



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

DANIEL DE BRITO

**PROSPECÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE PROTEÍNAS
DE SEMENTES DE FABACEAE DA AMAZÔNIA BRASILEIRA**

FORTALEZA

2018

DANIEL DE BRITO

PROSPECÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE PROTEÍNAS
DE SEMENTES DE FABACEAE DA AMAZÔNIA BRASILEIRA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Viana Ramos

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

B875p Brito, Daniel de.

Prospecção, identificação e atividade antifúngica de proteínas de sementes de Fabaceae da Amazônia brasileira / Daniel de Brito. – 2018.

84 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2018.

Orientação: Prof. Dr. Márcio Viana Ramos.

1. *Dimorphandra caudata*. 2. *Dimorphandra parviflora*. 3. *Swartzia longistipitata*. 4. *Swartzia recurva*. 5. *Zygia trunciflora*. I. Título.

CDD 572

DANIEL DE BRITO

PROSPECÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE PROTEÍNAS
DE SEMENTES DE FABACEAE DA AMAZÔNIA BRASILEIRA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Viana Ramos

Aprovada em: __/__/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Márcio Viana Ramos (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Cleverson Diniz Teixeira de Freitas
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Marina Duarte Pinto Lobo
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

POS-DOC. Dra. Ayrles Fernanda Brandão da Silva
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Às empregadas domésticas.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), através do projeto Pró-Amazônia: biodiversidade e sustentabilidade;

À Universidade Federal do Ceará, através do Laboratório de Plantas Laticíferas, coordenado pelo professor Dr. Márcio Viana Ramos, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular;

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, através do Prof. Dr. José Francisco de Carvalho Gonçalves e da Professora Dra. Andreia Varmes Fernandes;

À Universidade de Fortaleza, por meio do Núcleo de Biologia Experimental, coordenado pelo professor Dr. Renato de Azevedo Moreira e pelos laboratórios de Desenvolvimento de Fármacos e Análise Proteômica, ambos coordenados pela professora Dra. Ana Cristina Oliveira Monteiro Moreira.

A **Jesus Cristo**, meu único e suficiente salvador.

Ao professor Dr. **Márcio Viana Ramos**, por toda a orientação ao longo desses quatro anos. Como orientador esteve presente e disponível todo o tempo para todas as indagações quando procurado. Empenhou-se desde o início deste estudo em propiciar estrutura e condições necessárias mesmo em tempos de recursos escassos. Assegurou e garantiu com planejamento e liderança os pré-requisitos necessários para a conclusão deste trabalho. Seu comprometimento com a ciência, o grupo de pesquisa, as aulas, as orientações e disposição em ajudar quem bate à porta do seu laboratório o fizeram um profissional admirável e imprimiram em mim o desejo pela ordem, praticidade, planejamento e “preciosismo”. Mas acima de tudo sou grato ao homem imperfeito, igual a todos, mas que me oportunizou uma bolsa de doutorado em um de seus projetos, reconheceu minhas deficiências, acreditou e confiou tarefas a mim, respeitou meus limites e compartilhou o ser pai, filho, sobrinho e amigo. Por fim, toda minha gratidão a esse que tanto me apoiou e torce por meu futuro, por quem tenho profundo carinho, respeito e admiração.

Ao Prof. Dr. **Cleverson Diniz Teixeira de Freitas**, por todo apoio, acompanhamento, disponibilidade, disposição, didática e paciência com que me tratou durante todo o doutorado. Seu jeito simples e amigo de ser foi o elo que nos tornou próximos. Sua amizade e acima de tudo sua capacidade humana de sensibilidade

tornaram minhas angústias mais leves e minhas dificuldades experimentais menos complexas. Deixo para trás o professor e carrego para a vida um amigo.

Aos membros da banca examinadora da tese prof. Dr. **Bruno Anderson Matias da Rocha**, profa. Dra. **Marina Duarte Pinto Lobo**, Dra. **Ayrles Fernanda Brandão da Silva** e prof. Dr. **Cleverson Freitas**, por ter aceito o convite e se colocado à disposição para certamente contribuir com o êxito do trabalho.

Aos membros da banca examinadora do processo de qualificação prof. Dr. **Renato de Azevedo Moreira**, professora Dra. **Raquel Sombra** e o prof. Dr. **Cleverson Freitas**, por todas as observações e sugestões oferecidas ao projeto.

Aos Drs. **Frederico Bruno Mendes Batista Moreno** e **Marina Duarte Pinto Lobo**, por toda ajuda e comprometimento nos ensaios de espectrometria de massas. Além da técnica **Hyldecia Lellis** que sempre me acolheu muito bem UNIFOR.

Aos professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular com quem tive o privilégio de aprender em sala de aula: Dr. **Enéas Gomes Filho**, Dra. **Ilka Maria Vasconcelos**, Dr. **Francisco de Assis Paiva Campos**, Dra. **Dirce Fernandes de Melo**, Dr. **José Tadeu Abreu de Oliveira**, Dr. **Márcio Viana Ramos**, Dr. **Cleverson Diniz Teixeira de Freitas**, Dr. **José Hélio Costa**, Dr. **Bruno Anderson Matias da Rocha** e a Dra. **Norma Maria Barros Benevides** a quem sou profundamente agradecido por todo apoio e carinho ao longo desses anos, levarei o aconchego de cada abraço e a saudade do sorriso tímido.

Aos colegas da turma de doutorado, por toda aprendizagem e companheirismo.

À professora Dra. **Carmensita Matos Braga Passos**, por todos os ensinamentos e discussões sobre didática e principalmente por ter reforçado em mim o compromisso com a docência.

À professora Dra. **Carmem Dolores Gonzaga Santos**, por todos os ensinamentos e discussões em fitopatologia, comprometimento com ensino/aprendizado e principalmente pelo carisma e carinho sempre presente.

Aos atuais e ex-funcionários do Departamento de Bioquímica **Fátima Andrade**, **Daniel Torres**, **Vanda Livino**, **Pedro Henrique Pereira**, **Maria Gildemar de Oliveira**, **Daniel Farias**, **Aldelisa Viana** e **Maria Edinilda Nascimento** que

colaboraram comigo em questões burocráticas ou funcionais no laboratório, meu profundo agradecimento.

Aos funcionários do Restaurante Universitário **Elenice Braga, Vanusia Costa, Patrícia Silva, Assis Cunha, Maria Nete (a tia), Evandro Bandeira, Vanda Mesquita, Murilo Sousa, Franciane Carvalho, David Sousa e Sansão Lopes**, por toda dedicação, carinho e compreensão que sempre me serviram e assim contribuíram de forma indireta para otimização da execução de minhas atividades.

Aos estudantes **Arthur Vieira e Aline Albuquerque**, por toda ajuda na bancada e companheirismo.

Ao mestrando **João Pedro Brasil de Oliveira**, por toda orientação prática no laboratório, ajuda nos experimentos, disponibilidade e apoio constante.

Aos doutorandos **Juscelino Sudário e Simone Torres**, pela ajuda nos ensaios quitinolíticos.

À doutoranda **Deborah Carvalho Freitas**, por todo apoio, companheirismo e disponibilidade em ajudar nos experimentos.

À doutoranda **Maria Zelândia Rocha Silva**, por toda orientação química, ambientação no laboratório e exemplo de comprometimento e dedicação à pesquisa.

À Dra. **Carolina de Araújo Viana**, pelo acolhimento, cuidado, orientação, formação, apoio, disponibilidade e carinho que sempre disponibilizou a mim.

Aos amigos **Wallace Teixeira da Cruz, Jackson Lima, Francimauro Sousa Moraes e Sandro Rios Silveira**, por todo apoio no hospital, preocupação e cuidado em dos momentos mais difíceis durante o doutoramento. Meu profundo agradecimento.

Aos amigos que fiz no laboratório **Hugo Leite, Camila Tauane, Isabel Cristina, Juliany Fátima, Rafaela Oliveira, Felipe Bessa, Guilherme Rúbem, Felipe Sousa, Camila Freitas, Pedro Rocha Júnior, Mirele Vasconcelos, Igor Studart, Liviane Rabelo, Bruna Araújo, Antônio Neto, Raphael Coelho, Beatriz Nishi, Eilton Sousa, Emanuel Alves, Larissa Freitas, Brena Késsia, Ana Júlia Ferreira**, por toda a amizade, ensinamentos, companheirismo, apoio e conselhos tão essenciais nos momentos de tomada de decisão.

Aos amigos Pr. **Thiago Eudes e Diego Mendes**, por todos os ensinamentos e demonstração de amor fraternal que me ajudaram nesse período distante da família, que foi essencial para o bom andamento desta tese.

Aos Amigos **João Garcia Alves Filho, Ricardo Basto Souza, Rodrigo Maranguape Silva da Cunha, Raulzito Fernandes Moreira, Maria Auxiliadora Sousa Oliveira, Francisco Robson Farias, Wagner Cavalcante, Cícero Luiz e Antônio Clairton**, pela amizade de uma vida, que contribuiu diretamente para que eu chegasse a esse programa de doutorado e a conclusão deste estudo. Muito obrigado.

À minha tia **Iracy Maria de Brito** e minha prima **Lucineide Marques de Brito**, por todo auxílio e carinho tão fundamentais para esta conquista.

À minha noiva **Nívea Theresa Rodrigues**, pela compreensão, pela dedicação e zelo mesmo com a distância, pelos momentos de força e encorajamento, por acreditar em mim, pelos conselhos, pelos cuidados em momentos difíceis, pela paciência, por todo amor e carinho que me deu ânimo para prosseguir neste trabalho.

Àquelas que abriram mão de seus sonhos, de seus projetos pessoais para dedicarem-se a minha formação. À minha mãe **Inácia Helena de Brito** que por doze anos distante, vendeu em “casas de família” o tempo que poderia estar me vendo crescer para dar-me condições de uma vida confortável dentro do possível. À minha tia **Raimunda Maria de Brito (Tidô)**, que dedicou todo seu tempo a cuidar de mim para que, com ajuda de minha mãe, eu pudesse na juventude apenas estudar. Pelo amor incondicional, exemplo de resistência e dedicação agradeço a essas, que ainda hoje são a principal razão de meu estudo e persistência, sem as quais seria impossível a execução e conclusão deste trabalho.

“No começo pensei que estivesse lutando para salvar seringueiras, depois pensei que estava lutando para salvar a Floresta Amazônica. Agora, percebo que estou lutando pela humanidade.”

Chico Mendes

RESUMO

Considerada um dos principais centros de biodiversidade global, a Floresta Amazônica representa o mais complexo bioma do planeta. Historicamente, o uso de espécies da floresta no cotidiano das populações tradicionais, para os mais diversos propósitos, atrai a atenção de pesquisadores. Entretanto, estudar cientificamente essas espécies tem seus desafios. Vencer as dificuldades de acesso/exploração territorial, a sazonalidade do clima e as características intrínsecas de cada espécie restringem fortemente a prospecção e estudos sistemáticos. Este trabalho foi desenvolvido em resposta a uma iniciativa do Governo Federal (CAPES) que apoiou a prospecção biológica na Amazônia brasileira. Centrado em sementes de plantas, o estudo buscou investigar proteínas em espécies nativas. Após expedição de coleta botânica, cinquenta espécies da família *Fabaceae* foram selecionadas para estudo. As proteínas das sementes foram extraídas em solução salina e os extratos foram testados em ensaios de inibição de crescimento dos fungos fitopatogênicos: *Aspergillus* sp., *A. flavus*, *A. niger*, *Fusarium* sp., *F. oxysporum*, *Penicillium chrysogenum* e *Phomopsis* sp. Os extratos de espécies identificadas como endêmicas da Amazônia brasileira [*Dimorphandra caudata*, *D. parviflora* (Caesalpinieae); *Swartzia longistipitata*, *S. recurva* (Swartzieae); *Zygia trunciflora* (Ingeae)] foram avaliados por SDS-PAGE e as proteínas presentes foram identificadas por espectrometria de massas (MS/MS), além da prospecção de atividades proteolíticas e quitinásicas. O fracionamento proteico em matrizes de troca iônica permitiu a purificação parcial de uma lectina e três quitinases, que foram avaliadas quanto as suas atividades antifúngicas e mecanismo de ação. A atividade antifúngica dos extratos foi observada entre os fungos testados e mais representativa na tribo *Ingeae*. Proteases, quitinases e inibidores de proteases foram identificados nas amostras, sendo que a atividade quitinolítica foi predominante. Os ensaios de microscopia de fluorescência evidenciaram a ligação de iodeto de propídio ao DNA de esporos de *Fusarium oxysporum*, sugerindo que a integridade da membrana dos esporos foi perdida quando exposta às proteínas parcialmente purificadas. Foi observado que os extratos proteicos das sementes coletadas na Amazônia apresentavam forte ação antifúngica e que a atividade quitinásica estava associada a este efeito. Estes achados podem ser bons subsídios para o estudo molecular mais amplo destas quitinases de

sementes de plantas nativas e suas atividades na defesa, considerando que as sementes destas plantas são submetidas a um complexo conjunto de adversidades inerentes ao ecossistema amazônico, especialmente ao ataque fúngico quando caem no solo e germinam.

