológica de látex  
de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) / Gileno Vitor  
Mota Lima. – Recife, 2014.  
130 f. : il.

Orientadora: Ana Lúcia Figueiredo Porto.  
Tese (Doutorado em Botânica) – Universidade Federal  
Rural de Pernambuco, Departamento de Biologia, Recife,  
2014.  
Inclui referências e anexo(s).

1. Atividade antimicrobiana 2. Enzimas antioxidativas  
3. *Hancornia speciosa* 4. Látex 5. Sistema de duas  
fases aquosas I. Porto, Ana Lúcia Figueiredo, orientadora  
II. Título

CDD 581

GILENO VITOR MOTA LIMA

METABOLISMO ANTIOXIDATIVO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE LÁTEX DE DE  
MANGABEIRA (*Hancornia speciosa* Gomes)

Tese defendida e aprovada pela banca examinadora em: 27/02/2014

---

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Ana Lúcia Figueiredo Porto

Orientadora / Presidente

---

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares

Co-orientadora

---

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Terezinha Rangel Camara

Co-orientadora

---

1º examinador

---

2º examinador

---

3º examinador

---

4º examinador

RECIFE, PE - FEVEREIRO, 2014

*“O dia está na minha frente esperando para ser o que eu quiser. E aqui estou eu, o escultor que pode dar forma a este dia.”*

*Albert Einstein*

*Dedico esta tese à minha mãe e a  
minha esposa pelo amor e apoio  
incondicional em todos os momentos.*

## AGRADECIMENTOS

Para se chegar a algum lugar, independente da distância a se percorrer, é preciso saber onde se está e aonde se quer chegar, dar o primeiro passo. E em cada passo dado nessa nossa jornada encontramos pessoas que têm alguma importância, mesmo que não saibamos reconhecê-la de imediato. Não se caminha ou se chega a algum lugar sozinho. Gostaria de deixar registrado que seria impossível citar todas as pessoas que tiveram importância desde o início da minha formação profissional e pessoal, porém sei o quão importante foram e são para mim e espero poder agradecer, de alguma forma, a cada uma delas.

Grato a Deus pela vida e por tudo.

À Deus novamente, por conceder-me uma família a qual posso amar e ser fortalecido na reciprocidade do mesmo amor, por ser sempre tão incentivadora e entender minha ausência por tantos anos. À minha mãe, Maria Vitória Mota que, com o carinho de mãe e de pai, ao longo de minha vida me transmitiu lições de honestidade, respeito e perseverança (você é meu maior exemplo de força);

À Gilvany Rodrigues de Andrade, minha esposa que sempre está ao meu lado (desde o listão do vestibular, graduação, mestrado, doutorado e por todo sempre) me dando todo o carinho, amor e apoio que precisei ao longo dessa jornada.

À minha querida orientadora, Profa. Ana Lúcia Figueiredo Porto, pela confiança depositada, acolhida, incentivo, ensinamentos, amizade, apoio, estímulo... enfim por tudo!

Às Professoras Maria Taciana e Terezinha Camara pela co-orientação, pelas valiosas colaborações e amizade.

Às Professoras Lilia Willadino e Cláudia Ulisses pela co-orientação ao longo da minha vida acadêmica, pelas valiosas colaborações e amizade.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco - FACEPE pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal Rural de Pernambuco representado pela coordenadora Dra. Ariadne Moura.

À secretária do Programa de Pós-Graduação em Botânica Kênia Muniz pelo entusiasmo constante em ajudar e escutar nossas aflições nos momentos mais críticos.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, pela oportunidade de realização do curso de Doutorado.

À EMEPA / PB (Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba) na pessoa do Eng. Agrônomo Ivaldo Antônio de Araújo pela constante disposição na coleta do látex de mangabeira.

À Ana Karoline pela ajuda, amizade e colaboração.

Ao amigo Thiago Pajeú pelos ensinamentos, amizade e paciência.

Aos amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (Francisco Wellington, Gemima Melo, Marciana Moraes).

Aos estagiários e bolsistas (ICs, mestrandos, doutorandos e PNPDs) do Laboratório de Tecnologias de Bioativos pelos momentos de trabalho e descontração.

Ao povo brasileiro, principalmente à massa trabalhadora e aos que não tiveram oportunidades de estudo, que no compromisso do pagamento de seus impostos, torna possível a educação formal de tantos outros brasileiros.

Como havia predito, várias pessoas estiveram envolvidas neste trabalho, não só de forma diretamente científica ou na labuta do trabalho, mas também muitas que contribuíram de forma significativa, cada uma ao seu modo e em seu momento, para que este trabalho obtivesse êxito.

Muito obrigado mesmo!!

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

**Figura 1.** Banco de Germoplasma de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) da EMEPA (PB) Fonte: Arquivo Pessoal.

**Figura 2.** Geração e interconversão de espécies reativas de oxigênio (EROS). Fonte: Gupta et al. 2011.

**Figura 3.** Reação de Fenton ou Haber-Weiss. Fonte: Resende et al. 2003.

**Figura 4:** Coagulação do látex de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) logo após incisão. Fonte: Arquivo Pessoal.

**Figura 5:** (A) Início da exudação do látex após incisão; (B) Coleta do látex. Fonte: Arquivo Pessoal.

**Tabela 1.** Origem dos acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Mangabeira da Emepa-PB, João Pessoa, 2004.

**Tabela 2.** Acessos promissores do BAG-Mangaba da Emepa-PB quanto à produção de frutos. Estação Experimental de Mangabeira, João Pessoa, PB. 1995/2000

### Capítulo 1

**Fig. 1.** Pluviometry of João Pessoa (PB) city in the quarter of October, November and December in 2010, 2011 and 2012 years. Means followed by the same letter do not differ statistically among themselves by Tukey test at 5% probability.

**Fig. 2.** SOD activity (A), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content (B), APX activity (C) and PPO activity (D) in the Pernambuco (PE), Paraíba (PB) e Rio Grande do Norte (RN) of mangaba tree (*Hancornia speciosa* Gomes) access latex under conditions of water deficit in the 2010, 2011 and 2012 sampling periods. Means followed by the same letter do not differ statistically among themselves by Tukey test at 5% probability. Uppercase letters compare sampling periods and lowercase letters compare accesses of mangaba tree.

### Capítulo 2

**Figura 1.** Teste de atividade antimicrobiana da solução padrão do látex de mangabeira frente ao micro-organismo padrão *Staphylococcus aureus* (UFPEDA 02) nas concentrações de 1,6% -100%.

**Figura 2.** Teste de atividade antimicrobiana da solução padrão do látex de mangabeira frente aos isolados de mastite bovina do gênero *Staphylococcus* nas concentrações de 50%-100%. (2A-2C) Experimento de concentração mínima inibitória; (2D-2F) Experimento de concentração mínima bactericida.

**Figura 3.** Teste de atividade antimicrobiana da solução padrão do látex de mangabeira frente aos isolados de mastite caprina do gênero *Staphylococcus* nas concentrações de 50%-100%. (3A-3C) Experimento de concentração mínima inibitória; (3D-3F) Experimento de concentração mínima bactericida.



Tabela 1. Atividade antimicrobiana de solução padrão de látex de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) medida pelo halo de inibição (mm) frente a isolados de *Staphylococcus* spp. causadores da mastite bovina.

Tabela 2. Atividade antimicrobiana de solução padrão de látex de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) medida pelo halo de inibição (mm) frente a isolados de *Staphylococcus* spp. causadores da mastite caprina.

### Capítulo 3

**Tabela 1:** Resultados obtidos no planejamento fatorial 3<sup>3</sup>

**Figura 1:** Efeito da interação entre a  $MM_{PEG}$ ,  $C_{PEG}$  e  $C_{FOSF}$  sobre a variável resposta fator de purificação da protease da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). \*Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas nas categorias de colunas e minúsculas nas colunas agrupadas não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. Letras maiúsculas comparam colunas e as letras minúsculas comparam linhas.

**Figura 2:** Efeito da interação entre a  $MM_{PEG}$ ,  $C_{PEG}$  e  $C_{FOSF}$  sobre a variável resposta percentual de rendimento da protease da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). \*Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas nas categorias de colunas e minúsculas nas colunas agrupadas não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. Letras maiúsculas comparam colunas e as letras minúsculas comparam linhas.

**Figura 3:** Efeito do pH na atividade (A) e estabilidade (B) do EB e EPP obtidos a partir do látex da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) à 25°C durante 60 minutos de incubação, tampão citrato-fosfato 0,2 M pH 4,0 e 5,0 , tampão fosfato 0,2 M pH 6,0 e 7,0 , tampão Tris-HCl 0, 2 M pH 8,0 e tampão carbonato-bicarbonato 0,2 M pH 9,0 e 10,0. \*Médias seguidas pela mesma letra minúsculas não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

**Figura 4:** Efeito da temperatura na atividade (A) e estabilidade (B) do EB e EPP obtidos a partir do látex da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) durante 60 minutos de incubação.\*Médias seguidas pela mesma letra minúsculas não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

**Figura 5:** Estabilidade das proteases presentes no EB (A) e EPP (B) obtidos a partir do látex da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) em detergentes comerciais a 70°C durante 60 minutos de incubação.

### Capítulo 4

**Figura 1.** Comprovante de depósito de patente junto ao INPI (Instituto Nacional da Propriedade Industrial).

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

EMEPA – Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba

UV – Ultravioleta

CO<sub>2</sub> – Gás carbônico

EROS – espécies reativas de oxigênio

O<sub>2</sub> – Oxigênio molecular

O<sub>2</sub><sup>•-</sup> – Radical aniônico superóxido

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – peróxido de hidrogênio

OH<sup>•</sup> – radical hidroxila

μs – Microsegundo

NADPH - Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

POX – Peroxidases

LOX – Lipoxigenases

SH<sub>2</sub> – Grupos tiol

Fe<sup>2+</sup> – Ferro

Cu<sup>2+</sup> – Cobre

<sup>1</sup>O<sub>2</sub> – Oxigênio singleto

SOD (EC 1.15.1.1) – Superóxido dismutase

APX (EC 1.11.1.11) –Ascorbato peroxidase

CAT (EC 1.11.1.6) –Catalase

PPO (EC 1.10.3.1) – Polifenoloxidase

Mm – Milimolar

IPP – Isopentenil pirofosfato

pH – Potencial hidroiônico

NBT – Nitro azul tetrazólio

EDTA - Etilenodiaminotetracético

nm – Nanômetro

TCA – Ácido tricloroacético

$\mu\text{M}$  – Micromolar

CMI – concentração mínima inibitória

CBM – concentração bactericida mínima

INPI – Instituto Nacional da Propriedade Industrial

UFPEDA – Universidade Federal Rural de Pernambuco Departamento de Antibióticos

PEG – Polietilenoglicol

SDFA – Sistema de duas fases aquosas

$\text{MM}_{\text{PEG}}$  - Massa molar do PEG

$\text{C}_{\text{PEG}}$  - Concentração do PEG

$\text{C}_{\text{FOSF}}$  - Concentração de fosfato

EB – Extrato bruto

EPP – Extrato pré - purificado

LIMA, GILENO VITOR MOTA; Dr; Universidade Federal Rural de Pernambuco; Fevereiro 2014; METABOLISMO ANTIOXIDATIVO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE LÁTEX DE MANGABEIRA (*Hancornia speciosa* Gomes); Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Lúcia Figueiredo Porto (Orientadora); Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares (Co-orientadora); Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Terezinha Rangel Camara (Co-orientadora)

## RESUMO

A mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) é uma árvore frutífera encontrada em várias regiões do Brasil. Apresenta uma grande plasticidade adaptativa e está exposta a distintas condições ambientais que podem conferir estresse abiótico induzido por fatores diversos, exercendo influência na produção e composição dos metabólitos secundários do vegetal, dentre eles o látex. Os metabólitos proteicos (oxidases e proteases) presentes no látex, podem atuar como mecanismo de defesa, o qual envolve desde flutuações ambientais até ataques por patógenos e predadores. Os metabólitos secundários presentes nas plantas estão relacionados com a maioria das propriedades terapêuticas destas, tornando-as uma grande fonte de medicamentos os quais têm apresentado um incrível poder de cura no seu estado natural ou como fonte de novos agentes antimicrobianos. As proteases compõem uma classe de enzimas que representam cerca de 60% do mercado mundial de enzimas. As proteases originárias de vegetais possuem especial importância para a medicina e para a indústria, pois exibem atividade em ampla faixa de temperatura e pH. As proteases são um dos principais ingredientes de uma grande variedade de detergentes, desde aqueles usados para limpezas domésticas, até àqueles usados para limpeza de lentes de contato e próteses dentárias. Sendo que, a maior parte dessas proteases é utilizada em formulações de detergentes em pó, respondendo por aproximadamente 25% do mercado total de enzimas. A maioria dos custos de produção para um produto biológico reside na estratégia de purificação. Os sistemas de duas fases aquosas (SDFAs) desempenham um papel estratégico pois, as duas fases são formadas predominantemente (60-95%) por água o que minimiza a possibilidade de desnaturação ou perda da atividade biológica, constituindo uma alternativa eficaz e economicamente viável para novos bioprocessos. Este estudo, objetivou avaliar *in vivo* as respostas bioquímicas dos látices de três acessos (PE, PB e RN) de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) frente ao déficit hídrico decorrente da variação pluviométrica, como também avaliar o potencial biotecnológico do látex desta espécie. O látex de mangabeira foi coletado na Estação Experimental José Irineu Cabral, unidade pertencente à Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba S.A. (EMEPA-PB) localizada em João Pessoa (PB),

através de incisões no caule com auxílio de material cortante de aço inoxidável, e posteriormente armazenado sob refrigeração à  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento das análises. Determinou-se a atividade das enzimas SOD, APX, CAT, PPO e do teor de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Para avaliação da atividade antimicrobiana, foi elaborada uma solução padrão do látex de mangabeira protegida sob o número BR 102013018181-1 (Pedido de Registro de Patente); foram utilizadas nove cepas de bactérias: *Escherichia coli* (UFPEDA 224), *Staphylococcus aureus* (UFPEDA 02), *Klebsiella pneumoniae* (UFPEDA 396), *Candida albicans* (UFPEDA 1007), *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 416), *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis* (UFPEDA 138), *Bacillus subtilis* (UFPEDA 86) e *Staphylococcus aureus* (32) (isolado de mastite caprina) e vinte e oito isolados do gênero *Staphylococcus*, sendo quatorze causadores da mastite bovina e os outros catorze isolados causadores da mastite caprina que foram mantidos em tubos de ensaio contendo caldo Mueller-Hinton por 24 horas em temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$  para posterior inoculação nas placas de Petri. Avaliou-se a concentração mínima inibitória (CMI) e concentração bactericida mínima (CBM). Para a caracterização e a pré-purificação de proteases do látex de mangabeira, utilizou-se SDFa (PEG-Fosfato). Posteriormente, avaliou-se a compatibilidade e estabilidade do extrato bruto e pré-purificado com detergentes comerciais. A partir dos resultados obtidos, evidencia-se a potencialidade da utilização do látex para a compreensão do metabolismo antioxidativo de plantas de mangabeira submetidas às condições de estresse oxidativo, como também a obtenção de produtos com fins industriais, possibilitando o fortalecimento dos pólos veterinário e químico em âmbito regional e nacional.

LIMA, GILENO VITOR MOTA; Dr; Universidade Federal Rural de Pernambuco; Fevereiro 2014; METABOLISMO ANTIOXIDATIVO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE LÁTEX DE MANGABEIRA (*Hancornia speciosa* Gomes); Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Lúcia Figueiredo Porto (Orientadora); Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares (Co-orientadora); Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Terezinha Rangel Camara (Co-orientadora)

## ABSTRACT

Mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) is a fruit tree found in various regions of Brazil. It features a large adaptive plasticity and is exposed to different environmental conditions that may confer abiotic stress induced by several factors, influencing the composition and production of secondary metabolites of the plant, including latex. The protein metabolites (oxidases and proteases) present in the latex, can act as a defense mechanism, which involves ranging from environmental fluctuations to attacks by pathogens and predators. The secondary metabolites in plants are related to most of these therapeutic properties, making them a great source of drugs which have shown an incredible healing power in its natural state or as a source of new antimicrobial agents. The proteases are a class of enzymes which represent about 60% of the world market for enzymes. Proteases originating from plants have particular significance for medicine and industry, as exhibit activity in a wide range of temperature and pH. Proteases are one of the major ingredients of a wide variety of detergents from those used for household cleaning, even those used for cleaning contact lenses and dentures. Being that the majority of these proteases is used in formulations of powder detergents, accounting for around 25% of the total market of enzymes. Most of the production costs for a biological product is in the purification strategy. The aqueous two-phase systems (ATPS) play a strategic role because the two phases are formed mainly (60-95%) by water which minimizes the possibility of denaturation and loss of biological activity, providing an effective and economically viable alternative to new bioprocesses. This study aimed to evaluate *in vivo* biochemical responses of three lattices access (PE, PB and RN) of mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) compared to water deficit due to rainfall variation, but also evaluate the biotechnological potential of latex of this specie. The latex of mangaba tree was collected in Experimental Station José Irineu Cabral, unit belonging to the State Company for Agricultural Research of Paraíba SA (EMEPA-PB) located in João Pessoa (PB), through incisions in the stem with cutting stainless steel material and subsequently stored under refrigeration at -20 °C until analysis. The activity of SOD, APX, CAT, PPO enzymes and the content of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was determined. For evaluation of antimicrobial activity, we created a

standard solution of latex mangaba tree protected under BR 102013018181-1 (Patent Registration Request) number nine strains of bacteria were used: *Escherichia coli* (UFPEDA 224), *Staphylococcus aureus* (02 UFPEDA), *Klebsiella pneumoniae* (UFPEDA 396), *Candida albicans* (UFPEDA 1007), *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 416), *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis* (UFPEDA 138), *Bacillus subtilis* (UFPEDA 86) and *Staphylococcus aureus* (32) (isolated from goat mastitis ) and twenty-eight isolates of *Staphylococcus*, with fourteen causes of cattle mastitis and the other fourteen isolates causing goat mastitis that were kept in test tubes containing Mueller-Hinton broth for 24 hours at 37 ° C for subsequent inoculation on plates Petri. We evaluated the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). For the pre-purification and characterization of proteases of mangabeira latex was used ATPS (PEG-phosphate). Subsequently, we evaluated the compatibility and stability of the crude extract and pre-purified with commercial detergents. From the results obtained, highlights the potential use of latex for understanding the antioxidant metabolism of plants mangaba tree subjected to conditions of oxidative stress, but also to obtain products for industrial purposes, allowing the strengthening of veterinary and chemical poles at the regional and nationally.

## SUMÁRIO

### RESUMO

### ABSTRACT

<b>1.0 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
<b>2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>22</b>
2.1 Aspectos Botânicos e Produtivos .....	22
2.2 Estresses Ambientais e seu Efeitos nas Plantas.....	25
2.2.1 Estresse Hídrico.....	26
2.2.2 Estresse Oxidativo.....	27
2.2.3 Metabolismo Antioxidativo.....	29
2.3 Metabolismo Secundário.....	33
2.3.1 Látex .....	34
2.3.2 Biossíntese do látex e polimerização do látex em borracha.....	35
2.3.3 Coleta do Látex.....	35
2.3.4 O Látex de <i>Hancornia speciosa</i> .....	36
2.4 Uso das Plantas na Medicina Tradicional .....	37
2.4.1 Atividades Biológicas das Plantas Laticíferas da família Apocynaceae.....	38
2.4.2 Atividade Antimicrobiana em plantas.....	39
2.4.3 Atividade Bioativa de <i>Hancornia speciosa</i> Gomes.....	40
2.5 Proteases.....	41
2.5.1 Funções Fisiológicas das Proteases.....	42
2.5.2 Atividade Proteolítica em Plantas.....	42
2.6 Efeitos Ambientais sobre a Atividade Enzimática.....	43
2.6.1 pH.....	43
2.6.2 Temperatura.....	44



2.7 Purificação de Proteínas .....	44
2.7.1 (Sistema de Duas Fases Aquosas - SDFA).....	45
2.8 Potencial Biotecnológico das Proteases do Látex de Mangabeira para a Indústria de Detergentes.....	46
<b>3.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>48</b>
<b>CAPÍTULO I: Latex as an oxidative stress indicator in mangabeira tree (<i>Hancornia speciosa</i> Gomes) submitted to water deficit.....</b>	<b>61</b>
Abstract .....	62
Introduction.....	63
Materials and Methods.....	65
Results and Discussion.....	67
Conclusions.....	71
Acknowledgments.....	71
References.....	72
Figure Legends.....	78
Figures.....	79
<b>CAPÍTULO II: Atividade antimicrobiana do látex de mangabeira (<i>Hancornia speciosa</i> Gomes).....</b>	<b>80</b>
Abstract.....	81
Introdução.....	82
Materiais e Métodos.....	86
Resultados e Discussão.....	88
Conclusões.....	93
Agradecimentos.....	93
Referências Bibliográficas.....	94
<b>CAPÍTULO III: Caracterização e pré-purificação de proteases do látex de mangabeira (<i>Hancornia speciosa</i> Gomes) por sistema de duas fases aquosas PEG-fosfato e compatibilidade com detergentes comerciais.....</b>	<b>105</b>
Abstract.....	107

Introdução.....	108
Parte Experimental.....	109
Resultados e Discussão.....	112
Conclusão.....	119
Referências Bibliográficas.....	120
<b>Capítulo IV:</b> Pedido de Patente - Processo de Obtenção de um novo bactericida a partir do látex de mangabeira ( <i>Hancornia speciosa</i> Gomes).....	128
Comprovante de depósito de patente junto ao INPI (Instituto Nacional da Propriedade Industrial).....	129
<b>ANEXOS.....</b>	<b>130</b>
Normas para publicação no periódico Journal of Experimental Botany	
Normas para publicação no periódico Journal of Medicinal Plant Research	
Normas para publicação no periódico Química Nova	

## 1.0 INTRODUÇÃO

A mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) é uma árvore frutífera, laticífera, de clima tropical, nativa do Brasil e encontrada em várias regiões do País, desde os Tabuleiros Costeiros e Baixadas Litorâneas do Nordeste, onde é mais abundante, até os cerrados das regiões Centro-Oeste, Norte e Sudeste (Lewinsohn, 1991). Os frutos da mangabeira possui ampla aceitação de mercado. No entanto o aproveitamento das propriedades restringem-se majoritariamente aos frutos, estando o látex em desvantagem quanto ao conhecimento de seus atributos e potencial bioativo (Lederman et al. 2000).

A mangabeira apresenta maior desenvolvimento vegetativo nas épocas de temperaturas mais elevadas por ser uma planta heliófita, e a pluviosidade ideal situa-se entre 750 e 1.600 mm anuais bem distribuídos, sendo resistente a períodos curtos de déficit hídrico (Andersen e Andersen, 1988; Espíndola, 2003). Informações sobre comportamento fisiológico e bioquímico da mangabeira face às variações ambientais são escassas, principalmente sob condições de restrição hídrica (Nogueira et al. 1999).

As alterações ambientais podem ser indutores de estresse abiótico, exercendo influência na produção e composição dos metabólitos secundários do vegetal, dentre eles o látex (Melo-Reis, 2010). Os metabólitos proteicos presentes no látex, podem atuar como mecanismo de defesa, o qual envolve desde flutuações ambientais até ataques por patógenos e predadores (Azarkan et al., 2005; Sumantha, 2006; Hagel, 2008; Konno, 2011).

Atualmente, a significância biológica do látex é pouco conhecida existindo poucos dados publicados, e nestes a maioria dos autores mantêm a hipótese de um papel defensivo do látex contra insetos e fitopatógenos. Essa hipótese é principalmente suportada pelo perfil fitoquímico encontrado em látices distintos (Farias et al. 2007; Freitas et al. 2010). O látex não possui apenas importância fitoquímica, mas também fisiológica, sendo essencial a compreensão da amplitude da atividade metabólica e suas implicações na proteção de plantas. Segundo Sumantha (2006) e Konno (2011) na composição do látex têm sido encontradas uma ampla variedade de enzimas como oxidases e proteases, estas possuem propriedades biológicas que conferem as plantas proteção contra danos ambientais.

O Brasil possui uma enorme biodiversidade florística, mas acredita-se que apenas 8% da vegetação da flora brasileira têm sido estudadas para a busca de compostos bioativos (Salvi, 2008). Embora ainda haja pouca informação disponível, nos últimos anos tem havido

grande interesse no látex de diversas espécies, pois se apresenta como uma fonte potencial de compostos biologicamente ativos (Shivaprasad et al. 2009; Melo-Reis, et al. 2010).

Os metabólitos secundários presentes nas plantas estão relacionados com a maioria das propriedades terapêuticas destas. A bioprospecção por novos agentes antimicrobianos, fortalece a promissora possibilidade a utilização destes metabólitos no combate as doenças infecciosas que são a principal causa da mortalidade em todo o mundo (Aibinu, 2006).

Dentre as principais infecções no âmbito veterinário destaca-se a mastite caprina e bovina, que caracteriza-se pela inflamação da glândula mamária ocasionada, geralmente, por micro-organismos (Islam et al. 2011). As infecções intramamárias em ruminantes geram graves prejuízos econômicos da ordem de 35 bilhões de dólares, devido ao descarte do leite, custos com medicamentos e assistência veterinária, tempo de eliminação dos antibióticos, aumento da mão-de-obra, redução da qualidade e quantidade do leite e seus subprodutos além de ser importante problema de saúde pública (Contreras et al. 2007; Baskaran et al. 2009; Okmen & Turkcan, 2013).

Em diversos estudos, a atividade antimicrobiana de extratos naturais de plantas e de alguns de seus compostos do metabolismo secundário, aos quais são atribuídos a atividade antimicrobiana de extratos vegetais (Souza et al. 2007; Simões et al. 2007); têm sido avaliadas evidenciando uma alternativa de prevenção e tratamento seguro, extremamente viável contra microrganismos indesejáveis, visto que, alguns destes já se encontram resistentes aos fármacos sintéticos de última geração lançados no mercado (Aibinu, 2006; Schuch et al. 2008; Gonçalves et al. 2011).

As proteases compõem uma classe de enzimas que representam cerca de 60% do mercado mundial de enzimas. As proteases originárias de vegetais possuem especial importância para a medicina e para a indústria, pois elas exibem atividade em ampla faixa de temperatura e de pH (Antao et al. 2005; Singh et al. 2008; Kumar et al. 2011). O conhecimento dessas características bioquímicas da enzima é muito importante, pois reduz a possibilidade de utilizar condições desnaturantes durante o processo de extração, minimizando eventuais perdas em escala industrial (Chanda et al. 2011).

As proteases são um dos principais componentes de uma grande variedade de detergentes, desde aqueles usados para limpezas domésticas, até àqueles usados para limpeza de lentes de contato e próteses dentárias. Sendo que, a maior parte dessas proteases é utilizada em formulações de detergentes em pó, respondendo por aproximadamente 25% do mercado total de enzimas (Rao et al. 1998).

A maioria dos custos de produção para um produto biológico reside na estratégia de purificação. Existe uma grande necessidade de se estabelecer técnicas de biosseparação eficientes e econômicas em larga escala, que permitam atingir elevado grau de pureza e rendimento, mantendo a atividade biológica da molécula (Silva e Loh, 2006).

Neste sentido, os sistemas de duas fases aquosas (SDFAs) desempenham um papel estratégico pois, as duas fases são formadas predominantemente (60-95%) por água o que minimiza a possibilidade de desnaturação ou perda da atividade biológica, constituindo uma alternativa eficaz e economicamente viável para novos bioprocessos (Silva e Loh, 2006; Asenjo e Andrews, 2012).

A mangabeira é uma espécie típica dos trópicos brasileiros, frequentemente associada às paisagens de cerrado, tabuleiro e restinga; entretanto é no litoral da Região Nordeste onde sua exploração tem sido mais intensificada (Júnior e Lédo, 2006). Estudos a respeito do comportamento bioquímico e fisiológico frente às variações ambientais (déficit hídrico) são escassos (Nogueira et al. 1999), como também de suas propriedades bioativas, o que limita o conhecimento quanto ao potencial produtivo e biotecnológico da mangabeira.

Este estudo, objetivou avaliar *in vivo* as respostas bioquímicas dos látices de três acessos (PE, PB e RN) de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) frente ao déficit hídrico decorrente da variação pluviométrica, como também avaliar o potencial biotecnológico do látex desta espécie.

## 2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Aspectos Botânicos e Produtivos

A mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) é uma árvore frutífera, laticífera, de clima tropical, nativa do Brasil e encontrada em várias regiões do País, desde os Tabuleiros Costeiros e Baixadas Litorâneas do Nordeste, onde é mais abundante, até os cerrados das regiões Centro-Oeste, Norte e Sudeste (Lewinsohn, 1991). A palavra mangaba é de origem indígena (*mã gawa*) e, segundo Ferreira (1973), significa “coisa boa de comer”.

A mangabeira pertence à classe Dicotyledoneae, ordem Gentianales, família Apocynaceae, gênero *Hancornia* e à espécie *Hancornia speciosa* (Cronquist, 1988). A mangabeira é uma árvore de porte médio, possuindo de 4 a 7 m de altura, podendo chegar a até 15 m, de crescimento lento, dotada de copa ampla e irregular, tronco tortuoso de 0,2 a 0,3 m de diâmetro, bastante ramificado e áspero; ramos lisos e avermelhados (Monachino, 1945) (Figura 1).

Apresenta frutos aromáticos, saborosos e nutritivos, com ampla aceitação de mercado, tanto para o consumo *in natura*, quanto para a indústria. Segundo o IBGE, a produção do fruto da mangaba no ano de 2011, foi de 680 toneladas.



**Figura 1.** Banco de Germoplasma de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) da EMEPA (PB) Fonte: Arquivo Pessoal.

Os maiores produtores nacionais da mangaba são os Estados de Sergipe, Bahia e Rio Grande do Norte, com produções respectivas de 351, 128 e 85 toneladas anuais de frutos. No estado de Pernambuco a época de maior produção é de dezembro a maio, com mais ênfase de janeiro a abril (Lederman et al. 2000; Vieira Neto, 2002).

A produção incipiente de mangaba é reflexo da exploração essencialmente extrativista pelas populações tradicionais, sendo necessário o desenvolvimento de estudos que forneçam parâmetros fisiológicos indicadores de tolerância à estresses abióticos possibilitando a redução da erosão genética, o desenvolvimento de programas de conservação, a domesticação e melhoramento da mangabeira; com a conseqüente evolução do cultivo extrativista para o tecnificado viabilizando a inclusão desta fruta no mercado nacional de forma mais expressiva (Lederman et al. 2000; Espíndola, 2003).

O estado da Paraíba possui o maior banco de germoplasma *ex situ* de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) conhecida no país (Figura 1), sendo mantido pela EMEPA (Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba) na estação experimental de Mangabeira em João Pessoa (PB) com cerca de 311 acessos coletados em 20 municípios de três estados da Região Nordeste: Rio Grande do Norte, Paraíba e Pernambuco (Tabela 1); sendo os acessos mais promissores quanto à produção de frutos: Rio Tinto (PB), Ipojuca (PE) e Extremóz (RN) (Tabela 2) (Barreiro Neto, 2003). Segundo Ramalho et al. (1989), banco de germoplasma é o local onde se armazena o material genético das espécies de interesse com origens geográfica e ambiental variadas, com o objetivo de formar o acervo mais representativo da variabilidade da cultura, sem repetições; constituindo assim, a matéria-prima para programas de pesquisa.

A mangabeira apresenta maior desenvolvimento vegetativo nas épocas de temperatura mais elevada por ser uma planta heliófita, e a pluviosidade ideal situa-se entre 750 e 1.600 mm anuais bem distribuídos, sendo resistente a períodos curtos de déficit hídrico (Andersen e Andersen, 1988; Espíndola, 2003). Informações sobre comportamento fisiológico e bioquímico da mangabeira face às variações ambientais são escassas, principalmente sob condições de restrição hídrica (Nogueira et al. 1999).

**Tabela 1.** Origem dos acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Mangabeira da Emepa-PB, João Pessoa, 2004.

<b>Origem</b>	<b>Número de Acessos</b>
<b>Rio Grande do Norte</b>	
Nízia Floresta	26
Parnamirim	13
Extremoz	21
Touros	30
São Gonçalo	10
Maxaranguape	10
<b>Paraíba</b>	
Rio Tinto	43
NUPPA, João Pessoa	30
Mangabeira, João Pessoa	10
Alhandra	08
Mataraca	12
Caaporã	03
Jacumã	09
Conde	20
Gramame	01
Lucena	09
Santa Rita	07
Pedras de Fogo	05
Baía da Traição	08
Mamanguape	12
<b>Pernambuco</b>	
Ipojuca	25
<b>Total</b>	<b>311</b>

Fonte: Barreiro Neto (2003).



**Tabela 2.** Acessos promissores do BAG-Mangaba da Emepa-PB quanto à produção de frutos. Estação Experimental de Mangabeira, João Pessoa, PB. 1995/2000

Acesso	Produção (kg/planta x ano)		Produção Média <sup>1</sup> (kg/planta x ano)
	Mínima	Máxima	
Rio Tinto – RIT.7	0,79	102,42	45,98
Extremóz – EXT.1	4,83	100,97	42,60
Ipojuca – IPO.3	5,82	90,32	41,47
Nízia Floresta – NIF.8	4,00	95,43	40,18
Ipojuca – IPO.4	0,54	64,28	35,70
Nízia Floresta – NIF.1	2,05	78,53	35,12
Nízia Floresta – NIF.2	3,87	81,20	33,53
Nízia Floresta – NIF.17	0,00	71,66	32,70
Nízia Floresta – NIF.23	0,00	70,81	32,00
Extremoz – EXT.20	0,00	88,74	31,20

Fonte: Barreiro Neto (2003).

(1) Produção média de 6 anos

## 2.2 Estresses Ambientais e seus Efeitos nas Plantas

Diante dos cenários climáticos globais atuais e das inevitáveis alterações destes, é cada vez mais importante estudar os efeitos que essas alterações poderão provocar nas plantas, pois em qualquer lugar que cresçam, elas estarão sujeitas às condições de múltiplos estresses, os quais limitarão seu desenvolvimento e suas chances de sobrevivência (Hasanuzzaman et al. 2012, 2013).