Palavras-chave: *Dimorphandra caudata*. *D. parviflora*. *Swartzia longistipitata*. *S. recurva*. *Zygia trunciflora*

ABSTRACT

The Amazon Forest is seen as one of the main focus of global biodiversity, and it represents the most complex ecosystem of the planet. Historically, the daily use of forest species by traditional populations, for the most diverse purposes, has attracted the researchers' attention. However, the scientific study of forest species has its challenges. To overcome the difficulties of territorial access/ exploration, seasonality of the climate, and the intrinsic characteristics of each species strongly restrict the prospecting and systematic studies. This work was planned in response to an initiative of the Federal Government (CAPES) that stimulated the biological prospecting in the Brazilian Amazon. Focused on plant seeds, the study aimed to investigate proteins in native species. After botanical collection, fifty species of the *Fabaceae* family were selected for study. Seed proteins were extracted in saline and the extracts were tested in a growth inhibition assays of the following phytopathogenic fungi: *Aspergillus sp.*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium sp.*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium chrysogenum* and *Phomopsis sp.* Extracts belonging to species that were identified as endemic of the Brazilian Amazon [*Dimorphandra caudate*, *Dimorphandra parviflora* (Caesalpinieae); *Swartzia longistipitata*, *Swartzia recurva* (Swartzieae); *Zygia trunciflora* (*Ingeae*)] were further evaluated by SDS-PAGE, proteomic analysis by mass spectrometry (MS/MS) of selected spots, and prospected for enzymatic activities of proteases and chitinases. Protein fractionation through ion exchange matrices allowed the partial purification of a lectin and three chitinases which were evaluated for their antifungal activities and mechanism of action. The antifungal activity of the extracts was widely observed among the tested fungi and was most representative in the *Ingeae* tribe. Proteases, chitinases and protease inhibitors were identified in the samples and chitinolytic activity was predominant. Fluorescence microscopy assays demonstrated the binding of propidium iodide to DNA of *Fusarium oxysporum* spores, suggesting that spore integrity was lost when exposed by the partially purified proteins. It was observed that the protein extracts of the seeds collected in the Amazon had a strong antifungal action and that chitinase activity was associated with this effect. These findings may be good subsidies for further molecular study of these seed chitinases from endogenous plants and their defense activities, considering that the seeds of these plants are subjected to a complex set of adversities inherent to the

Amazonian ecosystem, especially to the fungal attack when they fall on the ground and germinate.

Keywords: *Dimorphandra caudata*. *Dimorphandra parviflora*. *Swartzia longistipitata*.
Swartzia recurva. *Zygia trunciflora*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Biomass Brasileiros.....	18
Figura 2 -	Bioma Amazônia e Amazônia Legal	21
Figura 3 -	Quitina: estrutura química.....	27
Figura 4 -	Espécies da família <i>Fabaceae</i> endêmicas da Floresta Amazônica Brasileira escolhidas para a continuação deste trabalho.....	37
Figura 5 -	SDS-PAGE (12,5%) p/v, dos extratos proteicos de sementes de <i>Fabaceae</i> da Floresta Amazônica brasileira.....	51
Figura 6 -	SDS-PAGE e Zimograma de extratos proteicos.....	58
Figura 7 -	Atividade quitinolítica dos extratos proteicos.....	59
Figura 8 -	Inibição da atividade proteolítica do tipo serínica.....	59
Figura 9 -	Cromatografia de troca iônica dos extratos proteicos de <i>S. recurva</i> e <i>Z. trunciflora</i>	61
Figura 10 -	Cromatografia de troca iônica do extrato proteico de <i>D. caudata</i> em coluna Mono-Q com pH 5,0.....	62
Figura 11 -	Cromatografia de troca iônica do extrato proteico <i>D. parviflora</i> em coluna Mono-Q com pH 5.0.....	63
Figura 12 -	Cromatografia de troca iônica do extrato proteico de <i>S. longistipitata</i> em coluna Mono-Q column com pH 5.0.....	64
Figura 13 -	Perfil cromatográfico em coluna HiTrap™ Benzamidine Sepharose 4 Fast Flow do extrato proteico de <i>S. longistipitata</i>	65
Figura 14 -	Permeabilização da membrana celular medida pelo iodeto de propídio.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Famílias de proteínas relacionadas à patogênese.....	26
Tabela 2 -	Lista das espécies da família Fabacea, separadas nas respectivas subfamílias (Caesalpinioideae, Faboideae e Mimosoideae)	33
Tabela 3 -	Atividade antifúngica de extratos proteicos de sementes de espécies da subfamília Mimosoideae, família <i>Fabaceae</i> , contra fungos fitopatogênicos.....	45
Tabela 4 -	Atividade antifúngica de extratos proteicos de sementes de espécies da subfamília Faboideae, família <i>Fabaceae</i> , contra fungos fitopatogênicos.....	47
Tabela 5 -	Atividade antifúngica de extratos proteicos de sementes de espécies da subfamília Caesalpinioideae, família <i>Fabaceae</i> , contra fungos fitopatogênicos.....	49
Tabela 6 -	Dosagem de proteínas solúveis dos extratos totais	50
Tabela 7 -	Identificação de proteínas a partir dos “spot’s’ de SDS-PAGE (Fig. 4) por espectrometria de massa ESI-Q-TOF	53
Tabela 8 -	Atividade proteolítica dos extratos proteicos.....	57

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	Biodiversidade vegetal brasileira.....	18
1.2	A Floresta Amazônica e suas características gerais.....	20
1.3	Espécies amazônicas no contexto científico e biotecnológico	22
1.4	<i>Fabaceae</i>	23
1.5	Defesa Vegetal	25
1.5.1	<i>PR – Proteínas</i>	25
1.5.1.1	<i>Quitinases</i>	27
1.6	Problemas e adversidades da produção agrícola brasileira em vistas das doenças e pragas infestantes.....	28
2	OBJETIVOS	31
2.1	Objetivo geral.....	31
2.2	Objetivos específicos.....	31
3	MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1	Materiais.....	32
3.1.1	<i>Reagentes</i>	32
3.1.2	<i>Material vegetal</i>	32
3.1.3	<i>Fungos</i>	33
3.2	Métodos.....	34
3.2.1	<i>Extração proteica</i>	34
3.2.2	<i>Atividade antifúngica</i>	34
3.2.2.1	<i>Cultivo dos fungos</i>	34
3.2.2.2	<i>Obtenção da suspensão de esporos</i>	34
3.2.2.3	<i>Ensaio de Inibição do crescimento vegetativo de hifas</i>	35
3.2.2.6	<i>Análises estatísticas</i>	36
3.2.3	<i>Dosagem de proteínas</i>	37
3.2.4	<i>Análise do perfil proteico por SDS-PAGE</i>	38
3.2.5	<i>Identificação de proteínas por MS/MS</i>	39
3.2.5.1	<i>Seleção e processamento dos spots</i>	39
3.2.5.2	<i>Espectrometria de massas</i>	39

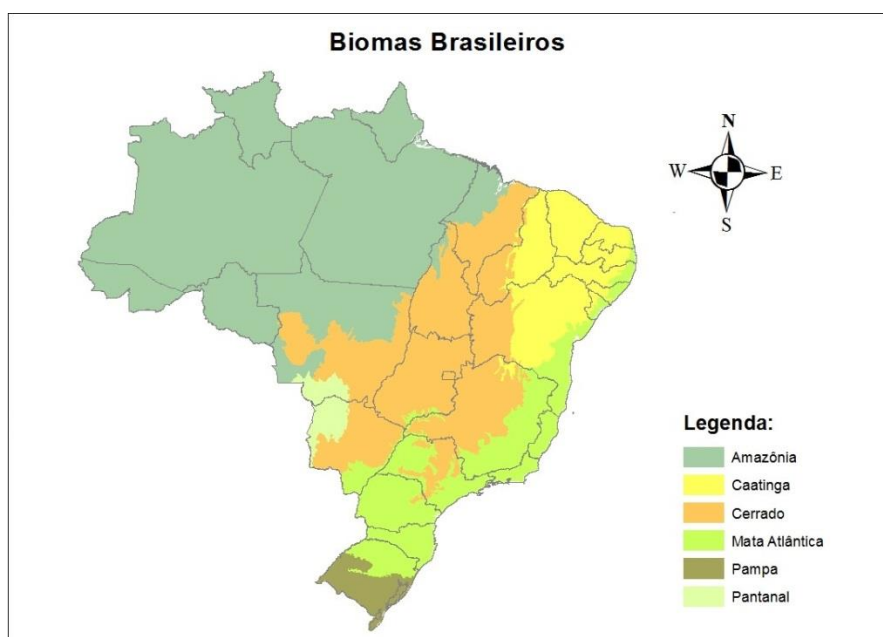
3.2.5.3	<i>Pesquisa em bancos de dados</i>	40
3.2.6	<i>Ensaio enzimático</i>	40
3.2.6.1	<i>Zimograma para detecção de atividade proteolítica</i>	40
3.2.6.2	<i>Determinação colorimétrica da atividade proteolítica</i>	40
3.2.6.3	<i>Atividade inibidora de proteases</i>	41
3.2.6.4	<i>Atividade quitinolítica</i>	41
3.2.7	<i>Purificação das proteínas</i>	42
3.2.7.1	<i>Cromatografia de troca iônica em coluna Mono-S acoplada ao sistema FPLC</i>	42
3.2.7.2	<i>Cromatografia de afinidade em coluna HiTrap - Benzamidina acoplada ao sistema FPLC</i>	43
3.2.8	<i>Avaliação da Integridade da Membrana Celular</i>	43
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1	Inibição do crescimento vegetativo de hifas	44
4.2	Dosagem de proteínas	50
4.3	Perfil proteico por SDS-PAGE dos extratos totais	50
4.4	Identificação de proteínas por espectrometria de massas	52
4.5	Ensaio enzimático	57
4.6	Purificação das proteínas	61
4.7	Avaliação da Integridade da Membrana Celular	66
5	CONCLUSÃO	68
	REFERÊNCIAS	69

1 INTRODUÇÃO

1.1 Biodiversidade vegetal brasileira

O Brasil possui uma biodiversidade extraordinária e abriga a mais rica flora do planeta. Este fato está relacionado à sua extensão territorial e grande diversidade edáfica, climática e geomorfológica que proporciona a ocorrência de diversos tipos vegetacionais (CARDOSO *et al.*, 2017; GIULIETTI *et al.*, 2009; GONÇALVES *et al.*, 2010; ZAPPI *et al.*, 2015). O país, com suas dimensões continentais, apresenta variações de temperatura e precipitação que alteram a distribuição espacial de climas, resultando em seis grandes biomas (FIGURA 1): Mata Atlântica, Cerrado, Caatinga, Pantanal, Pampa (Campos Sulinos) e Amazônia (DONOGHUE; EDWARDS, 2014; ZAPPI *et al.*, 2015).

Figura 1- Biomas Brasileiros.



Fonte: Serviço Florestal Brasileiro - SFB, (2016).

O Bioma Mata Atlântica está presente em aproximadamente 13% do território brasileiro (RIBEIRO *et al.*, 1999). Está localizado na região litorânea onde há alta densidade populacional bem como plantas invasoras, o que representa uma

ameaça para o equilíbrio do mesmo (BERGALLO *et al.*, 2016; FOLLADOR *et al.*, 2018). A mata atlântica é caracterizada por formações vegetais que abrigam uma biodiversidade ímpar e reúne o maior número de angiospermas do Brasil, com 7.432 espécies endêmicas (ZAPPI *et al.*, 2015).

O Cerrado é o segundo maior da América do Sul. Ocupa 24% do território nacional, o segundo com a maior quantidade de espécies angiospermas, reunindo 4.252 espécies endêmicas (SANO, 2010; ZAPPI *et al.*, 2015). Reconhecido como a savana mais rica do mundo em biodiversidade, possui várias tipologias vegetais.