Na maioria das definições, o estresse é considerado como um desvio significativo das condições ótimas para a vida, e induz a mudanças e respostas em todos os níveis funcionais do organismo, as quais são reversíveis a princípio, mas podem se tornar permanentes. Já do ponto de vista botânico, o estresse pode ser descrito como um estado no qual o aumento da demanda leva a planta a uma perda de estabilidade inicial das funções, seguida pela normalização e aumento da resistência. Se os limites de tolerância e a capacidade de adaptação forem transgredidos, pode ocorrer uma injúria permanente ou mesmo a morte (Larcher, 2004).

As adversidades ambientais como a radiação UV, luminosidade intensa, herbicidas, ataque de patógenos, hiperoxia, ozônio, flutuações na temperatura, seca, metais pesados, elevada concentração de sais, extremos de temperatura, poluição do ar; podem ser indutoras

de estresse biótico e abiótico (Mittler, 2006; Jiping et al. 2007), exercendo influência na produção e composição dos metabólitos do vegetal (Melo-Reis, 2010).

Segundo Shewry e Lucas (1997) e De Wit (2007), as plantas conseguem mudar a constituição de compostos moleculares, como um mecanismo de resposta e muitas dessas alterações podem estar diretamente relacionadas com defesa e proteção. Para sobreviver durante sua evolução, os vegetais desenvolveram mecanismos de resposta contra danos e doenças que quando acionados reconhecem a agressão (Konno, 2011).

As respostas adequadas às mudanças ambientais são cruciais para o crescimento e sobrevivência da planta (Kato-Noguchi e Morokuma, 2007) contudo, os mecanismos moleculares e bioquímicos que orquestram estas respostas ainda são pouco compreendidos.

### **2.2.1 Estresse Hídrico**

Estresses abióticos causam efeitos adversos na produtividade das culturas agrícolas e influenciam na distribuição destas em diferentes ambientes (Araus et al., 2002). Estes efeitos recebem considerável atenção devido aos potenciais impactos das mudanças climáticas no padrão de distribuição das chuvas, extremos de temperatura, salinização de terras pela irrigação e a necessidade de expandir a agricultura para áreas marginais mantendo uma alta produtividade (Verslues et al. 2006).

O estresse hídrico é um dos tipos de estresse abiótico mais crítico e comum que acometem as lavouras conduzidas em ambientes secos. Seus efeitos (redução na assimilação de CO<sub>2</sub>, na taxa de transpiração, de crescimento e na abertura estomática) são evidentes em qualquer estágio fenológico da planta, podendo variar de acordo com a severidade e duração do estresse (Farooq et al. 2009).

À medida que o déficit hídrico torna-se mais severo, as plantas não conseguem manter o equilíbrio entre a captação e a perda de água. Neste caso, a redução no potencial hídrico dos tecidos vegetais não pode ser evitada e novas estratégias fazem-se necessárias para que as plantas possam tolerar a seca. Assim, a tolerância à seca pode ser entendida como a habilidade das plantas em resistir à redução no potencial hídrico de seus tecidos (Mitra et al. 2001). Entre os mecanismos adotados nesta fase, estão o aumento na atividade do sistema de defesa antioxidante (Asada et al. 1999).

### 2.2.2 Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre os níveis endógenos de compostos antioxidantes e compostos oxidantes que acarretam o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROS) (Cassels e Cury, 2001; Bhattacharjee et al. 2011).

Os estresses ambientais bióticos e abióticos não apenas promovem a geração de EROS, mas também iniciam mecanismos de sinalização de defesa que, se tiverem sucesso, começam com a indução da geração de EROS, continuam com a indução de respostas de defesa e terminam com a remoção de EROS para restabelecer o balanço redox e promover a sobrevivência das células (Hirt e Shinozaki 2003).

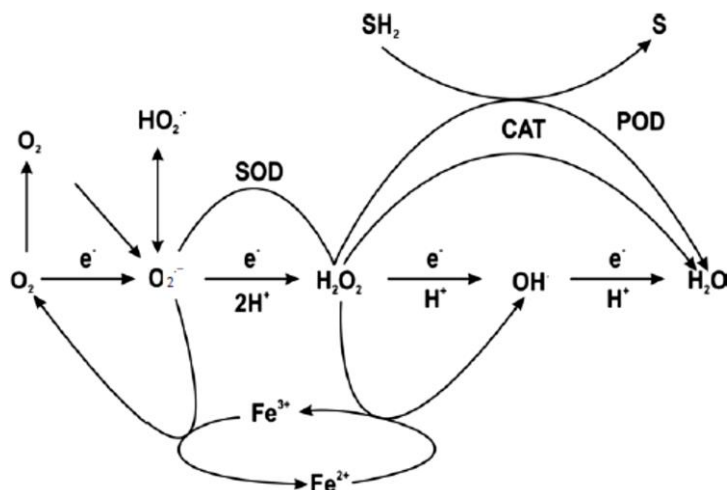
Sob condições normais, as EROS são geradas pelo metabolismo dos organismos aeróbicos, principalmente através da fotossíntese e respiração, porém mantidas em níveis basais através de sistemas antioxidantes de defesa (Foyer e Noctor, 2009; Gupta et al. 2011) (Figura 2). Segundo Del Rio et. al. (1992), aproximadamente 1% do oxigênio consumido pelas plantas é direcionado para produção de EROS em diversos compartimentos celulares como os cloroplastos e os peroxissomos (Apel e Hirt 2004, Bhattacharjee, 2005). Em condições adversas como seca, salinidade, alta temperatura, radiação ultravioleta, presença de metais pesados e patógenos a produção de EROS pode saltar de  $240 \mu\text{M s}^{-1} \text{O}_2^-$  para  $720 \mu\text{M s}^{-1} \text{O}_2^-$  (Polle, 2001). Quando esse aumento é maior que a capacidade antioxidante da célula, caracteriza-se o processo de estresse oxidativo (Pandhair e Sekhon, 2006).

A formação de EROS ocorre porque o oxigênio é pouco reativo, mas tem a capacidade de originar estados excitados reativos como radicais livres e derivados (Scandalios, 1993). Com dois átomos de oxigênio, o  $\text{O}_2$  é completamente reduzido por quatro elétrons gerando duas moléculas de água.

A redução parcial do oxigênio molecular ( $\text{O}_2$ ) leva à produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) na forma do radical aniônico superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), do peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e do radical hidroxila ( $\text{OH}^\cdot$ ) (Figura 2), quando a redução se dá pela aquisição de um, dois ou três elétrons, respectivamente (Mittler, 2002; Bartoz, 1997).

No primeiro passo da redução de  $\text{O}_2$  os radicais formados, superóxidos (reação de Mehler) (Mehler, 1951), têm vida relativamente curta (1-4 $\mu\text{s}$ ) e podem ser produzidos na planta por meio de vários mecanismos, inclusive pela ativação de NADPH-oxidases/sintases ligadas à membrana, peroxidases (POX) da parede celular, lipoxigenases (LOX) e como resultado da transferência de elétrons da mitocôndria ou do cloroplasto (Figura 2). Normalmente, oxida várias moléculas orgânicas, como o ascorbato, ou como redutor de

metais como  $\text{Fe}^{3+}$ , nas reações de Haber-Weiss ou Fenton (Figura 3) (Imlay et al. 2008). Esses radicais praticamente não conseguem atravessar as membranas biológicas, ficando confinados no compartimento onde foram gerados. Os superóxidos formam hidroxiperóxidos com duplas ligações (enos) ou duplas ligações alternadas (dienos), além de oxidar aminoácidos específicos, como metionina, histidina e triptofano. Os superóxidos também podem causar peroxidação de lipídeos no ambiente celular e nas membranas celulares (Breusegem et al. 2001; Resende et al. 2003).

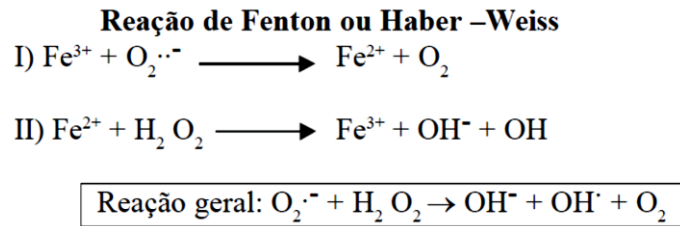


**Figura 2.** Geração e interconversão de espécies reativas de oxigênio (EROS). Fonte: Gupta et al. 2011

O peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), apesar de não ser um radical livre, possui 1ms de vida, atravessa as biomembranas e se distribui a partir do local de sua produção favorecendo a rápida elicitação da resposta vegetal, sendo inativado por enzimas que oxidam os grupos tiol ( $\text{SH}_2$ ) (Figura 2) (Resende et al. 2003; Buchanon e Balmer 2005).

A última e mais reativa espécie a ser formada por redução parcial do oxigênio molecular é o radical hidroxila ( $\text{OH}\cdot$ ). Esse radical é formado pela redução do  $\text{H}_2\text{O}_2$  por íons metálicos ( $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$ ) na reação de Fenton e tem grande afinidade por moléculas biológicas em seu sítio de produção (Figura 3).

O radical hidroxila apresenta uma meia-vida muito curta, pois reage muito rapidamente com moléculas biológicas, sequestrando aleatoriamente um átomo de hidrogênio (Breusegem et al. 2001; Imlay et al. 2008).



**Figura 3.** Reação de Fenton ou Haber-Weiss. Fonte: Resende et al. 2003

Semelhante aos radicais hidroxila, o oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ) têm aproximadamente 1  $\mu\text{s}$  de vida e são altamente destrutivos, reagindo com a maioria das moléculas biológicas, porém a maioria dos danos são próximos aos sítios onde são produzidos. São predominantemente gerados nos cloroplastos, através da transferência de energia de uma clorofila fotoexcitada para o elétron do oxigênio molecular. O oxigênio singlete reage facilmente com ligações duplas e têm alta afinidade com “dienos” na membrana e aminoácidos específicos como histidina, metionina, triptofano e cisteína (Foyer et al. 1994).

O estresse oxidativo pode ativar a morte celular programada devido à peroxidação lipídica de membranas, oxidação de proteínas, inibição enzimática e danos ao DNA e RNA. Por outro lado, as EROS também podem agir como sinalizadoras em vários processos intrínsecos de crescimento e desenvolvimento adaptativos (Pitzschke et al. 2006), além de atuarem como mensageiros secundários envolvidos na ativação de genes de resposta ao estresse e rotas de defesa (Desikan et al. 2001; Miller et al. 2008).

### 2.2.3 Metabolismo Antioxidativo

O estresse oxidativo provoca uma série de alterações bioquímicas, principalmente, no sistema de defesa antioxidante, os quais são utilizados pelas plantas para desintoxicar as células das EROS produzidas, interrompendo as cascatas de oxidação descontrolada. As enzimas do sistema antioxidante são bastante sensíveis às condições de estresse abiótico servindo como sinalizadores do estresse (Gratão et al. 2005; Dewir et al. 2006). O mecanismo antioxidante enzimático inclui as enzimas superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT), polifenoloxidase (PPO) entre outras.

#### Superóxido dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1)

Esta enzima faz parte de um grupo de metaloproteínas que catalisam a formação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a partir do radical superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ). Até o presente momento, a SOD é a única enzima descrita cuja atividade controla a concentração de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ , substratos da reação de Haber-Weiss (Figura 3), desempenhando, portanto, papel central no mecanismo de defesa ao

prevenir a formação do radical  $\text{OH}^\cdot$  (Bowler et al. 1992). Este, juntamente com o oxigênio singleto ( $^1\text{O}_2$ ), apresenta alta reatividade, sendo bastante tóxico a célula (Gratão et al. 2005). Segundo Scandalios (2005) as SODs compreendem a primeira linha de defesa contra EROS nas células.

Três classes de SODs foram encontradas em plantas e classificadas de acordo com seu cofator metálico: manganês (Mn), cobre/zinco (Cu/Zn) ou ferro (Fe) (Alscher et al. 2002). As Mn-SODs estão localizadas nas mitocôndrias e peroxissomos (Del Rio et al. 2002), mas também foram encontradas nos cloroplastos de algumas plantas (Hayakawa et al. 1984). As Fe-SODs são encontradas em um número limitado de espécies vegetais e estão localizadas nos cloroplastos (Ferreira et al. 2002; Alscher et al. 2002). As Cu/Zn-SODs são as mais abundantes em folhas verdes e são encontradas no citosol, nos cloroplastos e peroxissomos (Del Rio et al. 2002; Bhattacharjee, 2011).

A regulação dos genes que codificam para a enzima SOD é bastante sensível a variações ambientais, provavelmente, devido à alteração do potencial redox da célula (Gill e Tuteja, 2010). O aumento na atividade da SOD, ocasionado pelo déficit hídrico, vem sendo reportado em diversas espécies como: híbridos de milho (Mozaffari et al. 2013), feijão-de-corda (El-Enany et al. 2013) e quinoa (Fghire et al. 2013).

### **Catalase (CAT) (EC 1.11.1.6)**

As catalases são hemoproteínas tetraméricas, que reduzem duas moléculas de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) a água ( $\text{H}_2\text{O}$ ) e oxigênio ( $\text{O}_2$ ) (Sreedhar et al. 2009). Essa relação estequiométrica, reflete a baixa afinidade da CAT pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$ , a qual é ativa somente em altas concentrações (mM) de  $\text{H}_2\text{O}_2$  sendo provavelmente responsável pela remoção do excesso de EROS durante o estresse (Gratão et al. 2005).

Na reação, uma molécula de  $\text{H}_2\text{O}_2$  é ligada ao grupo heme da enzima, onde ele é rapidamente convertido em oxigênio atômico e água, suportado por resíduos de aminoácidos da proteína da enzima. O átomo de oxigênio é temporariamente ligado ao átomo de ferro central do grupo heme, e depois transferido de lá para a segunda molécula de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Koolman e Roehm 2005). Presentes em peroxissomos e glioxissomos, ainda não tiveram sua existência comprovada em cloroplastos e mitocôndrias (Noctor et al. 2007).

Segundo Akcay et al. (2010), a CAT é uma das enzimas mais eficazes na defesa de processos oxidativos, uma vez que, na planta resistente, possibilita a integridade da célula mesmo quando o estresse encontra-se em um estágio mais rigoroso. A catalase apresenta atividade independente de agentes redutores com atividade rápida, sendo capaz de neutralizar o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em aproximadamente  $10^7 \text{ min}^{-1}$ , antes mesmo da sua difusão pela célula.

Nas células vegetais, três isoformas da catalase já foram caracterizadas: a CAT 1 envolvida no processo fotorrespiratório, a CAT 2 presentes em tecidos vasculares e a CAT 3 presente nos glioxissomos (Willekens et al. 1994). Vários estudos evidenciam a efetividade da CAT como um marcador bioquímico na resposta ao estresse oxidativo em diversas espécies: amendoim (Akcay et al. 2010; Pereira et al. 2012), feijão (Terzi et al. 2010) e quinoa (Fghire et al. 2013).

#### **Ascorbato Peroxidase (APX) (EC 1.11.1.11)**

A ascorbato peroxidase é uma heme peroxidase encontrada nos cloroplastos citosol, mitocôndria e peroxissomos. A APX reduz o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) à água utilizando o ascorbato o qual é produzido na mitocôndria, como doador de elétrons. Neste processo, um intermediário de dois elétrons oxidados da APX é formado, este oxida o ascorbato produzindo duas moléculas de monodehidroascorbato sendo, então, reduzido novamente (Asada, 1999; Green e Fry, 2005).

Assim como a catalase, a APX converte o  $H_2O_2$  em água ( $H_2O$ ) e oxigênio ( $O_2$ ), entretanto, apresentam afinidades diferentes por essa ERO. A APX demonstra afinidade pelo  $H_2O_2$  na ordem de micromolar ( $\mu\text{M}$ ), enquanto a catalase na ordem de milimolar (mM). Assim, a APX parece ser responsável pela fina regulação da resposta às EROS (Mittler, 2002), todavia tem elevada importância na proteção contra o dano oxidativo em compartimentos subcelulares onde a catalase não está presente, como os cloroplastos onde são encontradas duas isoformas, uma ligada ao tilacóide e a outra dispersa no estroma (Asada, 1999).

Segundo estudos prévios de Gill e Tuteja (2010) as APX são as principais peroxidases na remoção do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) no interior da célula e atuam em sincronia com outras enzimas que participam do ciclo ascorbato-glutationa estando diretamente envolvida na resposta ao estresse hídrico, tendo sua atividade intensificada com o aumento da exposição ao estresse.

Diversos estudos têm demonstrado a efetividade da APX na remoção do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e a consequente proteção oxidativa em diversas espécies: lírio das areias (Seckin e Aksoy, 2013), híbridos de milho (Mozaffari et al. 2013) e feijão-de-corda (El-Enany et al. 2013).

### **Polifenoloxidase (PPO) (EC 1.10.3.1)**

A polifenoloxidase possui papel estrutural na parede celular dos vegetais, exercendo também função protetora contra a ação das EROS em resposta ao estresse oxidativo e a ferimentos do vegetal decorrentes da herbivoria ou da exploração do látex. Segundo Wahler et al. (2009), o ferimento através do corte para sangria na maioria das plantas laticíferas induz um aumento imediato na atividade da polifenoloxidase através da liberação rápida de complexos *Frey-Wyssling* o que possibilita a rápida vedação do ferimento e a redução do risco de infecção por patógenos facultativos (Figura 4).

A PPO atua na hidroxilação e degradação oxidativa de compostos fenólicos, os quais em última instância são convertidos à quinonas (Zhu-Salzman et al. 2008; Agrawal e Konno, 2009). De acordo com Mayer (2006), os níveis de atividade de polifenoloxidases apresentam uma relação direta com tolerância vegetal ao estresse hídrico, o que pode significar uma forma de proteção do tecido vegetal contra o estresse oxidativo, gerado em tais circunstâncias.

Diversos estudos têm demonstrado a estimulação da atividade da polifenoloxidase proporcional ao aumento do estresse hídrico em diversas espécies: tomate (Tahi et al. 2008), oliveira (Anjum et al. 2012), maçã (Wang et al. 2012) e quinoa (Fghire et al. 2013). Portanto, fica evidente o papel modulador da polifenoloxidase em circunstâncias de estresse, atuando como efetivo indicador do estresse oxidativo.



**Figura 4:** Início da coagulação do látex de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) logo após incisão. Fonte: Arquivo Pessoal.



### 2.3 Metabolismo Secundário

O metabolismo é definido como o conjunto total das transformações das moléculas orgânicas, catalisadas por enzimas, que ocorre nas células vivas, suprindo o organismo de energia, renovando suas moléculas e garantindo a continuidade do estado organizado (Marzzoco e Torres, 2007). Essas reações possuem certa direção devido à presença de enzimas específicas, estabelecendo, assim, as rotas metabólicas, visando o aproveitamento de nutrientes para satisfazer as exigências fundamentais da célula. Além do metabolismo primário, responsável pela síntese de celulose, lignina, proteínas, lipídeos, açúcares e outras substâncias importantes para a realização das funções vitais, as plantas também apresentam o chamado metabolismo secundário (Champe et al. 2008).

Os metabólitos secundários possuem geralmente estrutura complexa, baixo peso molecular, possuem atividades biológicas marcantes e, diferentemente dos metabólitos primários, apresentam-se em baixas concentrações em determinados grupos de plantas (Berg e Lubert, 2008). Já foram considerados como produtos de excreção do vegetal no passado, no entanto, sabe-se que muitas dessas substâncias estão diretamente envolvidas nos mecanismos que permitem a adaptação do vegetal ao seu ambiente, aumentando a probabilidade de sobrevivência de uma espécie.

Os metabólitos secundários são responsáveis por diversas atividades biológicas atuando como: antibióticos, antifúngicos e antivirais; protegendo as plantas de possíveis patógenos, apresenta também atividade antigerminativa ou tóxica para outras plantas. Segundo Gobbo-Neto e Lopes (2007) alguns fatores alteram a produção e a concentração dos metabólitos secundários como a temperatura, sazonalidade, disponibilidade de água, radiação ultravioleta, nutrientes do solo, altitude, composição atmosférica e fase de desenvolvimento das plantas.

Devido às extensas atividades biológicas dos metabólitos secundários de plantas, estes são utilizados há séculos na medicina popular e nos dias atuais, como medicamentos, cosméticos, matéria-prima para a química fina, ou mais recentemente como nutracêuticos (Yunes e Chechinel, 2001; Amaral et al. 2006; Funke e Melzig, 2006; Biavatti et al. 2007; Barbosa-Filho et al. 2007; Saúde-Guimarães e Faria, 2007; Barbosa-Filho et al. 2008). Estudos estabeleceram que nos países ocidentais, onde a química sintética é a base da indústria farmacêutica, aproximadamente 60% dos medicamentos utilizados hoje em dia são derivados dos princípios ativos das plantas como os compostos fenólicos, terpênicos e alcalóides; os quais compõem diversos metabólitos vegetais, dentre eles o látex (Fumagali et al. 2008; Newman e Cragg, 2012).

### 2.3.1 Látex

As alterações ambientais podem ser indutores de estresse abiótico, exercendo influência na produção e composição dos metabólitos secundários do vegetal, dentre eles, o látex (Melo-Reis, 2010). Os metabólitos proteicos presentes no látex, podem atuar como mecanismo de defesa, o qual envolve desde flutuações ambientais até ataques por patógenos e predadores (Azarkan et al. 2005; Sumantha, 2006; Hagel, 2008; Konno, 2011).

Sabe-se que uma rota de defesa vegetal, talvez a mais conhecida, é denominada rota octadecanóide, a qual culmina com a produção do ácido jasmônico: um hormônio vegetal que induz a expressão de diversos genes relacionados à defesa contra estresses (Soares e Machado, 2007). Esta mesma rota induz a produção de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), uma espécie reativa de oxigênio que pode atuar inicialmente como molécula sinalizadora de defesa em plantas (Mittler, 2002).

Segundo Morcelle et al. (2004) e Aguiar (2006), o látex é o fluido citoplasmático dos tecidos laticíferos vegetais de aspecto leitoso, cor geralmente esbranquiçada, sendo uma emulsão complexa constituída de proteínas, aminoácidos, carboidratos, lipídeos, vitaminas, alcalóides, carbonatos, resinas, gomas, taninos e terpenos. No látex de uma mesma espécie, os constituintes são sempre os mesmos, podendo haver alterações quantitativas, variando sob a ação de fatores ambientais e eventos fenológicos (Pinheiro e Pinheiro, 2006), estando de acordo com os estudos posteriores de Rasmann et al. (2009), os quais verificaram diferença de 4 vezes no volume de látex exsudado em folhas de *Asclepias barjoniifolia* e de *Asclepias angustifolia* respectivamente, ambas pertencentes ao mesmo gênero.

O látex normalmente está contido em tubos (sistema articulado) ou em células isoladas (sistema inarticulado) formando o citoplasma destas, os quais são coletivamente conhecidos como sistemas laticíferos (Premakuri et al. 1995; Hagel et al. 2008; Zhou e Liu, 2010). Os vasos laticíferos estão distribuídos no floema, o qual é limitado internamente pelo meristema regenerador, conhecido como câmbio (Pinheiro, 2003; Cai et al. 2009).

Atualmente, a significância biológica do látex é pouco conhecida existindo poucos dados publicados, e nestes a maioria dos autores mantêm a hipótese de um papel defensivo do látex contra insetos e fitopatógenos. Essa hipótese é principalmente suportada pelo perfil fitoquímico encontrado em látices distintos (Farias et al. 2007; Freitas et al. 2010). O látex não possui apenas importância fitoquímica, mas também fisiológica, sendo essencial a compreensão da amplitude da atividade metabólica e suas implicações na proteção de plantas. Segundo Sumantha (2006) e Konno (2011) na composição do látex têm sido encontradas uma

ampla variedade de enzimas como oxidases e proteases, estas possuem propriedades biológicas que conferem as plantas proteção contra danos ambientais.

### **2.3.2 Biossíntese do látex e polimerização do látex em borracha (cis-1,4 polisopreno (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>)<sub>n</sub>)**

Os carboidratos resultantes da fotossíntese constituem a principal fonte intercelular de substâncias necessárias à atividade metabólica das plantas. A sacarose, resultante desse metabolismo é conduzida pela seiva do floema, até a célula laticífera onde o látex é sintetizado (Castro, 2000).

A partir da sacarose, as etapas básicas na síntese do látex foram bem estabelecidas segundo Linen (1969), citado por Usha Nair (2000), que estabeleceu três estágios básicos na síntese do látex, sendo o último estágio responsável pela formação da borracha: 1 – Formação de acetilcoenzima A (acetil-CoA); 2 – Conversão do acetil-CoA em isopentenil pirofosfato (IPP) (unidades de cinco carbonos), via ácido mevalônico e 3 – polimerização do IPP em borracha através da enzima *rubber* transferase, ou seja, justaposição sucessiva de unidades de cinco carbonos (IPP).

### **2.3.3 Coleta do Látex**

Os sistemas laticíferos, dependendo de suas formas, condicionam as várias maneiras de explorar e coletar o látex nas plantas. Sob este aspecto as plantas laticíferas podem ser divididas em vários grupos. No grupo mais numeroso encontram-se todas as plantas com vasos laticíferos inarticulados dentre elas, o gênero *Hancornia*. Nestas, após a primeira sangria exaustiva, se cortadas seguidamente nos outros dias, produzem quantidades de látex progressivamente menores até não mais haver produção. Este decréscimo confirma os estudos prévios realizados por Observación (1946) citado por Wisniewski e Melo, (1982), pois devido ao sistema de vasos ser restrito, os cortes precisam ser distribuídos no espaço e no tempo, distando pelo menos 30 cm e a intervalos de tempo longos para a recomposição do látex viabilizando-se assim outra sangria (Figura 5A e 5B).



**Figura 5:** (A) Início da exudação do látex após incisão; (B) Coleta do látex. Fonte: Arquivo Pessoal.

No segundo grupo encontram-se as espécies nas quais o sistema laticífero é do tipo articulado. Neste estão todas as *Hevea* e algumas espécies do gênero *Manihot*. Nestas plantas, após a abertura dos vasos laticíferos pela sangria, o látex flui copiosamente, mesmo após sangrias sucessivas em locais diferentes do tronco da árvore. Em seguida o fluxo de látex é reduzido, devido à mecanismos fisiológicos (restabelecimento do equilíbrio osmótico) e bioquímicos (ação de polifenoloxidasas) o qual juntamente com a regeneração dos tecidos constituem fatores limitantes e importantes para a produção e exploração do látex (Compagnon, 1986; Pinheiro e Pinheiro, 2006; Wahler et al. 2009).

#### **2.3.4 O látex de *Hancornia speciosa***

Ao exsudar da árvore o látex de *Hancornia speciosa*, tem aparência leitosa, muitas vezes de coloração ligeiramente rosada e pH levemente alcalino, que vai, com o decorrer do tempo, se acidificando em decorrência da exposição ao ar. Características análogas foram verificadas anteriormente no látex de *Asclepias syriaca* (Apocynaceae) e diferentes para o látex de *Nerium indicum* (Apocynaceae), no qual observou-se ausência de coloração (Dussourd, 1995). Quanto ao pH, Paula (1944) e Wisniewski e Melo (1982) registraram média de 3,8 no látex de mangabeira colhido em Minas Gerais e na ilha de Marajó, no estuário do rio Pará. Estudos atuais verificaram pH de 3,8 em látex de mangabeira coletado em João Pessoa – PB confirmando-se assim os registros anteriores. Caracteristicamente, o látex de mangabeira logo após ser colhido se mantido sob refrigeração, não forma coágulos, não exala cheiro desagradável de proteínas em decomposição e permanece fluido mesmo após um ano de colhido, tendo uma estabilidade química muito alta. Em contrapartida, a estabilidade mecânica desse látex é muito baixa, coagulando com facilidade sob agitação forte (Pinheiro, 2003).

## 2.4 Uso das Plantas na Medicina Tradicional

A terapia através da utilização de plantas é conhecida e praticada desde as antigas civilizações, sendo que o hábito de recorrer às virtudes curativas de certos vegetais é uma das primeiras manifestações do esforço do homem para compreender e utilizar a natureza (Teske e Trentini, 1997).

Ao longo dos tempos a utilização das plantas foi evoluindo desde as formas mais simples de tratamento local, provavelmente utilizada pelo homem das cavernas até as formas mais sofisticadas de fabricação industrial utilizada pelo homem moderno (Lorenzi e Matos, 2002).

Apesar dos países desenvolvidos possuírem fácil acesso à medicina moderna, grande parte da população ainda faz uso de plantas medicinais devido a questões culturais e históricas. Já nos países em desenvolvimento cerca de 65-80% da população depende quase que exclusivamente das plantas medicinais na atenção básica à saúde (Agra et al. 2008).

No Japão, China, Indonésia e diversas regiões da África e do Brasil utilizam-se do látex e diversas partes de *Euphorbia tirucalli* (aveloz) no tratamento de: artrite, tosse, asma, abscessos, câncer, cólicas, neuralgia, dores de ouvido, dente, úlceras, reumatismo, verrugas (Valadares et al. 2006).

Na África ocidental, a *Guiera senegalensis* é uma das plantas medicinais mais utilizadas, sendo as folhas usadas para tratar majoritariamente doenças sexualmente transmissíveis, diarreias de origem infecciosa, doenças respiratórias e doenças da pele (Gomes et al. 2003; Serrano et al. 2008).

Segundo Martinez (2011), na Índia as plantas são utilizadas tradicionalmente como fonte terapêutica, as folhas, frutos e secreções da casca das raízes do nim (*Azadirachta Indica* A. Juss) são empregadas no tratamento de doenças de pele, hérnias, parasitas intestinais, doenças cardiovasculares, diabetes, controle do colesterol e celulite.

O Brasil possui uma enorme biodiversidade florística, mas acredita-se que apenas 8% da vegetação da flora brasileira têm sido estudadas para a busca de compostos bioativos (Salvi, 2008). Embora ainda haja pouca informação disponível, nos últimos anos tem havido grande interesse no látex de diversas espécies, pois se apresenta como uma fonte potencial de compostos biologicamente ativos (Shivaprasad et al. 2009; Melo-Reis, et al. 2010).

Os metabólitos secundários presentes nas plantas estão relacionados com a maioria das propriedades terapêuticas destas, tornando-as uma grande fonte de medicamentos os quais têm apresentado um incrível poder de cura no seu estado natural ou como fonte de novos agentes farmacológicos (Aibinu, 2006).

#### **2.4.1 Atividades Biológicas das Plantas Laticíferas da família Apocynaceae.**

As propriedades medicinais provenientes do metabolismo secundário das plantas laticíferas têm sido investigadas na constante e recente evolução científica em todo o mundo, devido à sua potente atividade antioxidante, ausência de efeitos colaterais e viabilidade econômica (Ashok et al. 2011). Dessa forma, o desenvolvimento e a intensificação de estudos é essencial para a comprovação da eficácia e a segurança dos medicamentos preparados a partir destas plantas para validá-las eticamente como fontes de medicamentos seguros e eficazes (Calixto, 2000; Simões, 2003; Sawadogo et al. 2012).

Dentre as plantas laticíferas utilizadas com fins medicinais, destacam-se as pertencentes à família Apocynaceae, as quais possuem significativa reputação etnobotânica devido à ampla utilização das substâncias resultantes do metabolismo secundário; estas em sua maioria possuem propriedades farmacológicas reconhecidas cientificamente (Tijjani, 2011).

Na Somália e no Quênia, o extrato da raiz e do caule de *Adenium obesum* (Apocynaceae) é utilizado na forma de loção no tratamento de doenças venéreas, doenças de pele, contra piolhos e rinite. O látex é empregado como emplastro no tratamento de feridas e contra parasitas de camelos e gado (Neuwinger, 2000; e Tijjani, 2011).

Na América do Sul, diversas pesquisas descreveram o uso do látex a partir de espécies distintas dos gêneros: *Plumeria*, *Allamanda* e *Himatanthus* (Rebouças et al. 2012). O látex de *Himatanthus sucuuba* diluído em água mostrou-se importante, apresentando diversas atividades biológicas como: anti-inflamatória, analgésica, anti-tumoral, anti-leishmanial (De Miranda et al. 2000), antifúngica e antibacteriana (Sequeira et al., 2009); além de desempenhar papel eficaz no tratamento de câncer (Coelho Ferreira, 2009), úlceras, asma, tuberculose (Soares et al. 2010), malária e sífilis (Suffredini Daly, 2004).

O extrato metanólico de raízes e látex de *Calotropis procera* é utilizado no tratamento eficaz de úlceras, malária e picadas de cobra (Van Quaquebeke et al. 2005; Soares et al. 2007). Segundo Maisanara et al. (2011), o látex de *Calotropis procera* possui elevado efeito antiproliferativo em linhagens de células cancerígenas evidenciando-se uma significativa ação antitumoral. Resultados semelhantes foram obtidos por Badmus et al. (2010) ao estudarem a

atividade biológica quanto à ação antitumoral e a picadas de cobra do extrato etanólico do caule de *Holarrena floribunda*.

Adotey et al. (2012) relatam as propriedades bioativas da casca, folhas e látex de *Alstonia boonei* utilizadas na medicina alternativa em diversas regiões do oeste da África no combate a malária, picadas de cobra e escorpião; possuindo também atividade antimicrobiana, antipirética, afrodisíaca e imunoestimulante.

#### **2.4.2 Atividade Antimicrobiana em Plantas**

A pesquisa de novos agentes antimicrobianos se faz necessária devido a surgimento de micro-organismos resistentes e de infecções oportunistas fatais. O estudo de agentes antimicrobianos tem grande abrangência, sendo ponto crucial em vários setores do campo farmacêutico, cosmético e veterinário, possibilitando um primeiro *screening* na descoberta da atividade farmacológica de novos agentes, sendo de extrema importância, principalmente em um país como o Brasil que oferece uma imensa biodiversidade. Desta forma, tais pesquisas podem contribuir significativamente no desenvolvimento do campo da saúde em nível mundial, encontrando substâncias mais eficazes e menos tóxicas na corrida contra a resistência e a proliferação de micro-organismos patogênicos (Barbosa-Filho et al. 2007; Ostrosky et al. 2008).

Ashok et al. (2011) avaliou a atividade antimicrobiana dos extratos dos látices de 16 espécies de plantas na Índia com histórico etnobotânico frente à 3 micro-organismos: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* utilizando o teste de difusão em ágar. Dentre as plantas testadas, *Calotropis procera* (Apocynaceae) apresentou significativa atividade antimicrobiana para *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* com halos de inibição de 12,33mm e 11,66mm respectivamente.

Tijjani et al. (2011) ao confrontar o extrato metanólico de látex de *Adenium obesum* (Apocynaceae) obtiveram resultados superiores quanto a sensibilidade desses micro-organismos com halos de inibição de 20 mm para *Escherichia coli* e 26 mm para *Staphylococcus aureus*; no entanto, a atividade do extrato de *Adenium obesum* não se restringiu às bactérias mencionadas, apresentando atividade para *Pseudomonas aeruginosa* (18mm), *Salmonella typhi* (19mm), *Bacillus subtilis* (25mm), *Streptococcus pyogenes* (26mm) e *Corynebacterium ulcerans* (19mm).

Avancini et al. (2008) avaliaram a atividade antimicrobiana *in vitro* de plantas citadas por uso popular como sendo utilizadas na prevenção e controle da mastite bovina no Sul do

Brasil, e verificaram que os extratos vegetais de penicilina (*Alternanthera brasiliana* L.), mil-em-rama (*Achillea millefolium* L.), carqueja (*Baccharis trimera* Less.) e lanceta (*Solidago chilensis* Meyer) foram ativos contra *S. aureus*.

Já Schuch (2007), utilizou extratos hidroalcoólicos (EHA) e decoctos (DEC) das plantas carqueja (*Baccharis trimera* Less.), picão preto (*Bidens pilosa* L.), eucalipto (*Eucalyptus* sp.), erva-de-bicho (*Polygonum hydropiper* L.) e chichilho (*Tagetes minuta* L.) para avaliar suas atividades antibacterianas frente a micro-organismos causadores de mastite; verificando atividade antibacteriana apenas para o extrato hidroalcoólico de eucalipto.

Silva et. al (2009) avaliaram a atividade antimicrobiana *in vitro* de óleo essencial de Alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) sobre o crescimento de 20 cepas de *S. aureus* isoladas de secreções do úbere, fossas nasais e do leite de vacas. Os resultados mostraram atividades antiestafilocócicas notadas por halos de inibição do crescimento bacteriano (11 a 26 mm) verificando-se efeito apenas bacteriostático.

### **2.4.3 Atividade bioativa de *Hancornia speciosa* Gomes**

Apesar do grande potencial medicinal apresentado pela família Apocynaceae, pouco se sabe sobre o potencial bioativo da mangabeira e do seu látex, o qual tem emprego etnobotânico na medicina popular em algumas localidades no tratamento eficaz da tuberculose, úlcera, herpes, dermatoses e verrugas (Lederman et al. 2000; Nogueira e Sampaio, 2006). Santos et al. (2007) avaliaram a atividade antimicrobiana do látex de *Hancornia speciosa* frente a seis micro-organismos: *Mycobacterium tuberculosis*, *Candida* sp., *Staphylococcus aureus*, *Neisseria meningitides*, *Streptococcus* sp. e *Cryptococcus neoformans*; e não verificaram propriedade antimicrobiana. Todavia, Silva et al. (2010) avaliaram com êxito a capacidade antifúngica do látex da mangabeira contra *Candida albicans*.

Pott e Pott, (1994) em estudos etnofarmacológicos verificaram uma ampla utilização por parte dos moradores da vila Caipé (São Cristóvão, Sergipe, Brasil) do látex obtido a partir do tronco da mangabeira no tratamento de luxações, como estimulante das funções hepáticas, de certos tipos de inflamações e de micoses (Marinho et al. 2011).

A atividade bioativa não se restringe ao látex da mangabeira, estando presente também na casca (ação gastroprotetora e atividade antimicrobiana (*Helicobacter pylori*), nos frutos e nas folhas nas quais foram verificadas propriedades vasodilatadoras a partir de extrato etanólico. Os resultados demonstraram ainda que este extrato possui ausência de toxicidade e

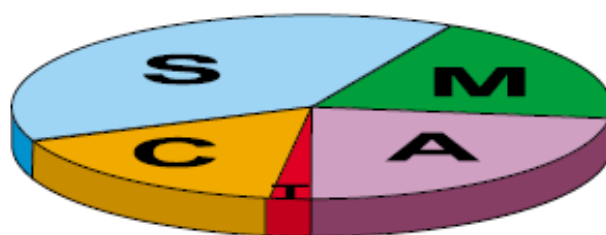


efetividade no combate e cicatrização de úlceras gástricas por sua capacidade de estimular a síntese de muco e produzir efeito anti-secretório (Ferreira et al. 2007; Moraes et al. 2008).

## 2.5 Proteases

As proteases conhecidas também como peptídeo hidrolases são enzimas que atuam na clivagem proteolítica de peptídeos sendo uma das mais frequentes e importantes modificações de proteínas. As proteases são classificadas como um subgrupo das hidrolases, e sua nomenclatura é feita segundo o tipo de reação catalisada, a natureza química do sítio catalítico e de acordo com sua estrutura. Dessa maneira, subdividem-se em exopeptidases e endopeptidases, dependendo de seu sítio de ação, ou seja, clivando peptídeos terminais ou aqueles distantes dos terminais dos substratos, respectivamente. O termo proteinase é sinônimo para o grupo das endopeptidases (Tremacoldi, 2009).

As proteases são agrupadas em cinco classes baseadas no grupo característico de resíduos de aminoácidos funcionais: serinoproteases, cisteinoproteases, metaloproteases, aspárticoproteases e treoninaproteases. Estes grupos foram identificados a partir do sequenciamento do genoma de *Arabidopsis* totalizando cerca de 488 genes codificadores de proteases, dos quais 40% codificam as serinoproteases, 22,5% codificam as aspárticoproteases, 19,40% codificam as cisteinoproteases, 15% codificam as metaloproteases e 3,10% codificam as treoninaproteases (Neurath, 1990; Hoorn e Jones, 2004; Tremacoldi, 2009) (Figura 6).



**Figura 6:** Diagrama das formas catalíticas das proteases. S – Serinoproteases (40%), A – Aspárticoproteases (22,5%), C – Cisteinoproteases (19,40%), M – Metaloproteases (15%), T – Treoninaproteases (3,10%). Fonte: Tremacoldi, (2009).

### 2.5.1 Funções Fisiológicas das Proteases

As enzimas proteolíticas executam uma grande variedade de funções fisiológicas complexas. Sua importância em conduzir as funções metabólicas e regulatórias essenciais é evidente, o que pode ser confirmado pela sua ocorrência em todas as formas de organismos vivos. Assim, podem exercer papel-chave em processos como: mobilização de proteínas de reserva durante a germinação de sementes, catabolismo de proteínas, crescimento, migração, senescência e morte celular programada, formação de tecidos, morfogênese, liberação de hormônios e de peptídeo farmacologicamente ativo liberação de proteínas precursoras, transporte de proteínas através das membranas, reconhecimento de patógenos, pragas e a indução eficaz de respostas de defesa (Rao et al. 1998; Tremacoldi, 2009).

Em geral, proteases extracelulares catalisam a hidrólise de grandes proteínas à moléculas menores para a subsequente absorção pela célula, enquanto as proteases intracelulares desempenham um importante papel na regulação do metabolismo (Neurath, 1990). Porém, em contraste à multiplicidade de funções exercidas pelas proteases, o conhecimento sobre os mecanismos pelos quais elas executam todas as atividades ainda é limitado (Hoorn e Jones, 2004).

### 2.5.2 Atividade Proteolítica em Plantas

O primeiro relato da atividade proteolítica em plantas data de 1799, mas muito provavelmente, ela já se fazia conhecida há mais tempo pelos habitantes de ilhas tropicais que utilizavam o látex e folhas de plantas de *papaya* como amaciante de carnes e como vermífugo (McKee, 1962).

O evento mais extensivamente estudado é a germinação de sementes, em que a atividade proteolítica está associada ao crescimento e desenvolvimento de plântulas, bem como à renovação de proteínas e à senescência (Richardson, 1991; Radlowski, 2005).

Um grande número de proteases já foram isoladas de frutos e látices de várias plantas, mas apenas recentemente tem sido estudado seu papel em processos celulares do metabolismo vegetal incluindo a papaína, bromelina, ficina e quimopapaína. As proteases são amplamente encontradas no látex de diversas famílias do reino vegetal dentre elas: *Caricaceae*, *Moraceae* e *Apocynaceae* (*Asclepias barjoniifolia*, *Asclepias angustifolia*, *Calotropis procera*, *Hancornia speciosa* Gomes) (Kimmel e Smith, 1954; Sgarbieri et al. 1964; Arribére et al. 1998; Rasmann et al. 2009; Konno, 2011).

## 2.6 Efeitos Ambientais sobre a Atividade Enzimática

As enzimas são proteínas globulares, e o seu poder catalítico depende da conformação tridimensional da molécula, em particular do centro ativo, existindo uma conformação ótima para a ligação do(s) substrato(s) e para a catálise propriamente dita. Desta forma, tornam-se necessários estudos dos fatores que influenciam a conformação da molécula, e conseqüentemente, a atividade e a estabilidade enzimática. Dentre esses fatores, destacam-se o pH e a temperatura (Lehninger, 2005).

### 2.6.1 pH

O pH influencia a ionização dos aminoácidos constituintes de uma enzima, alterando sua conformação e, portanto, sua atividade. Valores de pH extremos levam a desnaturação da proteína, com perda permanente da atividade (Lehninger, 2005). Mudanças no valor de pH alteram a distribuição de cargas da enzima. Valores de pH acima do ponto isoelétrico tornam a enzima carregada negativamente e abaixo carregada positivamente. As interações não-covalentes, como as ligações de hidrogênio, ligações hidrofóbicas e interações eletrostáticas, que mantêm a estrutura tridimensional da proteína, são fracas e podem ser desfeitas com valores extremos de pH levando a uma desnaturação (Campbel, 2000).

Segundo Bracht, (2003) o pH ótimo de uma enzima está próximo do pH predominante onde a enzima possui atividade *in vivo*, fato este confirmado posteriormente por Freitas et al. (2007), ao trabalhar com látex de *Calotropis procera*, sendo esta espécie pertencente a mesma ordem da mangabeira (Gentianales), em que a máxima atividade da protease desta espécie foi descrita em pH ácido (5,0) em condições *in vivo* e de laboratório.

Em coletas do látex de *Hancornia speciosa* Gomes registrou-se o pH 3,8 em condições *in vivo* o qual apresentou atividade apreciável em pH 4,0 (tampão citrato-fosfato 0,2 M) em condições de laboratório, estando assim em conformidade com os estudos descritos anteriormente. Segundo Patel et al. (2012), devido às características das proteases em serem lineares com a realidade fisiológica dos líquidos biológicos os quais possuem pH menor ou maior que sete, torna-se extremamente viável a utilização destas enzimas no âmbito medicinal e industrial.

## 2.6.2 Temperatura

A temperatura influencia de forma positiva a atividade enzimática, ou seja, o aumento da temperatura favorece a entropia no interior da molécula, e a energia dessas vibrações pode tornar-se grande o suficiente para desfazer a estrutura terciária da enzima (Campbel, 2000).

Chanda et. al. (2011), estudaram a temperatura ótima da protease de *Plumeria rubra* Linn, sendo esta espécie pertencente à mesma família da mangabeira (Apocynaceae), e reportaram que a temperatura ótima da protease desta espécie é 55°C. Já no látex da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) as enzimas proteásicas apresentaram atividade em uma ampla faixa de temperatura (20 a 85°C), o que sugere que esta enzima é uma proteína termoestável e de promissora utilização industrial, visto que, mantém sua atividade proteolítica até 85°C sem desnaturar. A temperatura ótima foi verificada a 30°C (dados não publicados). O conhecimento dessas características bioquímicas da enzima é muito importante, pois reduz a possibilidade de utilizar condições desnaturantes durante o processo de extração, minimizando eventuais perdas em escala industrial.

## 2.7 Purificação de Proteínas

A maioria dos custos de produção para um produto biológico reside na estratégia de purificação. Existe uma grande necessidade de se estabelecer técnicas de biosseparação eficientes e econômicas em larga escala, que permitam atingir elevado grau de pureza e rendimento, mantendo a atividade biológica da molécula (Silva e Loh, 2006).

A purificação de produtos biotecnológicos, produzidos por células microbianas, animais ou vegetais, constitui a etapa complexa do processo, dada as variadas características dos meios e das biomoléculas de interesse, como as proteínas, aminoácidos, antibióticos, polissacarídeos e hormônios. Em resultado à variedade de características, as etapas de purificação são tão ou mais desafiantes que o estudo de produção, pois não há processos de purificação de aplicação geral (Pessoa-Jr; Kilikian, 2005). Neste sentido, os sistemas de duas fases aquosas (SDFAs) desempenham um papel estratégico pois, como veremos em maiores detalhes a seguir, as duas fases são formadas predominantemente (60-95%) por água o que minimiza a possibilidade de desnaturação ou perda da atividade biológica, constituindo uma alternativa eficaz e economicamente viável para novos bioprocessos (Silva e Loh, 2006; Asenjo e Andrews, 2012).

### 2.7.1 (Sistema de Duas Fases Aquosas - S DFA)

A formação dos SDFAs é conhecida desde o final do século 19. A partir dos relatos na literatura de Beijerinck (1896), o qual descobriu que soluções aquosas de gelatina e agar ou gelatina e amido solúvel, misturadas em uma dada faixa de temperatura e concentração, formavam misturas turvas que, em repouso, separavam espontaneamente em duas fases líquidas límpidas. A fase mais densa era enriquecida em agar (ou amido) e a fase superior em gelatina, sendo que a água era o componente majoritário em ambas as fases.

Porém, foi apenas com os trabalhos de Per-Åke Albertsson, em meados da década de 50, que ficou evidente para a comunidade científica a grande potencialidade de aplicação destes sistemas à partição/purificação de materiais biológicos, desde proteínas até células. Como o solvente é a água em ambas as fases e geralmente se encontra presente em grande quantidade, estes sistemas fornecem um ambiente ameno para as biomoléculas evitando, assim, mudanças em suas estruturas e perda das atividades biológicas (Silva e Loh, 2006; Asenjo e Andrews, 2012).

A utilização dos sistemas de duas fases aquosas (S DFA), compatível com os processos de biosseparações, permite isolar moléculas com atividade biológica de misturas complexas, e oferece vantagens como curto tempo de processamento, baixo custo e facilidade de aplicação tanto em escala piloto como em escala industrial (Teixeira, 2009).

O S DFA baseia-se na transferência de massa entre duas fases líquidas imiscíveis. Com base nas propriedades físico-químicas da molécula alvo, a separação irá ocorrer através da adição de dois polímeros hidrofílicos (ou um polímero e um sal) que acima da concentração crítica destes componentes ocorre espontaneamente a formação de duas fases aquosas imiscíveis, extraindo grupos específicos de moléculas para uma das fases resultantes (Albertsson, 1986; Tubio; Nerli; Picó, 2004; Coelho et al. 2013).

Inúmeras propriedades físico-químicas do sistema e do biopolímero influenciam a distribuição da biomolécula de interesse entre as fases como a massa molar e a concentração dos polímeros (Hartounian et al. 1994; Huddleston et al. 1996), a presença de ligantes ao longo da cadeia polimérica que possam interagir especificamente com sítios de proteínas (Sharp et al. 1986; Brooks, 1994), pH e temperatura (Waziri et al. 2004); como também fatores associados às proteínas como o tamanho, a conformação (estruturas secundária, terciária e quaternária) e a composição (estrutura primária), presença de carga elétrica e hidrofobicidade (Collen et al. 2001). Além do mais, a adição de diferentes sais inorgânicos a estes sistemas bifásicos produz uma diferença de potencial elétrico na interface, que influencia marcadamente a partição de moléculas carregadas eletricamente. Este potencial

eletrostático ocorre devido à distribuição desigual dos cátions e dos ânions entre as fases enriquecidas pelos diferentes polímeros (Farruggia et al. 2004).

Um dos polímeros que vêm sendo empregado por apresentar rápida separação de fases, baixo custo e elevada seletividade na separação de moléculas com base na solubilidade é o polietilenoglicol (PEG) (Pessoa-Jr; Kilikian, 2005; Silva e Loh, 2006; Porto et al. 2011; Coelho et al. 2013). Embora existam diversos sais que formem duas fases com o PEG, o sal fosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) (Saloma, Zhao et al. 2013) é utilizado por apresentar alto coeficiente de partição das biomoléculas em relação a outros sais, tais como o  $\text{NaCl}$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  (Porto et al. 2011),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Coelho, Xavier et al. 2013) além de ser uma boa alternativa de baixo custo aos processos convencionais (PEG/dextrana) (Albertsson, 1971).

O SDFA mostra-se uma técnica eficaz para a recuperação de produtos biológicos e eficiente para utilização em escala industrial; a recuperação de produtos biotecnológicos é essencial em muitos processos industriais, e a dificuldade nos processos de recuperação depende significativamente da natureza do produto. Com isso, sob o ponto de vista econômico, o desenvolvimento e otimização de processos de recuperação e purificação de proteínas passaram a ser de vital importância na produção industrial dessas biomoléculas (Silva e Loh, 2006; Saloma et al. 2013).

## **2.8 Potencial Biotecnológico das Proteases do Látex de Mangabeira para a Indústria de Detergentes**

As proteases compõem uma classe de enzimas que representam cerca de 60% do mercado mundial de enzimas. As proteases originárias de vegetais possuem especial importância para a medicina e para a indústria, pois elas exibem atividade em ampla faixa de temperatura e pH (Antao et al. 2005; Singh et al. 2008).

As proteases são um dos principais componentes de uma grande variedade de detergentes, desde aqueles usados para limpezas domésticas, até àqueles usados para limpeza de lentes de contato e próteses dentárias. Sendo que, a maior parte dessas proteases é utilizada em formulações de detergentes em pó, respondendo por aproximadamente 25% do mercado total de enzimas (Rao et al. 1998).

Uma condição para que enzimas proteolíticas possam ser usadas na formulação de detergentes é que elas sejam alcalinas e termostáveis, com um pH ótimo alto. Essas características são importantes devido ao pH do sabão em pó, que é geralmente entre 9 e 12 e

a temperatura de lavagem que varia de 50 a 60°C (Takami et al. 1989; Manachini; Fortina, 1998).

A aplicação de proteases em formulações de detergentes aumentou nos últimos anos porque elas possuem melhor desempenho na remoção de manchas e manutenção da cor dos tecidos, em relação aos produtos convencionais, características estas reconhecidas pelos consumidores. Outros pontos positivos são que o uso destes biocatalisadores diminuem o uso de produtos químicos, como solventes e substâncias cáusticas, tornando os detergentes menos agressivos ao meio ambiente; e reduz o consumo de água e de energia (Castro et al. 2004). As proteases são também usadas nas formulações de detergentes para lavar louça (Showell, 1999).

O uso de proteases cresceu em importância, e estas enzimas deixaram de ser simples aditivos das formulações de detergentes passando a serem ingredientes chave. Um importante parâmetro na escolha das proteases de detergentes é o valor do seu ponto isoelétrico (pI), porque estas enzimas agem melhor quando o valor do pH das soluções de detergentes é aproximadamente o mesmo do pI da enzima. Contudo, existem outros parâmetros envolvidos na escolha de uma boa protease para detergentes, tais como: compatibilidade com os componentes do detergente (surfactantes, perfumes e branqueadores), boa atividade à temperatura de lavagem e eficiência na remoção de manchas (Showell, 1999).

Diante do exposto, evidencia-se a potencialidade da utilização do látex para a compreensão do metabolismo antioxidativo de plantas de mangabeira submetidas à condições de estresse oxidativo, como também a obtenção de produtos com fins industriais, uma vez que os resultados de estudos com membros pertencentes à família Apocynaceae apresentam-se extremamente viáveis. No entanto, as pesquisas com *Hancornia speciosa* Gomes que avaliem suas potencialidades biotecnológicas são escassas sendo sua maioria composta por relatos etnobotânicos. Existe uma necessidade crescente de pesquisas que viabilizem a descoberta e bioprospecção de compostos bioativos potentes originários de fontes vegetais os quais poderão fornecer subsídios na obtenção de produtos contribuindo assim, para o fortalecimento dos pólos químico e farmacológico em âmbito regional e nacional.

### 3.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADOTEY, J.P.K.; ADUKPO, G.E; BOAHEN, Y.O; ARMAH, F.A. A Review of the Ethnobotany and Pharmacological Importance of *Alstonia boonei* DeWild (*Apocynaceae*). **International Scholarly Research Network Pharmacology**, p 1-9, 2012.

AGRA, M. F.; SILVA, K. N.; BASÍLIO, I. J. L. D.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 3, p. 472-508, 2008.

AGRAWAL, A.A., KONNO, K. Latex: a model for understanding mechanisms, ecology, and evolution of plant defense against herbivory. **Annual Reviews Ecology Evolution Systematics**, n.40, 311–331, 2009.

AGUIAR, V.C. **Aspectos bioquímicos, toxicológicos e alergênicos do látex da planta *Calotropis procera* (Ait.) R. Br.** 2006. 183 p. Tese. (Doutorado em bioquímica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

AIBINU I. **Medicinal plants as antimicrobials in outlines and pictures of medicinal plants from Nigeria.** Odugbemi. T. (Ed). Univ. of Lagos press, 2006, p.53-64.

AKCAY, U. C. *et al.* Drought-induced oxidative damage and antioxidant responses in peanut (*Arachis hypogaea* L.) seedlings. **Plant Growth Regulation**, v. 61, n. 01, p. 21-28, 2010.

ALBERTSSON, P. A. **Partition of cell particles and macromolecules.** 2 ed., John Wiley, 1971.

ALBERTSSON, P. A. **Partition of cell particles and macromolecules.** 3 ed., John Wiley, 1986.

ALSCHER, R.G.; ERTURK, N.; HEATH, L.S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants, **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 372, p. 1331-1341, 2002.

AMARAL, F.M.M.; RIBEIRO, M.N.S.; BARBOSA-FILHO, J.M.; REIS, A.S.; NASCIMENTO, F.R.F.; MACEDO, R.O. Plants and chemical constituents with giardicidal activity. **Ver Bras Farmacogn 16 (Supl.):** p.696-720, 2006.

ANDERSEN, O., ANDERSEN, V. U., 1988. **As Frutas Silvestres Brasileiras.** 2ª. Ed. Rio de Janeiro: Globo.

ANJUM, S.A.; FAROOQ, M.; XIE, X.Y.; LIU, X.J.; LJAZ, M.F. Antioxidant defense system and proline accumulation enables hot pepper to perform better under drought. **Scientia Horticulturae**, 140, p.66-73, 2012.

ANTAO, C.M.; MALCATA, F.X. Plant serine proteases: biochemical, physiological and molecular features. **Plant Physiol. Biochem.** 43, 637-650, 2005.

ARRIBÉRE, M.C.; CORTADI, A.A.; GATTUSO, M.A.; BETTIOL, M.P.; PRIOLO, N.S.; CAFFINI, N.O. Comparison of Asclepiadaceae latex proteases and characterization of *Morrenia brachystephana* Griseb. Cysteine peptidases. **Phytochem. Anal.** 9, 267–273, 1998.



- ASADA, K. The water-water cycle in chloroplast: scavenging oxygens and dissipation of excess protons. **Annuals Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology** n.50, p. 601–639, 1999.
- ASENJO, J.A.; ANDREWS, B.A. Aqueous two-phase systems for protein separation: phase separation and applications. **Journal of Chromatography**, 1238, p.1– 10, 2012.
- ASHOK, C.D.; PRASHU, B.M.; UMESH, J.U.; MANOHAR, P.V. Antibacterial and antioxidant activity of plant latex. **Journal of Pharmacy Research**, n. 4(2), p 406-407, 2011.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review Plant Biotechnology**, v.55, p.373-399, 2004.
- AVANCINI, C.; WIEST, J. M.; DALL'AGNOL, R.; HAAS, J. S.; POSER, G. L. V. Antimicrobial Activity of Plants Used in the Prevention and Control of Bovine Mastitis in Southern Brazil. **Latin American Journal Pharmacology**, n.27 (6): p.894-899, 2008.
- AZARKAN, M.; CLANTIN, B.; BOMPARD, C.; BELRHALI, H.; BAYENS-VOLANT, D.; LOOZE, Y.; VILLERET, V. AND WINTJENS, R. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the glutaminyl cyclase from *Carica papaya* látex. **Acta Crystallographica**, n.61 p.59-61, 2005.
- BADMUS, J.A.; ODUNOLA, O.A.; OBUOTOR, E.M.; OYEDAPO, O.O. Phytochemicals and *in vitro* antioxidant potentials of defatted methanolic extract of *Holarrhena floribunda* leaves. **African Journal Biotechnology**, n.9: p.340–436, 2010.
- BARBOSA-FILHO, J.M.; NASCIMENTO-JÚNIOR, F.A.; TOMAZ, A.C.A; ATHAYDE-FILHO, P.F; SILVA, M.S; CUNHA, E.V.L; SOUZA, M.F.V; BATISTA, L.M.; DINIZ, M.F.F.M. Natural products with antileprotic activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, n. 17: p.141-148, 2007.
- BARBOSA-FILHO, J.M.; ALENCAR, A.A.; NUNES, X.P.; TOMAZ, A.C.A.; SENA-FILHO, J.G.; ATHAYDE-FILHO, P.F.; SILVA, M.S.; SOUZA, M.F.V.; DA-CUNHA, E.V.L. Sources of alpha-, beta-, gamma-, delta- and epsilon-carotenes: A twentieth century review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, n.18: p.135-154, 2008.
- BARREIRO NETO, M. Recursos genéticos para o melhoramento da mangabeira no estado da Paraíba. In: **SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DA MANGABA**, Aracaju, SE, 2003. Anais... Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2003. CD-ROM.
- BARTOSZ, Grzegorz. Oxidative stress in plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, n.19 p. 47-64, 1997.
- BEIJERINCK, M. W. **Zbl. Bakt. II Natur.** p.627, 698, 1896.
- BERG, J. M. T.; LUBERT, J. **Bioquímica**. 6.Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 545p, 2008.
- BHATTACHARJEE, S.. Reactive oxygen species and oxidative burst: Role in stress, senescence and signal transduction in plants. **Current Science**, n.89, p.1115–1121, 2005

- BHATTACHARJEE, S.; HALANE, M. K.; KIM, S. H.; GASSMANN, W. Pathogen effectors target Arabidopsis EDS1 and alter its interactions with immune regulators. **Science**, n. 334, p.1405-1408, 2011.
- BIAVATTI, M.; MARENSE, V.; LEITE, S.N.; REIS, A. Ethnopharmacognostic survey on botanical compendia for potential cosmeceutic species from Atlantic Forest. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, n.17, p.640-653, 2007.
- BOWLER, C.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 43, p. 83-116, 1992.
- BREUSEGEM, F. V. et al. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, v. 161, p. 405-414, 2001.
- BROOKS, D. E.; LUTWYCHE, P. **ACS Symp. Ser.** 207, 62, 1994.
- BUCHANON, B.B. AND Y. BALMER. Redox regulation: A broadening horizon. **Annuals Reviews of Plant Biology**, n.56 p.187–220, 2005.
- CAI, X.; LI, W.; YIN, L. Ultrastructure and cytochemical localization of acid phosphatase of laticifer in *Euphorbia kansui* Liou. **Protoplasma**, n.238, p.3–10, 2009.
- CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (Phytotherapies). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 179-189, 2000.
- CASSELLS, A.C.; CURY, R.F. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, n.64, p.145-157, 2001.
- CASTRO, P.R.C. Bases fisiológicas da produção de látex e da estimulação de *Hevea brasiliensis*. In: BERNARDES, M.S. (Ed.) **Sangria da seringueira**. São Paulo: ESALQ/USP, 2000, 405P.
- CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Quim. Nova**, 27:146-56, 2004.
- CHANDA, I.; BASU, S. K.; DUTTA, S. K.; DAS, S. R. C.; A Protease Isolated from the Latex of *Plumeria rubra* Linn (Apocynaceae) 1: Purification and Characterization, **Tropical Journal of Pharmaceutical**, 10 (6): 7 05, 2011.
- COELHO-FERREIRA, M. Medicinal knowledge and plant utilization in an Amazonian coastal community of Marudá, Pará State (Brazil). **Journal Ethnopharmacology**, n.126, p.159-175, 2009.
- COELHO, D.F.; SILVEIRA, E.; PESSOA-JUNIOR, A.; TAMBOURGI, E.B. Bromelain purification through unconventional aqueous two-phase system (PEG/ammonium sulphate). **Bioprocess Biosyst Eng**, 36:185–192, 2013.
- COLLEN, A.; WARD, M.; TJERNELD, F.; STALBRAND, H. **J. Biotechnol.**, 87,179, 2001.

- COMPAGNON, P. **Le caoutchouc naturel, biologie, culture, production**. Paris: Maisonneuve et Larose, 1986. 583p.
- CRONQUIST, A. **The evolution in classification of flowering plants**. 2<sup>o</sup>ed. Bronx: The New York Botanical Garden, 1988, 555p.
- DEL RIO, L.A.; SANDALIO, L.M.; PALMA, J.M.; BUENO, P.; COSPUS, F.J. 1992. Metabolism of oxygen radicals in peroxisomes and cellular implications. **Free Radicals Biology Medicine**, n.13, p.557–580.
- DEL RIO, L.A.; CORPAS, F.J.; SANDALIO, L.M.; PALMA, J.M.; GOMEZ, M.; BARROSO, J.B. Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 372, p. 1255-1272, 2002.
- DE MIRANDA, A.L.P.; SILVA, J.R.A; REZENDE, C.M.; NEVES, J.S. PARRINI, S.C; PINHEIRO, M.L.B.; CORDEIRO, M.C.; TAMBORINI, E.; PINTO, A.C. Anti-inflammatory and analgesic activities of the latex containing triterpenes from *Himatanthus sucuuba*. **Planta Med**, 66, p.284-286, 2000.
- DESIKAN, R.; MACKERNESS, S.A.H.; HANCOCK, J.T.; NEILL, S.J. Regulation of the Arabidopsis transcriptome by oxidative stress. **Plant Physiology**, New York, v. 127, n. 1, p. 159-172, 2001.
- DEWIR, Y.H. et al. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of *Euphorbia millii* hyperhydric shoots. **Environmental and Experimental Botany**, v.58, p.93-99, 2006.
- DE WIT, P.J. How plants recognize pathogens and defend themselves. **Cellular and Molecular Life Science**, In Press, 2007.
- DUSSOURD, D.E. Entrapment of aphids and whiteflies in lettuce latex. **Ecological Popular Biology**, n.88, p.163–172, 1995.
- EL-ENANY, A.; AL-ANAZI, A.D.; DIF, N.; WAFI'A, A.; TAISAN-AL. Role of antioxidant enzymes in amelioration of water deficit and waterlogging stresses on *Vigna sinensis* plants. **Journal of Biology and Earth Sciences**, 2013, Vol 3, Issue 1 44-53, 2013.
- ESPÍNDOLA, A.C. de M.; CARVALHO, N.S.G. de; ALMEIDA, C.C. de S. Prospecção, coleta e manutenção de germoplasma de mangabeira em Alagoas. In: **SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DA MANGABA**, 2003, Aracaju, SE. Anais...Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2003. CD-ROM.
- FARIAS, L.R.; COSTA, F.T.; SOUZA, L.A.; PELEGRINI, P.B.; GROSSI-DE-SÁ, M.F.; NETO, S.M.; BLOCH, C.; LAUMANN, R.A.; NORONHA, .E.F.; FRANCO, O.L. Isolation of a novel *Carica papaya*  $\alpha$ -amylase inhibitor with deleterious activity toward *Callosobruchus maculatus*. **Pesticide Biochemistry Physiology**, n.87, p.255–260, 2007.
- FAROOQ, M. et al. Plant drought Stress: Effects, mechanisms and management. **Agronomy for Sustainable and Development**, v. 29, n. 01, p. 185-212, 2009.
- FARRUGGIA, B.; RIGATUSO, R.; CAPEZIO, L.; DIEZ, V.; PICO, G. **J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.** 809, 301, 2004.
- FERREIRA, M. B. Frutos comestíveis do Distrito Federal: III. pequi, mangaba, marolo e mamãozinho. **Cerrado**, Brasília, v. 5, n. 20, p. 22-25, 1973.