A caatinga atinge aproximadamente 10% do Brasil, demonstrando variedade de paisagens, média riqueza biológica e espécies que aparecem apenas nessa região. A vegetação predominante é a Savana Estépica (Caatinga) (RIBEIRO *et al.*, 1999). Considerado um dos mais desconhecidos e negligenciados biomas brasileiros (MMA, 2011; SANTOS *et al.*, 2011). De acordo com Zappi *et al.* (2015) são relatados nesta região duas espécies de gimnospermas e 4.697 espécies de angiospermas.

O Pantanal abrange aproximadamente 2% do território brasileiro e é a maior superfície inundável interiorana do planeta. No Pantanal predominam as tipologias de vegetação do Cerrado, vegetação da Caatinga e pequenas áreas com florestas (RIBEIRO *et al.*, 1999; ZAPPI *et al.*, 2015).

O Pampa, com área em torno de 2% do território brasileiro, é caracterizado por clima chuvoso, ausência de seca e temperaturas abaixo de zero. Essa exerce influência sobre a formação da vegetação (DONOGHUE; EDWARDS, 2014; RIBEIRO *et al.*, 1999). Poaceae é a família mais rica em espécies nessa região (ZAPPI *et al.*, 2015)

A Amazônia está distribuída entre Peru, Colômbia, Bolívia, Venezuela, Guiana, Suriname, Equador, Guiana Francesa e Brasil, ocupando uma área de 6,4 milhões de quilômetros quadrados. De todo este bioma, 63% está localizado em território brasileiro (HOMMA, 2012). A Amazônia contempla 49% do território nacional e sua vegetação é representada por uma flora altamente variada. Esta diversidade biológica é consequência das condições geoclimáticas dominantes na região (DONOGHUE; EDWARDS, 2014; IBGE, 2015).

Schulman *et al.* (2007) relatou a subamostragem florística da Amazônia brasileira com um número de coletas inferior aos países vizinhos. Além disso, as coletas eram concentradas nas proximidades de grandes cidades ou pelas rotas de

acesso a rios importantes, de forma que uma grande parte de sua área nunca foi coletada. Além disso, muitos pesquisadores enfrentavam dificuldades em acessar a biodiversidade da floresta por falta de um aparato legal. A legislação tornava o acesso ao patrimônio genético da biodiversidade brasileira praticamente inacessível para estudos. O que representou, certamente, um atraso no desenvolvimento de novos conhecimentos e produtos a partir do uso sustentável da biodiversidade. Finalmente, em 20 de maio de 2015 foi sancionado o novo marco legal da Biodiversidade no Brasil através da Lei No 13.123, de 20 de maio de 2015 que versa sobre o “acesso ao patrimônio genético, sobre a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional associado e sobre a repartição de benefícios para conservação e uso sustentável da biodiversidade”. Regulamentando assim, o acesso à pesquisa e tornando possível o desenvolvimento da ciência e tecnologia a partir da biodiversidade brasileira de forma legal (BRASIL, 2015).

A nova lei da biodiversidade, ao garantir acesso regulamentado e legal ao pesquisador a redutos como Amazônia, contribuirá ainda mais para que o país tenha uma das mais avançadas legislações ambientais (NUNES *et al.*, 2016). Certamente favorecerá um número crescente de descobertas que poderão tornar-se produtos de forte interesse na sociedade ou ainda, proteger a flora amazônica permitindo conhecimento sobre esta em tempos de crise ambiental como discutido por Pitman e Jorgensen (2002).

1.2 A Floresta Amazônica e suas características gerais

Florestas são todos os territórios que possuem árvores com mais de cinco metros de altura e que cubram no mínimo 10% da superfície (FAO, 2005). A Floresta Amazônica é o maior banco genético e a maior floresta tropical do planeta (HOMMA, 2012), representando cerca de 50% das florestas tropicais restantes, além de ser um ecossistema importantíssimo na regulação do clima mundial (KRUIJT *et al.*, 2016).

Todo este patrimônio florestal é afetado fortemente pelos ciclos sazonais, que interferem em seu clima, hidrologia e composição atmosférica (ARAGÃO *et al.*, 2014; COX *et al.*, 2013; DONOGHUE & EDWARDS, 2014; SPRACKLEN *et al.*, 2012). Considerada um dos principais focos de biodiversidade global (CARDOSO *et al.*, 2017; LEAL; SIQUEIRA; STÜRMER, 2013), a Floresta Amazônica possui posição geográfica que permite maior incidência de energia solar, acompanhada por uma

massa de ar úmido, baixa amplitude térmica anual e ausência de estações secas acentuadas (AB' SÁBER, 2003). A região apresenta a maior bacia hidrográfica da Terra, Bacia Amazônica, ocupando 1/4 da superfície da América do Sul e reunindo 15% da água doce superficial em estado líquido do globo Terrestre (MEIRELES FILHO, 2004 *apud* PEREIRA *et al.*, 2010).

Segundo Pereira e colaboradores (2010), existem dois tipos de Amazônia no Brasil: Bioma Amazônia e Amazônia Legal (FIGURA 2). O primeiro é evidenciado pela cobertura florestal, com cerca de quatro milhões de quilômetros quadrados, o que equivale a 49% do território Nacional. Formado majoritariamente por três tipos de florestas: terra firme, várzea e iguapó. Estados como Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Roraima e parte do Maranhão, Mato Grosso, Rondônia e Tocantins estão inclusos neste. O segundo é um conceito político-administrativo que abrange todo o Bioma Amazônia, áreas de cerrado e campos naturais, e se prolonga em torno de 59% do país. Sua área abrange todos os estados do Norte Brasileiro, Mato Grosso e parte do Maranhão, com uma extensão total de aproximadamente 5.020.000 km² (IBGE, 2017).

Figura 2- Bioma Amazônia e Amazônia Legal.



Fonte: autor.

Quanto à cobertura vegetal em 2009, cerca de 63% da Amazônia Legal era coberta por Florestas densas, abertas e estacionais, enquanto 22% era coberta por vegetação nativa não Florestal e aproximadamente 15% tinha sido desmatada até então (PEREIRA *et al.*, 2010). Já em 2014, somavam-se 407.511 Km² de desmatamento quando analisado um acumulado desde 1988 (INPE, 2014). Dados que representam preocupação para a sociedade, uma vez que a floresta amazônica

possui a maior reserva de plantas medicinais do mundo, de acordo com a Federação das Indústrias do Estado do Amazonas – FIEAM (2002). Diversas espécies agregam valor à economia da região (SILVA *et al.*, 2014).

1.3 Espécies amazônicas no contexto científico e biotecnológico.

A Floresta Amazônica concentra um grande acervo de plantas com diversos princípios ativos utilizados na indústria farmacêutica e de cosméticos. O uso de substâncias isoladas de plantas dessa região tem sido alvo de diversos estudos nos últimos anos (ALVES *et al.*, 2014; DE MOURA *et al.*, 2015; HANADA, 2014; LIMA *et al.*, 2015; RAPOSO *et al.*, 2017; RUIZ *et al.*, 2011). Os relatos presentes na literatura demonstram atividade citotóxica, antioxidante, anticolinesterase (DA SILVA *et al.*, 2014), antinociceptiva (PAULA-FREIRE *et al.*, 2013), inseticida (ALECIO *et al.*, 2010; DOS SANTOS *et al.*, 2011; MACHADO *et al.*, 2013), antifúngica (RODRIGUES *et al.*, 2014; SEQUEIRA *et al.*, 2009), larvicida (TRINDADE *et al.*, 2013), antimicrobiana (DE ALMEIDA VAUCHER *et al.*, 2015); nutracêutica (NEVES *et al.*, 2015), anti-inflamatória (SCHMEDA-HIRSCHMANN *et al.*, 2014), antiplasmodial (MIRANDA JÚNIOR *et al.*, 2012) e várias plantas com outras propriedades medicinais (GIOVANNINI, 2015).

Dentre as espécies mais estudadas encontra-se o guaraná, popularizado como refrigerante em todo o mundo. No entanto, sua aplicação vai muito além disso. A espécie de nome científico *Paullinia cupana* Kunth var. *sorbilis* (Mart.) Ducke aparece em diversos relatos na literatura (LIOTTI, 2018; PEIXOTO *et al.*, 2017; SCHIMPL *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2017). Seu maior uso tem sido na produção de refrigerantes, seguido por outros, tais como: xarope, energéticos e ainda produtos farmacêuticos e cosméticos (ANVISA-BRASIL, 1997; FUNASAKI *et al.*, 2016; KURI, 2008).

A *Carapa guianensis* Aubl., popularmente conhecida por Andiroba, também apresenta grande importância e variadas atividades biológicas como antiplasmodial (MIRANDA JÚNIOR *et al.*, 2012), larvicida (JESUS *et al.*, 2017), uso medicinal (NARDI *et al.*, 2016; NINOMIYA *et al.*, 2016) e produção de biocombustíveis (ILHA *et al.*, 2014).

O Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum), espécie nativa da Amazônia, possui notória importância por apresentar diversas substâncias com propriedades de interesse econômico, tais como os polifenóis bioativos (YANG *et al.*,

2003; BARROS *et al.*, 2016) e medicinal (GOMES *et al.*, 2017; PUGLIESE *et al.*, 2013; SANTOS; LIMA; OLIVEIRA, 2014;).

Outra espécie nativa da floresta e que hoje é cultivada em diversas partes do mundo é a *Hevea brasiliensis*, que ficou mundialmente conhecida como árvore da borracha (RAHMAN *et al.*, 2013). A seringueira, nome popular local, é a fonte da borracha (AOKI *et al.*, 2014), um produto derivado de seu látex e utilizado na indústria em diversos aspectos (FAUZI, 2003; FRIOLANI *et al.*, 2017; NEVES-JUNIOR *et al.*, 2006; HASMA; OTHMAN; TORQUATO *et al.*, 2016).

Lonchocarpus floribundus, cujo nome popular é timbó ou timborana, bem comum na região do Amazonas, é uma espécie da família *Fabaceae*, com alto potencial inseticida, conforme demonstrado por Corrêa (2006), estudando Pulgão preto dos citros. Machado *et al.* (2013) avaliou esta atividade contra carrapato bovino. Outros estudos também investigaram a atividade biológica de espécies da família *Fabaceae* na Amazônia (LEANDRO *et al.*, 2015; OTTOBELLI *et al.*, 2011; RODRIGUES *et al.*, 2014), além de outras abordagens (FERNANDES *et al.*, 2012, 2015).

1.4 Fabaceae

A família *Fabaceae* contém 19.325 espécies distribuídas em 727 gêneros e estes em 36 tribos, sendo a terceira maior família botânica de angiospermas do mundo e a mais farta em espécies da Floresta Amazônica (LEWIS *et al.*, 2005; ZAPPI *et al.* 2015). No Brasil, sua abundante diversidade está nos mais diferentes domínios fitogeográficos (FORZZA *et al.*, 2010), o que otimiza sua representatividade em todos os biomas do país, somando 210 gêneros no total (LEWIS *et al.*, 2005). De todos esses gêneros, 2.964 espécies foram identificadas, sendo 1.458 endêmicas. Ainda foram relacionadas 53 subespécies, das quais 16 endêmicas e 731 variedades, sendo 419 endêmicas (LIMA, 2010).

Esta família por muito tempo foi chamada de Leguminosae, assim suas espécies ficaram conhecidas como leguminosas em alusão a morfologia dos frutos (legume) de vários de seus representantes como *Phaseolus vulgaris*, *Cicer arietinum*, *Arachis hypogaea*, *Vigna unguiculata* e *Glycine max* (SOUZA, 2012). Estima-se, através de informações de herbários daquela região, que na Amazônia existam 1.241 espécies distribuídas em 148 gêneros. Presente em diversos ecossistemas, suas

espécies são encontradas em várzeas, matas primárias, campinaranas, savanas, igapós, além de áreas secundárias e abertas (LIMA *et al.*, 2010). Três subfamílias são reconhecidas com ampla distribuição global: Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae (Faboideae) (LEWIS *et al.*, 2005; POLHILL *et al.*, 1981; SCHWARZ *et al.*, 2017). *Fabaceae*, da ordem Fabales, possui como critério de classificação dos gêneros e espécies das subfamílias sua morfologia floral (SOUZA, 2012).

As espécies da subfamília Caesalpinioideae são praticamente três mil, distribuídas em 180 gêneros, com folhas normalmente pinadas ou bipinadas. Representadas em sua grande maioria por árvores, arbustos e em menor quantidade por herbáceas (GENTRY, 1996). A subfamília mais antiga da fabaceae apresenta flores moderadamente zigomorfas, pétalas laterais do tipo alas cobrindo o estandarte no botão e estames livres ou monoadelfos em quantidade de dez ou menos (SOUZA, 2012).

A subfamília Mimosoideae é formada por árvores e arbustos; reunindo três mil espécies distribuídas em torno de 56 gêneros (LORENZI, 2002). Com exceção do gênero *Inga*, que apresenta folhas pinadas e glândula nectarífera extrafloral entre os pares de folíolos, os demais gêneros possuem folhas normalmente bipinadas. É habitual a existência de espinhos nesta subfamília, bem como pecíolo contendo pulvino. As flores se caracterizam como actinomorfas, unissexuais ou andróginas, pétalas valvares no botão, contendo de dez ou mais estames (PEREZ, 2008).

Há aproximadamente quatro décadas, Corby (1981) já relatava o predomínio da subfamília Faboideae às demais dentro da família *Fabaceae*. O autor relacionou 441 gêneros, reunindo mais de 12.000 espécies em todo o planeta. Os principais representantes desta subfamília são as ervas, consideradas as espécies mais evoluídas da fabaceae, cabendo ainda em menor proporção árvores e arbustos. Seus constituintes possuem folhas normalmente pinadas, mas ocasionalmente simples podendo ser unifolioladas ou trifolioladas. As flores são hermafroditas e do tipo zigomorfas, possuindo pétalas laterais resguardadas pelo estandarte no botão. Os estames geralmente são dez, mas por vezes monoadelfos ou livres (SOUZA, 2012). De acordo com Lima (2010) no Brasil haviam 210 gêneros desta subfamília. Através de novas buscas verificou-se que 160 destes gêneros estavam descritos na Amazônia (FERNANDES, 2012).

As plantas da família fabaceae representam uma potencial fonte de proteínas com atividade de defesa, através de suas sementes, incluindo uma

variedade de proteínas antifúngicas (BRITO *et al.* 2016; BOGDANOV *et al.*, 2016; MÜLLER *et al.*, 2017; NG *et al.*, 2002; ODDEPALLY; GURUPRASAD, 2015).

1.5 Defesa Vegetal

As plantas possuem um sistema de defesa bem versátil, uma vez que são constantemente alvo de ataques. Devido a isto, elas apresentam mecanismos de superação, pois possuem uma capacidade inata para perceber sinais de ameaças patogênicas e assim, se tornam resistentes aos ataques, reprogramando seu sistema de defesa de acordo com a ameaça (BRUCE, 2015; FREITAS *et al.*, 2016; JAIN *et al.*, 2012; MÉLIDA *et al.*, 2018). Ainda podem realizar associação com micróbios através das raízes e obter vantagens no seu desenvolvimento (SARMA *et al.*, 2015).

Quanto ao insucesso do patógeno, geralmente ocorrem três motivos para que isto aconteça: primeiro, a planta pode não apresentar os requisitos de nicho para determinado patógeno; segundo, apresentar barreiras estruturais pré-formadas ou compostos tóxicos especializados; e terceiro, reprogramação e elaboração de resposta frente ao ataque e reconhecimento do patógeno (BAETZ; MARTINOIA, 2014; HOUSTON *et al.*, 2016; MARTINEZ-MEDINA *et al.*, 2016; MIEDES *et al.*, 2014; SAVATIN *et al.*, 2014).

A literatura apresenta diversos relatos sobre os mecanismos de defesa vegetal, como resposta por hipersensibilidade, produção de espécies reativas de oxigênio, fortificação da parede celular, indução de ácido benzóico e ácido salicílico, síntese de proteínas relacionadas à patogênese (PR-proteínas), além de metabólitos secundários, como as fitoalexinas (CHOUDHURY *et al.*, 2017; HAMMOND-KOSACK; JONES, 1996; MIEDES *et al.*, 2014; TRAN *et al.*, 2014; YAN *et al.*, 2015).

1.5.1 PR-Proteínas

Durante as respostas de defesa, as PR-proteínas apresentam as maiores taxas de proteína solúvel detectadas (SELS *et al.*, 2008). Verificadas pela primeira vez na década setenta (VAN LOON; VANKAMMEN, 1970), estas proteínas são induzíveis no hospedeiro em resposta à infecção por um patógeno ou estímulos abióticos (SELS *et al.*, 2008; STINTZI *et al.*, 1993; OLIVEIRA; VARANDA; FÉLIX, 2016; ULLAH *et al.*, 2017). As PR-proteínas apresentam características incomuns às demais proteínas

vegetais, à guisa de exemplo: estáveis em condições extremas de pH e temperaturas; resistência à ação de enzimas proteolíticas; normalmente são monômeros com massa molecular de no máximo 50 kDa; com localização possível no vacúolo, parede celular e/ou apoplasto (STINTZI *et al.*, 1993; SELS *et al.*, 2008).

Em 2009, 17 famílias de PR-proteínas vegetais já eram conhecidas e relacionadas a diversas funções (TABELA 1) (GORJANOVIC, 2009).

Tabela 1 – Famílias de proteínas relacionadas à patogênese

Família	Propriedades
PR-1	Antifúngica
PR-2	B-1,3 glucanase (enzimas)
PR-3	Quitinase I-II, IV (enzimas)
PR-4	Quitinase I-II (enzimas)
PR-5	Osmotina
PR-6	Inibidores de proteases
PR-7	Endoproteinases (enzimas)
PR-8	Quitinase III (enzimas)
PR-9	Peroxidases (enzimas)
PR-10	Proteínas semelhantes à ribonuclease
PR-11	Quitinase V (enzimas)
PR-12	Defensinas
PR-13	Tioninas
PR-14	Proteínas relacionadas com o transporte de lipídeos
PR-15	Oxalato oxidases (enzimas)
PR-16	Proteínas semelhantes à oxalato oxidases
PR-17	Desconhecida

Fonte: Adaptado de Gorjanovic (2009).

Gorjanovic (2009) relata que a maioria das PR-proteínas possuem grande importância na indução de resistência de plantas contra fitopatógenos, como prevenção contra penetração de patógenos ou na transdução de sinais durante a interação patógeno-hospedeiro. De acordo com o autor, as PR-proteínas ainda

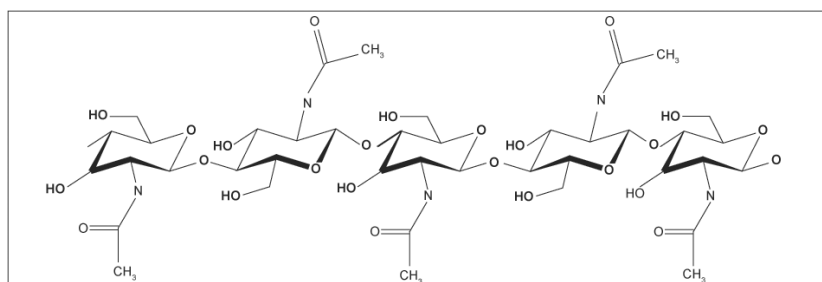
desempenham uma ação direta na resistência contra fitopatógenos, como exemplo: inibição do crescimento ou da germinação de esporos.

Algumas famílias de PR-proteínas possuem atividade enzimática (quitinases, glucanases, peroxidases e ribonucleases) ou ação inibitória (inibidores enzimáticos). O mecanismo de ação dessas proteínas sobre os patógenos, ocorre através da ação hidrolítica sobre a parede da célula, toxicidade, permeabilização da membrana plasmática, sinalização ou inibição (GORJANOVIC, 2009). Dentre as PR-proteínas, as quitinases são aquelas que induzem resistência local ou sistêmica frente o ataque de fitopatógenos (DE JESUS MIRANDA *et al.*, 2017; EBRAHIM; USHA; SINGH, 2011; LI; YI, 2012; SELS *et al.*, 2008).

1.5.1.1 Quitinases

As quitinases (EC 3.2.1.14) são enzimas com capacidade de hidrolisar a quitina (HAN *et al.*, 2016; VAIKUNTAPU *et al.*, 2016), que é o segundo polissacarídeo em maior quantidade na natureza, perdendo apenas para a celulose. Como ilustrado na figura 3, é constituída por resíduos de N-acetil- β -D-glucosamina (2-acetamido-2-desoxi- β -D-glucopiranosose; GlcNAc) unidos por ligações O-glicosídicas β -(1,4) lineares. A quitina é o principal componente estrutural da parede celular dos fungos e de algumas algas, bem como no exoesqueleto de insetos, na carapaça dos crustáceos, nas conchas de moluscos e ovos de nematódeos (HEGEDUS *et al.*, 2009; LEHANE; WU; LEHANE, 1997; PHILIBERT; LEE; FABIEN, 2017; YOUNES; RINAUDO, 2015).

Figura 3 – Quitina: estrutura química.



Fonte: Borgognoni, Polakiewicz e Pitombo (2006).

Estas enzimas são encontradas em diversos organismos e podem apresentar diferentes funções (ADRANGI *et al.*, 2010; COHEN-KUPIEC; CHET, 1998; KARLSSON; STENLID; LINDAHL, 2016; RATHORE; GUPTA, 2015; UNHELKAR *et al.*, 2017). Em fungos, estão envolvidas na morfogênese e alguns processos de patogênese (LANGNER; GÖHRE, 2016), já em animais e plantas atuam na defesa do organismo (ADRANGI; FARAMARZI, 2013; MONGE *et al.*, 2018).

As quitinases vegetais são encontradas em duas famílias de glicosil hidrolases (GH18 e GH19) (DI ROSA *et al.*, 2016; KASPRZEWSKA, 2003). A família GH18 inclui quitinases de arqueobactérias, bactérias, fungos, vírus, animais e plantas, além de endo- β -N-acetilglucosaminidases (EC 3.2.1.96). Já a família GH19 inclui lisozimas (EC 3.2.1.17), quitinases vegetais, algumas quitinases bacterianas e de nematódeos (WATANABE *et al.*, 1999, KASPRZEWSKA, 2003; KAWASE *et al.*, 2006).

Organizadas em cinco classes de acordo com a sequência de seus aminoácidos, as quitinases de plantas representam um grupo com estrutura diversificada em relação as suas propriedades físicas, atividade enzimática, especificidade por substrato e localização (BRUNNER *et al.*, 1998; KASPRZEWSKA, 2003). A maior parte das quitinases de plantas são endoquitinases com massa molecular variando de 26 a 43 kDa (SAHAI; MANOCHA, 1993; SHAKHBAZAU; KARTEL, 2008). Sua expressão constitutiva, pela maioria das plantas, é normalmente baixa, sendo alterada mediante ataques de fitopatógenos de forma sistêmica ou local (DAHIYA; TEWARI; HOONDA, 2006).

A identificação de biomoléculas presentes nas sementes de plantas da Amazônia, capazes de agir sobre agentes infecciosos ou mesmo predadores de sementes, seria muito promissor para futuras análises de programas de transgenia, tendo como alvo culturas agrícolas que sofrem adversidades face às suas deficiências quando atacadas por agentes bióticos.

1.6 Problemas e adversidades da produção agrícola brasileira em vistas às doenças e pragas infestantes

O Brasil tem na agricultura uma das maiores atividades de exportação comercial e ainda um grande programa de agricultura familiar. A extensão geográfica do país propicia regiões distintas e com características peculiares para a agricultura.

Desta forma, as culturas predominam em uma ou outra região do país. O Brasil tem vivenciado ano a ano uma crescente evolução na produção agrícola, em especial de grãos. Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (2017), mesmo com a estiagem no Sudeste em 2015, a safra nacional de cereais, leguminosas e oleaginosas totalizou um aumento de 4,2% em relação a obtida em 2014. Em 2017, atingiu 30,1% à obtida em 2016 (IBGE, 2017). Assim, de acordo com estimativas oficiais, o país poderá tornar-se o maior produtor de grãos do mundo.

Contudo, muito do sucesso agrícola do Brasil está ainda associado à expansão das áreas cultivadas e a mecanização do processo, mais do que o desenvolvimento tecnológico da matéria prima cultivada (FREITAS; MENDONÇA, 2016). Portanto, a expectativa de que o estado brasileiro venha a ser o maior produtor agrícola mundial, ou um deles, é ainda ameaçada por sérios problemas fitossanitários que preocupam os produtores do país, sobretudo aqueles que trabalham com monoculturas em áreas extensas, pois as pragas provocam perdas que vão desde o cultivo ao armazenamento (OERKE, 2006), acarretando grandes prejuízos. Assim, há um investimento grande realizado no controle destas com uso de inseticidas, despesas com tratamentos e danos ambientais que representam indiretamente grandes danos aos produtores (DE OLIVEIRA *et al.*, 2014).