- FERREIRA, R.R.; FORNAZIER, R.F.; VITÓRIA, A.P.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Changes in antioxidant enzyme activities in soybean under cadmium stress. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, v. 25, n. 2, p. 327-342, 2002.
- FERREIRA, H.C.; SERRA, C.P.; ENDRINGER, D.C.; LEMOS, V.S.; BRAGA, F.C.; CORTES, S.F. Endothelium-dependent vasodilation induced by *Hancornia speciosa* in rat superior mesenteric artery. **Phytomedicine**, n.14, p.473-478, 2007.
- FGHIRE, R.; ISSA ALI, O.; ANAYA, F.; BENLHABIB, O.; JACOBSEN, S.; WAHBI, S. Protective antioxidant enzyme activities are affected by drought in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd). **Journal of Biology, Agriculture and Healthcare**, n.3, p.62-69, 2013.
- FREITAS, T.D.et.al. Enzymatic activities and protein profile of latex from *Calotropis procera*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.45, Issues 10-11, p. 781-789, 2007.
- FREITAS, C.D. T DE.; SOUZA DE, D. P.; ARAÚJO, E.S.; CARVALHEIRO, M.G.; OLIVEIRA, L.S.; RAMOS, M.V. Anti-oxidative and proteolytic activities and protein profile of laticifer cells of *Cryptostegia grandiflora*, *Plumeria rubra* and *Euphorbia tirucalli*. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, n.22, p.11-22, 2010.
- FOYER, C.H.; LELANDAIA, M.; KUNERT, K.J. Photooxidative stress in plants. **Physiologia Plantarum**, n.92, p.696-717, 1994.
- FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. **Antioxidants & redox signaling**, 2009, n.1, p.861-905.
- FUMAGALI, E; GONÇALVES, R.A.C; MACHADO, M.F.P.S; VIDOTI, G.J.; OLIVEIRA, A.J.B. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, n.18, p.627-641, 2008.
- FUNKE, I.; MELZIG, M.F. Traditionally used plants in diabetes therapy - phytotherapeutics as inhibitors of  $\alpha$ -amylase activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, n.16, p.1-5, 2006.
- GILL, S.S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, n.48, p.909-930, 2010.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas Medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 374-381, mar./abr. 2007.
- GOMES, E.T.; SILVA, O.; DINIZ, M.A. e MARTINS, E.S. **Plantas medicinais da Guiné-Bissau: Manual prático Bissau, Ação para o Desenvolvimento**. 17-20, 2003.
- GRATÃO, P.L.; POLLE, A.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Making the life of heavy metalstressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, n.32, p.481-494, 2005.
- GREEN, M.A.; FRY, S.C. Vitamin C degradation in plant cells via enzymatic hydrolysis of 4-O-oxalyl-L-threonate. **Nature**, n.433, p.83-87, 2005.

- GUPTA, S.D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**, first ed. Science publishers, New Hampshire, USA, 2011.
- HAGEL, J.M., YEUNG, E.C., FACCHINI, P.J. Got milk? The secret life of laticifers. **Trends Plant Science**, n.13, p.631–639, 2008.
- HARTOUNIAN, H.; KALER, E. W.; SANDLER, S. I.; **Ind. Eng. Chem. Res.**, 33, 2294, 1994.
- HASANUZZAMAN, M. and HOSSAIN, M. A. TEIXEIRA, J.A.; FUJITA, M. Plant Responses and tolerance to abiotic oxidative stress: antioxidant defenses is a key factors. In: BANDI, V.; SHANKER, A.K.; SHANKER, C.; MANDAPAKA, M. (Org) **Crop Stress and its management: Perspectives and strategies**. Berlin: Springer, 2012. p.261-316.
- HASANUZZAMAN, M.; NAHAR, K. and FUJITA, M. Extreme Temperature Responses, Oxidative Stress and Antioxidant Defense in Plants. In: VAHDATI, K. and LESLIE, C. (Org) **Abiotic Stress - Plant Responses and Applications in Agriculture**. Berlin: Intech, 2013. p.169-204.
- HAYAKAWA, T.; KANEMATSU, S.; ASADA, K. Occurrence of Cu-Zn-superoxide dismutase in the intrathylakoid space of spinach-chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, v. 25, n. 6, p. 883-889, 1984.
- HIRT, H.; SHINOZAKI, K. **Topics in Current Genetics: Plant Responses To Abiotic Stress**. v. 4, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2003.
- HORN, R. A.V.D; JONES, J.D.G. The plant proteolytic machinery and its role in defence. **Current Opinion in Plant Biology**. 7:400–407, 2004.
- HUDDLESTON, J.; ABELAIRA, J. C.; WANG, R. D.; LYDDIATT, A.; **J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.**, 680, 31, 1996.
- IMLAY, J.A. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. **Annuals. Reviews Biochemistry**, v.77, p.755–776, 2008.
- JINPING, Z.; SUN, Y.; WANG, Y.; YANG, J.; LI, F.; ZHOU, Y.; ZHU, L.; RHEYS, J.; MOHAMMADHOSEIN, F.; XU, J. Dissection of genetic overlap of salt tolerance QTLs at the seedling and tillering stages using backcross introgression lines in rice. **Science in China Series C: Life Sciences**, v. 51, n.7, p. 583-591, 2008.
- KATO-NOGUCHI, H.; MOROKUMA, M. Ethanol fermentation and anoxia tolerance four rice cultivars. **Journal Plant Physiology**, v.64, p.168-173, 2007.
- KIMMEL, J.R.; SMITH, E.L. Crystalline papain. I. Preparation, specificity, and activation. **J. Biol. Chem.** 207, 515–531, 1954.
- KOOLMAN, J.; ROEHM, K.H. **Color Atlas of Biochemistry**, 2<sup>nd</sup>ed., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2005.

- KONNO, K. Plant latex and other exudates as plant defense systems: Roles of various defense chemicals and proteins contained there in. **Phytochemistry**, v.72 p.1510–1530, 2011.
- KUMAR, R.; SINGH, K. A.; TOMAR, R.; JAGANNADHAM, M.V. Biochemical and spectroscopic characterization of a novel metalloprotease, cotinifolin from an antiviral plant shrub: *Euphorbia cotinifolia*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.49, p.721-728, 2011.
- LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: RiMa, 2004. 531p.
- LEDERMAN, I. E.; FERREIRA JÚNIOR, J. da S.; BEZERRA, J. E. F.; ESPÍNDOLA, A. C. de M. E. **Mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes)**. Jaboticabal: Funep, 2000. 35 p.
- LEHNINGER-Nelson, D. L.; COX, M. M. Principles of Biochemistry, 4th Edition Freeman, NY, 2005.
- LEWINSOHN, T. M. The geographical distribution of plant latex. **Chemoecology**, 2: 64-68, 1991.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. de Abreu. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. São Paulo: **Instituto Plantarum**, 2002. 512 p.
- JUNIOR, J.F. da SILVA.; LÉDO, A. da SILVA. A cultura da mangaba. 1. Ed. Embrapa, 253p. 2006.
- MAINASARA, M.M.; ALIERO, B.L.; ALIERO, A.A.; DAHIRU, S.S. Phytochemical and antibacterial properties of *Calotropis procera* (Ait) R. Br. (Sodom Apple) fruit and bark extracts. **Int J Mod Bot**, v.1, p.8–11, 2011.
- MANACHINI, P. L.; FORTINA, M. G., Production in sea-thermostable alkaline proteases by a halotolerant strain of *Bacillus licheniformis*. **Biotechnology Letters**, 20: 565-568, 1998.
- MARINHO, D.G.; ALVIANO, D.S.; MATHEUS, M.E.; ALVIANO, C.S.; FERNANDES, P.D. The latex obtained from *Hancornia speciosa* Gomes possesses anti-inflammatory activity. **Journal of Ethnopharmacology** v.135, p.530–537, 2011.
- MARTINEZ, S.S. **O nim, *Azadirachta indica*, natureza, usos múltiplos, produção**. 2011. 205 p.
- MARZZOCO, A.; E TORRES, B. B. **Bioquímica Básica**. 3. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 736p. 2007.
- MAYER, A.M. Polyphenol oxidases in plants and fungi: going places? A review. **Phytochemistry**, v.67, p.2318–2331, 2006.
- McKEE, H. S. **Nitrogen metabolism in plants**, 329. Oxford: Clarendon, 1962. 728 p.
- MEHLER, A.H.. Studies on reactions of illuminated chloroplasts. II. Stimulation and inhibition of reaction with oxygen. **Archives Biochemistry Biophysics**, v.33, p. 65–77, 1951.
- MELO-REIS, P.R.; ANDRADE, L.S.; SILVA, C.B.; ARAÚJO, L.M.M.; PEREIRA, M.S.; MRUE, F.& CHEN-CHEN, L. Angiogenic activity of *Synadenium umbellatum* Pax latex. **Brazilian Journal Biology**, v. 70, n. 1, p. 189-194, 2010.
- MILLER, G.; SHULAEV, V.; MITTLER, R. Reactive oxygen signaling and abiotic stress. **Physiologia Plantarum**, v.133, p.481-489, 2008.

- MITRA, J. Genetics and genetic improvement of drought resistance in crop plants. **Current Science**, Bangalore, v. 80, n. 6, p. 758-763, 2001.
- MITTLER, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant in Science**, v.9, p.405-410.
- MITTLER, R. Abiotic stress, the field environment and stress combination. **Trends in plant science**, 2006, v.1, p.15-19.
- MONACHINO, J. **A revision of *Hancornia* (Apocynaceae)**. Lilloa, Tucumán, v. 11, p. 19-48, 1945.
- MORAES, T. M.; RODRIGUES, C.M.; KUSHIMA, H.; BAUAB, T. M.; VILLEGASB, W.; PELLIZZON, C.H.; BRITO, A.R.M.S.; HIRUMA-LIMA, C.A. *Hancornia speciosa*: Indications of gastroprotective, healing and anti-*Helicobacter pylori* actions. **Journal of Ethnopharmacology**, v.120, p.161–168, 2008
- MORCELLE, S. R.; CAFFINI, N. O.; PRIOLO, N. Proteolytic properties of *Funastrum clausum* latex. **Fitoterapia**, v.75, p.480-493, 2004.
- MOZAFFARI, V.; PAKNIYAT, H.; HASHEMINASAB, H.; ANOSHEH-PIRASTEH, H. Differential antioxidative response to drought stress and relationship with water use efficiency in maize hybrids. **International Journal of Farming and Allied Sciences**, v.2, p.277-281, 2013.
- NEURATH, H. The diversity of proteolytic enzymes. In: BEYNON, R. J.; BOND, J. S. (Eds.). **Proteolytic enzymes - a practical approach**. Oxford: JRL Press, 1990. 259 p.
- NEUWINGER, H.D. **African traditional medicine: a dictionary of plant use and applications**. Medpharm Scientific, Stuttgart, Germany, 2000. 589p.
- NEWMAN, D.J.and CRAGG, G.M. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v.75 (3), p.311-335, 2012.
- NOCTOR, G.; DE PAEPE, R.; FOYER, C.H. Mitochondrial redox biology and homeostasis in plants. **Trends in Plant Science**, v.12, p.125-134, 2007.
- NOGUEIRA, R.J.M.C.; FILHO, P.A.M.; ARAÚJO, E.L. Expressões ecofisiológicas de germoplasma de *Hancornia speciosa* Gomes cultivado no litoral de Pernambuco. **Ciência Rural**, v.29, p.731-732, 1999.
- NOGUEIRA P. C. L.; SAMPAIO T. S. Volatile components of mangaba fruit (*Hancornia speciosa* Gomes) at three stages of maturity, **Food Chemistry**, 2006.
- OSTROSKY, E.A.; MIZUMOTO, M.K.; LIMA, M.E.L.; KANEKO, T.M.; NISHIKAWA, S.O.; FREITAS, B.R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.18(2), p.301-307, 2008.
- PANDHAIR, V.; SEKHON, B.S. Reactive oxygen species and antioxidants in plants: An overview. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, New Delhi, v. 15, n. 2,p. 71-78, 2006.
- PAULA, R.D. de G. Estudo sobre o látex e borracha de mangabeira (*Hancornia sp.*). **Revista de Química Industrial**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 153, p. 20-25, 1944.

PREMAKURI, V.T.; REGHU, C.P.; PANIKKAR, A.O.N.; AMMA, S.C.K. Anatomical and histochemical aspects of bark regeneration in *Hevea brasiliensis*. **Annals of Botany** v.75, p.421-426, 1995.

PEREIRA, J.W.L DE.; FILHO, P. A DE. M.; ALBUQUERQUE, M.B.; NOGUEIRA, R.J.M.C.; SANTOS, R.C. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 4, p. 766-773, 2012.

PESSOA-JR, A., KILIKIAN, B.V. **Purificação de Produtos Biotecnológicos**. 1 ed. São Paulo: Editora Manole, 2005. 444p.

PINHEIRO, E. O látex e a borracha da mangabeira. In: **Simpósio Brasileiro sobre a cultura da mangaba, 2003**, Aracaju, SE. Anais... Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2003. Disponível em CD-ROM.

PINHEIRO, E.; PINHEIRO, F.S.V. Produção de Borracha. In: **A cultura da mangaba**. Embrapa, v.1 p.233-234, 2006.

PITZSCHKE, A.; FORNAZI, C.; HIRT H. Reactive oxygen species signaling in plants. **Antioxidants and Redox Signalling**, New York, v. 8, n. 9, p. 1757-1764, 2006.

POLLE, A. Dissecting the superoxide dismutase–ascorbate–glutathione pathway in chloroplasts by metabolic modeling. Computer simulations as a first step towards flux analysis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 126, n. 1, p. 445–462, 2001.

PORTO, C.S.; PORTO, T.S.; NASCIMENTO, K.S.; TEIXEIRA, E.H.; CAVADA, B.S.; LIMA-FILHO, J.L.; PORTO, A.L.F. Partition of lectin from *Canavalia grandiflora* Benth in aqueous two-phase systems using factorial design. **Biochemical Engineering Journal**, v.53, p.165–171, 2011.

POTT, A., POTT, V.J. **Plantas do pantanal**. EMBRAPA, Planaltina, 1994. 320p

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B.; PINTO, C. A. B. P. Genética na agropecuária São Paulo: Globo. 359 p.,1989.

RAO, M. B.; TANKSALE, M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 597-635, Sep. 1998.

RASMANN, S., JOHNSON, M.D., AGRAWAL, A.A. Induced responses to herbivory and jasmonate in three milkweed species. **Journal Chemistry Ecology**, v.35, p.1326–1334, 2009.

REBOUÇAS, S.O.; SILVA, J.; GROFF, A.A.; NUNES, E.A.; IANISTCKI, M.; FERRAZ, A.B.F. The antigenotoxic activity of latex from *Himatanthus articulatus* **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.22(2), p.389-396, 2012.

RESENDE, M.L.V.; SALGADO, S.M.L.; CHAVES, Z.M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesas de plantas a patógeno. **Fitopatologia Brasileira**, v.8, p. 123-130, 2003.

RICHARDSON, M. Seed storage proteins: the enzyme inhibitors. In: DEY, P. M.; J. B. HARBORNE (Ed.). **Methods in plant biochemistry**. New York: Academic Press, 1991. v. 5, p. 259-306.



SALOMA, E. E.; VILLEGAS, P. V.; AGUILLAR, O.; RITO-PALOMARES, M. Continuous aqueous two-phase systems devices for the recovery of biological products. **Food and Bioproducts Processing**, 2013.

SALVI, R. M. et. al. **Interações medicamentos x Fitoterápicos: em busca de uma prescrição racional**-Porto alegre: EDIPUCRS, p. 13, 2008.

SANTOS, P.O.; BARBOSA, J.A.M.; MELO, D.L.F.M.; TRINDADE, R.C. Investigação da atividade antimicrobiana do látex da mangabeira (*Hancornia speciosa* GOMES). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.9, p.108–111, 2007.

SAÚDE-GUIMARÃES, D.A.; FARIA, A.R. Substâncias da natureza com atividade anti-*Trypanosoma cruzi*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, p.455-465, 2007.

SAWADOGO, W.R.; SCHUMACHER, M.; TEITEN, M.H. DICATO, M.; DIEDERICH, M. Traditional West African pharmacopeia, plants and derived compounds for cancer therapy. **Biochemical Pharmacology**, 2012.

SCANDALIOS, J.G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology**, v.101, p.7-12, 1993.

SCANDALIOS, J. G., 2005. Oxidative stress: Molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.38, p.995-1014.

SECKIN, B., AKSOY, M. The Responses of Ascorbate - Glutathione Cycle Enzymes in Seedlings of *Pancreatium maritimum* L. under Drought Treatments. **Journal of Stress Physiology & Biochemistry**, v.9 (2), p.148-158, 2013.

SEQUEIRA, B.J.; VITAL, M.J.S.; POHLIT, A.M.; PARAROLS, I.C.; CAÚPER, G.S.B. Antibacterial and antifungal activity of extracts and exudates of the Amazonian medicinal tree *Himatanthus articulatus* (Vahl) Woodson. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, p.659-661, 2009.

SERRANO, R.; SILVA, O.; DINIZ, M.A.; GOMES, E.T. *Guiera senegalensis* - **A medicina dos mouros - botânica, usos tradicionais e atividade farmacológica**. Workshop Plantas Mediciniais e Fitoterapêuticas nos Trópicos. ICT /CCCM, 29, 30 e 31 de Outubro de 2008.

SGARBIERI, V.C.; GUPTE, S.M.; KRAMER, D.E.; WHITAKER, J.R. Ficus enzymes. I. Separation of proteolytic enzymes of *Ficus carica* and *Ficus glabrata* latices. **J. Biol. Chem.** 239, p.2170–2177, 1964.

SHARP K. A.; YALPANI, M.; HOWARD, S. J.; BROOKS, D. E.; **Anal. Biochem.** p.154,110, 1986.

SILVA, L.H.M.; LOH, W. Sistemas aquosos bifásicos: fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas. **Quim. Nova**, Vol. 29, No. 6, 1345-1351, 2006.

SILVA, V. A.; FREITAS, A. F. R.; PEREIRA, Ma. S. V.; PEREIRA, A. V. Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* da *Lippia sidoides* Cham sobre *Staphylococcus aureus* de origem bovina. **ACSA - Agropecuária Científica no Semi-Árido**, v.05, p.52-56, 2009.

SINGH, V.K.; PATEL, A.K.; MOIR, A.J. Jagannadham, Indicaín, a dimeric serine protease from *Morus indica* cv. K2, **Phytochemistry** 69, 2110-2119, 2008.

SHEWRY, P.R.; LUCAS, J.A.; 1997. Plant proteins that confer resistance to pests and pathogens. **Advances In Botanical Research Incorporating Advances In Plant Pathology**, v.26, p.135-192.

SCHUCH, L. F. D. **Plantas Medicinais em Atenção Básica Veterinária: Atividade Antimicrobiana frente a Bactérias Relacionadas com Mastite Bovina e a Dermatofitos**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

SILVA, T.F.; COELHO, M.R.R.; VOLLÚ, R.E.; GOURLART, F.R.V.; ALVIANO, D.S.; SELDIN, L. Bacterial community associated with the trunk latex of *Hancornia speciosa* Gomes (*Apocynaceae*) grown in the northeast of Brazil. **Antonie van Leeuwenhoek** v.99, p.523-532, 2010.

SIMÕES, C.M.O. Fitoterápicos eficazes e validados para estas patologias **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 3<sup>a</sup>. ed. Porto Alegre- RS, Editora da UFSC e UFRGS, 2003.

SHIVAPRASAD, H.V.; RAJESH, R.; NANDA, B.L.; DHARMAPPA, K.K.; VISHWANATH, B.S. Thrombin like activity of *Asclepias curassavica* L. latex: Action of cysteine proteases **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, p. 106-109, 2009.

SHOWELL, M. S. Enzymes, detergent. *In*: FLICKINGER, M. C.; DREW, S.W(eds.). **Encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis and bioseparation**. Wiley&Sons, New York, 1999. p. 958-971.

SOARES, A.M.S DO.; MACHADO, O.L.T. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica**, v.1, n.9, 2007.

SOARES, D.C.; ANDRADE, A.L.S.; DELORENZI, J.C.; SILVA, J.R.A.; FREIRE DE-LIMA, L.; FALCÃO, C.A.B.; PINTO, A.C.; ROSSI-BERGMANN, B. Leishmanicidal activity of *Himatanthus sucuuba* latex against *Leishmania amazonensis*. **Parasitol Int.**, v.59, p.173-177, 2010.

SREEDHAR, R.V.; VENKATACHALAM, L. & NEELWARNE, B. Hyperhydricity-related morphologic and biochemical changes in *Vanilla* (*Vanilla planifolia*). **Journal of Plant Growth Regulation**, v.28, p.46-57, 2009.

SUFFREDINI, I.B.; DALY, D.C. O Rio Negro como Cenário na Busca de Novos Medicamentos. *In* **Florestas do Rio Negro**, p. 257-281, 2004.

SUMANTHA, A.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: a perspective. **Food Technology Biotechnology**, v.44 (2), p.220-221, 2006.

TAHI, H.; WAHBI, S.; MODAFAR, C.E. Changes in antioxidant activities and phenol content in tomato plants subjected to partial root drying and regulated deficit irrigation. **Plant Biosystems**, v.142, 2008.

- TAKAMI, H., AKIBA, T.; HORIBOSHI, K., Production of extremely thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 30: 120-124, 1989.
- TERZI, R. et al. Impact of soil drought stress on photochemical efficiency of photosystem II and antioxidant enzyme activities of *Phaseolus vulgaris* cultivars. **Tubitak**, v. 34, p. 01-10, 2010.
- TESKE, MAGRID; TRENTINI, ANNY MARGALY M. Herbarium: compêndio de fitoterapia. 3. ed. Curitiba: **Herbarium** Laboratório Botânico, 1997. 317 p.
- TIJJANI, A.; SALLAU, M.S; SUNUZI, I. Synergistic activity of methanolic extract of *Adenium obesum* (*Apocynaceae*) stem-bark and oxytetracycline against some clinical bacterial isolates. **Bayer Journal of Pure and Applied Sciences**, v.4(1), p.79 – 82, 2011.
- TREMACOLDI, C.R. Proteases e inibidores de proteases na defesa de plantas contra pragas. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2009 44p.
- TUBIO, G.; NERLI, B.; PICÓ, G. Relationship between the protein surface hydrophobicity and partitioning behavior in aqueous two -phase systems of polyethyleneglycol-dextran. **Journal of Chromatography B**. v. 799, 2004. p. 293-301.
- USHA NAIR, R. Biochemistry and physiology of látex productive. In: Natural Rubber agromanagement and crop processing. **Rubber Institut of Índia**, p. 249-260, 2000.
- VAN QUAQUEBEKE, E.; SIMON, G.; ANDRE, A.; DEWELLE, J.; EL YAZIDI, M.; BRUYNEEL, F. Identification of a novel cardenolide (200-oxovoruscharin) from *Calotropis procera* and the hemisynthesis of novel derivatives displaying potent *in vitro* antitumor activities and high *in vivo* tolerance: structure–activity relationship analyses. **Journal Medicinal Chemistry**, v.48, p.849–856, 2005.
- VALADARES, M. C.; CARRUCHA, S. G.; ACCORSI, W.; & QUEIROZ, M. L.. *Euphorbia tirucalli* L. modulates myelopoiesis and enhances the resistance of tumour-bearing mice. **International immunopharmacology**, v.6, (2), p.294-299, 2006.
- VERSLUES, P.E.; KIM, Y.S.; ZHU, J.K. Altered ABA, proline and hydrogen peroxide in an *Arabidopsis* glutamate:glyoxylate aminotransferase mutant, **Plant Molecular Biology**, Amsterdam, v. 64, n. 2, p. 205-217, 2007.
- VIEIRA NETO, R. D. **Cultura da mangabeira**. Aracaju: Embrapa-CPATC,. 16 p. (Circular técnica, 2) 1994.
- VIEIRA NETO, R. D.; VIÉGAS, P. R. de A. Comportamento da mangabeira sob diferentes substratos, em adubação de fundação. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA**, 17., 2002, Belém. Resumos... Belém: Embrapa Amazônia Oriental/Sociedade Brasileira de Fruticultura, 2002. CD-ROM.
- XAVIER, L.; FREIRE, M.S.; VIDAL-TATO, I.; GONZÁLEZ-ÁLVAREZ, J. Sistemas de duas fases aquosas para a extração de compostos fenólicos de eucalipto (*Eucalyptus globulus*) de madeira resíduos industriais. **Journal Chemical Technology Biotechnology** . doi: 10.1002/jctb.4260, 2013.

YUNES, R.A.; CECHINEL, F. V. Breve análise histórica da química de plantas medicinais: Sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas ocidental e oriental. In: Yunes R. A., Calixto J.B. (org.) **Plantas medicinais sob à ótica da química medicinal moderna**. Chapecó, Brasil: Argos, p. 18-44, 2001.

WAHLER, D., SCHULZE GRONOVER, C.S., RICHTER, C., FOUCU, F., TWYMAN, R.M., MOERSCHBACHER, B.M., FISCHER, R., MUTH, J., PRÜFER, D. Polyphenoloxidase silencing affects latex coagulation in *Taraxacum* species. **Plant Physiology**, v.151, p.334–346, 2009.

WANG, S.; LIANG, D.; LI, C.; HAO, Y.; MA, F.; SHU, H. Influence of drought stress on the cellular ultrastructure and antioxidant system in leaves of drought-tolerant and drought-sensitive apple rootstocks. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.51, p.81-89, 2012.

WAZIRI, S. M.; ABU-SHARKH, B. F.; ALI, S. A. **Biotechnol. Prog.** 20, 526, 2004.

WILLEKENS, H.; C. LANGEBARTELS, C.; TIRÉ, M.; VAN MONTAGU, D.; INZÉ, AND VAN CAMP, W. Differential expression of catalase genes in *Nicotiana plumbaginifolia* (L.). **Proc. Natl. Acad. Sci.**, USA 91: p.10450–10454, 1994.

WISNIEWSKI, A.; MELO, C.F.M. Borracha naturais brasileiras III . **Borracha de mangabeira**. Belém; EMBRAPA-CPATU, 1982, 59p.

ZHAO, L.; PENG, Y.L.; GAO, J.M.; CAI, W.M. Bioprocess intensification: an aqueous two-phase process for the purification of C-phycocyanin from dry *Spirulina platensis*. **European Food Research Technology**, 2013.

ZHU-SALZMAN, K.; LUTHE, D.S.; FELTON, G.W. Arthropod-inducible proteins: broad spectrum defenses against multiple herbivores. **Plant Physiology**, v.146, 852–858, 2008.

ZHOU, Y.F.; LIU, W.Z. Laticiferous canal formation in fruit of *Decaisnea fargesii*: a programmed cell death process? **Protoplasma**, p.229-232, 2010.

## Capítulo 1

Latex as an oxidative stress indicator in mangabeira tree (*Hancornia speciosa* Gomes)  
submitted to water deficit<sup>1</sup>.

---

<sup>1</sup>Trabalho desenvolvido no Programa de Pós-Graduação em Botânica/UFRPE, enviado para a revista Journal of Experimental Botany.

## **Latex as an oxidative stress indicator in mangabeira tree (*Hancornia speciosa* Gomes) submitted to water deficit.**

Running Title: Latex antioxidative metabolism in response to drought

Gileno Vitor Mota Lima, Gilvany Rodrigues de Andrade, Maria Taciana Cavalcanti Soares, Terezinha Rangel Camara\*, Ana Lúcia Figueiredo Porto.

Bioactives Technologies Laboratory and Plant Tissue Culture Laboratory, Pernambuco Federal Rural University (UFRPE), Dom Manoel de Medeiros Avenue, Recife /PE, Brazil

\* To whom correspondence should be addressed. E-mail: [teca.camara@gmail.com](mailto:teca.camara@gmail.com)

### **Abstract**

The biochemical responses of three lattices accesses (Pernambuco-(PE), Paraíba-(PB) and Rio Grande do Norte-(RN)) of mangabeira tree (*Hancornia speciosa* Gomes) established in a germplasm bank facing the water deficit were evaluated *in vivo* due to rainfall variation observed over the months of drought in 2010 to 2012 years in the João Pessoa-PB city. SOD activity increased over the years. The highest values were recorded in the year 2012, being RN access what obtained highest average activity. The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> level increased in the 2010 and 2011years, reflecting the low activity of APX in those years. In the 2012 year, there has been increased of SOD and APX activity, evidencing the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content control. APX activity increased when precipitation declined. The largest APX activity were in the 2012 year in all accesses evaluated, being RN access which presented higher activity than other accesses that year, and the PE access the lower APX activity. The major averages about H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content were observed in the 2011year for all accessions tested. The PB access obtained greater accumulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the 2010 and 2011years; already in the 2012 year, the highest content of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was observed in the PE access. PPO activity, increased gradually in the PE and RN accesses over the years evaluated. In the PB access, the activity has reduced over the years. The results indicates that increased exposure to drought induces distinct responses of antioxidative metabolism in mangabeira accesses investigated and mangabeira latex is a viable alternative for evaluation of antioxidative metabolism.

Key words: Antioxidative response, *Hancornia speciosa* Gomes, *in vivo*, latex, rainfall, water deficit.

## Introduction

The *Hancornia speciosa* Gomes species, of the Apocynaceae family, is a tropical fruit tree native from Brazil and found in various regions of the country, since the coastal trays and coastal lowlands in the Northeast, where it is more abundant, till the cerrados of Central-West, North and Southeast regions (Andersen and Andersen, 1988).

The mangabeira, a cerrado typical species is a laticifer plant which presents aromatic, tasty and nutritious fruits, with wide acceptance in the market, both for fresh consumption, as for the industry. The exploitation of this species is restricted mostly to the fruits, latex at a drawback regarding the knowledge of its attributes and bioactive potential (Lederman et al., 2000).

The mangabeira vegetative development is more significant during periods of higher temperature and pattern rainfall is between 750 and 1.600 annual mm, although the species is resistant to water deficit periods (Andersen and Andersen, 1988). Physiological and biochemical behavior informations of mangabeira against to environmental variations are few, especially under water restriction conditions (Nogueira et al. 1999).

The environmental adversities such as UV radiation, intense light, herbicides, pathogen attack, hyperoxia, ozone, drought, heavy metals, high salt concentration, temperature extremes, air pollution, among others, may be inducing biotic and abiotic stress (Mittler, 2006; Jiping et al., 2007; Gupta, 2011), influencing the plant secondary metabolites composition and production, including latex (Melo-Reis, 2010). The latex biological properties exert defensive role, against environmental fluctuations (abiotic stress) and predators, pathogens (biotic stress) attacks (Azarkan et al., 2005; Sumantha, 2006; Hagel, 2008; Konno, 2011).

According Morcelle et al., (2004) and Aguiar (2006), latex is the cytoplasmic fluid of tissues vegetables laticifers, milky, and usually whitish color. It consists of complex emulsion composed of: proteins, amino acids, carbohydrates, lipids, vitamins, alkaloids, carbonates, gums, resins, tannins, and terpenes. In the specie latex, the constituents are always the same, and there may be quantitative changes, ranging under the influence of environmental factors and phenological events (Pinheiro and Pinheiro, 2006).

According Shewry and Lucas (1997) and De Wit (2007), plants can change the composition of molecular compounds, as a defense mechanism and many of these

changes may be directly related to the defense and protection. To survive during the evolutionary process, plants have developed response mechanisms against damage and disease, when triggered, recognize aggression (Konno, 2011).

Currently, the biological significance of latex is poorly known there are few published data. Most authors hold the hypothesis of a defensive role of latices against insects and phytopathogens. Such hypothesis is mainly supported by phytochemical profile found in distinct latices (Farias et al., 2007; Freitas et al., 2010). Latex, however, not only has phytochemical relevance, but also physiological, highlighting the importance of understanding the breadth of its role in metabolic activity and implications in plant protection (Freitas et al., 2010). Recent surveys of latices have contributed to the understanding the structure and occurrence of secondary metabolites naturally accumulated in laticifers (Elsasser et al., 2005; Mazoir et al., 2008). However, studies that mention the proteins activities on latices under a physiological perspective are just beginning, being restricted to proteins of the latices involved in primary metabolism, limiting the elucidation of the role of latex in plants (Freitas et al., 2010).

According Sumantha (2006) and Konno (2011), in the latex composition has been found a broad range of enzymes such as oxidases and proteases that have biological properties which confer protection for plants against environmental damage. The biotic or abiotic stresses lead to changes in expression pattern of proteins in plants may occur as both inhibition of the induction of specific constituent protein biosynthesis (Soares and Machado, 2007).

Appropriate responses to environmental changes are crucial for adaptation, growth and survival of the plant and the study of these responses enable the understanding of the functioning of biological systems under different environmental conditions. But, the molecular and biochemical mechanisms that orchestrate these responses are still poorly understood (Kato-Noguchi and Morokuma, 2007; Gupta, 2011; Santino et al., 2013).

It is known that a route plant defense, perhaps the best known is called route octadecanoid, which culminates with the production of jasmonic acid: a plant hormone that induces the expression of several genes related to defense against stress (Soares and Machado, 2007). This same route induces hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) production, a reactive oxygen species that can act initially as a signaling molecule in plant defense. Other reactive oxygen species (ROS) such as superoxide



anion ( $O_2^{\cdot-}$ ) and hydroxyl radical ( $OH^{\cdot}$ ), and several antioxidant enzymes are modulated constantly against specific stress, in order to get around it (Mittler, 2002). According Van Loon et al.,(2006), is expected to occur antioxidative activity in latex, considering the endogenous oxidative process involving secondary metabolites in plants specialized cells. The antioxidative enzymes, however, are recognized as pathogenesis-related proteins and regulated according to the intensity of the infection.

The antioxidative enzymes present in the latex, such as superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, polyphenol oxidase and catalase to, among others that make up the antioxidative system, are of great importance, because they are responsible for keeping under control the level of reactive oxygen species (ROS), thus preventing damage to the photosynthetic apparatus, the membrane lipids, proteins and nucleic acids under inducing conditions biotic and abiotic stresses (Houssain et al. 2009; Seckin and Aksoy, 2013). The efficiency of this regulation may be differentially assigned to tolerant or sensitive plants to oxidative stress (Moller et al. 2007; Gupta, 2011).

Most of the antioxidant enzymes system operates catalyzing the conversion of  $H_2O_2$  to  $H_2O$  and  $O_2$  with the exception of SOD, which operates in the dismutation of superoxide anion ( $O_2^{\cdot-}$ ) Xu et al., 2008; Gill and Tuteja, 2010). The stress tolerance varies not only between species, but also between plants of the same species and between leaves of the same plant at different stages of development (Klumpp et al. 2000).

Therefore, we aimed to evaluate the *in vivo* biochemical responses of the lattices of three mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) accesses (PE, PB and RN) which are currently considered the most productive, established in a germplasm bank against the water deficit resulting from the variation in rainfall observed over the dry months, in the 2010 to 2012 years in the João Pessoa (PB) city.

## **Materials and methods**

### **Collecting Mangabeira Latex**

Latex of Pernambuco (PE), Paraíba (PB) and Rio Grande do Norte (RN) accesses were collected at the José Irineu Cabral Experimental Station unit, belonging for Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba (EMEPA-PB) located in João Pessoa (PB) city, through incisions in the stem with the aid of

stainless steel cutting material, and then stored under refrigeration at -20 °C until analysis.