O Brasil é um dos maiores consumidores de pesticidas (inseticidas, acaricidas e fungicidas) do mundo. Somente no ano de 2011 foram gastos no país US\$ 8,5 bilhões com estes produtos (SINDAG, 2013 *Apud* DE OLIVEIRA, *et al.*, 2014). Em 2013, já eram utilizados 102 princípios ativos de inseticidas no país e 423 produtos comerciais com esta ação registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (ANONYMOUS, 2012 *Apud* DE OLIVEIRA *et al.*, 2014), ainda assim os danos à agricultura somam-se a cada ano, seja pela ineficiência dos pesticidas e agrotóxicos ou pela adaptação das pragas a estes. Enquanto isso, um volume grande de produtos prejudiciais ao meio ambiente é utilizado constantemente.

A investigação de produtos naturais que tenham efeitos pesticidas eficientes e sobretudo que não ofereçam danos à natureza, é fundamental para garantir a sustentabilidade do planeta (FAWCETT; SPENCER, 1970). A bioprospecção por alternativas ao controle de agentes infecciosos e/ou danosos à produção agrícola continua a ser uma atividade inerente ao contexto produtivo e científico do país. Doenças fúngicas e virais acometem diversas culturas brasileiras e

a infestação de grãos pós-colheita ainda representa obstáculos, principalmente para a agricultura familiar.

A podridão da raiz do feijão comum provocada pelo fungo *Fusarium solani* (EKE *et al.*, 2016), a antracnose no mamão causada por *Colletotrichum gloeosporioides* (ONG; ALI, 2015), a murcha vascular e podridão da raiz em várias plantas acarretado por *Fusarium oxysporum* (UPASANI *et al.*, 2016), a ferrugem da bainha em *Oryza sativa* L. ocasionada por *Rhizoctonia solani* (CARDONA; DELGADO, 2017), o mofo verde em *Anacardium occidentale* gerada por *Neurospora* sp (LAWAL; FAGBOHUN, 2014) e o caruncho do feijão acarretado pelo inseto *Callosobruchus maculatus* são exemplos dessas doenças e pragas que acometem as culturas agrícolas no Brasil.

Portanto, a bioprospecção de moléculas a partir de plantas da Floresta Amazônica brasileira, além de identificar bioatividade em espécies selvagens de nossa flora, possibilita a busca por produtos medicinais e agrícolas, que podem ajudar na resolução de desafios prementes de nossa sociedade (FERNANDES *et al.*, 2011). Assim, a investigação por ação antifúngica em extratos oriundos de sementes da Amazônia é uma estratégia interessante no combate a fungos fitopatogênicos.

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Identificar proteínas com atividade antifúngica em extratos de sementes de plantas endêmicas da Amazônia.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Extrair proteínas;
- ✓ Determinar o potencial antifúngico de extratos totais obtidos de sementes de diferentes espécies encontradas na Amazônia;
- ✓ Investigar possíveis atividades enzimáticas (proteolítica, quitinolítica e inibitória de proteases) de espécies endêmicas da Floresta Amazônica brasileira;
- ✓ Determinar o perfil de proteínas isoladas de sementes com atividades enzimáticas constatadas;
- ✓ Avaliar potencial antifúngico das proteínas purificadas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Reagentes

Os meios de cultura Batata Dextrose Agar (BDA) e *Yeast Peptone Dextrose* (YPD) foram obtidos da DIFCO e Himedia, respectivamente. O Iodeto de propídio foi da Sigma-Aldrich, Brasil. Todas as amostras utilizadas nos ensaios antifúngicos foram esterilizadas utilizando filtros para seringa de 0,22 µm (Millipore®).

Marcadores de massa molecular, persulfato de amônio, membrana de diálise com poro de exclusão de 8.000 Da, acrilamida, bis-acrilamida, glucuronidase (EC 3.2.1.31), quitina coloidal e reagente de Schiff foram obtidos da Sigma-Aldrich, Brasil. As colunas de troca iônica (Mono-Q e Mono-S) e de afinidade (Benzamidina) foram obtidas da GE HealthCare, Brasil. Ditioneitol (DTT), dodecil sulfato de sódio (SDS), iodoacetamida, uréia e tiouréia foram obtidos da Amersham Bioscience, USA. Tripsina (EC 3.4.21.4) grau sequenciamento foi obtida da Promega, Brasil.

Os demais reagentes foram de grau analítico e de diferentes fornecedores.

3.1.2 Material vegetal

A autorização legal para coletar o material botânico usado neste estudo foi concedido pelo SISBio (Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade) sob o número 47978-1.

As sementes (maduras) estudadas foram coletadas em locais distintos na Floresta Amazônica brasileira. Espécimes de cada lote coletado foram separadas e depositadas no herbário INPA do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia em Manaus, onde foram identificadas. Um total de cinquenta espécies da família *Fabaceae* foram destinadas para a realização inicial deste trabalho. A tabela 2 apresenta as espécies separadas em suas respectivas subfamílias.

TABELA 2 – Lista das espécies da família *Fabaceae*, separadas nas respectivas subfamílias (Caesalpinioideae, Faboideae e Mimosoideae).

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

Fonte: Autor.

3.1.3 Fungos

Os isolados dos fungos fitopatogênicos *Aspergillus* sp., *A. flavus*, *A. niger*, *Fusarium* sp., *F. oxysporium*, *P. chrysogenum* e *Phomopsis* sp. foram obtidos da micoteca mantida pelo Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (LFBV/INPA).

3.2 Métodos

3.2.1 Extração proteica

Cada espécie da família fabaceae teve suas sementes maduras trituradas em moinho (IKA – WERKE – M20 – Universal) até a obtenção de um pó fino. A solução salina (NaCl 0,15 M) foi utilizada para homogeneizar a mistura, que foi suspensa (10% p/v) sob leve agitação a temperatura ambiente por duas horas. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 20.000 x g por 20 min a 4 °C, o precipitado descartado e as proteínas solúveis submetidas à diálise (8.000 Da) contra água destilada por 72 horas a 4 °C. Depois, as proteínas solúveis foram liofilizadas até a obtenção de uma massa seca (FERNANDES *et al.*, 2011).

3.2.2 Atividade antifúngica

3.2.2.1 Cultivo dos fungos

Os fungos fitopatogênicos foram cultivados em meio Batata Dextrose Agar (BDA) vertido em placas de Petri estéreis e mantidos em câmara de germinação com Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) a 27 ± 2 °C. Os isolados foram periodicamente renovados por meio de repique, que consiste na transferência de um pequeno pedaço do meio de cultura contendo o fungo para outra placa contendo apenas meio de cultura BDA. Todos os procedimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar com chama de fogo.

3.2.2.2 Obtenção da suspensão de esporos

A obtenção das suspensões de esporos foi realizada segundo Melo e *et al.* (2005). Após os fungos crescerem em todo o diâmetro da placa de Petri, 15 dias após o repique, essas placas foram abertas em câmara de fluxo laminar e foram adicionados 5 mL de água destilada estéril. Com o auxílio de uma alça de Drigalski, previamente esterilizada, foram feitos movimentos suaves na superfície do micélio para a liberação dos esporos. As suspensões obtidas foram filtradas em malhas finas de nylon estéreis para a retirada das hifas remanescentes. As suspensões de esporos

foram ajustadas para a concentração de 2×10^5 esporos/mL. A contagem de esporos foi realizada com auxílio de uma câmara de Neubauer em microscópio óptico (Carl ZeissAxioLab A1), no aumento 100x.

3.2.2.3 Ensaio de Inibição do crescimento vegetativo de hifas

Os ensaios de inibição do crescimento vegetativo de hifas foram realizados conforme a metodologia descrita por Broekaert, Cammue e Vanderleyden (1990). Os ensaios foram desenvolvidos em placas de microtitulação de poliestireno de fundo chato de 96 poços. Em cada poço foram adicionados 10 μ L da suspensão de esporos (2×10^5 esporos/mL) de um determinado fungo e 90 μ L de meio YPD (*Yeast Peptone Dextrose*). Após 16 horas, na ausência de luz a 27 °C, foram adicionados 100 μ L de um determinado extrato vegetal. Os controles negativos e positivos foram o tampão Tris HCl 50 mM pH 7,5 e o peróxido de hidrogênio 10 mM, respectivamente. Os ensaios foram realizados na concentração de 5,0 mg/mL do extrato em tampão. Todas as amostras foram filtradas em membranas de 0,22 μ m. O monitoramento do crescimento das hifas foi feito por meio das leituras de absorbância a 620 nm, em intervalos de 12 horas, até um total de 72 horas, em leitora de microplacas (Biotrak II Plate Reader, Amersham Biosciences).

Os cálculos foram feitos a partir das médias de cada triplicata das absorbâncias de 48 horas menos a absorbância do início do experimento [0 horas] e o percentual de inibição do crescimento fúngico foi calculado de acordo com a fórmula a seguir:

$$\text{Inibição fúngica (\%)} = 100 - \left(\frac{\text{At} \times 100}{\text{Ac}} \right)$$

Onde, Ac: Absorbância do controle.

At: Absorbância do tratamento (extratos proteicos).

3.2.2.4 Análises estatísticas

Para a análise estatística dos dados, foram realizadas análises de variância simples (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, sendo utilizado o programa estatístico *GraphPad Prism 6*.

A partir do ensaio de inibição do crescimento vegetativo de hifas optou-se por dar seguimento ao estudo somente com as sementes de espécies endêmicas da Floresta Amazônica brasileira e que apresentaram resultado positivo na inibição de fungos fitopatogênicos. Uma tentativa de gerar conhecimento científico e apontar possível potencial biotecnológico de espécies intrínsecas daquela região tão ameaçada pelo desmatamento. Assim, oito espécies entre as cinquenta coletadas foram relacionadas. Destas, cinco apresentaram viabilidade de execução experimental e estão demonstradas na figura 4 com seu respectivo número de tombamento no herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia em Manaus (INPA).

Figura 4 – Espécies da família *Fabaceae* endêmicas da Floresta Amazônica Brasileira escolhidas para a continuação deste trabalho.



D. caudata
(21260)



D. parviflora
(189574)



S. longistipitata
(272795)



S. recurva
(251142)



Z. trunciflora
(198497)

Fonte: Elaborado pelo autor. Sementes de espécies da família *Fabaceae* com seu respectivo número de tombamento no herbário INPA.

3.2.3 Dosagem de proteínas

As proteínas solúveis dos extratos de sementes foram quantificadas pelo o método de Bradford (1976), onde foram adicionados 2,5 mL do reagente de Bradford a alíquotas de 100 μ L das amostras escolhidas para continuação do estudo (1 mg/mL). Passados 10 minutos, realizou-se as leituras das absorbâncias a 595 nm em espectrofotômetro (Ultrospec 1000 Amersham Pharmacia). Foi utilizada albumina sérica bovina como padrão na curva de calibração.

3.2.4 Análise do perfil proteico por SDS-PAGE

Os perfis proteicos dos extratos foram avaliados por eletroforese em gel de poli(acrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS), seguindo o método de Laemmli (1970) adaptado para o uso em placas de vidro. Utilizou-se o sistema descontínuo, com os géis de concentração e separação obtidos a partir de uma solução estoque de acrilamida 30 % (p/v), contendo N-N'-metilenobis-acrilamida 0,8% (p/v). A concentração final do gel de concentração foi igual a 5% p/v e foi preparado em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8. O gel de separação foi constituído a 12,5% em tampão Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8, sendo acrescentado em ambos os géis SDS para uma concentração final de 1%.

As amostras foram preparadas com objetivo de possibilitar uma boa resolução no gel. Assim, as proteínas totais das sementes foram ré-extraídas usando 2 mg de extrato total acrescido de 4 mg de PVPP (polivinilpolipirrolidona) e 80 µL de tampão piridina-SDS (piridina 50 mM, tiouréia 10 mM, SDS 1%, pH 5,0) (proporção de 1:2:40). A mistura ficou sob agitação por 2 h e 30 min a 4°C seguido de centrifugação a 10.000 x g por 40 min. Foram adicionados ao sobrenadante quatro volumes de acetona gelada contendo 10% de TCA (ácido tricloroacético) e a solução ficou *overnight* a -20 °C (DAMERVAL *et al.*, 1986). Em seguida, a amostra foi centrifugada a 10.000 x g por 30 min e o sobrenadante descartado. O precipitado contendo as proteínas totais foi lavado com 1 mL de acetona gelada 100% (3 vezes) e seco a temperatura ambiente.