#### Antioxidative Enzymes Determination

##### Superoxide Dismutase (SOD, E.C. 1.15.1.1)

The superoxide dismutase activity was determined by measuring their ability to inhibit the photochemical reduction of nitro blue tetrazolium chloride (NBT), as described by Giannopolitis et al., (1977). The reaction mixture (3.0 mL) was composed of 0.05 ml sample 1.765 ml of potassium phosphate buffer (50 mM, pH 7.0), 0.03 ml EDTA (0.1 mM) 0.78 ml of methionine (13 mM) 0.225 ml NBT (75 mM), 0.15 ml riboflavin (1mM). Riboflavin was added last and the tubes were shaken and exposed to fluorescent lamps (30 watts) for 5 minutes. After this time, the tubes were kept in dark, and measured absorbance at 560 nm. A unit of SOD activity (U) has defined as the amount of enzyme required to cause a 50% reduction in the rate of NBT. The results were expressed as U mg SOD<sup>-1</sup> protein.

##### Ascorbate peroxidase (E.C. 1.11.1.11)

The activity was determined as described by Nakano and Asada (1981). The reaction mixture (1.5 mL) was composed of 0.075 ml sample, 1.335 ml of potassium phosphate buffer (50mM, pH 7.0), 0.075 ml of L ascorbic acid (0.5 mM) and 0.015 mL of hydrogen peroxide (20mM).The assay depends on the decrease in absorbance at 290nm as ascorbate was oxidized. The activity was expressed as μmol AsA / mg protein / min.

##### Catalase (E.C. 1.11.1.6)

The activity was determined according to Havir and Mchale (1987). The reaction system (1.5 ml) was composed of 1.390 ml of potassium phosphate buffer (50mM, pH 7.0), 0.050 ml of the sample and 0.060 ml of hydrogen peroxide (0.5 M). The decomposition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was followed at 240 nm (E = 39.4 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>). The activity was expressed as μmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/mg protein / min.

##### Poliphenoloxidase (E.C. 1.14.18.1)

The activity was determined as described by Kar and Mishra (1976). The reaction system (1.5 ml) was composed of 1 ml of pyrogallol (50 mM), 0.250 ml of the sample and 0.250 ml of sulfuric acid (5%). The absorbance was performed at 420 nm, and the activity expressed in U / ml.

##### Hydrogen Peroxide Content (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

The hydrogen peroxide content was quantified according to the Alexieva et al., (2001) protocol. The fresh samples were homogenized with trichloroacetic acid (TCA) 0.1%, 1 mL/10 mL (v: v) ratio. The samples were centrifuged at 10,000 g for 15 min at 4 ° C. The supernatant was removed 0.2 mL to which was added 0.2 mL of potassium phosphate buffer 100 mM (pH 7.5) and 0.8 mL of potassium iodide (1 M). The samples remained on ice in the dark for one hour. After this period, samples were removed from ice and kept at room temperature for stabilizing the reaction, and then measured absorbance at 390 nm.

#### Protein Content (Bradford)

Protein concentration in the enzyme extract was determined by the method of Bradford, (1976).

#### Statistical analysis

It was used a 3x3 factorial design consisting of factors: access (PE, PB and RN) x sampling times (2010, 2011 and 2012). Quantitative data were subjected to analysis of variance and means were compared by Tukey test at 5% probability, using the Assistat software (Assis and Silva, 2013).

## Results and Discussion

Environmental stresses situations among them water deficit resulting from irregular rainfall distribution, limiting the development of plant species causing, in most cases, the accumulation of free radicals in response to these oscillations (Valliyodan and Nguyen, 2006; Solomon et al., 2009).

Throughout the experimental period, the maximum rainfall (28.63 mm) was recorded in 2010 and the minimum (11.2 mm) occurred in 2012 (Fig. 1), a rainfall deviation of 76.15 mm to 2010 mm and 90.7 mm for the 2012 year, respectively ([www.aesa.pb.gov.br/](http://www.aesa.pb.gov.br/) accessed in: May, 2013).

According to Doorenbos and Kasan (1979), rainfall distribution periods less than 60 mm of rain has characterized water deficit.

Water deficit leads biochemical changes, especially in the antioxidant defense system (Gratão et al., 2005). However, it is important to highlight that the observed changes, as well as the adaptation of plants to adverse conditions, are strongly associated with the duration and intensity of stress (Behera et al., 2003), species (Ghannoum, 2009) and the genotype (Gimenez et al. 1992; Abraham et al. 2004).

The mangabeira accesses PE, PB and RN had different responses regarding the antioxidant enzymatic and non-enzymatic activity (Fig. 2). These accesses seem to have different adaptive mechanisms to regulate their redox state against drought.

As to SOD activity, it was increased over the years evaluated (Fig. 2A). The highest values were observed in 2012 (Fig. 2A), and RN access had higher average activity compared to other accesses.

In response to the SOD high activity, the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> level increased in the 2010 and 2011 years reflects, also the still low APX activity in these years. In 2012, there was increased SOD and APX activity, showing control the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content (Fig. 2 A, B, C).

Although SOD part of an initial adjustment tolerance of plants to oxidative stress, accumulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a product of that enzyme is as damaging superoxide (Gupta, 2011).

Plants contain different SOD isoforms, suggesting the existence of multiple nuclear genes (Scandalios, 2005). The regulation of genes encoding for SOD is very sensitive to environmental variations, probably due to changes in redox potential of the cell. Increased SOD activity, caused by drought, has been reported in several species such as olive (Doupis et al., 2013), mulberry (Yu et al., 2013), fig (Gholami et al., 2012), among others.

Similar results on the activities of antioxidant enzymes (APX and SOD) were obtained by Freitas et al., (2010) evaluated the protein profile of lattices of two species of the family Apocynaceae: *Cryptostegia grandiflora* R.Br. and *Plumeria rubra* L. According Salunke et al., (2005) the laticifers are specialized cells that express DNA information differently, leading to the synthesis of specific proteins and metabolites.

Wang et al., (2013) when comparing two apple genotypes with different levels of tolerance to drought found that adaptation to drought depends on different mechanisms including the ability to increase the antioxidant enzymatic and non-enzymatic activity. However, this feature seems to vary according to the genotypes.

The APX activity increased when precipitation declined. The highest average APX activity (Fig. 2C) were recorded in the 2012 year in all evaluated accesses, with RN access showed higher activity than the other accesses that year, and PE access lower APX activity.

No catalase (CAT) activity was detected in the course of the experiment, however Freitas et al., (2010) reported CAT activity for *Cryptostegia grandiflora* R.Br. and detected no activity for *Plumeria rubra* L. although the species evaluated in this experiment (Mangabeira) and investigated by the authors belong to the same family, Apocynaceae, that way again stands out the differences in the metabolism of the latex protein expression.

The highest average of the hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) content (Fig. 2B) were observed in 2011 for all accesses evaluated. PB access had a higher accumulation of  $H_2O_2$  in the 2010 and 2011 years, whereas in 2012, the highest level of  $H_2O_2$  was observed in PE access when compared with other treatment, demonstrating a possible signaling role of this ROS in the activation of enzymes and gene expression (Fig. 2B).

The endogenous concentrations of  $H_2O_2$  described in a wide range of species, are quite variable from nanomoles (nmol / g) to hundreds of micromoles ( $\mu\text{mol}$  / g) in fresh matter (Veljovic-Jovanovic et al., 2002), which difficult to establish toxic levels.

Thus, it is important to point out that the  $H_2O_2$  to be a more stable molecule and have lower reactivity compared with other ROS (Gratão et al., 2005) not has reached, in the accesses studied, sufficient concentration to stimulate the activity of APX and consequent oxidative protection the 2010 and 2011 years.

Even though the deleterious role is assigned to the majority of ROS, some authors advocate the molecular signaling role of environmental conditions, in particular by hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) (Mittler, 2002; Xiong et al., 2002; Miller et al., 2008).  $H_2O_2$  can be removed by APX and CAT through different mechanisms also result in  $O_2$  and  $H_2O$  (Mittler, 2002; Foyer and Noctor, 2003).

According to Bowler and Fluhr (2000), the accumulation of  $H_2O_2$  in specific tissues and in suitable quantities benefits plants mediating acclimation and cross-tolerance to biotic and abiotic stresses. It has been shown that the addition of  $H_2O_2$  in leaf tissues and its endogenous induction acts as a signal to induce the expression of genes related to catalase, ascorbate peroxidase, guaiacol peroxidase, and glutathione peroxidase. Thus, the production of  $H_2O_2$  in different cellular compartments coordinates the activity of antioxidant enzymes, which act alone or in conjunction determining the type and level of response to environmental stresses.

The specificity between the enzymes and  $H_2O_2$  reflect their different affinities wherein the APX has a high affinity operating on the order of micromolar ( $\mu\text{M}$ ) of

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> while the CAT has low affinity, acting in order of millimolar (mM), of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Gupta, 2011).

Thus, the APX seems to be responsible for fine adjustment of the response to ROS (Mittler, 2002), with great importance in protecting against oxidative damage. This apparatus may be essential to cause the modulation at the level of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resulting in signaling and, therefore, oxidative protection (Shigeoka et al., 2002; Scandalios, 2002, 2005).

Therefore, the balance between APX and CAT gene and biochemical level may be an important mechanism to enable other routes defense to oxidative stress conditions against environmental stresses (Møller et al., 2007; Nguyen et al., 2009).

It was found in this work an inverse relationship regarding APX activity and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content (Figs. 2A and 2B). According to previous studies carried out by Foyer and Noctor (2000), the APX are peroxidases that act in the removal of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inside the cell and act in synchrony with other enzymes involved in the ascorbate-glutathione cycle being directly involved in the response to water stress, and its increased activity with increased exposure to stress. Thus confirming the results related to the effects of water stress in Andiroba (Carvalho et al., (2013), beets (Romano et al., 2013) in apple genotypes (Liu et al., 2012) and Seckin and Aksoy (2013 ) evaluated the responses of antioxidative metabolism to drought of seedlings of *Pancratium maritimum* L.

As for PPO activity, it was found gradual increase in PE and RN accesses over the years evaluated. In the PB access, there was a reduction in activity in the course of the years studied (Fig. 2D).

The PPO is associated with cell wall structure of plants, having also a protective function against the action of ROS in response to oxidative stress and injuries resulting from herbivory plant or exploitation of latex (Alvarenga et al., 2011). According to Wahler et al. (2009), the wound through the cut to sangria in most laticifer plants induces an immediate increase in PPO activity by rapid release of rubber complexes (*Frey Weyssling*) which enables the rapid sealing of the wound and reducing the risk of infection by facultative pathogens.

The PPO acts in hydroxylation and oxidation of phenolic compounds, which are ultimately converted to quinones (Zhu-Salzman et al., 2008; Agrawal and Konno, 2009). According to Mayer (2006), the polyphenol oxidases activity levels have a direct relationship with plant tolerance to water stress, which can mean a form of

protection of plant tissues against oxidative stress generated under such circumstances.

Several studies have demonstrated stimulation of PPO activity proportional to the increase of water stress in several species: tomato (Tahi et al., 2008), olive (Anjum et al., 2012), apple (Wang et al., 2012) and quinoa (Fghire et al., 2013).

The results of this experiment indicates that increasing the period of exposure to water deficit increased levels of reactive oxygen species (ROS) and the enzymatic activity of the accesses studied variable manner, minimizing the deleterious effects of ROS, except for PPO in PB access.

According to Fan et al., (2009), as the water deficit increases, plants elevate ROS levels and enzymatic activity, enabling the rebalancing of redox homeostasis and consequent adaptation and tolerance.

In the face of global climate change, is increasingly important to study the effects that these changes may cause in the plants, as well as defining the role of the substances participating in the biochemical processes related to plant defense. Understanding the mechanisms underlying physiological and biochemical response of the plant to drought and their metabolites, it is essential to provide from a protein perspective, an integration of the responses of antioxidant metabolism, which converge for the elimination of ROS; allowing through biotechnology, obtaining agricultural varieties more tolerant to future climate change and less susceptible to the impacts of abiotic stress, which can increase production, quality and sustainability of the plants.

## **Conclusions**

Increased exposure to drought induces distinct responses of antioxidative metabolism in accesses of mangabeira studied, the highest activities of SOD, APX and PPO were observed in RN access but the lowest mean activity of these enzymes were obtained in PE access. Given the biochemical variations obtained from the responses of the antioxidant metabolism enzymes (SOD, APX, PPO) and the content of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, latex mangabeira shown a viable alternative for evaluating the antioxidant metabolism in plants subjected to abiotic stress conditions.

## **Acknowledgments**

This work was supported by Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco.

## References

- Abraham, EM, Huang, B, Bonos, SA, Meyer, WA.** 2004. Evaluation of drought resistance for Texas Bluegrass, Kentucky Bluegrass, and their hybrids. *Crop Science* **44**,1746-1753.
- Agrawal, AA, Konno, K.** 2009. Latex: a model for understanding mechanisms, ecology, and evolution of plant defense against herbivory. *Annual Reviews Ecology Evolution Systematics* **40**, 311–331.
- Aguiar VC.** 2006. Aspectos bioquímicos, toxicológicos e alergênicos do látex da planta *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. Biochemistry PhD Tesis, Ceará Federal University, Brazil.
- Alexieva, V, Sergiev, I, Mapelli, S, Karanov, E.** 2001. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant Cell Environment* **24**, 1337- 1344.
- Alvarenga, TC, Neto, HFS, Ogassavara, FO, Arantes, FC, Marques, MO, Frigieri, MC.** 2011. Polifenoloxidase: uma enzima intrigante. *Ciência & Tecnologia* **3**, 83-93.
- Andersen, O, Andersen, V U.** 1988. *As Frutas Silvestres Brasileiras*. Rio de Janeiro: Globo.
- Anjum, SA, Farooq, M, Xie, XY, Liu, XJ,Ljaz, MF.** 2012. Antioxidant defense system and proline accumulation enables hot pepper to perform better under drought. *Scientia Horticulturae* **140**, 66-73.
- Assis and Silva F.** 2013. Assistat. **7.5** beta Version.
- Azarkan, M, Clantin, B, Bompard, C, Belrhali, H, Bayens-Volant, D, Looze, Y, Villeret, V and Wintjens, R.** 2005. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the glutaminyl cyclase from *Carica papaya* látex. *Acta Crystallographica* **61**, 59-61.
- Behera, RK, Choudhury, NK.** 2003. High irradiance-induced changes in carotenoid composition and increase in non-photochemical quenching of Chl a fluorescence in primary wheat leaves. *Journal of Plant Physiology* **160**, 1141-1146.
- Bowler, C, Fluhr, R.** 2000. The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling cross-tolerance. *Trends in Plant Science* **5**, 241-246.
- Bradford, MM.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.



- Carvalho, KS, Pinheiro, HA, Festucci-Buselli, RA, Júnior, DDS da, Castro, GLS, Cruz, FJR, Fujiyama, BS.** 2013. Diurnal changes in leaflet gas exchange, water status and antioxidant responses in *Carapa guianensis* plants under water-deficit conditions. *Acta Physiologiae Plantarum* **35**,13-21.
- De Wit, PJ.** 2007. How plants recognize pathogens and defend themselves. *Cellular and Molecular Life Science*, In Press.
- Doupis, G, Bertaki, M, Kasapakis, I.** 2013. Water relations, physiological behavior and antioxidant defence mechanism of olive plants subjected to different irrigation regimes. *Scientia Horticulturae* **153**, 150-156.
- Elsasser, B, Krohn, K, Akhtar, MN, Florke, U, Kouam, SF, Kuigoua, MG, Ngadjui, BT, Abegaz, BM, Antus, S, Kurtan, T.** 2005. Revision of the absolute configuration of plumericin and isoplumericin from *Plumeria rubra*. *Chemistry Biodiversity* **2**, 99-808.
- Fan, XW, Li, FM, Song, L, Xiong, YC, An, LZ, Jia, Y, Fang, XW.** 2009. Defense strategy of old and modern spring wheat varieties during soil drying. *Physiologia Plantarum* **136** (3), 310-323.
- Farias, LR, Costa, FT, Souza, LA, Pelegrini, PB, Grossi-de-Sá, MF, Neto, SM, Bloch, C, Laumann, RA, Noronha, EF, Franco, OL.** 2007. Isolation of a novel *Carica papaya*  $\alpha$ -amylase inhibitor with deleterious activity toward *Callosobruchus maculatus*. *Pesticide Biochemistry Physiology* **87**, 255–260.
- Fghire, R, Issa ali, O, Anaya, F, Benlhabib, O, Jacobsen, S, Wahbi, S.** 2013. Protective antioxidant enzyme activities are affected by drought in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd). *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare* **3**, 62-69.
- Foyer, C H, Noctor, G.** 2000. Oxygen processing in photosynthesis: Regulation and signaling. *New Phytologist* **146**, 359-388.
- Foyer, C H, Noctor, G.** 2003. Redox sensing and signaling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum* **119**, 355-364.
- Freitas, CD T de, Souza de, D P, Araújo, ES, Carvalheiro, MG, Oliveira, LS, Ramos, MV.** 2010. Anti-oxidative and proteolytic activities and protein profile of laticifer cells of *Cryptostegia grandiflora*, *Plumeria rubra* and *Euphorbia tirucalli*. *Brazilian Journal of Plant Physiology* **22**, 11-22.
- Ghannoum, O.** 2009. C4 photosynthesis and water stress. *Annals of Botany* **103**, 635-644.

- Giannopolitis, CN, Riels, SK.** 1977. Superoxides dismutases. I. Occurrences in higher plants. *Plant Physiology* **59**, 309-314.
- Gill, SS, Tuteja, N.** 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **48**, 909-930.
- Gimenez, C, Mitchell, VJ, Lawlor, DW.** 1992. Regulation of photosynthetic rate of two sunflower hybrids under water stress. *Plant Physiology* **98**, 516-524.
- Gholami, M, Rahemi, M, Kholdebarin, B, Rastegar, S.** 2012. Biochemical responses in leaves of four fig cultivars subjected to water stress and recovery. *Scientia Horticulturae* **148**, 109-117.
- Gratão, PL, Polle, A, Lea, PJ, Azevedo, RA.** 2005. Making the life of heavy metalstressed plants a little easier. *Functional Plant Biology* **32**, 481-494.
- Gupta, SD.** 2011. *Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants*. New Hampshire: Science publishers.
- Hagel, JM, Yeung, EC, Facchini, PJ.** 2008. Got milk? The secret life of laticifers. *Trends Plant Science* **13**, 631–639.
- Havir, EA, Mchale, NA.** 1987. Biochemical and development characterization of multiples forms of catalase in Tobacco leaves. *Plant Physiology* **84** (2), 450-455.
- Hossain, Z, Lopez-Climent, MF-M, Arbona, V, Perez- Clemente, RM, Gomez-Cadenas, A.** 2009. Modulation of the antioxidant system in citrus under waterlogging and subsequent drainage. *Journal Plant Physiology* **66**, 1391 -1404.
- Kar, M, Mishra, D.** 1976. Catalase, peroxidase and polyphenol oxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology* **57**, 315-319.
- Kato-Noguchi, H, Morokuma, M.** 2007. Ethanolic fermentation and anoxia tolerance four rice cultivars. *Journal Plant Physiology* **64**, 168-173.
- Klumpp, G, Furlan, CM, Domingos, M and Klumpp, A.** 2000. Response of stress indicators and growth parameters of *Tibouchina pulchra* Cogn. exposed to air and soil pollution near the industrial complex of Cubatão, Brazil. *The Science of the Total Environment*. **246**,79-91.
- Konno, K.** 2011. Plant latex and other exudates as plant defense systems: Roles of various defense chemicals and proteins contained there in. *Phytochemistry* **72**, 1510–1530.
- Lederman, I, E, Ferreira Júnior, J da S, Bezerra, J E F, Espíndola, A C de M E.** 2000. *Mangaba (Hancornia speciosa* Gomes). Jaboticabal: Funep, 35 p.

- Liu, B, Li, M, Cheng, L, Liang, D, Zou, Y, Ma, F.** 2012. Influence of rootstock on antioxidant system in leaves and roots of young apple trees in response to drought stress. *Plant Growth Regulation* **67** (3), 247-256.
- Mayer, AM.** 2006. Polyphenol oxidases in plants and fungi: going places? A review. *Phytochemistry* **67**, 2318–2331.
- Mazoir, N, Benharref, A, Bailén, M, Reina, M, Gonzalez-Coloma, A.** 2008. Bioactive triterpene derivatives from latex of two *Euphorbia* species. *Phytochemistry* **69**,1328–1338.
- Melo-Reis, PR, Andrade, LS, Silva, CB, Araújo, LMM, Pereira, MS, Mrue, F and Chen-Chen, L.** 2010. Angiogenic activity of *Synadenium umbellatum* Pax latex. *Brazilian Journal Biology* **70**, 189-194.
- Miller, G, Shulaev, V, Mittler, R.** 2008. Reactive oxygen signaling and abiotic stress. *Physiologia Plantarum* **133**,481-489.
- Mittler, R.** 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant in Science* **9**, 405-410.
- Møller, IM, Jénsen, P E, Hansson, A.** 2007. Oxidative Modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology* **58**, 459-81.
- Morcelle, S R, Caffini, N O, Priolo, N.** 2004. Proteolytic properties of *Funarium clausum* latex. *Fitoterapia* **75**, 480-493.
- Nakano, Y, Asada, K.** 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidases in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology* **22**, 867-880.
- Nguyen, G N, Hailstones, D L, Wilkes, M, Sutton, B G.** 2009. Drought-induced oxidative conditions in rice anthers leading to a programmed cell death and pollen abortion. *Journal of Agronomy & Crop Science* **195**, 157-164.
- Nogueira, RJMC, Filho, PAM, Araújo, EL.** 1999. Expressões ecofisiológicas de germoplasma de *Hancornia speciosa* Gomes cultivado no litoral de Pernambuco. *Ciência Rural* **29**, 731-732.
- Pinheiro and Pinheiro, FSV.** 2006. Produção de Borracha. In: *A cultura da mangaba*. Embrapa: 233-234.
- Romano, A, Sorgoná, A, Lupini, A, Araniti, F, Stevanato, P, Cacco, G, Abenavoli, MR.** 2013. Morpho-physiological responses of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) genotypes to drought stress. *Acta Physiologiae Plantarum* **35**, 853-865.

- Salunke, BK, Kotkar, HM, Mendki, PS, Upasani, SM, Maheshwari, VL.** 2005. Efficacy of flavonoids in controlling *Callosobruchus chinensis* (L.) (Coleoptera: Bruchidae), a post-harvest pest of grain legumes. *Crop Protection* **24**, 888–893.
- Santino, A, Taurino, M, De Domenico, S, Bonsegna, S, Poltronieri, P, Pastor, V, Flors, V.** 2013. Jasmonate signaling in plant development and defense response to multiple (a)biotic stresses. *Plant Cell Rep* **32**, 1085–1098.
- Scandalios, J G.** 2002. The rise of ROS. *Trends in Biochemical Sciences* **27**, 483-486.
- Scandalios, J G.** 2005. Oxidative stress: Molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **38**, 995-1014.
- Seckin, B, Aksoy, M.** 2013. The Responses of Ascorbate - Glutathione Cycle Enzymes in Seedlings of *Pancratium maritimum* L. under Drought Treatments. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry* **9**, 148-158.
- Shewry, PR, Lucas, JA.** 1997. Plant proteins that confer resistance to pests and pathogens. *Advances In Botanical Research Incorporating Advances In Plant Pathology* **26**, 135-192.
- Shigeoka, S, Ishikawa, T, Tamoi, M, Miyagawa, Y, Takeda, T, Yabuta, Y, Yoshimura, K.** 2002. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany* **53**, 1305-1319.
- Soares, AMS do, Machado, OLT.** 2007. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. *Revista Trópica* **1**, 9.
- Sumantha, A, Larroche, C, Pandey, A.** 2006. Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: a perspective. *Food Technology Biotechnology* **44**, 220-221.
- Tahi, H, Wahbi, S, Modafar, C.E.** 2008. Changes in antioxidant activities and phenol content in tomato plants subjected to partial root drying and regulated deficit irrigation. *Plant Biosystems* **142**.
- Van Loon, LC. R, M, Pieterse, CMJ.** 2006. Significance of inducible defense related proteins in infected plants. *Annual Reviews Phytopathology* **44**, 135-62.
- Veljovic-Jovanovic, S, Noctor, G, Foyer, CH.** 2002. Are leaf hydrogen peroxide concentrations commonly overestimated? The potential influence of artefactual interference by tissue phenolics and ascorbate. *Plant Physiology and Biochemistry* **40**, 501–507.

- Wahler, D, Gronover, CS, Richter, C, Foucu, F, Twyman, RM, Moerschbacher, M, Fischer, R, Muth, J, Prüfer, D.** 2009. Polyphenoloxidase Silencing Affects Latex Coagulation in *Taraxacum* Species *Plant Physiology* **151**,334–346.
- Wang, S, Liang, D, Li, C, Hao, Y, Ma, F, Shu, H.** 2012. Influence of drought stress on the cellular ultrastructure and antioxidant system in leaves of drought-tolerant and drought-sensitive apple rootstocks. *Plant Physiology and Biochemistry* **51**, 81-89.
- Wang, K, Zhang, L, Gao, M, Lixia, LV, Zhao, Y, Zhang, L, Li, B, Han, M, Alva, AK.** 2013. Influence of salt stress on growth and antioxidant responses of two *Malus* species at callus and plantlet stages. *Pakistanian Journal Botany* **45**, 375-381.
- Xiong, L, Schumaker, K S, Zhu, J K.** 2002. Cell Signaling during cold, drought, and salt stress. *The Plant Cell* **14**,165-183.
- Xu, P, Chen, F, Mannas, JP, Feldman, T, Sumner, LW, Roossinck, MJ.** 2008. Virus infection improves drought tolerance. *New Phytologist* **180**, 911-921.
- Yu, C, Huang, S, Hu, X, Deng, W, Xiong, C, Ye, C, Li, Y, Peng, B.** 2013. Changes in photosynthesis, chlorophyll fluorescence, and antioxidant enzymes of mulberry (*Morus* ssp.) in response to salinity and high-temperature stress. *Biologia* **68**, 404-413.
- Zhu-Salzman, K, Luthe, DS, Felton, GW.** 2008. Arthropod-inducible proteins: broad spectrum defenses against multiple herbivores. *Plant Physiology* **146**, 852–858.

## Figure Legends

**Fig. 1.** Pluviometry of João Pessoa (PB) city in the quarter of October, November and December in 2010, 2011 and 2012 years. Means followed by the same letter do not differ statistically among themselves by Tukey test at 5% probability.

**Fig. 2.** SOD activity (A), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content (B), APX activity (C) and PPO activity (D) in the Pernambuco (PE), Paraíba (PB) e Rio Grande do Norte (RN) of mangaba tree (*Hancornia speciosa* Gomes) access latex under conditions of water deficit in the 2010, 2011 and 2012 sampling periods. Means followed by the same letter do not differ statistically among themselves by Tukey test at 5% probability. Uppercase letters compare sampling periods and lowercase letters compare accesses of mangaba tree.

## Figures

Figure 1

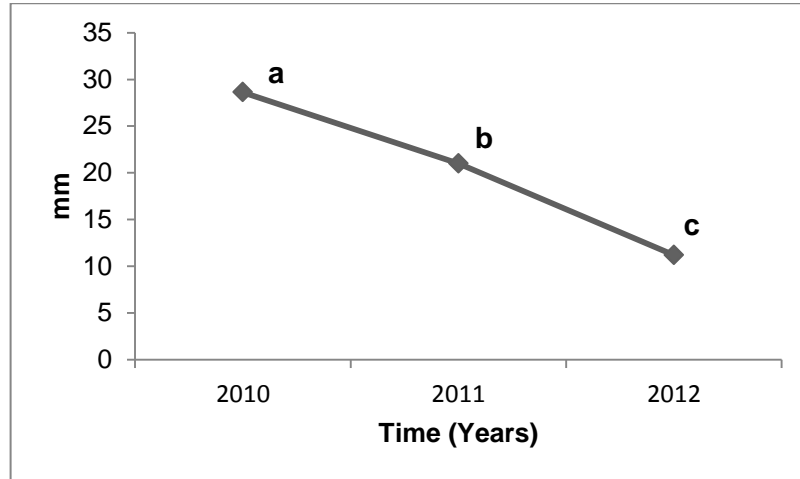
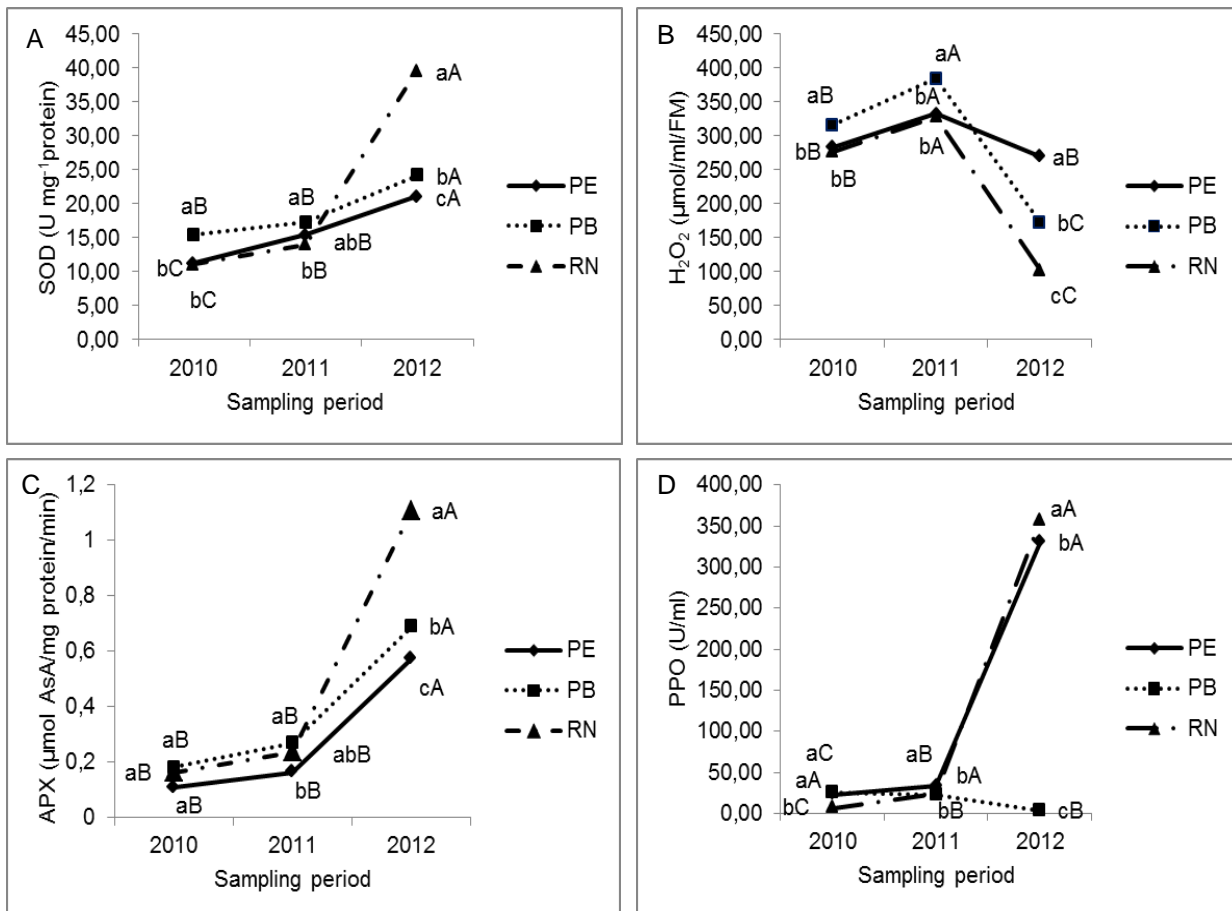


Figure 2



## Capítulo II

Atividade antimicrobiana do látex de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes).<sup>2</sup>

---

<sup>2</sup>Trabalho desenvolvido no Programa de Pós-Graduação em Botânica/UFRPE, a ser enviado para a revista Journal of Medicinal Plant Research.



Atividade antimicrobiana do látex de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes)".

Gileno Vitor Mota Lima, Gilvany Rodrigues de Andrade, Thiago Pajeú Nascimento, Ana Karoline Caitano do Nascimento, Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares, Ana Lúcia Figueiredo Porto\*

Laboratório de Tecnologias de Bioativos Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Rua Dom Manoel de Medeiros s/n CEP: 52171-900 Recife /PE, Brasil.

\*Corresponding author. E-mail: analuporto@yahoo.com.br

### ABSTRACT

Considering the growing demand for new antimicrobial agents for the treatment and control of cattle and goat mastitis, we evaluated the antimicrobial activity of latex mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) against a group of bacteria genus *Staphylococcus* responsible for this pathology. The mangabeira latex was collected through an incision in the stem with cutting stainless steel material, and then stored under refrigeration at - 20°C until analysis. In the first stage nine strains of bacteria were used: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* (isolated from goat mastitis). In a second step we used twenty-eight isolates of *Staphylococcus*, with fourteen causes of cattle mastitis and the other fourteen isolates causing goat mastitis. It was recorded for the first time the antimicrobial activity of latex mangabeira against *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* and *Enterococcus faecalis*. The mangabeira latex showed bactericidal activity to 100% of the tested microorganisms, totaling 28 isolates causing microorganisms cattle and goat mastitis, evidencing the effectiveness of this plant metabolite, being promising for use as herbal medicine in the treatment of cattle and goat mastitis.

Key words: Bactericidal activity, cattle mastitis, goat mastitis *Hancornia speciosa* Gomes, latex.

## INTRODUÇÃO

A bovinocultura e a caprinocultura brasileira dispõem de um expressivo rebanho, principalmente na região centro-oeste e nordeste do Brasil, onde se encontram aproximadamente 34,6% dos bovinos e 90% dos caprinos respectivamente. A região nordeste (NE) possui o 3º maior rebanho de bovinos do Brasil, já o estado de Pernambuco apresenta o 3º maior efetivo de pequenos ruminantes no nordeste do país (IBGE, 2012).