As proteínas resultantes da extração foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,0625 M, contendo 1% de SDS e 10% v/v de glicerol. As condições de corrida foram iguais a 120 volts, 15 mA por gel, temperatura de 20 °C por aproximadamente 2 horas. Para a estimativa da massa molecular das proteínas, foram utilizados como marcadores de massa molecular: fosforilase B (97,0 kDa), albumina sérica bovina (66,0 kDa), ovalbumina (45,0 kDa), anidrase carbônica (30,0 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e alfa-lactalbumina (14,4 kDa).

As bandas proteicas puderam ser visualizadas após coloração dos géis com a solução de metanol, ácido acético e água destilada (4:1:5; v:v:v) além do corante Coomassie Brillhante Blue R-250 (PhastGel Blue R) e reveladas com uma solução contendo os mesmos componentes, exceto o corante.

3.2.5 Identificação de proteínas por MS/MS

3.2.5.1 Seleção e processamento dos spots

As bandas contendo as proteínas coradas com *Coomassie Brillante Blue* foram excisadas dos géis com auxílio de um bisturi e transferidas para tubos de polipropileno de 1,5 mL, onde foi realizada a digestão com tripsina, seguindo o método descrito por Hellman *et al.* (1995). A solução de bicarbonato de amônio 25 mM com acetonitrila (1:1) foi usada para descorar os *spots* que, posteriormente, foram desidratados com acetonitrila 100% por 5 minutos. Estes foram reidratados em banho de gelo, por 1 hora, com 15 µL de solução de bicarbonato de amônio 50 mM, contendo 0,2 µg de tripsina. A digestão foi realizada a 37 °C por 16 horas. Logo após, os peptídeos foram extraídos dos géis com uma solução de acetonitrila 50% e ácido trifluoracético (TFA) 5%, com auxílio de um sonicador, por 30 minutos e foram concentrados em Speed-Vac (JUNQUEIRA, 2005).

3.2.5.2 Espectrometria de massas

O material resultante da digestão tríptica (mistura de peptídeos) foi dissolvido em 2 µL de TFA 0,5%. Foi usado uma coluna de fase reversa nanoACQUITY HSS T3 C18 (75 µm x 200 mm) utilizando um gradiente de acetonitrila de 7% a 40%, contendo 0,1% de ácido fórmico, a partir de um fluxo de 500 nL/minuto para separar os peptídeos (PANIS *et al.*, 2013).

Com uso de um espectrômetro de massas *Synapt HDMS* (Waters, Manchester, UK) acoplado a um sistema NanoUPLC-ESI, foi possível adquirir os espectros de massa. O procedimento foi realizado através de ionização por *electrospray* no modo ESI (+) através da fonte *NanoLockSpray*. O canal de coleta do analito foi fechado a cada 30 segundos permitindo a passagem do íon de referência. O espectrômetro de massas foi calibrado com uma solução de GFP (320 fmol/mL) injetado através do *spray* de referência da fonte *NanoLockSpray*. Um ponto inicial (*Lteff*) foi calibrado com o íon duplamente carregado ($[M + 2H]^2+$), enquanto que a calibração final do instrumento foi adquirida com a fragmentação iônica de GFP em MS/MS.

3.2.5.3 Pesquisa em bancos de dados

O software ProteinLynx Global Server v. 2.4 (Waters) foi usado para processar os dados obtidos pelo ESI-QUAD-TOF. O processamento conteve a correção automática dos valores de m/z dos espectros MS e MS/MS de acordo com a massa do íon de referência do *lockspray*. Concomitantemente, os dados de MS e MS/MS foram submetidos ao programa de busca MASCOT (Matrix Science Ltd. – www.matrixscience.com). Com o objetivo de identificar as proteínas, as buscas foram realizadas utilizando banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information) restringido para Viridiplantae (Green Plants). Os critérios de busca foram baseados considerando como modificações fixas carboxymethyl (C) e como modificação variável a oxidação das metioninas. Na hidrólise por tripsina, foi considerada a possível perda de um sítio de clivagem e a tolerância das massas dos peptídeos e dos fragmentos foi de $\pm 0,05$ Da.

3.2.6 Ensaio enzimáticos

3.2.6.1. Zimograma para detecção de atividade proteolítica

Duas metodologias se complementaram para a realização deste ensaio. Primeiro, a eletroforese em gel de poliacrilamida foi desenvolvida seguindo o método de Laemili (1970) e a atividade proteolítica no gel foi realizada de acordo com Macedo *et al.* (2004) utilizando gelatina 0,1 % como substrato. Ao final da migração das de 40 μ g de proteínas no gel, este foi incubado em uma solução de Triton X-100 2,5 % por dois momentos de 20 minutos cada a 25 °C. Em seguida, o gel foi incubado em uma solução ativadora (tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 6,0, contendo DTT 2mM) por 14 horas a 37 °C. Depois o gel foi corado com uma solução de *Coomassie Brilliant Blue R-250*.

3.2.6.2 Determinação colorimétrica da atividade proteolítica

A atividade proteolítica total das amostras foi avaliada segundo a metodologia descrita por Xavier-Filho *et al.* (1989). Foi utilizado como substrato não específico para avaliação da atividade proteolítica total a Azocaseína. Esta proteína

quando degradada por proteases, libera o “azo”, um composto que funciona como cromóforo, sendo detectado por espectrofotômetro a um comprimento de onda 420-440 nm. A reação consistiu de 200 µL (2 mg/mL em acetato de sódio 50 mM, pH 6,0) das proteínas de cada espécie, 200 µL de azocaseína 1 % e o volume ajustado para 500 µL com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 6,0. Após 60 min a 37 °C, a reação foi interrompida pela adição de 300 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10 %. Os tubos foram centrifugados a uma rotação de 5.000 x g por 10 min a 25 °C e 400 µL do sobrenadante foram alcalinizados com 400 µL de uma solução de hidróxido de sódio 2 N. A absorbância foi medida por espectrofotômetro (Ultrospec 1000 Amersham Pharmacia) a 420 nm. Foi definida uma unidade de atividade como a quantidade de enzima capaz de aumentar a absorbância em 0,01. Os ensaios foram realizados em quadruplicata e os resultados expressos como a média das mensurações obtidas.

3.2.6.3 Atividade inibidora de proteases

A determinação de inibidores de proteases foi realizada de acordo com Gomes *et al.* (2005). No ensaio de inibição da tripsina foi usado BApNA (1,25 mM) como substrato específico em Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 e PMSF como inibidor. Neste ensaio, as proteínas foram previamente fervidas por 5 min, com o objetivo de eliminar a atividade proteolítica endógena. De acordo com a literatura, inibidores de proteases são resistentes a tratamentos térmicos desta natureza. O ensaio foi realizado através da incubação de diferentes concentrações do extrato total (50 e 100 µg) da espécie *Z. trunciflora* após aquecimento, atuando assim como possíveis inibidores de protease sérica. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados expressos como a média das mensurações obtidas.

3.2.6.4 Atividade quitinolítica

A determinação da atividade quitinolítica foi mensurada de acordo com o método colorimétrico relatado por Oliveira, Gondim e Vasconcelos (2010). Este ensaio consiste na liberação de N-acetil-D-glucosamina (NAG) a partir da ação hidrolítica das enzimas sobre a quitina coloidal. Assim, 1 mg/ mL de extrato protéico de cada espécie foi incubado com 250 µL de quitina coloidal (10 mg/mL) a 37 °C por 60 minutos. Logo após, a reação foi cessada com fervura por 5 minutos, seguido de resfriamento e

centrifugação a 15.000 x g, 25 °C, por 20 min. A seguir, 10 µL de uma solução de glucuronidase foram adicionados a 300 µL de cada sobrenadante e incubado a 37 °C por 60 minutos. Essa reação enzimática também foi interrompida através de fervura por 5 minutos. A determinação da quantidade de NAG liberada ocorreu acrescentando 190 µL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 6,5 e 100 µL de tetraborato de potássio 0,6 M aos 310 µL de hidrolisados. A mistura foi aquecida a 98 °C por 5 minutos. Depois de resfriado, foi adicionado 1 mL da solução de p-dimetilaminobenzaldeído (DMAB) e incubado a 37 °C por 20 minutos. Após resfriamento, as leituras das absorvâncias foram realizadas no comprimento de onda de 585 nm. A atividade quitinásica foi expressa em unidade (U), e 1 U foi definida como a quantidade de nmol de GlcNAc/mL/h a 37° C. O ensaio foi realizado em triplicata.

3.2.7 Purificação das proteínas

Os extratos totais das cinco amostras selecionadas para o estudo de prospecção foram submetidos a diferentes cromatografias acopladas ao sistema *Fast Performance Liquid Chromatography* (FPLC) utilizando o equipamento *ÅKTA pure 25 L* (GE Healthcare - USA).

3.2.7.1 Cromatografia de troca iônica em colunas Mono-S ou Mono-Q acopladas ao sistema FPLC

Nestas cromatografias de troca iônica em coluna Mono-S ou Mono-Q acopladas ao sistema de FPLC, equilibrou-se previamente ambas colunas com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0. O extrato total de cada espécie na concentração de 5 mg/ml em tampão de equilíbrio da coluna foi centrifugado a 20.000 x g, a 4 °C, por 20 minutos e filtrado em filtros de 0,22 µm (Millipore®). Para a eluição das proteínas retidas na matriz foi realizado um gradiente linear de 0 a 0,3 M de NaCl, durante 66 minutos, a um fluxo de 1 mL/min e o conteúdo proteico determinado em 280 nm. Os picos obtidos foram dialisados contra água destilada ou filtrados e lavados com 20 ml de H₂O ultrapura em filtro Vivaspin® 20; liofilizados e utilizados nos ensaios subsequentes. A pureza das frações foi verificada por SDS-PAGE e a identificação de proteínas por espectrometria de massas, conforme descrito nos itens 3.2.4 e 3.2.5, respectivamente.

3.2.7.2 Cromatografia de afinidade em coluna HiTrap-Benzamidina acoplada ao sistema FPLC

A cromatografia de afinidade em coluna HiTrap - Benzamidina acoplada ao sistema de FPLC foi realizada com equilíbrio prévio da coluna em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 contendo NaCl 0,5 M. O extrato total de cada espécie na concentração de 5 mg/ml em tampão de equilíbrio da coluna foi centrifugado a 20.000 x g, a 4 °C, por 20 minutos e filtrado em filtros de 0,22 µm (Millipore ®). As proteínas retidas na matriz foram eluídas com Glicina 50 mM, pH 3,0, durante 21 minutos, a um fluxo de 1 mL/minuto e o conteúdo proteico determinado em 280 nm. Os picos obtidos foram dialisados contra água destilada ou filtrados e lavados com 20 ml de H₂O ultrapura em filtro Vivaspin® 20; liofilizados ou concentrados e utilizados nos ensaios subsequentes. A pureza das frações foi verificada por SDS-PAGE e a identificação de proteínas por espectrometria de massas, conforme descrito nos itens 3.2.4 e 3.2.5, respectivamente.

3.2.8 Avaliação da Integridade da Membrana Celular

A permeabilização da membrana celular foi estimada pela absorção de iodeto de propídio (Regente *et al.*, 2014). Os esporos de *Fusarium oxysporum* (2×10^6 células/ mL em água) foram incubados na presença das proteínas ou controle negativo sem proteína. As amostras foram armazenadas durante 24 horas a 30 °C. As suspensões de células tratadas foram centrifugadas a 10 000 x g, durante 5 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi homogeneizado em 100 µL de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,5. O processo foi repetido por 3 vezes para lavar amostra residual e o meio de cultura. Após a terceira centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuscitado em 30 µL de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,5 e, adicionou-se 2 µL de iodeto de propídio para atingir a concentração final de 1 µM. A mistura foi incubada a 25 °C durante 30 minutos. A absorção de iodeto de propídio foi observada usando um sistema de medição de fluorescência (Microscopia do Sistema Olympus, comprimento de onda de excitação 400-500 nm, comprimento de onda de emissão 600-700 nm). Cada experimento foi realizado duas vezes, consistindo em duas repetições por tratamento.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Inibição do crescimento vegetativo de hifas

A análise dos resultados da atividade antifúngica identificou diferenças entre os extratos totais das sementes sobre os fungos fitopatogênicos estudados (*Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. sp.*, *Fusarium oxysporum*, *F. sp.*, *Penicillium chrysogenum* e *Phomopsis sp.*) (TABELAS 2, 3 e 4).

Com relação aos extratos totais provenientes da subfamília Mimosoideae (TABELA 3) (família *Fabaceae*), dois (*Z. cauliflora* e *Z. trunciflora*) apresentaram atividade antifúngica sobre todos os fitopatógenos estudados. Ambos inibiram acima de 50%, seis dos sete fungos testados. *Z. cauliflora* inibiu $94,5 \pm 0,6\%$ o crescimento de *Aspergillus sp.*, enquanto que *Z. trunciflora* inibiu $91,1 \pm 1,83\%$ o crescimento de *A. flavus* e $90,6 \pm 1,8\%$ de *Fusarium sp.* De acordo com Venturoso *et al.* (2011), que investigou atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fitopatógenos, considerou-se alta a atividade antifúngica quando igual ou superior a 50% de inibição do crescimento.

Entre as tribos de Mimosoideae testadas, as espécies de *Ingeae* foram as que apresentaram os extratos totais de sementes com as maiores percentagens de inibição, com exceção de *I. pezizifera* que variou de $11,3 \pm 3,3\%$ sobre *A. niger* e $24,5 \pm 6,0\%$ sobre *Phomopsis sp.* As espécies desta tribo foram as únicas entre as estudadas da subfamília Mimosoideae a apresentar atividade antifúngica para *Aspergillus sp.* e *F.oxysporum*, com exceção de *I. pezizifera* que não apresentou inibição do crescimento fúngico na concentração testada (5 mg/mL), *E. schomburgkii* e *Z. inaequalis* que não obtiveram resultados conclusivos. Os extratos de *A. peregrina* e *P. multijuga* não demonstraram inibição do crescimento fúngico sobre nenhum dos fungos testados.

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

Tribo	Espécie	Inibição do crescimento fúngico (%)						
		<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Penicillium chrysogenum</i>	<i>Phomopsis</i> sp.
Ingeae	<i>E. schomburgkii</i>	64.7±4.8aA	79.2±0.6aA	63.7±5.7aA	NC*	44.5±4.1aB	44.6±14.6aB	16.9±2.5aC
	<i>I. pezizifera</i>	-	11.3±3.3bA	-	-	16.5±5.3bA	-	24.5±6.0aB
	<i>M. spruceana</i>	79.3±2.4aA	NC*	83.9±3.7aA	34.5±5.9aB	67.0±3.4cC	NC*	33.0±1.7bB
	<i>Z. cauliflora</i>	80.7±1.96aA	79.7±2.0aAD	94.5±0.6bB	85.7±5.2bA	34.7±1.3aC	69.7±6.6bD	69.2±1.7cD
	<i>Z. inaequalis</i>	82.0±6.04aA	85.9±1.1aA	96.9±9.2bB	NC*	45.4±0.5aC	20.9±2.7cD	76.4±2.1cdA
	<i>Z. trunciflora</i>	91.1±1.83bA	87.9±2.3aA	68.9±16.2aBD	44.5±2.3ac	90.6±1.8dA	75.3±1.5bAD	85.3±1.9dA
Mimoseae	<i>A. peregrina</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>D. excelsa</i>	61.9±3.2a	22.6±0.6be	-	-	-	-	-
	<i>L. leucocephala</i>	18.9±7.6c	-	-	-	45.8±6.4a	-	-
	<i>S. guianensis</i>	47.7±5.3adA	53.7±10.7dA	-	-	20.6±8.8bB	21.6±0.1cB	59.9±2.3cA
Parkieae	<i>P. decussata</i>	50.9±7.3adA	27.4±1.15eBC	-	-	31±10.5abAC	-	-
	<i>P. gigantacarpa</i>	15.4±9.6c	-	-	-	42.5±3.86a	-	-
	<i>P. multijuga</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>P. nitida</i>	56.7±7.5adA	-	-	-	31.9±5.6abB	-	47.0±1.6cA
	<i>P. panurensis</i>	42.7±12dA	25.7±1.9beAC	-	-	37.1±4.0aA	15.6±1.1cBC	30.1±3.8bA
	<i>P. pendula</i>	18.7±2.5cA	85.1±1.6aB	-	-	61.6±4.1cC	20.4±1.5cA	22.7±7.0aA

*NC: Não conclusivo. -: Não apresentou inibição do crescimento fúngico na concentração testada (5 mg/mL). Os valores de médias seguidos pela mesma letra minúscula nas colunas e a mesma letra maiúscula nas linhas não diferem entre si, de acordo com teste de Tukey ($p > 0,05$).

Dos extratos totais provenientes da subfamília Faboideae (família Fabaceae) avaliados neste estudo (TABELA 4), duas espécies (*O. costulata* e *O. discolor*) inibiram 100% o crescimento do fungo *Fusarium* sp., ambas da tribo Sophoreae. Entre as tribos estudadas, Swartzieae apresentou o maior número de espécies com atividade antifúngica para seis dos sete fungos testados. *S. longistipitata* inibiu $64,7 \pm 4,9\%$ o crescimento de *A. flavus*, $60,0 \pm 2,1\%$ de *A. niger*, $51,1 \pm 2\%$ de *Fusarium* sp. e $22,5 \pm 1\%$ de *P. chrysogenum*, enquanto *S. polyphylla* inibiu $90,5 \pm 0,7\%$ *A. niger*, $60,9 \pm 13,8\%$ *Aspergillus* sp. e $60,4 \pm 2,2\%$ *Phomopsis* sp. *S. sericea* inibiu $78,8 \pm 2,5\%$ *A. flavus*, $87,0 \pm 3,3\%$ *A. niger*, $85,0 \pm 9,1\%$ *Aspergillus* sp. e $67,9 \pm 1,6\%$ *Phomopsis* sp. Estes resultados corroboram com a literatura. Bariani et al. (2012) relatou a diminuição da esporulação de fungos testados contra o extrato total de sementes de *S. polyphylla*, uma espécie da subfamília Faboideae. Além disso, existem vários trabalhos que relatam a atividade antifúngica de extratos oriundos de plantas contra diversos fungos, como *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sac. (CELOTO et al., 2008), *Didymella bryoniae* (Auersw.) Rehm (FIORI et al., 2000), *Fusarium moniliforme* Sheldon (OWOLADE; AMUSA; OSIKANLU, 2000), *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *C. kikuchii*, *Colletotrichum* sp., *F. solani*, *Phomopsis* sp. (VENTUROSOSO et al., 2011), *Glomerella cingulata* (Ston.) Spauld & Schrenk, *C. gloeosporioides* (ROZWALKA et al., 2008) e *A. flavus* (BILGRAMI; SINHA, K.; SINHA, A.; 1992).

Neste trabalho, nenhum dos 19 extratos da subfamília Faboideae foi capaz de inibir o crescimento do fungo *Fusarium oxysporum*, na concentração testada (5 mg/mL). Três extratos (*D. spruceana*, *D. bicolore* e *O. grossa*) não apresentaram atividade antifúngica sobre nenhum dos sete fungos avaliados. *A. nitens*, *M. urens* e *O. smithii* inibiram o crescimento de um fungo fitopatogênico cada. Este resultado só reforça a especificidade de cada extrato.

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

Tribo	Espécie	Inibição do crescimento fúngico (%)						
		<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Penicillium chrysogenum</i>	<i>Phomopsis</i> sp.
<i>Dalbergieae</i>	<i>A. nitens</i>	-	40,6±3,5a	-	-	-	-	-
	<i>D. spruceana</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Phaseoleae</i>	<i>C. brasiliensis</i>	37,7±7,6aA	82,7±2,7bB	-	-	45,2±2,2aA	-	26,9±0,7aAC
	<i>C. triquetrum</i>	52,7±5,6aA	17,9±9,8cB	-	-	22,4±6,7bB	-	-
	<i>D. bicolor</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>M. urens</i>	-	-	-	-	77,6±1,3c	-	-
<i>Sophoreae</i>	<i>O. costulata</i>	-	-	-	-	100d	-	33,5±6,1a
	<i>O. discolor</i>	49,1±2,5aA	-	-	-	100dB	9,0±3,3Ac	38,3±3,8aD
	<i>O. grossa</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>O. lignivalvis</i>	24,3±10,0aA	-	-	-	79,7±2,3cB	64,6±1,1bC	26,7±2,4aA
	<i>O. macrocalyx</i>	-	27,5±2,6aA	-	-	14,8±2,9bB	52,9±5,6cC	-
	<i>O. paraensis</i>	-	-	-	-	17,2±3,6b	-	-
	<i>O. smithii</i>	-	-	-	-	11,3±6,0b	-	-
<i>Swartzieae</i>	<i>S. ingifolia</i>	-	-	-	-	45,0±4,5aA	44,9±10,3cA	28,3±9,0aA
	<i>S. longistipitata</i>	64,7±4,9bA	60,0±2,1dA	-	-	51,1±2,8aB	22,5±1,1dC	-
	<i>S. pendula</i>	61,3±4,9bA	17,5±5,6cB	-	-	26,0±4,4bB	21,8±0,8dB	52,9±9,4bA
	<i>S. polyphylla</i>	59,5±8,8bA	90,5±0,7bB	60,9±13,8A	-	49,3±4,7aA	21,7±2,5dC	60,4±2,2bA
	<i>S. recurva</i>	-	17,2±5,4cA	-	-	50,7±5,1aB	22,2±0,6dA	56,4±4,9bB
	<i>S. sericea</i>	78,8±2,5cA	87,0±3,3bA	85,0±9,1A	-	52,5±1,4aB	22,2±0,5dC	67,9±1,6bD

- : Não apresentou inibição do crescimento fúngico na concentração testada (5 mg/mL). Os valores de médias seguidos pela mesma letra minúscula nas colunas e a mesma letra maiúscula nas linhas não diferem entre si, de acordo com teste de Tukey ($p > 0,05$).

No geral, os extratos totais provenientes da subfamília Caesalpinioideae (família *Fabaceae*) apresentaram uma menor eficiência antifúngica em relação aos das subfamílias Mimosoideae e Faboideae, quando testados contra os mesmos fungos no estudo (TABELA 5). O extrato total de *C. ferrea* inibiu $54,7 \pm 5,7\%$ o crescimento de *A. flavus*, enquanto *D. caudata* inibiu $59,7 \pm 4,2\%$, ambas as espécies da tribo Caesalpinieae. Os extratos totais de *C. leiandra* e *S. tapajonensis* inibiram em $68,1 \pm 1,0\%$ e $53,4 \pm 5,5\%$ o crescimento fúngico de *A. flavus*, respectivamente. *P. catingae* foi a espécie da subfamília Caesalpinioideae, cujo extrato total das sementes obteve a maior percentagem de inibição do crescimento para um dos sete fungos testados: $70,1 \pm 2,8\%$ de inibição sobre *Phomopsis* sp. Ainda da tribo *Detarieae*, o extrato total de *P. paniculata* inibiu $61,3 \pm 9,9\%$ de *Fusarium* sp. e o de *P. venosa* $60,9 \pm 5,4\%$ sobre *Phomopsis* sp. Os extratos totais de *C. grandis*, *D. guianense* e *D. paraenses*, na concentração de 5 mg/mL, não foram capazes de inibir o crescimento de nenhum dos fungos testados.

De todos os extratos avaliadas no estudo somente os oriundos de espécies pertencentes a tribo *Ingeae* da subfamília mimosoideae foram capazes de inibir o crescimento de hifas do fungo *F. oxysporum*. Goma e colaboradores (2016) também trabalhando com extratos totais de sementes, verificaram alto grau de atividade antifúngica de alguns extratos vegetais sobre este fungo e sugeriu que essa capacidade se devia a presença de alguns compostos fitoquímicos nesses extratos. Também Bobbarala *et al.* (2009) demonstrou atividade direta de extratos vegetais contra o fungo fitopatogênico *Aspergillus niger*. No seu estudo de 49 extratos testados, 43 demonstraram atividade antifúngica. Interessante observar a forma específica como cada fungo reagiu aos diferentes extratos totais, evidenciando uma especificidade entre as partes, uma vez que as plantas apresentam seletividade contra fungos patogênicos (PAUW; ELOFF, 2014).

Tabela 5: Atividade antifúngica de extratos proteicos de sementes de espécies da subfamília Caesalpinioideae, família *Fabaceae*, contra diferentes fungos fitopatogênicos.