A elevada adaptabilidade destes animais às condições edafoclimáticas da região, além da baixa necessidade de capital inicial, torna a criação destes ruminantes uma alternativa viável para a geração de renda e garantia de segurança alimentar para a população nordestina, principalmente aquela localizada em áreas semi-áridas (Holanda Junior & Araújo, 2004).

Na região NE do Brasil, a falta de organização dos criadores, de assistência técnica especializada, além da precariedade do manejo higiênico-sanitário, são algumas das dificuldades que impedem o crescimento da atividade. Os problemas sanitários, nutricionais e de manejo em geral, limitam o potencial produtivo dos animais (Vieira et al. 1998).

Dentre os principais problemas sanitários, destaca-se a mastite caprina e bovina, que caracteriza-se pela inflamação da glândula mamária ocasionada, geralmente, por micro-organismos (Islam et al. 2011). As infecções intramamárias em ruminantes geram graves prejuízos econômicos da ordem de 35 bilhões de dólares, devido ao descarte do leite, custos com medicamentos e assistência veterinária, tempo de eliminação dos antibióticos, aumento da mão-de-obra, redução da qualidade e quantidade do leite e seus subprodutos além de ser importante

problema de saúde pública (Contreras et al. 2007; Baskaran et al. 2009; Okmen & Turkcan, 2013).

Os programas de controle possuem o objetivo de diminuir a prevalência da doença para níveis aceitáveis, uma vez que sua erradicação não é viável. Entre as medidas recomendadas para o controle das mastites produzidas pela maioria dos organismos incluem-se as medidas higiênicas (Barlett et al. 1992).

Dentre as formas de mastite, a mastite clínica é facilmente diagnosticada por alterações no leite e no úbere (Ladeira, 1998; Anderson et al., 2004). No entanto, a forma mais relacionada aos prejuízos é a mastite subclínica, que não pode ser diagnosticada pela observação visual da fêmea ou do leite e sim pela presença de elevadas contagens de células somáticas (CCS) no leite e o cultivo bacteriano (Klaas et al. 2004; Islam et al. 2011).

A terapia das mastites subclínicas, causadas principalmente por estafilococos e estreptococos, durante a lactação apresenta resultados variáveis quanto ao sucesso das terapias (Berry et al. 1997, Pengov & Ceru, 2003). A utilização de antibióticos constitui a principal forma de tratamento de casos de mastite na propriedade. No entanto, o alto custo e a resistência bacteriana a esses compostos vêm levando os pesquisadores à busca de novas alternativas para o controle dessa enfermidade (Loguercio et al. 2006; Baskaran et al. 2009).

A obtenção de novos agentes antimicrobianos se faz necessária devido ao surgimento de micro-organismos resistentes e de infecções oportunistas fatais. O estudo de agentes antimicrobianos tem grande abrangência, sendo ponto importante em vários setores do campo farmacêutico, cosmético e veterinário, sendo de extrema relevância, principalmente em um país como o Brasil que dispõe de uma

imensa biodiversidade florística na qual apenas 8% desta é estudada para a busca de compostos bioativos (Barbosa-Filho et al. 2007; Ostrosky et al. 2007; Salvi, 2008).

É relevante o conhecimento do potencial medicinal de plantas da flora do nordeste do Brasil numa etapa posterior sendo ponto de partida para a obtenção de compostos sintéticos ou biossintéticos (Bôas & Gadelha, 2007). O uso de plantas medicinais constitui uma opção viável em decorrência, principalmente, da facilidade de obtenção e o baixo custo (Marinho et al. (2007).

Embora ainda haja pouca informação disponível, nos últimos anos tem havido grande interesse no látex de diversas espécies, pois se apresenta como uma fonte potencial de compostos biologicamente ativos (Shivaprasad et al. 2009; Melo-Reis, et al. 2010).

Dentre as plantas laticíferas utilizadas com fins medicinais, destacam-se as pertencentes à família Apocynaceae, as quais possuem significativa reputação etnobotânica devido à ampla utilização das substâncias resultantes do metabolismo secundário; estas em sua maioria possuem propriedades farmacológicas reconhecidas cientificamente (Tijjani, 2011).

Apesar do grande potencial medicinal apresentado pela família Apocynaceae, pouco se sabe sobre o potencial bioativo da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) e do seu látex, o qual tem emprego etnobotânico na medicina popular em algumas localidades no tratamento eficaz da tuberculose, úlcera, herpes, dermatoses e verrugas (Lederman et al. 2000; Nogueira & Sampaio, 2006).

A atividade bioativa não se restringe ao látex da mangabeira, estando presente também na casca (ação gastroprotetora e atividade antimicrobiana (*Helicobacter pylori*), nos frutos e nas folhas nas quais foram verificadas propriedades vasodilatadoras a partir de extrato etanólico (Ferreira et al. 2007; Moraes et al. 2008). Os resultados demonstraram ainda que este extrato possui ausência de toxicidade e efetividade no combate e cicatrização de úlceras gástricas por sua capacidade de estimular a síntese de muco e produzir efeito anti-secretório.

Os metabólitos secundários presentes nas plantas estão relacionados com a maioria das propriedades terapêuticas destas, tornando-as uma grande fonte de medicamentos os quais têm apresentado um incrível poder de cura no seu estado natural ou como fonte de novos agentes farmacológicos (Aibinu, 2006).

As propriedades terapêuticas provenientes do metabolismo secundário das plantas têm sido investigadas na constante e recente evolução científica em todo o mundo, devido à sua potente atividade antioxidante, ausência de efeitos colaterais e viabilidade econômica (Ashok et al. 2011). Dessa forma, o desenvolvimento e a intensificação de estudos é essencial para a comprovação da eficácia e a segurança dos medicamentos preparados a partir destas plantas para validá-las cientificamente como medicamentos seguros e eficazes. Além de contribuir significativamente no desenvolvimento do campo da saúde em nível mundial, encontrando substâncias mais eficazes e menos tóxicas contra a resistência e o surgimento de micro-organismos patogênicos (Calixto, 2000; Simões, 2003; Sawadogo et al. 2012).

Em diversos estudos, a atividade antimicrobiana de extratos naturais de plantas e de alguns de seus compostos do metabolismo secundário, aos quais são atribuídos a atividade antimicrobiana de extratos vegetais (Souza et al. 2007;

Simões et al. 2007); têm sido avaliadas evidenciando uma alternativa de prevenção e tratamento seguro, extremamente viável contra microrganismos indesejáveis, visto que, alguns destes já se encontram resistentes aos fármacos sintéticos de última geração lançados no mercado (Aibinu, 2006; Schuch et al. 2008; Gonçalves et al. 2011).

Considerando a crescente demanda por novos agentes antimicrobianos para o controle e tratamento da mastite bovina e caprina, avaliou-se a atividade antimicrobiana do látex de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) frente a um grupo de bactérias do gênero *Staphylococcus* responsável por essa patologia.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### Coleta do Látex de Mangabeira

O látex de mangabeira foi coletado na Estação Experimental José Irineu Cabral, unidade pertencente à Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba S.A. (EMEPA-PB) localizada em João Pessoa (PB), através de incisões no caule com auxílio de material cortante de aço inoxidável, e posteriormente armazenado sob refrigeração à -20°C até o momento das análises.

### Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Os experimentos de atividade antimicrobiana do látex de mangabeira foram conduzidos a partir do teste de difusão em poço em ágar Müller-Hinton segundo a metodologia proposta a partir das Normas da Comissão Nacional de Laboratório de Análises Clínicas (NCCLS, 2005).

Esse teste baseia-se na determinação da menor concentração da solução padrão necessária para inibir o crescimento do micro-organismo-teste; relacionando o tamanho da zona de inibição de crescimento do microrganismo teste com a concentração da substância ensaiada (Pinto et al. 2003).

Na primeira etapa foram utilizadas nove cepas de bactérias: *Escherichia coli* (UFPEDA 224), *Staphylococcus aureus* (UFPEDA 02), *Klebsiella pneumoniae* (UFPEDA 396), *Candida albicans* (UFPEDA 1007), *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 416), *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis* (UFPEDA 138), *Bacillus subtilis* (UFPEDA 86) e *Staphylococcus aureus* (32) (isolado de mastite caprina), que foram mantidas em tubos de ensaio contendo caldo Mueller-Hinton por 24 horas em temperatura de 37°C para posterior inoculação nas placas de Petri.

Os microorganismos em duplicata foram semeados nas placas de Petri contendo ágar Müller-Hinton, seguindo-se da aplicação de 50 µL das diluições (1.6%, 3.12%, 6.25%, 12.5%, 25%, 50% e 100%) da solução padrão do látex de mangabeira protegida sob o número BR 102013018181-1 (Pedido de Registro de Patente) nos poços.

Posteriormente, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas. A avaliação é comparativa frente a um padrão biológico de referência (controle positivo – (Clorexidrina – 4%), controle negativo – (Solução salina de NaCl – 0.9%) e o halo de inibição de crescimento é medido partindo-se do diâmetro, até a margem onde há crescimento de microorganismos (Barry and Thornsberry, 1991).

A concentração bactericida mínima (CBM) foi estabelecida como a menor concentração da solução em estudo capaz de causar a morte do micro-organismo teste após inoculação em placas de Petri contendo ágar Muller-Hinton.

Foram utilizados vinte e oito isolados do gênero *Staphylococcus*, sendo quatorze causadores da mastite bovina e os outros catorze isolados causadores da mastite caprina, estes foram mantidos em tubos de ensaio contendo caldo Mueller-Hinton por 24 horas em temperatura de 37°C para posterior inoculação nas placas de Petri.

Os micro-organismos em duplicata foram semeados nas placas de Petri contendo ágar Müller-Hinton, seguindo-se da aplicação de 50 µL das diluições (50%, 60%, 70%, 80%, 90% e 100%) da solução padrão do látex de mangabeira protegida sob o número BR 102013018181-1 (Pedido de Registro de Patente) nos poços.

Posteriormente, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas. A avaliação é comparativa frente a um padrão biológico de referência (controle positivo – (Clorexidrina – 4%), controle negativo – (Solução salina de NaCl – 0.9%) e o halo de inibição de crescimento é medido partindo-se do diâmetro, até a margem onde há crescimento de micro-organismos (Barry and Thornsberry, 1991).

#### Análises Estatísticas

Os dados quantitativos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, utilizando-se o programa ASSISTAT (Assis and Silva, 2013).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A utilização de plantas no tratamento da mastite é uma alternativa viável e promissora, existindo na literatura diversas pesquisas realizadas com diversas partes de vegetais e de seus compostos demonstrando essa viabilidade (Schuch et



al. 2008; Baskaran et al. 2009; Diaz et al. 2010; Mubarack et al. 2011; Dal Pozzo et al. 2012), entretanto nenhuma até o momento faz menção a mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) e a nenhum de seus metabólitos.

No primeiro ensaio, constatou-se atividade antimicrobiana a partir da existência de halo de inibição de 30 mm para o micro-organismo padrão *Staphylococcus aureus* (UFPEDA 02) na concentração de 100% da solução padrão do látex de mangabeira, sendo esta zona de inibição maior que o controle positivo empregado (16 mm) (Clorexidrina – 4%) (Figura 1). Já para *Staphylococcus aureus* (isolado de mastite caprina) verificou-se zona de inibição de 15 mm também para a concentração de 100% da solução padrão. A partir da concentração de 50% da solução padrão do látex de mangabeira observou-se a inibição do crescimento bacteriano para as cepas *Micrococcus luteus* e *Enterococcus faecalis* com halos variando de 18 mm e 10 mm, respectivamente.

Dessa forma, registra-se pela primeira vez a atividade antimicrobiana do látex de mangabeira, o que viabiliza a utilização deste no combate as doenças infecciosas. Estes resultados ampliam o conhecimento das propriedades biológicas da mangabeira já relatadas anteriormente em frutos, folhas (propriedades vasodilatadoras) e casca do tronco (ação gastroprotetora e atividade antimicrobiana (*Helicobacter pylori*)) segundo Ferreira et al. (2007) e Moraes et al. (2008).

Resultados inferiores aos obtidos neste estudo foram relatados por Ashok et al. (2011), no qual avaliaram a atividade antimicrobiana dos extratos etéreos dos látices de 16 espécies de plantas na Índia com histórico etnobotânico frente à três micro-organismos: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* utilizando o teste de difusão em ágar. Dentre as plantas testadas, *Carica papaya*,

*Calotropis procera* (Apocynaceae) e *Euphorbia geniculata*, apresentaram atividade antimicrobiana significativa para *Escherichia coli* com halos de inibição de 13 mm, 12.33 mm e 9.33 mm respectivamente; para *Staphylococcus aureus* halos de inibição de 20 mm, 11,66mm e 14 mm; para *Pseudomonas aeruginosa* verificou-se halo de inibição de 9 mm apenas para *Euphorbia geniculata*.

Ao testar o extrato metanólico de látex de *Adenium obesum* (Apocynaceae), Tijjani et al. (2011) obtiveram resultados superiores aos estudos de Ashok et al. (2011) e inferiores aos descritos no presente trabalho quanto a sensibilidade desses micro-organismos; com halos de inibição de 20 mm para *Escherichia coli* e 26 mm para *Staphylococcus aureus*; no entanto a atividade do extrato de *Adenium obesum* não se restringiu às bactérias mencionadas, apresentando atividade para *Pseudomonas aeruginosa* (18 mm), *Salmonella typhi* (19 mm), *Bacillus subtilis* (25 mm), *Streptococcus pyogenes* (26 mm) e *Corynebacterium ulcerans* (19 mm).

No segundo ensaio, verificou-se halo de inibição a partir da concentração de 50% (menor concentração utilizada) da solução padrão de látex de mangabeira para os 28 isolados do gênero *Staphylococcus* causadores da mastite bovina (Figuras 2A - 2C) e caprina (Figuras 3A - 3C).

O extrato do látex de mangabeira mostrou ser dose dependente em relação a sua atividade antimicrobiana (Figuras 2 e 3). As maiores médias de halo de inibição foram verificadas na concentração de 100% da solução padrão do látex de mangabeira, diferindo significativamente das concentrações de 50 a 70% em 13 dos 14 isolados de mastite bovina (Tabela 1), e em 11 dos 14 isolados de mastite caprina (Tabela 2).

Para a concentração bactericida mínima (CBM), verificou-se que das 30 amostras de microorganismos em que foi observado halo de inibição; 25 destas (83,33%) foram sensíveis a partir da concentração de 60% da solução padrão do látex de mangabeira (Figuras 2F, 3D, 3E). Enquanto que a concentração de 50% foi letal apenas para cinco amostras (16,33%) dos microorganismos testados (Figuras 2D, 2E e 3F). Avaliando a ação bactericida do extrato etanólico da casca do caule das espécies vegetais *Amburana cearensis* e *Hymenaea courbari* em isolados de *Staphylococcus* causadores da mastite caprina, Peixoto e Costa, (2011) obtiveram atividade de 88,1 e 99,4% quanto à ação bactericida.

Resultados inferiores ao deste estudo foram obtidos por Okmen e Turkcan (2013) ao investigarem a atividade antimicrobiana do extrato etanólico de folhas de *Elaeagnus angustifolia*, frente a sete isolados de *S. aureus* causadores da mastite bovina; utilizando a técnica de difusão em disco verificaram halos de inibição de 9 a 20 mm para cinco dos sete isolados testados.

Estudos prévios de Silva et. al (2009), reportam a atividade antimicrobiana *in vitro* de óleo essencial de Alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) sobre o crescimento de 20 cepas de *S. aureus* isoladas de secreções do úbere, fossas nasais e do leite de vacas. Os resultados mostraram atividades antiestafilocócicas comprovados por halos de inibição do crescimento bacteriano (11 a 26 mm), todavia verificando-se efeito apenas bacteriostático.

Bezerra et al. (2009) avaliaram a atividade antimicrobiana do extrato de jurema-preta (*Mimosa tenuiflora* Willd.), pelo método da difusão em meio sólido, frente a 25 cepas de *S. aureus* isoladas de amostras de leite de vacas com histórico de mastite clínica e subclínica. Observou-se halos de inibição entre 6 e 25 mm de diâmetro.

Segundo os autores, o estudo da *M. tenuiflora* Willd. sobre as amostras de *S. aureus* testadas demonstrou que a planta possui ação antimicrobiana.

Schuch (2007), utilizou extratos hidroalcoólicos (EHA) e decoctos (DEC) das plantas carqueja (*Baccharis trimera* Less.), picão preto (*Bidens pilosa* L.), eucalipto (*Eucalyptus* sp.), erva-de-bicho (*Polygonum hydropiper* L.) e chichilho (*Tagetes minuta* L.) para avaliar suas atividades antibacterianas frente a micro-organismos causadores de mastite; verificando atividade antimicrobiana apenas para o extrato hidroalcoólico de eucalipto.

Posteriormente Avancini et al. (2008) avaliaram a atividade antimicrobiana *in vitro* de plantas citadas por uso popular como sendo utilizadas na prevenção e controle da mastite bovina no Sul do Brasil, e observaram que os extratos vegetais de penicilina (*Alternanthera brasiliana* L.), mil-em-rama (*Achillea millefolium* L.), carqueja (*Baccharis trimera* Less.) e lanceta (*Solidago chilensis* Meyer) foram ativos contra *S. aureus*.

Nader et al. (2010) ao investigarem o potencial de atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos de algumas plantas endêmicas do cerrado tais como a vassourinha (*Baccharis dracunculifolia* DC.), algodãozinho do campo (*Cochlospermum regium* Mart.), pé de perdiz (*Croton antisiphiliticus* Mart.), cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) e alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham.), frente ao agente *Staphylococcus aureus* isolado de leite mastítico, óstio do teto da vaca, equipamento de ordenha, fossas nasais e garganta do ordenhador; verificaram que os extratos de *Baccharis dracunculifolia* DC., *Croton antisiphiliticus* Mart., seguido do extrato de *Lippia sidoides* Cham., apresentaram, respectivamente, melhor atividade inibitória sobre a multiplicação da bactéria *Staphylococcus aureus*.

Peixoto e Costa (2010), relataram a atividade antimicrobiana do extrato etanólico de folhas de *Hymenaea courbaril* frente a isolados de *Staphylococcus* provenientes de casos de mastite subclínica em cabras e ovelhas.

Verifica-se que a atividade antibacteriana de extratos naturais de plantas e alguns de seus compostos vem sendo demonstrada frente aos isolados obtidos de casos de mastite bovina e caprina constituindo uma alternativa de tratamento mais eficiente e segura quando comparados aos fármacos sintéticos e a bioprodutos como a própolis comercial (Santos Neto et al. 2009; Andrade, 2010). Atualmente inexistem relatos ou similares a respeito da atividade bactericida do látex da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) e a nenhum de seus metabólitos frente aos isolados de mastite bovina e caprina.

## **CONCLUSÕES**

Registrou-se pela primeira vez a atividade antimicrobiana do látex de mangabeira frente a isolados de *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* e *Enterococcus faecalis*.

O látex de mangabeira apresentou atividade bactericida para 100% dos microorganismos testados, totalizando 28 isolados de microorganismos causadores da mastite bovina e caprina, ficando evidente a eficácia deste metabólito vegetal, sendo promissor para a utilização como fitoterápico no tratamento da mastite bovina e caprina.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem à FACEPE (processo nº IBPG – 0052-2.03/10) pela bolsa de estudos concedida.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aibinu I (2006). Medicinal plants as antimicrobials in outlines and pictures of medicinal plants from Nigeria, Odugbemi T (Ed). Univ. of Lagos press, pp 53-64.
- Anderson DE, Hull BH, Pugh DG (2004). Enfermidades da glândula mamária, In: Pugh DG, (eds) Clínica de Ovinos e Caprinos, Roca, São Paulo, pp 379-399.
- Andrade UVC (2010). Potencial antibacteriano do extrato hidrossolúvel de própolis obtido por hidrólise alcalina para a inibição de cultivos de *Staphylococcus aureus* e higienização de pré e pós - imersão de tetos de vacas leiteiras. PhD dissertation, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil.
- Assis and Silva F, 2013. Assistat. 7.5 beta Version.
- Avancini C, Wiest JM, Dall'agnol R, Haas JS, Poser GLV (2008). Antimicrobial activity of plants used in the prevention and control of bovine mastitis in southern Brazil. Lat. Am. J. Pharm. 27: 894-899.
- Ashok CD, Prashu BM, Umesh JU, Manohar PV (2007). Antibacterial and antioxidant activity of plant latex. J. of Pharm. Res. 4: 406-407.
- Barbosa-Filho JM, Nascimento-Júnior FA, Tomaz ACA, Athayde-Filho PF, Silva MS, Cunha EVL, Souza MFV, Batista LM, Diniz MFFM (2007). Natural products with antileprotic activity. Rev. Bras. Farmacogn. 17:141-148.
- Barlett PC, Miller GY, Lance SE, Heider LE (1992). Managerial determinants of intramammary coliform and environmental streptococci infections in Ohio dairy herds. J. of Dairy Science. 14:1241-1252.
- Barry AL, Thornsberry C (1991). Susceptibility tests: Diffusion Test Procedures. In: Balows A, Hauser WJ, Hermann KL, Isenberg HD, Shamody HJ Manual of clinical microbiology: American Society for Microbiology, 5.ed. Washington, DC, pp 1117-1125.

Baskaran SA, Kazmer GW, Hinckley L, Andrew SM and Venkitanarayanan K (2009). Antibacterial effect of plant-derived antimicrobials on major bacterial mastitis pathogens *in vitro*. J. of Dairy Science. 92:1423-1429.

Bezerra DAC, Pereira A V, Lôbo K M S, Rodrigues OG, Athayde ACR, Mota R A, Medeiros ES, Rodrigues SC (2009). Atividade biológica da jurema-preta (*Mimosa tenuiflora* (Wild) Poir.) sobre *Staphylococcus aureus* isolado de casos de mastite bovina. Rev. Bras. Farmacogn.19:194-199.

Berry SL, Mass J, Kirk JH, Reynolds JP, Gardner IA, Ahamadi A (1997). Effects of antimicrobial treatment at the end of lactation on milk yield, somatic cell count, and incidence of clinical mastitis during the subsequent lactation in a dairy herd with a low prevalence of contagious mastitis. J. of Am. Vet. Med. Assoc. 211:207-211.

Bôas GKV, Gadelha CAG (2007). Oportunidades na indústria de medicamentos e a lógica do desenvolvimento local baseado nos biomas brasileiros: bases para a discussão de uma política nacional. Caderno Saúde Pública. 23:1463-1471.

Calixto JB (2000). Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (Phytotherapies). Braz. J. of Med. and Biol. Res. 33:179-189.

Contreras A, Sierra D, Sánchez A, Corrales JC, Marco JC, Paape MJ and Gonzalo C (2007). Mastitis in small ruminants. Small Rum. Res. 68:145-153.

Dall pozzo M, Loreto ES, Santurio DF, Alves SH, Rossato L, De Vargas AC, Viegas J, Da Costa MM (2012). Antibacterial activity of essential oil of cinnamon and trans-cinnamaldehyde against *Staphylococcus* spp. isolated from clinical mastitis of cattle and goats. Acta Scien. Vet. 40:1080-1083.

Diaz M, Rossi CC, Mendonça VR, Silva Dm, Ribon ADOB, Aguilar Ap, Munoz GD (2010). Screening of medicinal plants for antibacterial activities on *S.aureus* strains isolated from bovine mastites. Braz. J. Pham. (20):724-728.

Ferreira HC, Serra CP, Endringer DC, Lemos VS, Braga, FC, Cortes SF (2007). Endothelium-dependent vasodilation induced by *Hancornia speciosa* in rat superior mesenteric artery. Phytomedicine.14:473–478.

Gonçalves DM, Araújo JHB, Francisco MS, Coelho MA, Franco JM (2011). Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato de *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. Rev. Bras. de Plantas Med.13:197-202.

Holanda Junior EV and Araújo GGL (2004). O papel dos caprinos e dos ovinos deslanados na agricultura familiar. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41 Campo Grande – MS. Anais... Campo Grande – MS.

IBGE. Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA. Available in: <http://www.sidra.ibge.gov.br> . Accessed March 8<sup>th</sup> 2013.

Islam MA, Samad MA, Rahman Anisur AKM (2011). Bacterial pathogens and risk factors associated with mastitis in black bengal goats in bangladesh. Bangl. J. Vet. Med. 9:155 – 159.

Klaas IC, Enevoldsen C, Vaarst M, and Houeh H (2004). Systematic clinical examinations for identification of latent udder health types in Danish dairy herds. J. Dairy Science. 87:1217-1228.

Ladeira SRL (1998). Mastite ovina. In: Riet-Correa F, Schild AL and Méndez MDC (eds.) Doenças de Ruminantes e Eqüinos. Ed. Universitária/UFPel, Pelotas, Brazil, pp 261-264.



Lederman I E, Ferreira Júnior J da S, Bezerra JEF, Espíndola AC de ME (2000). Mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes). Jaboticabal: Funep, Brazil, pp 35.

Loguercio AP, Groff ACM, Pedrozzo AF, Witt NM, Silva MS, Vargas AC (2006). Atividade *in vitro* do extrato de própolis contra agentes bacterianos da mastite bovina. *Pesq. Agropec. Bras.* v.41:347-349.

Marinho ML, Alves MS, Rodrigues MLC, Rotondano TEF, Vidal IF, Silva WW, Athayde ACR (2007). A utilização de plantas medicinais em medicina veterinária: um resgate do saber popular. *Rev. Bras. Pl. Med.*9:64-69.

Melo-Reis PR, Andrade LS, Silva CB, Araújo LMM, Pereira MS, Mrue F, and Chen-Chen L (2010). Angiogenic activity of *Synadenium umbellatum* Pax latex. *Braz. J. Biol.* 70:189-194.

Moraes TM, Rodrigues CM, Kushima H, Bauab TM, Villegasb W, Pellizzon CH, Brito ARMS, Hiruma-Lima CA (2008). *Hancornia speciosa*: Indications of gastroprotective, healing and anti-*Helicobacter pylori* actions. *J. of Ethnopharmacol.* 20:161–168.

Mubarack HM, Doss A, Dhanabalan R, Venkataswamy R (2011). Activity of some selected medicinal plant extracts against bovine mastitis pathogens. *J. Anim. Vet. Adv.* 10:738-741.

Nader TT, Coppede JS, Amaral LA, Facchin, AL, Pereira MAS, Ferreira LM (2010). Avaliação *in vitro* da eficácia de extratos de plantas medicinais do cerrado frente *Staphylococcus aureus* isolado de diferentes fontes de propriedades leiteiras. *Arq. Inst. Biol.*77:429-433.

NCCLS (2005). National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard. 8. ed. Wayne: NCCLS.

Nogueira PCL, Sampaio TS (2006). Volatile components of mangaba fruit (*Hancornia speciosa* Gomes) at three stages of maturity. Food Chemistry.

Okmen G, Turkcan O (2013). The antibacterial activity of *Elaeagnus angustifolia* L. against mastitis pathogens and antioxidant capacity of the leaf methanolic extracts. J. of Anim. Vet. Adv. 12:491-496.

Ostrosky EA, Mizumoto MK, Lima MEL, Kaneko TM, Nishikawa SO, Freitas BR (2008). Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. Brazilian Journal of Pharmacognosy. 18:301-307.

Peixoto RM and Da Costa MM (2009). Potencial antibacteriano de plantas nativas do bioma caatinga frente a isolados bacterianos de mastite subclínica caprina e ovina. MsC Dissertation, Universidade do Vale do São Francisco, Petrolina, Brazil.

Pengov A and Ceru S (2003). Antimicrobial drug susceptibility of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine and ovine mammary glands. J. of Dairy Science.86:3157-3163.

Pinto TJA, Kaneko TM, Ohara MT (2003). Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos. 2.ed. São Paulo: Atheneu Editora, Brazil, pp 325.

Salvi, RM et. al (2008). Interações medicamentos x Fitoterápicos: em busca de uma prescrição racional-Porto alegre: EDIPUCRS, Brazil pp. 13.

Santos Neto TM, Mota RA, Silva LBG, Viana DA, Lima-Filho JL, Sarubbo LA, Converti A, Porto ALF (2009). Susceptibility of *Staphylococcus* spp. Isolated from Milk of Goats with Mastitis to Antibiotics and Green Propolis Extracts. Letters in Drug Design & Discovery.6:63-68.

Sawadogo WR, Schumacher M, Teiten MH, Dicato M, Diederich M (2012). Traditional West African pharmacopeia, plants and derived compounds for cancer therapy. *Biochem. Pharmacol.*

Schuch LFD (2007). Plantas Medicinais em Atenção Básica Veterinária: Atividade Antimicrobiana frente a Bactérias Relacionadas com Mastite Bovina e a Dermatófitos. PhD dissertation, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Schuch LFD, Wiest JM, Coimbra HS, Prestes LS, Toni L, Lemos JS (2008). Cinética da atividade antibacteriana in vitro de extratos naturais frente a microorganismos relacionados à mastite bovina. *Ciênc. Ani. Bras.* 9: 161-169.

Simões CMO (2003). Fitoterápicos eficazes e validados para estas patologias Farmacognosia: da planta ao medicamento, 3<sup>a</sup>. ed. Porto Alegre- RS, Editora da UFSC e UFRGS, Brazil.

Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G (2007). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6. ed. Florianópolis: UFSC, Brazil.

Shivaprasad HV, Rajesh R, Nanda BL, Dharmappa KK, Vishwanath BS (2009). Thrombin like activity of *Asclepias curassavica* L. latex: Action of cysteine proteases *Journal of Ethnopharmacology.* 123:106–109.

Souza TM, Moreira RRD, Pietro RCLR (2007). Avaliação da atividade anti-séptica de extrato seco de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville e de preparação cosmética contendo este extrato. *Ver. Bras. de Farmacognosia.* 17: 71-75.

Tijjani A, Sallau MS, Sunuzi I (2011). Synergistic activity of methanolic extract of *Adenium obesum* (Apocynaceae) stem-bark and oxytetracycline against some clinical bacterial isolates. *B. J. Pure and Applied Sciences.* 4: 79 – 82.

Vieira LS, Cavalcante ACR, Ximenes LF (1998). Epidemiologia e controle das principais parasitoses de caprinos nas regiões semi – áridas do Nordeste. Sobral: EMBRAPA-CNPC, Brazil, 50p.

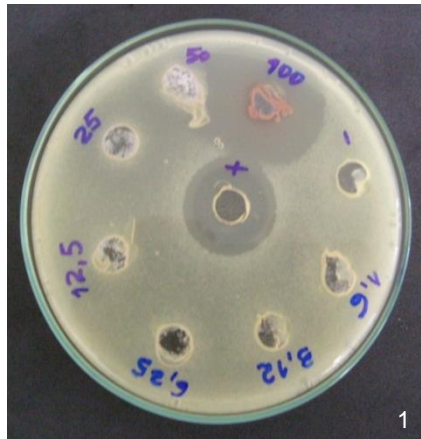


Figura 1. Teste de atividade antimicrobiana da solução padrão do látex de mangabeira frente ao microorganismo padrão *Staphylococcus aureus* (UFPEDA 02) nas concentrações de 1,6% -100%.

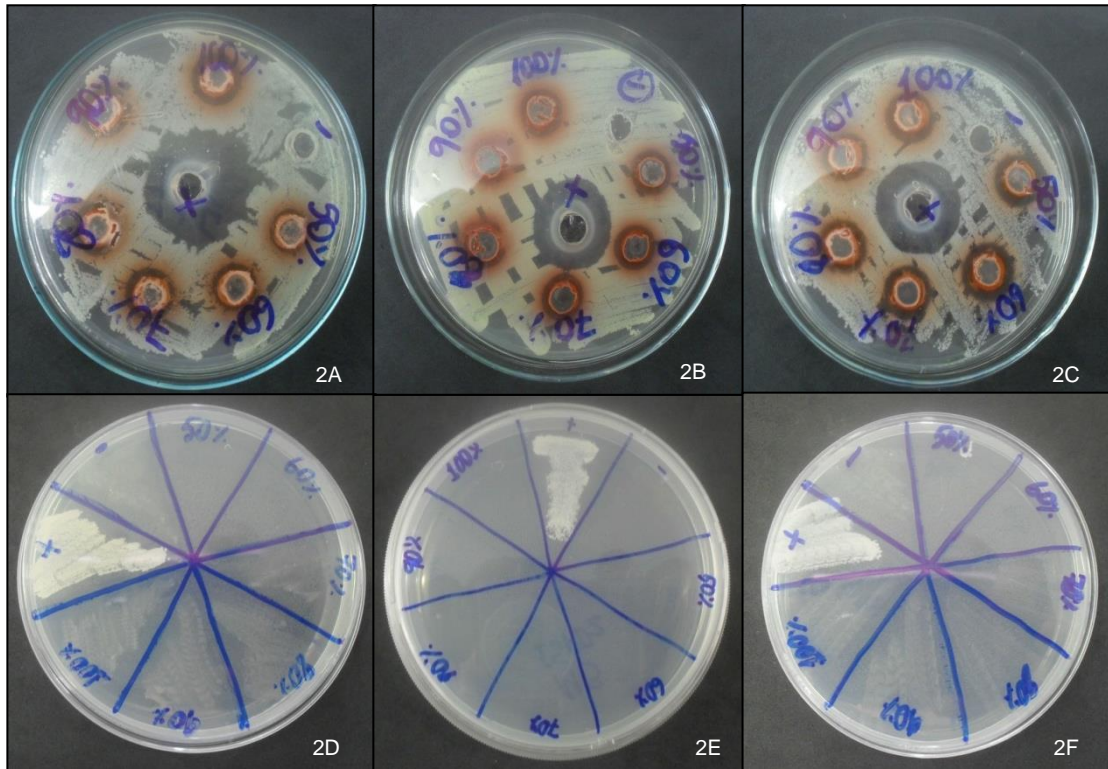


Figura 2. Teste de atividade antimicrobiana da solução padrão do látex de mangabeira frente aos isolados de mastite bovina do gênero *Staphylococcus* nas concentrações de 50%-100%. (2A-2C) Experimento de concentração mínima inibitória; (2D-2F) Experimento de concentração mínima bactericida.

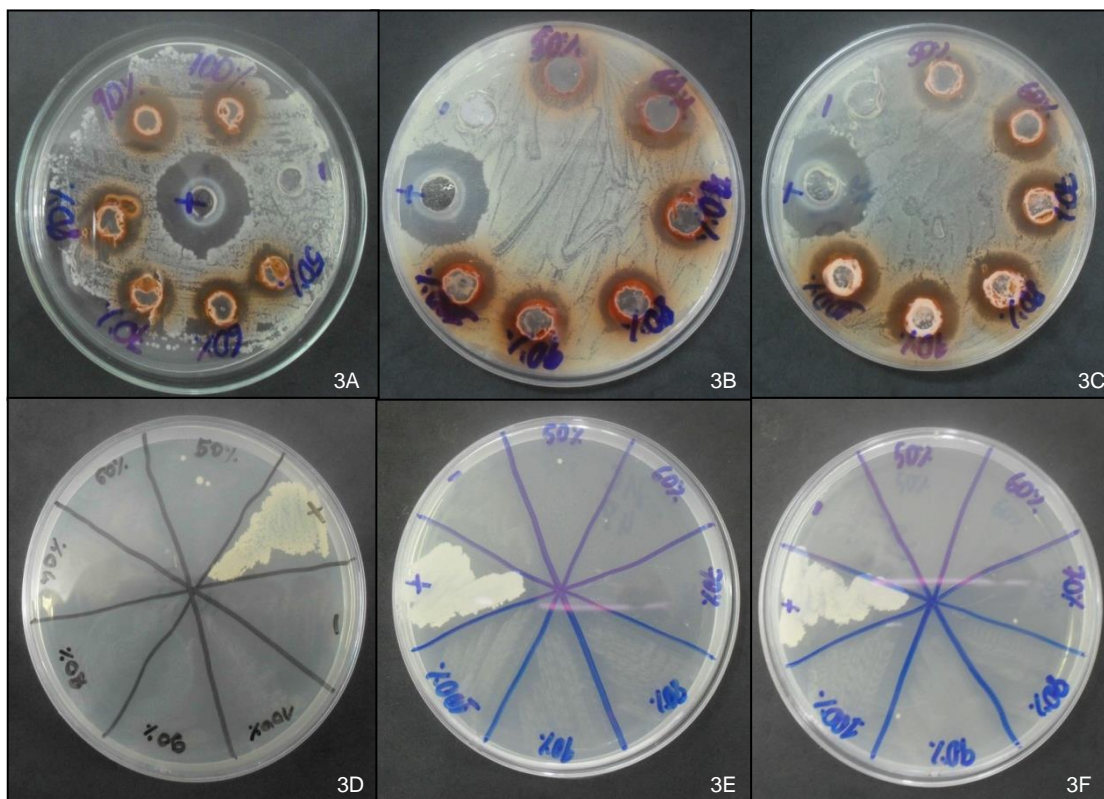


Figura 3. Teste de atividade antimicrobiana da solução padrão do látex de mangabeira frente aos isolados de mastite caprina do gênero *Staphylococcus* nas concentrações de 50%-100%. (3A-3C) Experimento de concentração mínima inibitória; (3D-3F) Experimento de concentração mínima bactericida.

Tabela 1. Atividade antimicrobiana de solução padrão de látex de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) medida pelo halo de inibição (mm) frente a isolados de *Staphylococcus* spp. causadores da mastite bovina.

Isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. causadores da mastite bovina														
CIM	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
50%	10.5±0.8 c	11±1.48b	10.5±1.97c	12±1.70c	12±1.44d	13.5 ± 1.90 e	14 ± 1.52 c	12.5 ± 1.79 c	16.5 ± 1.19 c	14 ± 2.04 b	16 ± 1.01 c	14 ± 1.92 d	15 ± 1.79 c	15 ± 1.86 c
60%	11±0.8bc	11.5±1.48b	11.5±1.97c	12.5±1.70bc	12.5±1.44cd	14.5 ± 1.90 de	15.5±1.52 bc	13 ± 1.79 c	17 ± 1.19 c	14.5 ± 2.04 b	16.5±1.01 c	15.5±1.92 c	16 ± 1.79 c	15.5±1.86 c
70%	12±0.8abc	12±1.48b	12±1.97c	13±1.70bc	14±1.44bc	16 ± 1.90 cd	16 ± 1.52 b	14 ± 1.79 bc	17.5±1.19 bc	15 ± 2.04 b	17 ±1.01 bc	17 ± 1.92 b	17 ±1.79 bc	16 ± 1.86 c
80%	12±0.8abc	14±1.48a	14±1.97b	14±1.70b	14±1.44bc	17 ± 1.90 bc	17 ± 1.52 ab	15.5±1.79 ab	18 ± 1.19 bc	18 ± 2.04 a	18 ±1.01 ab	18 ± 1.92 b	19±1.79 ab	18 ± 1.86 b
90%	12.5±0.8ab	14±1.48a	15±1.97ab	16±1.70a	15±1.44ab	18 ± 1.90 ab	18 ± 1.52 a	17 ± 1.79 a	19 ± 1.19 ab	18.5±2.04 a	18 ±1.01 ab	18 ± 1.92 b	19±1.79 ab	19±1.86 ab
100%	13±0.8a	15±1.48a	16±1.97a	16.5±1.70a	16±1.44a	19 ± 1.90 a	18.5 ± 1.52 a	17 ± 1.79 a	20 ± 1.19 a	19 ± 2.04 a	19 ± 1.01 a	20 ± 1.92 a	20 ± 1.79 a	20 ± 1.86 a
CV%	3.45	2.23	3.10	2.92	2.71	2.50	2.47	2.75	2.27	2.47	1.66	1.69	3.27	1.67

\*Médias dos halos de inibição seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 2. Atividade antimicrobiana de solução padrão de látex de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) medida pelo halo de inibição (mm) frente a isolados de *Staphylococcus spp.* causadores da mastite caprina.

Isolados de <i>Staphylococcus spp.</i> causadores da mastite caprina														
CIM	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
50%	15±2.14d	12± 1.33c	15±1.53d	14 ± 1.17 c	16 ± 1.72 d	14 ± 0.84c	11 ± 1.64 e	15 ± 1.48 c	16 ± 1.14 b	16 ± 1.25 c	12 ± 2.49 d	14 ± 1.77 e	13.5 ±1.9c	12 ± 1.72 c
60%	16.5±2.14cd	12.5±1.33c	16.5±1.53c	14.5 ±1.17 bc	16.5±1.72cd	14.5 ± 0.84 bc	12 ± 1.64 de	16 ± 1.48 bc	16.5 ± 1.14 b	17 ± 1.25 c	13.5±2.49 c	14.5±1.77d e	15 ±1.9bc	13.5±1.72 b
70%	17±2.14cd	13.5±1.33bc	17±1.53bc	16 ± 1.17 ab	18±1.72bc	15 ±0.84 abc	13 ± 1.64 cd	16.5 ± 1.48 b	18 ± 1.14 a	17.5±1.25b c	14 ± 2.49 c	16 ± 1.77cd	16 ±1.9bc	14 ± 1.72 b
80%	18.5±2.14bc	15±1.33ab	18±1.53b	16.5 ± 1.17 a	19±1.72b	15 ±0.84 abc	14 ± 1.64 bc	17 ± 1.48 b	18 ± 1.14 a	19 ±1.25 ab	16 ± 2.49 b	16.5±1.77b c	17±1.9 ab	16 ± 1.72 a
90%	20.5±2.14ab	15±1.33ab	18±1.53b	17 ± 1.17 a	19.5±1.72a b	16 ±0.84 ab	14.5 ± 1.64 b	19 ± 1.48 a	19 ± 1.14 a	19 ±1.25 ab	18 ± 2.49 a	18±1.77ab	17.5±1.9ab	16 ± 1.72 a
100%	21±2.14a	15.5±1.33a	20±1.53a	17 ± 1.17 a	21±1.72a	16.5 ±0.84 a	16 ± 1.64 a	19 ± 1.48 a	19 ± 1.14 a	19.5±1.25 a	19 ± 2.49 a	19±1.77a	19.5±1.9a	17 ± 1.72 a
CV%	3.18	3.59	1.66	2.58	2.23	2.69	2.15	1.69	1.63	2.27	1.87	2.50	4.65	1.96

\*Médias dos halos de inibição seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.



### Capítulo III

Caracterização e pré-purificação de proteases do látex de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) por sistema de duas fases aquosas PEG-fosfato e compatibilidade com detergentes comerciais.<sup>3</sup>

---

<sup>3</sup>Trabalho desenvolvido no Programa de Pós-Graduação em Botânica/UFRPE, a ser enviado para a revista Química Nova.

**CARACTERIZAÇÃO E PRÉ-PURIFICAÇÃO DE PROTEASES DO LÁTEX DE MANGABEIRA (*Hancornia speciosa* GOMES) POR SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS PEG-FOSFATO E COMPATIBILIDADE COM DETERGENTES COMERCIAIS**

**Gileno Vitor Mota Lima<sup>a</sup>, Ana Karoline Caitano do Nascimento<sup>b</sup>, Maria Taciana Holanda Cavalcanti<sup>c</sup> e Ana Lúcia Figueiredo Porto<sup>\*,c</sup>**

<sup>a</sup>Departamento de Botânica, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, 52171-900, Recife - PE – Brasil.

<sup>b</sup>Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, 52171-900, Recife - PE – Brasil.

<sup>c</sup>Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Dom Manuel de Medeiros, s/n, 52171-900 Recife - PE, Brasil.

---

Marque uma das alternativas:

- ( X ) Tenho apenas figuras em tons de cinza
- ( ) Tenho figuras coloridas e aceito custo da publicação impressa
- ( ) Tenho figuras coloridas, quero publicá-las coloridas apenas online e confirmo que a impressão dessas figuras em tons de cinza não prejudicará a compreensão

Marque uma das alternativas:

- ( ) Manuscrito com material suplementar
- ( X ) Manuscrito sem material suplementar

---

\*e-mail:analuporto@yahoo.com.br

PRE-PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF PROTEASES LATEX MANGABEIRA (*Hancornia speciosa* GOMES) IN AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEM PEG-PHOSPHATE AND COMPATIBILITY WITH COMMERCIAL DETERGENTS

Abstract: A factorial  $3^3$  design was used in the proteases pre purification of mangabeira latex in aqueous two-phase system PEG-phosphate, where the best condition was the system  $MM_{PEG}$  1000,  $C_{PEG}$  20% (w/w) and  $C_{PHOSF}$  15 (w/w) with purification factor of 8.62 and yield percentage of 150.59% in the top phase. Biochemical characterization of pre-purified extract showed their activity and stability over a wide pH (4 – 10) and temperature (30°C - 90°C) range, and the analysis of the compatibility with commercial detergents showed that the enzymes present in it maintained its initial activity 89,49% after 60 minutes of incubation at 70°C.

Key words: Latex, proteases, aqueous two-phase systems.

## INTRODUÇÃO

A Mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) é uma espécie típica do cerrado pertencente à família Apocynaceae e à ordem Gentianales. É uma árvore de porte médio, possuindo de 2 a 10 m de altura, podendo chegar até 15 m, dotada de copa irregular, tronco tortuoso, bastante ramificado e áspero; ramos lisos e avermelhados, exsudando látex em toda a sua extensão.<sup>1</sup>

O látex é um fluido biológico originário do metabolismo secundário das plantas, cuja concentração é extremamente alterada pelas condições edafoclimáticas em que se encontram os vegetais.<sup>2</sup> Possui aspecto leitoso, sendo uma emulsão complexa constituída de proteínas, aminoácidos, carboidratos, lipídios, vitaminas, alcalóides, carbonatos, resinas, gomas, taninos e terpenos.<sup>3</sup>

As proteases presentes no látex apresentam propriedades biológicas que conferem as plantas proteção contra os danos ambientais.<sup>4</sup> Estas enzimas constituem um dos mais importantes grupos de enzimas industriais com aplicação em diferentes setores, tais como: de alimentos, têxtil, farmacêutica e de detergentes.<sup>5-7</sup> A venda dessas enzimas representa 65% do total de enzimas comercializadas no mundo.<sup>8</sup>

As características que uma protease deve apresentar para ser utilizada como aditivo de detergentes inclui: atividade em pH alcalino e elevadas temperaturas, estabilidade na presença de agentes surfactantes e oxidantes, eficiência em baixas concentrações em relação à concentração da solução de detergentes e substrato específico amplo.<sup>9</sup>

As técnicas utilizadas para purificação de enzimas fazem com que seu custo de produção seja elevado. Com isso, o desenvolvimento de processos alternativos que visem a redução de custos é interessante. A aplicação do sistema de duas fases aquosas (SDFA) é proposta como alternativa para extração e purificação das proteases. Esta técnica tem sido extensivamente estudada para a concentração e purificação de biomoléculas, principalmente por causa de suas vantagens intrínsecas, tais como eficiência, versatilidade e baixo custo.<sup>10</sup>

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar e pré-purificar por SDFA as proteases obtidas a partir do látex da mangabeira e avaliar a compatibilidade destas enzimas com detergentes comerciais.

## **PARTE EXPERIMENTAL**

### **Reagentes**

Azocaseína, Polietilenoglicol (PEG) 400, 1000, 1500 g mol<sup>-1</sup> foram adquiridos na Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA). Fosfato dibásico de potássio (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) e fosfato de sódio monobásico (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) foram adquiridos na Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Albumina de soro bovino (BSA) foi adquirida na Merck (São Paulo, Brasil). Todos os outros produtos químicos e reagentes utilizados foram de grau analítico.

### **Obtenção do látex**

O látex foi obtido na Estação Experimental José Irineu Cabral, unidade pertencente à Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba S.A. (EMEPA-PB) localizada em João Pessoa (PB).

### **Coleta do Látex de Mangabeira**

O látex foi coletado através de incisões no caule com auxílio de material cortante de aço inoxidável. Em seguida, foi realizado o preparo da solução padrão do látex de mangabeira protegida sob o número BR 102013018181-1 (Pedido de Registro de Patente).

### **Determinação da atividade proteásica**

A determinação da atividade proteásica foi realizada segundo o método de Alencar<sup>11</sup> modificado. A atividade proteásica foi determinada com a incubação de 60 µL do extrato enzimático com 100 µL de solução de azocaseína 1% (p/v), preparada em 0,1 M de solução tampão Tris-HCl a 25°C por uma hora em câmara escura. A reação foi interrompida pela adição de 480 µL da solução de ácido tricloroacético (TCA) 10% (p/v). Após a centrifugação a 8.000 xg por 10 minutos, uma alíquota de 300 µL do sobrenadante foi adicionada em tubos de ensaio contendo 560 µL de hidróxido de sódio 1M (NaOH) e a leitura foi realizada à 440 nm em espectrofotômetro. Uma unidade da enzima é definida como a quantidade de enzima capaz de produzir um aumento na absorvância de 0,01 em 1 h a 440 nm

### **Conteúdo protéico**

A determinação da concentração protéica foi realizada através do método de Bradford<sup>12</sup>, que utiliza soro albumina bovina (BSA) como padrão de proteína.

### **Preparação do sistema de duas fases aquosas (SDFA)**

A solução concentrada de sais de fosfato (40% m/m) foi preparada no pH 6 pela mistura de quantidades apropriadas das soluções de fosfato dibásico de potássio ( $K_2HPO_4$ ) e fosfato de sódio monobásico ( $NaH_2PO_4$ ) a temperatura ambiente ( $22 \pm 2^\circ C$ ). Quantidades requeridas das soluções de sais de fosfato foram misturadas à solução de PEG (50% m/m) e o extrato bruto representou 20% (m/m) do total da massa do sistema, todos foram adicionados a tubos graduados de 15 mL com o auxílio de pipetas. Água foi adicionada por último para uma quantidade final de 10 g. Após a agitação em vórtice por 1 minuto, as duas fases foram separadas por decantação após 60 minutos. Depois, os volumes das fases foram aferidos e separados. A determinação da concentração protéica e da atividade enzimática foi realizada em ambas as fases.<sup>13</sup>

### **Planejamento fatorial para extração em sistemas de duas fases aquosas**

O processo de extração por sistema de duas fases aquosas foi conduzido através de um delineamento inteiramente casualizado, em três níveis para massa molar do PEG  $g\ mol^{-1}$  ( $MM_{PEG}$ ) (400, 1000, 1500), concentração do PEG m/m ( $C_{PEG}$ ) (15%, 17,5%, 20%) e concentração de fosfato m/m ( $C_{FOSF}$ ) (10%, 15%, 20%).

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Assistat<sup>®14</sup>, os efeitos dos diferentes níveis da  $MM_{PEG}$ ,  $C_{PEG}$ ,  $C_{FOSF}$  e suas interações sobre as variáveis estudadas, foram avaliados aplicando-se o teste de Tukey a nível de 5% de significância.

### **Determinação do coeficiente de partição, fator de purificação e rendimento em atividade enzimática**

O coeficiente de partição ( $k$ ) foi calculado pela razão entre a atividade proteásica na fase superior ( $A_s$ ) e na fase inferior ( $A_i$ ).

$$K = \frac{A_s}{A_i}$$

O fator de purificação ( $P_f$ ) foi calculado pela razão entre a atividade específica na fase e a atividade específica inicial no extrato bruto.

$$P_f = \frac{\frac{A_s}{C_s}}{\frac{A_i}{C_i}}$$

Onde o  $A_S$  e  $A_I$  são as atividades enzimáticas em U/mL na fase superior e no extrato bruto (antes da partição), respectivamente;  $C_S$  e  $C_I$  são as concentrações de proteína total em mg/mL da fase superior e extrato bruto, respectivamente.

O rendimento ( $y$ ) da atividade proteolítica foi determinado pela razão entre a atividade proteásica das fases multiplicada pelos seus volumes e atividade proteásica multiplicada pelo seu volume no extrato bruto.

$$Y = \left( \frac{A_S \times V_S}{A_I \times V_I} \right) \times 100$$

Onde o  $A_S$  e  $A_I$  são as atividades enzimáticas em U/mL na fase superior e no extrato bruto (antes da partição), respectivamente;  $V_S$  e  $V_I$  são os volumes da fase superior e do extrato bruto em mL, respectivamente.

### **Efeito do pH na atividade e estabilidade das proteases**

O efeito do pH na atividade proteásica foi avaliado pela mistura do extrato bruto ou pré-purificado como substrato a azocaseína 1% (p/v) preparado em soluções tampões 0,05 M com diferentes valores de pH: citrato de sódio (pH 4,0 e 5,0); fosfato de sódio (pH 6,0 e 7,0); Tris-HCl (pH 8,0) e Carbonato-bicarbonato (pH 9,0 e 10,0), logo após foram realizadas as determinações da atividade enzimática. Para a determinação da estabilidade da enzima ao pH, o extrato bruto e pré-purificado foi incubado com cada um dos tampões citados numa proporção de 1:1 (v/v) à temperatura ambiente ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), sendo retirada alíquotas a cada 30 minutos durante 90 minutos de incubação, para a determinação da atividade proteásica.

### **Efeito da temperatura na atividade e estabilidade das proteases**

O efeito da temperatura na atividade proteásica foi avaliado utilizando-se uma mistura de reação contendo o extrato bruto ou pré-purificado e o substrato específico, azocaseína 1% (p/v), incubados nas temperaturas de  $30^\circ\text{C}$  à  $90^\circ\text{C}$  por 1 hora, para posterior determinação da atividade. Para a determinação da estabilidade térmica, o extrato bruto ou pré-purificado foi pré-incubado em temperaturas entre  $30^\circ\text{C}$  e  $90^\circ\text{C}$ . O tempo de incubação foi de 90 minutos, retirando-se amostras a cada 30 minutos, para a realização da atividade proteásica.

## **Avaliação da compatibilidade e estabilidade do extrato bruto e pré-purificado com detergentes comerciais**

Os detergentes comerciais das marcas Omo<sup>®</sup>, Ace<sup>®</sup>, Ala<sup>®</sup> e Bem-te-vi<sup>®</sup> foram diluídos em água destilada a uma concentração final de 7 mg/mL para simular condições de lavagem. Em seguida, foram tratados termicamente a 100°C por 15 min, para inativar as enzimas que poderiam fazer parte da formulação dos detergentes. Posteriormente, foi adicionado 1 mL do extrato bruto ou pré-purificado na preparação do detergente e incubado a 70°C por 1 h. A cada 10 min, foram retiradas alíquotas de cada amostra para determinação da atividade enzimática, tanto nos ensaios quanto no controle (incubado sem detergente).<sup>15,16</sup>

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Pré-purificação de proteases presentes no extrato bruto do látex da mangabeira em sistema de duas fases aquosas PEG – Fosfato.**

Os resultados obtidos com o planejamento fatorial  $3^3$  estão apresentados na Tabela 1. Na qual podemos observar que os sistemas 1 ( $MM_{PEG}$  400 g mol<sup>-1</sup>,  $C_{PEG}$  15% (m/m),  $C_{FOSF}$  10% (m/m)), 4 ( $MM_{PEG}$  400 g mol<sup>-1</sup>,  $C_{PEG}$  17,5% (m/m),  $C_{FOSF}$  10% (m/m)), 7 ( $MM_{PEG}$  400 g mol<sup>-1</sup>,  $C_{PEG}$  20% (m/m),  $C_{FOSF}$  10% (m/m)) e 10 ( $MM_{PEG}$  1000 g mol<sup>-1</sup>,  $C_{PEG}$  15% (m/m),  $C_{FOSF}$  10% (m/m)) não formaram fases, porque nestas condições eles se encontram na região monofásica, ou seja, abaixo da curva binodal que corresponde à região bifásica do sistema PEG – Fosfato<sup>17</sup>. Situação semelhante foram reportadas por Porto et al.<sup>13</sup> e Porto et al.<sup>18</sup>

Observa-se na Tabela 1, que as proteases foram particionadas para a fase superior (rica em PEG) em quase todos os sistemas avaliados. Em geral, o coeficiente de partição aumentou com o aumento da concentração do sal, indicando que a concentração de fosfato induziu a migração das proteases para a fase superior (rica em PEG). Este fenômeno pode ser explicado pelo efeito “*salting out*”, em que a biomolécula é conduzida para outra fase, devido a um elevado teor de sal na fase inferior.<sup>19</sup>

Os resultados obtidos para o coeficiente de partição demonstraram que a interação entre a  $MM_{PEG}$ ,  $C_{PEG}$  e  $C_{FOSF}$  foram estatisticamente significativos a um nível de 5% de significância, com o maior coeficiente de partição (96,88) obtido nas seguintes condições:  $MM_{PEG}$  1000 g mol<sup>-1</sup>,  $C_{PEG}$  20% (m/m) e  $C_{FOSF}$  15% (m/m) (Tabela 1).

Com um aumento da concentração de fosfato, as proteínas carregadas negativamente preferem a fase rica em PEG devido à força de repulsão causada por ânions de sal<sup>20</sup>. Este



fenômeno foi observado por Porto et al.<sup>13</sup>, ao particionar uma protease de *Clostridium perfringens* em PEG / citrato. Eles observaram que a protease foi transferida para a fase superior do sistema com o aumento da concentração de citrato. Diversos autores têm relatado que proteínas com carga negativa migram para a fase superior do sistema (PEG) e proteínas carregadas positivamente migram para a fase inferior (rica em sal).<sup>20,21,22, 23</sup>

Em concentrações mais elevadas de sal, os íons diminuem a solubilidade da proteína (efeito “*salting out*”), aumentando a interação hidrofóbica, a agregação e o efeito de hidratação da molécula de sal em torno da proteína. Por isso, a maioria das proteínas tendem a particionar fortemente para a fase com a concentração mais baixa de sal, aumentando assim a interação entre a proteína e as moléculas de PEG e, por fim otimizando a extração de proteínas para a fase rica em PEG<sup>24</sup>.

Na Figura 1 estão apresentados os resultados obtidos para o fator de purificação na fase superior. Verifica-se que não houve diferenças estatisticamente significativas entre as médias 8,62 e 7,77 obtidas nos sistemas 17 ( $MM_{PEG}$  1000 g mol<sup>-1</sup>,  $C_{PEG}$  20% (m/m),  $C_{FOSF}$  15% (m/m)) e 24 ( $MM_{PEG}$  1500 g mol<sup>-1</sup>,  $C_{PEG}$  17,5% (m/m),  $C_{FOSF}$  20% (m/m)).

Chaiwut et al.<sup>25</sup>, estudaram a extração de proteases do látex de *Calotropis procera* por sistema de duas fases aquosas PEG-sal, sendo esta espécie pertencente à mesma ordem da mangabeira (Gentianales), e obtiveram como maior fator de purificação (4,92) ao utilizar a solução de sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>) a 14% (m/m) e PEG 4000 g mol<sup>-1</sup> a 12% (m/m) na fase superior, o que difere do resultado obtido neste trabalho cujo fator de purificação foi de 8,62 ao utilizar PEG 1000 g mol<sup>-1</sup> a 20% (m/m).

A Figura 2 mostra a interação entre a  $MM_{PEG}$ ,  $C_{PEG}$  e  $C_{FOSF}$  sobre a variável resposta percentual de rendimento na fase superior. Observa-se que houve diferenças significativas entre as médias obtidas ( $P > 0,05$ ), sendo a maior média 150,59% obtida no sistema 17 ( $MM_{PEG}$  1000 g mol<sup>-1</sup>,  $C_{PEG}$  20% (m/m) e  $C_{FOSF}$  15% (m/m)). Rendimentos de atividade com valores superiores a 100%, tal como os obtidos no presente estudo, têm sido relatados com frequência para a extração de proteína utilizando sistemas líquido-líquido.<sup>20, 24, 26</sup>

Babu et al.<sup>27</sup> obtiveram um rendimento de 228% de atividade de bromelina a partir de abacaxi em SFA PEG / fosfato, e Cavalcanti et al.<sup>20</sup> obtiveram um rendimento de atividade de 230% para a extração de uma toxina produzida por *Clostridium perfringens* tipo A com

PEG / fosfato. Já, Porto et al.<sup>18</sup> relataram um rendimento de atividade 625% para a partição de lectinas de *Canavalia grandiflora* usando PEG / citrato.

Rawdkuen et al.<sup>28</sup> trabalhando com látex de *Calotropis procera*, encontraram 68% de rendimento em atividade proteásica na fase superior, ao utilizar PEG 1000 g mol<sup>-1</sup> a 18% (m/m) e solução de fosfato dibásico de potássio (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) a 14% (m/m). Este percentual foi inferior 82,59% ao encontrado neste trabalho para as proteases do látex de mangabeira ao utilizar a mesma MM<sub>PEG</sub>, porém com concentrações maiores do PEG e da solução de fosfato. Porto et al.<sup>13</sup> verificaram um rendimento de atividade de 131% para a extração de protease de caldo fermentado com um sistema de PEG / citrato, enquanto Nascimento et al.<sup>29</sup> reportaram um rendimento de atividade de 116,8% para a separação e recuperação de lectinas de *Canavalia brasiliensis* utilizando PEG / fosfato.

Os elevados percentuais de rendimento obtidos neste trabalho podem ser explicados possivelmente pela eliminação ou diminuição dos inibidores enzimáticos das proteases durante o processo de purificação a partir da influência do PEG no sítio ativo das enzimas, como também pela composição do sistema em condições ótimas que favoreceram as atividades enzimáticas.<sup>30</sup>

Diante dos resultados apresentados, o sistema 17(MM<sub>PEG</sub> 1000 g mol<sup>-1</sup>, C<sub>PEG</sub> 20% (m/m) e C<sub>FOSF</sub> 15% (m/m)) foi selecionado como melhor para a pré-purificação das proteases do látex de mangabeira; o mesmo foi submetido à caracterização bioquímica.

### **Caracterização parcial do extrato bruto (EB) e extrato pré-purificado (EPP)**

#### **Efeito do pH na atividade e na estabilidade das enzimas proteásicas presentes no extrato bruto (EB) e pré-purificado (EPP)**

O efeito do pH na atividade proteásica do extrato bruto (EB) e pré-purificado (EPP) obtido a partir do látex da mangabeira (*Hancornia speciosa*) está apresentado na Figura 3A. No EB as enzimas proteolíticas apresentaram atividade em uma ampla faixa de pH entre 4,0 e 10,0 com atividade ótima (318 U/mL) em pH 4,0 e tampão citrato-fosfato 0,2 M; diferenciando-se significativamente das demais condições. No EPP, a atividade ótima (62,66 U/mL) estatisticamente significativa foi verificada em pH 7,0 e tampão fosfato 0,2M.

Resultado análogo quanto a influência do pH na atividade proteásica do EB foi reportado por Freitas et. al.<sup>31</sup>, ao trabalhar com látex de *Calotropis procera*, sendo esta espécie pertencente a mesma ordem da mangabeira (Gentianales), em que a máxima atividade da protease desta espécie também foi descrita em pH ácido (5,0).

Patel et. al.<sup>32</sup>, ao trabalharem com látex de *Euphorbia hirta*, verificaram que a máxima atividade de uma serino protease com atividade fibrinolítica extraída desta espécie, e purificada por uma combinação de Q-Sepharose de troca aniônica e cromatografia de filtração em gel Superdex 200 também foi obtida em pH neutro (7,2).

Os dados referentes à estabilidade das proteases ao pH no EB no EPP estão apresentados na Figura 3B, onde verificou-se que as enzimas proteolíticas presentes no EB apresentaram estabilidade nos valores de pH entre 4,0 a 7,0 com maior atividade relativa em pH 4,0; as atividades relativas foram superiores a 106,8% durante 60 minutos de incubação, com perda de 20,1% da atividade relativa no pH 8,0, após o mesmo tempo.

Resultados similares quanto a influência do pH na estabilidade das proteases foram descritos por Duarte et. al.<sup>33</sup>, ao estudarem o látex de *Jacaratia corumbensis* O. Kuntze. Estes autores verificaram que a protease desta espécie mantiveram-se estáveis no intervalo de pH ácido (3,6 – 6,5), onde reteve cerca de 100% de sua atividade proteolítica após 120 minutos de incubação.

Em relação ao EPP, as proteases apresentaram estabilidade ao pH na faixa de 5,0 a 10,0 (Figura 3B), com maior atividade relativa em pH 7,0; as atividades relativas foram mantidas acima de 98,98% durante 60 minutos de incubação. Em geral, as proteases presentes no EPP se apresentaram mais estáveis quando comparadas as do EB.

Yadav et. al.<sup>34</sup>, obtiveram resultados de estabilidade ao pH semelhantes aos apresentados neste trabalho, pois verificaram que uma serino protease dimérica de *Euphorbia neriifolia* Linn, purificada por permuta aniônica e cromatografia de exclusão de tamanho, foi estável na faixa de pH compreendida entre 7,0 e 10,0 no qual reteve mais de 75% de sua atividade após 24 h de incubação.

Os resultados da caracterização quanto ao pH ótimo e estabilidade ao pH obtidos para as proteases presentes no EPP do látex de mangabeira, demonstram que os valores elevados de atividades na faixa alcalina de pH (mais de 100% na manutenção da atividade) possibilitam a aplicação deste em diversos setores industriais, incluindo a indústria de detergentes.

## **Efeito da temperatura na atividade e na estabilidade das enzimas proteásicas presentes no extrato bruto (EB) e pré-purificado (EPP)**

O efeito da temperatura na atividade proteásica do EB e EPP obtidos a partir do látex da mangabeira (*Hancornia speciosa*) pode ser observado na Figura 4A. As enzimas proteásicas apresentaram atividade em uma ampla faixa de temperatura (30 a 90°C) tanto no EB quanto no EPP.

No EB, a temperatura ótima foi obtida a 30°C com atividade total de 66,25 U/mL diferenciando-se significativamente das demais temperaturas (Figura 4A). Na condição a 90°C o EB apresentou atividade de 63,5 U/mL, o que sugere a presença de proteases distintas, viabilizando a sua utilização industrial (Figura 4A).

Duarte et. al.<sup>35</sup>, estudaram o perfil de atividade das proteases coagulantes do leite de *Jacaratia corumbensis* O. Kuntze em diferentes temperaturas e, reportaram que a máxima atividade das proteases presentes no extrato bruto desta espécie foi obtida a 55°C.

No EPP, a temperatura que proporcionou maior atividade proteolítica foi 40°C (76,5 U/mL), diferenciando-se significativamente apenas das temperaturas de 80°C e 90°C; este resultado encontra-se bem próximo da temperatura ótima do EB (Figura 4A). Nas temperaturas de 50°C e 60°C, houve uma pequena diminuição da atividade em relação a anterior, entretanto, a 70°C a atividade foi aproximadamente à mesma da temperatura ótima não havendo diferença estatisticamente significativa entre estas (Figura 4A).

Estes resultados foram próximos aos apresentados por Sharma et. al.<sup>36</sup>, que obtiveram no intervalo entre 45-50°C a temperatura ótima para uma serino protease extraída do látex de *Ficus religiosa* purificada por precipitação em sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica e cromatografia de filtração em gel.

Os resultados da estabilidade térmica estão apresentados na Figura 4B, onde é possível observar o comportamento diferente entre o EB e EPP. O EB foi ativado após 60 minutos de incubação de 30°C a 50°C, mostrando uma elevação na atividade de 52,8%, diferindo significativamente; entretanto, nas demais temperaturas houve uma diminuição de 61,2% na atividade (Figura 4B). Com esse perfil a presença de proteases distintas no EB, já sugerido na Figura 4A, é mais uma vez comprovado.

Freitas et al.<sup>37</sup> verificaram que a protease presente no extrato bruto do látex de *Cryptostegia grandiflora* apresentou perda de atividade em temperaturas acima de 60°C durante 30 minutos de incubação levando a desnaturação da enzima a 90°C. Sendo esta protease mais sensível ao efeito da temperatura quando comparadas às proteases deste estudo, onde as proteases presentes no EB obtidos do látex da mangabeira foram termicamente mais estáveis, pois mantiveram mais de 50% da atividade a 80°C da amostra que não foi exposta a temperatura.

As proteases presentes no EPP apresentaram um perfil mais estável em relação ao EB, pois as proteases mantiveram 117,96% de sua atividade inicial nas temperaturas de 30°C e 40°C, após 60 minutos de exposição havendo diferença significativa das outras condições. A maior perda de atividade observada foi de 12,8 % na temperatura de 90°C (Figura 4B). Esses resultados corroboram com os já obtidos para a temperatura ótima, onde as proteases presentes no EPP, em geral, apresentaram melhor desempenho em termos de atividade em relação ao EB nas mesmas condições.

#### **Avaliação da compatibilidade e estabilidade do extrato bruto (EB) e pré-purificado (EPP) com detergentes comerciais**

A Figura 5 apresenta o perfil em atividade das proteases presentes no EB e EPP obtidos a partir do látex da mangabeira frente a detergentes comerciais.

As proteases do EB apresentaram comportamento similar durante os 60 minutos de incubação a 70°C nas marcas de detergentes testadas, mantendo em média 72,81% de sua atividade relativa (Figura 5A). Com uma pequena ativação de 11,97% após 20 – 30 minutos de exposição, a seguir houve uma perda de 32,37% na atividade após 60 minutos de experimento. Dentre os detergentes avaliados o mais compatível foi o detergente Ace<sup>®</sup>, o qual reteve 65,20% da atividade da enzima após 60 minutos de incubação.

Esta perda parcial de atividade das proteases presentes no EB ao longo do tempo de incubação em alguns detergentes pode ser atribuída ao efeito inibitório de seus componentes. Tem sido relatado que os diferentes componentes presentes nos detergentes para roupas, tais como agentes tensoativos aniônicos, agentes de branqueamento e estabilizadores podem influenciar a estabilidade da enzima.<sup>38</sup>

Provavelmente estes agentes tensoativos aniônicos promoveram uma perda de estabilidade das proteases no EB obtido do látex da mangabeira, tendo em vista que este componente encontra-se presente apenas no detergente da marca Omo<sup>®</sup>, que apresentou uma perda de atividade acentuada em relação aos demais testados após 30 minutos de exposição.

O perfil apresentado pelas proteases do EPP foi completamente diferente em relação as do EB, pois enquanto as do EB mostraram uma ativação de 11,97% após 20 minutos em todos os detergentes testados, as do EPP tiveram uma perda de 40,03%. Apesar disso, ao final dos 60 minutos a atividade proteásica do EPP foi de 78,84% em relação ao inicial (Figura 5B).

A maior estabilidade foi verificada na presença do detergente Bem-te-vi<sup>®</sup> onde a protease manteve 89,49 de sua atividade quando incubada a 70°C por 60 minutos.

A compatibilidade de uma serino protease purificada a partir do látex de *Euphorbia neriifolia* Linn. com detergentes comerciais, foi estudada por Yadav et. al.<sup>39</sup>, onde os autores verificaram que esta enzima é razoavelmente estável na presença de vários detergentes utilizados comercialmente na Índia. A maior estabilidade foi obtida na presença do detergente da marca Tide<sup>®</sup>, onde a Neriifolin reteve cerca de 70% de sua atividade após 60 minutos de incubação.

A utilização de enzimas em detergentes não é uma abordagem simples, pois além de apresentar atividade em temperaturas elevadas e meio alcalino, a enzima tem de suportar a presença de detergentes iônicos e não iônicos, agentes tensoativos, produtos químicos de branqueamento, agentes sequestrantes, etc.<sup>40,41</sup>

Uma vez que a atividade proteolítica variou para cada detergente testado, os resultados obtidos indicam claramente que o desempenho das enzimas neles depende de um número de fatores, incluindo os compostos presentes nos detergentes.<sup>41</sup> Um dos compostos que pode ter interferido na estabilidade da protease no EB, é o lauril sulfato de sódio, tendo em vista, o fato de que, dentre os produtos testados este componente encontra-se presente apenas na marca Omo<sup>®</sup>.

## CONCLUSÕES

As proteases do látex de mangabeira foram particionadas para a fase PEG, sendo o SDFA influenciado pela concentração de fosfato devido ao efeito “*salting out*”.

O planejamento fatorial provou que o sistema 17 apresentou os melhores resultados para a pré-purificação de proteases do látex de mangabeira.

Estes resultados viabilizam a utilização do SDFA na pré-purificação de proteases a partir do extrato bruto.

As proteases contidas no EB e no EPP do látex de mangabeira apresentaram atividade em ampla faixa de pH, mostrando-se estáveis na faixa alcalina, com manutenção da atividade em mais de 100%.

As proteases do EB e do EPP do látex de mangabeira mostraram-se ativas em ampla faixa de temperatura (30 a 90°C) mostrando-se estáveis entre 40°C e 70°C. A atividade proteásica foi mantida em cerca de 117,96% da atividade inicial nas temperaturas de 30°C e 40°C após 60min de exposição.

Essas características bioquímicas da protease pré-purificada, bem como sua compatibilidade com detergentes comerciais, sugerem a viabilidade de aplicação em indústrias de detergentes, pois preenche a maioria dos requisitos necessários como: atividade catalítica em valores elevados de pH e temperatura.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Maroni, B. C.; Stasi, C. D.; Machado, S. R; *Plantas medicinais do cerrado de Botucatu – guia ilustrado*, 1<sup>th</sup> ed., UNESP: São Paulo, 2006.
2. Mesquita, A. C.; Oliveira, L. E. M.; Cairo, P. A. R.; Viana, A. A. M. *Bragantia*. **2006**, 65, 633.
3. Morcelle, S. R., Caffini, N. O., Priolo, N. *Fitoterapia*. **2004**, 75, 480.
4. Sumantha, A.; Larroche, C.; Pandey, A. *Food Technology Biotechnology*. **2006**, 2, 220.
5. Singh, J.; Vohra, R. M.; Sahoo, D. K. *Process Biochemistry*. **2003**, 39, 1093.
6. Maurer, K. H. *Current Opinion in Biotechnology*. **2004**, 15, 330.
7. Joo, H.S; Chang, C.S. *Process Biochemistry*. **2005**, 40, 1263.
8. Vishwanatha, K.S. Rao, A. G. A.; Singh, S. A.; *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. **2010**, 37, 129.
9. Moreira, K. A, Albuquerque, B. F., Teixeira, M. F. S., Porto, A. L. F., Lima Filho, J. L. *Word J. Microb. Biotech*. **2002**, 18, 307.
10. Mazzola, P. G.; Lopes, A. M.; Hasmann, F. A.; Jozala, A. F.; Penna, T. C. V.; Magalhaes, P. O.; Rangel-Yagui, C. O.; Pessoa-Jr., A. *Journal of Chemical Techonology and Biotechonology*. **2008**, 83, 143.
11. Alencar, R. B.; Biondi, M. M., Paiva, P. M. G.; VIEIRA, V. L. A.; Carvalho junior, L. B.; Bezerra, R. S. *Braz. J. Food Technol*. **2003**, 6, 279.
12. Bradford, M. M. *Anal Biochem*. **1976**, 72, 248.
13. Porto, T.S.; Silva, G.M.M., Porto, C.S., Cavalcanti, M.T.H., Neto, B.B., Lima-Filho, J.L.; Converti, A.; Porto, A.L.F.; Pessoa Jr, A. *Chem. Eng. Process*. **2008**, 47, 716.
14. Assis, e Silva. F. *Assistat*, Versão 7.3 beta, 2006.
15. Phadatare, S. U.; Deshpande, V. V.; Srinivasan, M. C. *Enzyme Microbiology Technolog*. **1993**, 15, 72.
16. Banerjee, U. C.; Sani, R. K.; Azmi, W.; Soni, R. *Process Biochemistry*. **1999**, 35, 213.
17. Porto, T.S.; Pessoa-Filho, P.A.; Barros-Neto, B.; Lima-Filho, J.L.; Converti, A.; Porto, A.L.F. *J. Microbiol. Biotechnol*. **2007**, 34, 552.
18. Porto, C.S.; Porto, T.S.; Nascimento, K.S.; Teixeira, E.H.; Cavada, B.S.; Lima-Filho, J.L.; Porto, A.L.F. *Biochem. Eng. J*. **2010**, 53, 171.
19. Kirsch, L. D. S.; Carolina, A.; Francisca, M.; Teixeira, S. *Parasitologia*. **2012**, 35, 1912.
20. Cavalcanti, M.T.H.; Porto, T.S.; Barros-Neto, B.; Lima-Filho, J.L.; Pessoa Jr, A.; Porto, A.L.F. *J. Chromatogr. B*. **2006**, 833, 140.

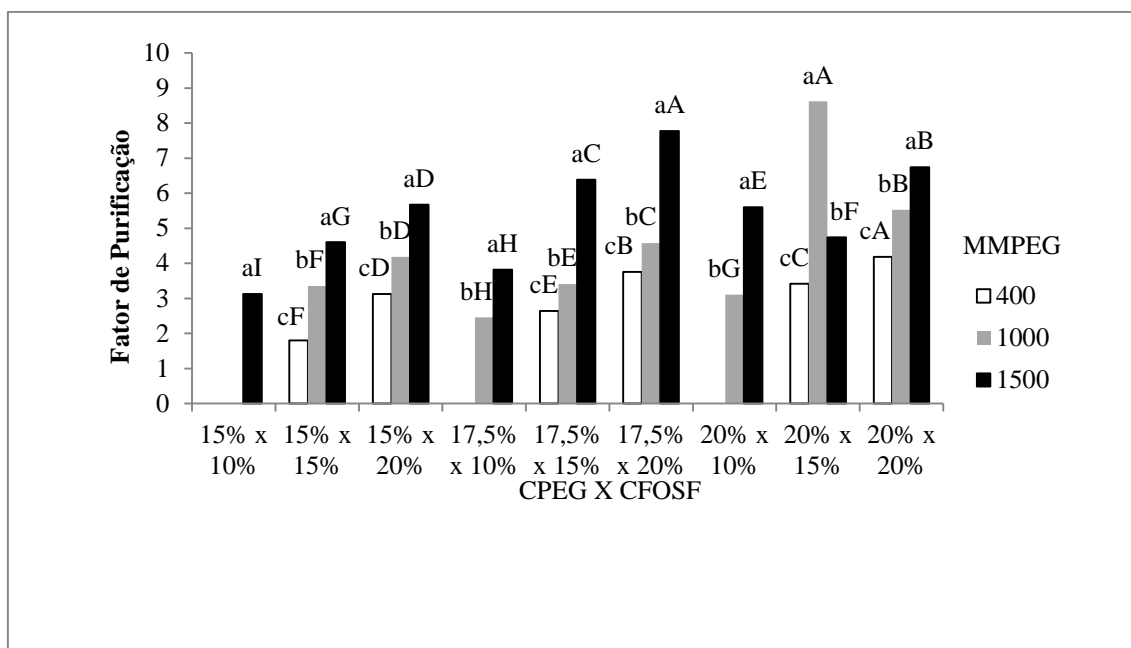


21. Azevedo, A.M.; Gomes, A.G.; Rosa, P.A.J.; Ferreira, I.F.A.; Pisco, M.M.O.; Aires-Barros, M.R. *Sep. Purif. Technol.* **2009**, 65.
22. Han, J.H.; Lee, C.H. *Colloids Surf.* **1997**, 9, 109.
23. Saravanan, S.; Rao, J.R.; Nair, B.U.; Ramasami, T. *Process Biochem.* **2008**, 43, 911.
24. Silva, C.A.S.; Coimbra, J.S.R.; Rojas, E.E.G.; Minim, L.A.; da Silva, L.H.M. *J. Chromatogr. B.* **2007**, 858, 205.
25. Chaiwut, P.; Rawdkuen, S.; Benjakul, S. *Process Biochemistry.* **2010**, 45, 1148.
26. Nascimento, C. O.; Soares, P.A.G.; Porto, T.S.; Costa, R.M.P.B, Lima, C. de A.; Lima-Filho, J.L.; Coelho, L.C.B.B.; Correia, M.T. dos Santos.; Cunha, M. das G. C.; Porto, A.L.F. *Separation and Purification Technology.* **2013**, 116, 161.
27. Rawdkuen, S.; Pintathong, P.; Chaiwut, P.; Benjakul, S.; *Food Bioprod. Process.* **2011**, 89, 73.
28. Mayerhoff, Z. D. V. L.; Roberto, I. C.; Franco, T. T. *Biochemical Engineering Journal.* **2004**, 18, 217.
29. Nascimento, S.K.; Rosa, P.A.J.; Nascimento, K.S.; Cavada, B.S.; Azevedo, A.M.; Aires-Barros, M.R. *Sep. Purif. Technol.* **2010**, 75, 54.
30. Freitas, T.D.; Oliveira, J. S.; Miranda, M. R. A.; Macedo, N. M. R.; Sales, M. P.; Villas-Boas, L. A.; Ramos, M. V. *Plant Physiology and Biochemistry.* **2007**, 45, 781.
31. Patel, G. K.; Kawale, A. A.; Sharma, A. K. *Plant Physiology and Biochemistry.* **2012**, 52, 104.
32. Duarte, A. R.; Duarte, D. M. R.; Moreira, K. A.; Cavalcanti, M. T. H.; Lima-Filho, J. L.; Porto, A. L. F. *Braz. Arch. Biol. Technol.,* **2009**, 52, 1.
33. Yadav, R. P.; Patel, A. K.; Jagannadham, M. V. *Food Chemistry.* **2012**, 132, 1654.
34. Sharma, A.; Kumari, M.; Jagannadham, M. V. *Process Biochemistry.* **2012**, 47, 914.
35. Freitas, T.D.; Souza, D. P.; Araújo, E. S.; Cavalheiro, M. G.; Oliveira, L. S.; Ramos, M. V. *Brazilian society of plant physiology.* **2010**, 22, 11.
36. Maurer K. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2004**, 15, 330.
37. Yadav, R. P.; Patel, A. K.; Jagannadham, M.V. *Food Chemistry.* **2011**, 1296.
38. Anwar, A.; Saleemuddin, M. *Bioresour. Technol.* **1998**, 64, 175.
39. Kalisz, H. M. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **1988**, 36, 1.
40. Nasri, R.; Sila, A.; Ktari, N. *Process Biochemistry.* **2012**, 47, 1957.

**Tabela 1:** Resultados obtidos no planejamento fatorial 3<sup>3</sup>

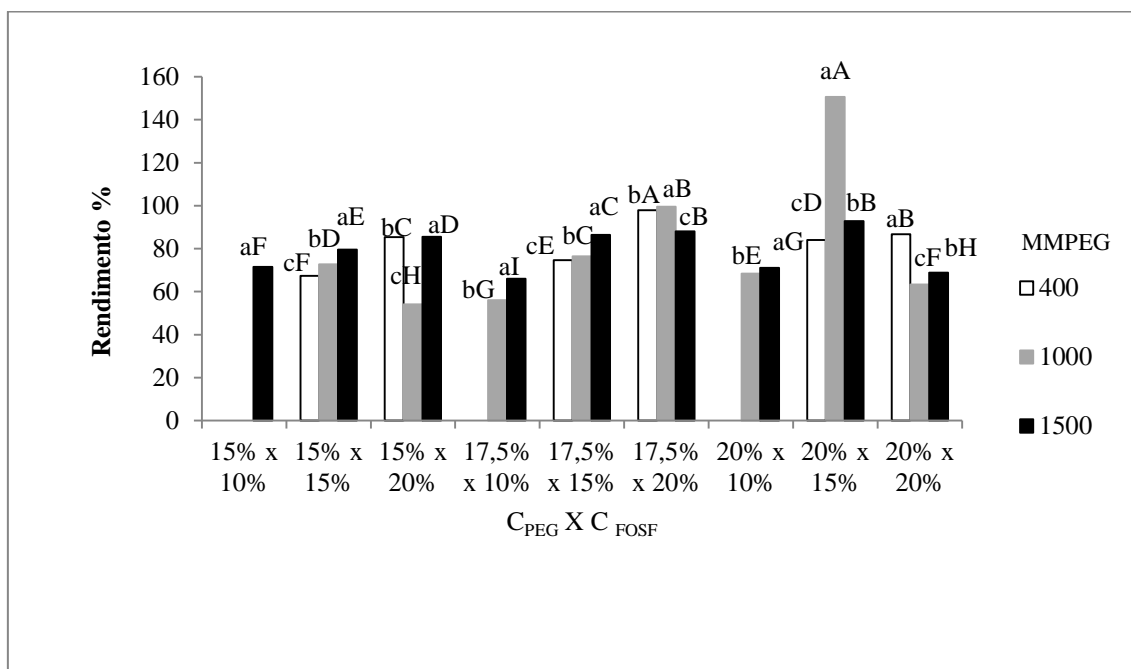
Ensaio	MM <sub>PEG</sub>	C <sub>PEG</sub> %	C <sub>FOSF</sub> %	K	PF <sub>s</sub>	PF <sub>i</sub>	Y <sub>s</sub>	Y <sub>i</sub>
1	400	15	10	- p	-	-	-	-
2	400	15	15	0,81 p	1,83	0,89	67,35	40,06
3	400	15	20	28,84 h	3,12	5,89	85,36	2,64
4	400	17,5	10	- P	-	-	-	-
5	400	17,5	15	2,38 o	2,62	0,39	74,63	17,05
6	400	17,5	20	11,89 l	3,76	9,46	97,91	4,48
7	400	20	10	- p	-	-	-	-
8	400	20	15	17,07 j	3,42	8,92	84,01	1,63
9	400	20	20	23,34 i	4,19	6,21	86,68	1,84
10	1000	15	10	- p	-	-	-	-
11	1000	15	15	28,79 h	3,37	0,04	72,72	2,518
12	1000	15	20	59,72 f	4,18	0	54,15	0
13	1000	17,5	10	5,85 m	2,46	0,10	56,12	4,78
14	1000	17,5	15	14,24 l	3,40	0,07	76,48	4,29
15	1000	17,5	20	85,38 d	4,58	0	99,53	0
16	1000	20	10	0,87 p	3,12	0,80	68,38	29,93
17	1000	20	15	96,88 a	8,62	0	150,59	0
18	1000	20	20	54,33 g	5,51	0	63,33	0
19	1500	15	10	3,45 n	3,12	0,23	71,58	10,36
20	1500	15	15	13,69 l	4,62	0,10	79,61	5,81
21	1500	15	20	94,27 b	5,67	0	85,47	0
22	1500	17,5	10	1,80 o	3,81	0,41	65,96	18,30
23	1500	17,5	15	66,72 e	6,39	0	86,42	0
24	1500	17,5	20	88 c	7,78	0	88	0
25	1500	20	10	1,19 o	5,60	0,64	71,06	29,74
26	1500	20	15	59,77 f	4,74	0	92,90	0
27	1500	20	20	66,44 e	6,74	0	68,84	0

$MM_{PEG}$ : massa molar do PEG,  $C_{PEG}$ : concentração de PEG,  $C_{FOSF}$ : concentração de fosfato,  $K$ : coeficiente de partição,  $PF_s$ : fator de purificação da fase superior,  $PF_i$ : fator de purificação da fase inferior,  $Y_s$ : rendimento da fase superior,  $Y_i$ : rendimento da fase inferior. \*Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a nível de 5% de significância.



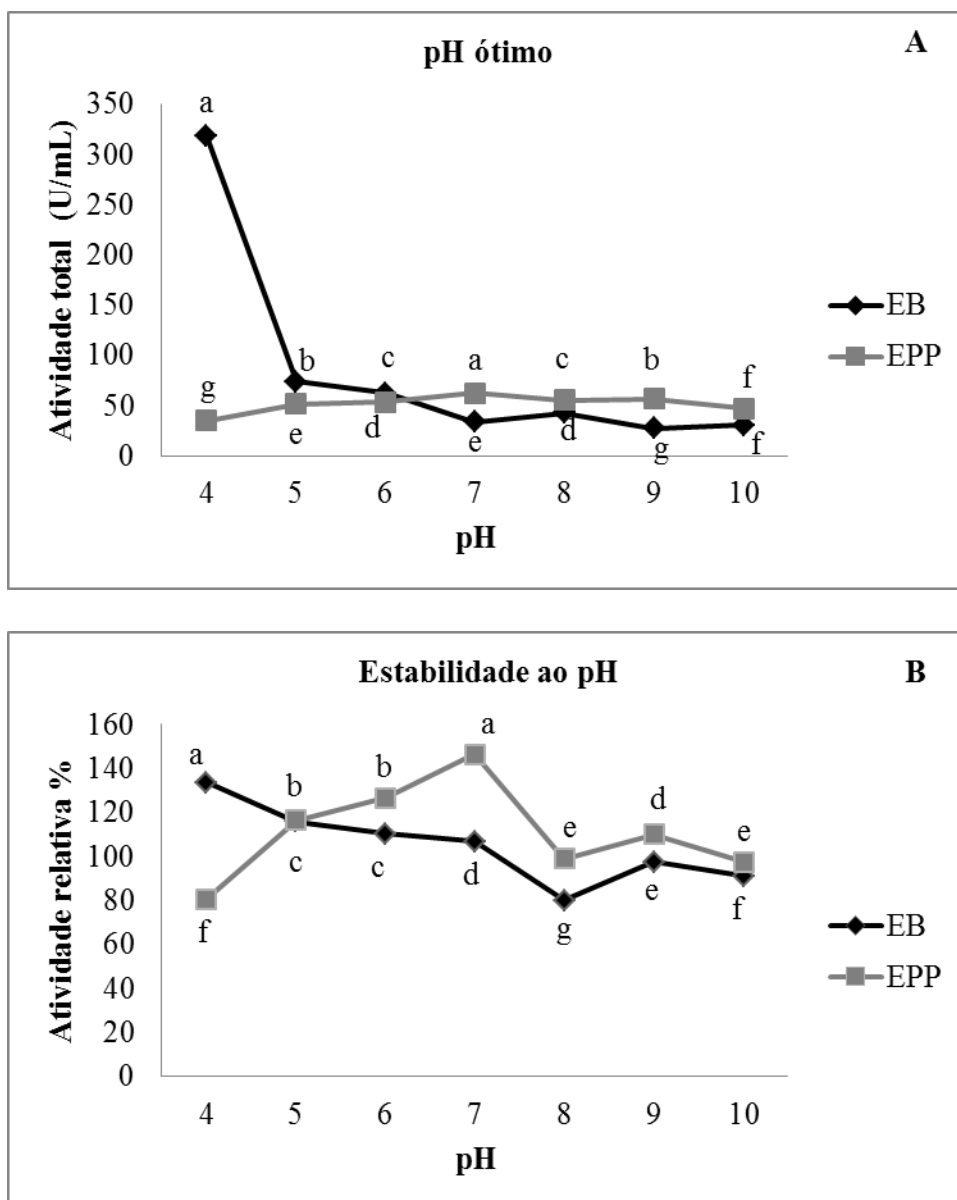
**Figura 1:** Efeito da interação entre a  $MM_{PEG}$ ,  $C_{PEG}$  e  $C_{FOSF}$  sobre a variável resposta fator de purificação da protease da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes).

\*Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas nas categorias de colunas e minúsculas nas colunas agrupadas não diferem entre si pelo teste de Tukey a nível de 5% de significância. Letras maiúsculas comparam colunas e as letras minúsculas comparam linhas.

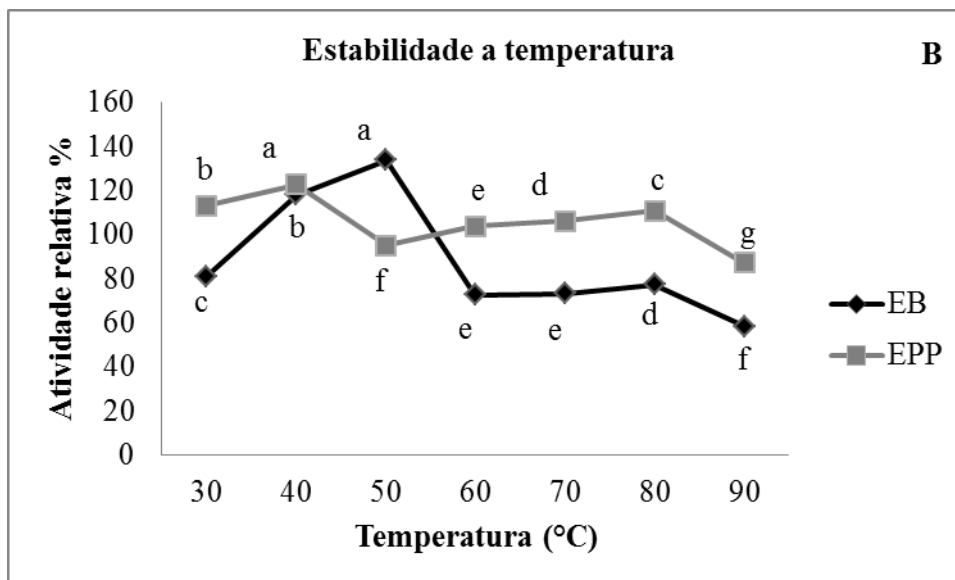
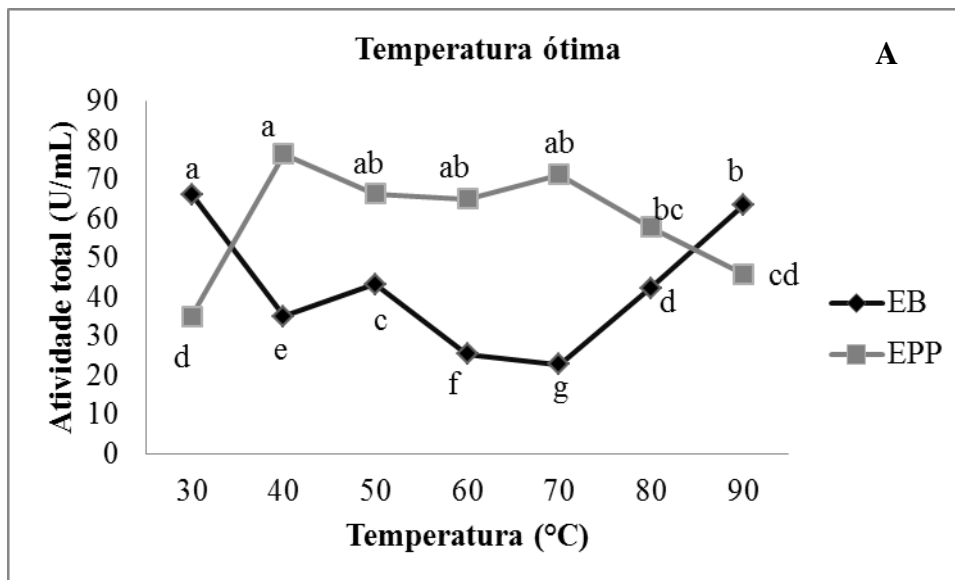


**Figura 2:** Efeito da interação entre a  $MM_{PEG}$ ,  $C_{PEG}$  e  $C_{FOSF}$  sobre a variável resposta percentual de rendimento da protease da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes).

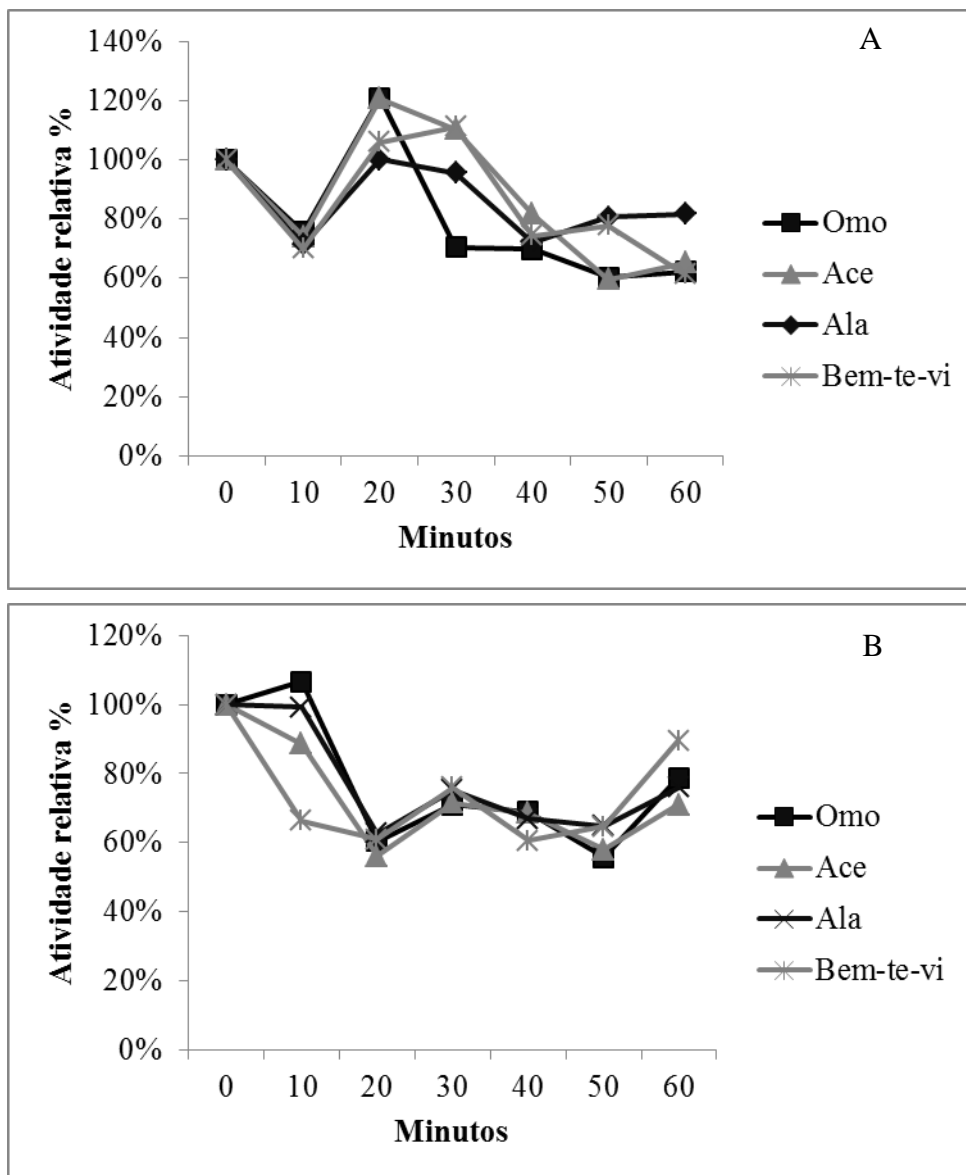
\*Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas nas categorias de colunas e minúsculas nas colunas agrupadas não diferem entre si pelo teste de Tukey a nível de 5% de significância. Letras maiúsculas comparam colunas e as letras minúsculas comparam linhas.



**Figura 3:** Efeito do pH na atividade (A) e estabilidade (B) do EB e EPP obtidos a partir do látex da mangabeira (*Hancornia speciosa*) à 25°C durante 60 minutos de incubação, tampão citrato-fosfato 0,2 M pH 4,0 e 5,0 , tampão fosfato 0,2 M pH 6,0 e 7,0 , tampão Tris-HCl 0, 2 M pH 8,0 e tampão carbonato-bicarbonato 0,2 M pH 9,0 e 10,0. \*Médias seguidas pela mesma letra minúsculas não diferem entre si pelo teste de Tukey a nível de 5% de significância.



**Figura 4:** Efeito da temperatura na atividade (A) e estabilidade (B) do EB e EPP obtidos a partir do látex da mangabeira (*Hancornia speciosa*) durante 60 minutos de incubação. \*Médias seguidas pela mesma letra minúsculas não diferem entre si pelo teste de Tukey a nível de 5% de significância.



**Figura 5:** Estabilidade das proteases presentes no EB (A) e EPP (B) obtidos a partir do látex da mangabeira (*Hancornia speciosa*) em detergentes comerciais a 70°C durante 60 minutos de incubação.

## Capítulo IV - Pedido de Patente

Processo de Obtenção de um novo bactericida a partir do látex de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes).<sup>4</sup>

---

<sup>4</sup>Depósito de pedido de patente realizado junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) em 17/07/2013.



< Uso exclusivo do INPI >



Espaço reservado para o protocolo

Espaço reservado para a etiqueta

Espaço reservado para o código QR



**INPI**  
INSTITUTO  
NACIONAL  
DA PROPRIEDADE  
INDUSTRIAL

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL  
Sistema de Gestão da Qualidade  
Diretoria de Patentes

<b>DIRPA</b>	Tipo de Documento: <b>Formulário</b>	DIRPA	Página: 1/3
		Código: <b>FQ001</b>	Versão: <b>2</b>
Título do Documento: <b>Depósito de Pedido de Patente</b>		Procedimento: <b>DIRPA-PQ006</b>	

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas:

1. Depositante (71):

1.1 Nome: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

1.2 Qualificação: UNIVERSIDADE

1.3 CNPJ/CPF: 24416174000106

1.4 Endereço Completo: R. DOM MANOEL DE MEDEIROS S/N - DOIS IRMÃOS - RECIFE - PE

1.5 CEP: 52171-900

1.6 Telefone: (81) 33206104

1.7 Fax:

1.8 E-mail: DIRETORIA@INOVATEC.UFRPE.BR

continua em folha anexa

2. Natureza:  Invenção  Modelo de Utilidade  Certificado de Adição

3. Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):

PROCESSO DE OBTENÇÃO DE UM NOVO BACTERICIDA A PARTIR DO LÁTEX DE MANGABEIRA  
(HANCORNIA SPECIOSA GOMES)

continua em folha anexa

4. Pedido de Divisão: do pedido Nº \_\_\_\_\_ Data de Depósito: \_\_\_\_\_

5. Prioridade:  Interna (66)  Unionista (30)

O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

País ou Organização do depósito	Número do depósito (se disponível)	Data de depósito

continua em folha anexa

Figura 1. Comprovante de depósito de patente junto ao INPI (Instituto Nacional da Propriedade Industrial).

## **ANEXOS**

Normas para publicação no periódico *Journal of Experimental Botany*

Normas para publicação no periódico *Journal of Medicinal Plant Research*

Normas para publicação no periódico *Química Nova*