Tribo	Espécie	Inibição do crescimento fúngico (%)						
		<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Penicillium chrysogenum</i>	<i>Phomopsis</i> sp.
Caesalpinieae	<i>C. ferrea</i>	54,7±5,7ac	-	-	-	-	-	-
	<i>D. caudata</i>	59,7±4,2a	-	-	-	-	-	-
	<i>D. parviflora</i>	37,2±5,5bA	25,3±1,6Ab	-	-	-	-	25,8±4,7aB
Cassieae	<i>C. leiandra</i>	68,1±1,0bc	NC*	-	-	-	NC*	-
	<i>C. grandis</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>D. guianense</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>D. paraenses</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>S. tapajonensis</i>	53,4±5,5bcA	NC*	-	-	40,2±6,4aB	NC*	36,6±2,8bB
Detarieae	<i>C. venezuelana</i>	10,5±0,6d	-	-	-	-	-	-
	<i>C. oblonga</i>	-	17,8±3,3b	-	-	-	-	-
	<i>C. bauhiniifolia</i>	22,1±4,1d	-	-	-	-	-	11,0±2,4c
	<i>H. courbaril</i>	-	-	-	-	24,8±6,3ab	-	-
	<i>P. catinae</i>	-	10,2±2,8cA	14,1±1,8a	-	52,9±8,1aB	20,0±2,5aC	70,1±2,8dB
	<i>P. paniculata</i>	-	-	-	-	61,3±9,9cA	17,8±2,2aB	42,7±3,6bC
	<i>P. venosa</i>	-	-	-	-	-	23,7±1,2 ^a	60,9±5,4d

*NC: Não conclusivo. -: Não apresentou inibição do crescimento fúngico na concentração testada (5mg/mL). Os valores de médias seguidos pela mesma letra minúscula nas colunas e a mesma letra maiúscula nas linhas não diferem entre si, de acordo com teste de Tukey ($p > 0,05$).

4.2 Dosagem de proteínas

Através da quantificação pelo método de Bradford (1976) foram obtidas as concentrações das proteínas solúveis, calculadas a partir das médias das triplicatas de absorbâncias de cada extrato total, das amostras escolhidas para continuação do estudo. As concentrações variaram de 0,04 para 0,41 mg/mL (TABELA 6). Esse resultado está em acordo com Bariani *et. al.*, (2012) que trabalhando com espécies de *Fabaceae* da Amazônia (*Swartzia polyphylla* e *Caesalpinia férrea*) obteve concentrações semelhantes para amostras extraídas com o mesmo protocolo.

Tabela 6 - Dosagem de proteínas solúveis dos extratos totais

Espécies	Concentração de Proteína (mg/mL)
<i>Dimorphandra caudata</i>	0,48
<i>Dimorphandra parviflora</i>	0,08
<i>Swartzia longistipitata</i>	0,11
<i>Swartzia recurva</i>	0,29
<i>Zygia trunciflora</i>	0,74

Fonte: o autor.

4.3 Perfil proteico por SDS-PAGE dos extratos totais

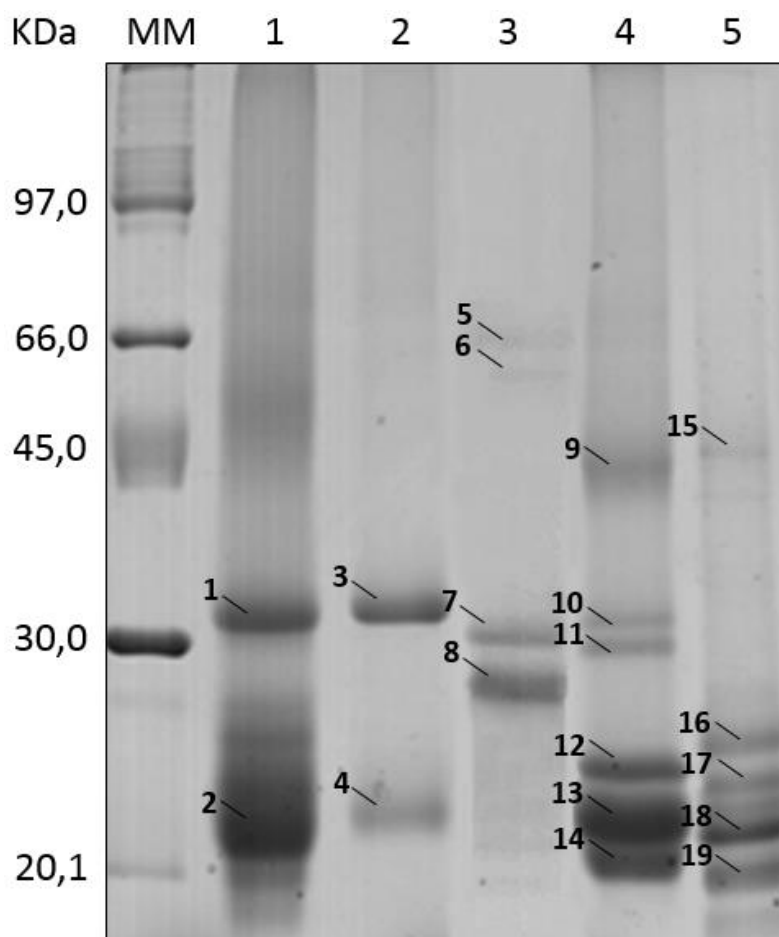
O perfil proteico das amostras escolhidas para o prosseguimento do estudo foi verificado por SDS-PAGE, no qual se verificou a presença de bandas íntegras e bem definidas, mostrando que a extração de proteínas das sementes foi eficiente (FIGURA 5). As bandas mais intensas têm massas moleculares aparentemente de 20 a 45 kDa. O número de bandas proteicas foi distinto entre as espécies.

O resultado evidenciou a presença de proteínas na amostra *D. caudata*, com uma banda definida entre 30,0 e 45,0 kDa e um aglomerado de proteínas entre 20,1 e 30,0 kDa. Este resultado está de acordo com o demonstrado por Fernandes *et al.* (2011). Em *D. parviflora*, uma banda definida foi demonstrada próximo a 30,0 kDa, além desta, uma segunda entre 20,1 e 30,0 kDa. Já *S. longistipitata* mostrou quatro bandas: duas muito evidentes entre 45,0 e 66,0 kDa e duas entre 20,1 e 30,0 kDa (FIGURA 4), este último dado confirma o perfil de proteínas de sementes desta espécie no estudo de Fernandes (2011).

O extrato de *S. recurva* exibiu seis bandas definidas: uma aparentemente com 45,0 kDa, duas próximas de 30,0 kDa e três entre 20,1 e 30,0 kDa. Em *Z. trunciflora* verificou-se seis bandas: duas entre 30,0 e 45,0 kDa e quatro entre 20,1 e 30,0 kDa (FIGURA 4).

Este resultado sugere que estas últimas bandas possam ser inibidores de proteases, uma que vez a literatura descreve inibidores de serino proteases do tipo Kunitz e Bowman-Birk com massas moleculares próximo a 25 kDa (CARLINI; GROSSI-DE-SÁ, 2002; PARK *et al.*, 2004).

Figura 5 - SDS-PAGE (12,5%) dos extratos proteicos de sementes de *Fabaceae* da Floresta Amazônica brasileira.



Fonte: Elaborada pelo autor. As proteínas foram visualizadas por coloração com 0,1% de Coomassie Brilliant Blue R-250. MM: peso molecular. 1, 2, 3, 4 e 5 representam *D. caudata*, *D. parviflora*, *S. longistipitata*, *S. recurva* e *Z. trunciflora*, respectivamente. Foram aplicados 40 µg do extrato de proteína a cada poço. Todos os spots foram retirados, tratados e digeridos com tripsina para posterior identificação por espectrometria de massas.

4.4 Identificação de proteínas por espectrometria de massas

Dos dezenove *spots* excisados a partir de SDS-PAGE das cinco espécies em estudo, 17 geraram espectros de massas. Através da ferramenta online MASCOT foram identificadas 26 proteínas, sendo a maioria considerada predita ou hipotética. Assim como a distribuição dos *spots* no gel de eletroforese, o número de proteínas identificadas entre os extratos foi bem distinto (TABELA 7). A quantidade de proteínas identificadas para cada espécie foi pequena considerando tratar-se de extrato total. Contudo, Johnson *et al.* (2005) explica que a identificação de proteínas por espectrometria de massas geralmente apresenta números baixos (5 a 50 %) para espécies em que o genoma não é descrito, mesmo com espectro de boa qualidade, o que justifica os resultados obtidos.

Entre as proteínas identificadas a maioria foi de famílias de proteínas relacionadas à patogênese. Uma ou outra família de quitinase foi observada em todos os extratos. À guisa de exemplo, endoquitinases foram identificadas em todos os extratos estudados. Estas proteínas representam a maioria das quitinases vegetais, sendo responsáveis pela hidrólise aleatória de ligações β -1,4 de GlcNAc em sítios internos da quitina (CHERNIN *et al.*, 1998; SAHAI; MANOCHA, 1993). Quitinases de classe III (normalmente básicas) foram observadas nos extratos das sementes de *D. caudata*, *D. parviflora* e *S. recurva*, enquanto quitinases ácidas pertencentes às classes Ia e II foram identificadas em *S. longistipitata* e *Z. trunciflora*. Esses achados corroboram com a literatura. Segundo Dahiya *et al.* (2006) a maioria das plantas expressa quitinases constitutivamente. De acordo com Silva *et al.* (2017) as quitinases de sementes são proteínas importantes no processo de defesa contra patógenos, inclusive na casca da semente.

Outra família de PR proteína identificada nos extratos totais das sementes foi a de inibidor de protease, como verificado nas espécies *Z. trunciflora* e *S. longistipitata*. Lectinas foram observadas nos extratos de *S. longistipitata* e *D. parviflora*.

Tabela 7 - Identificação de proteínas a partir dos “spots” do SDS-PAGE por espectrometria de massa ESI-Q-TOF

Espécie	Spot	Teórico MM	Teórico pI	Escore proteico	Sequência dos peptídeos identificados	ID (NCBI)	Descrição e origem das proteínas identificadas
<i>D. caudata</i>	1	46181	5.03	171	K.KSSNYGGVMLWSR.Y	gi 950968238	PREDITA: semelhante a subunidade ácida de endoquitinase [<i>Vigna radiata</i> var. <i>radiata</i>]
		31956	8.05	109	K.DSSKYGGVMLWSR.Y	gi 357487419	Quitinase [<i>Medicago truncatula</i>]
		33777	5.49	109	K.YGGVMLWSR.A K.QASKYGGVMLWSR.A	gi 586715476	PREDITA: Subunidade ácida de endoquitinase [<i>Amborella trichopoda</i>]
	2	46181	5.03	86	K.SSNYGGVMLWSR.Y	gi 950968238	PREDITA: semelhante a subunidade ácida de endoquitinase [<i>Vigna radiata</i> var. <i>radiata</i>]
<i>D. parviflora</i>	3	29803	8.87	73	R.SFGGFGTTGDSNTR.K	gi 920702021	Proteína hipotética [<i>Vigna angularis</i>]
		32535	6.33	72	K.IAVVTGGDSGIGR.A	gi 23194375	Provável fator protéico TAG [<i>Lupinus angustifolius</i>]
		32422	9.04	71	K.YGGVMLWSR.F	gi 871764	Subunidade básica de quitinase classe 3 [<i>Vigna unguiculata</i>]
		31912	6.54	57	K.VALVTGGDSGIGR.A	gi 7431022	Homóloga de glucose e ribitol desidrogenase de cevada [<i>Hordeum vulgare</i>]
		39249	9.04	57	K.VAIVTGGDSGIGR.A	gi 46391111	Provável oxidoreductase dependente de NAD/NADP [<i>Oryza sativa Japonica Group</i>]
	4	14653	5.73	79	K.AFDDGAFTGIR.E	gi 126111	Cadeia alfa de aglutinina; cadeia alfa de jacalina
<i>S. longistipitata</i>	5	26571	5.37	155	R.VLYSAPVHLWDSSR.L R.VGISGATGQEVAIHDR.S	ARJ33356.1	Cadeia parcial da lectina A [<i>Swartzia simplex</i> var. <i>grandiflora</i>]
	6	Não ionizado					
	7	19705	8.50	71	K.ASAKYGGVMLWDR.Y	gi 590721619	Provável quitinase A [<i>Theobroma cacao</i>]
		33559	7.14	67	K.KDNYGGVMLWDR.Y	gi 66766322	Inibidor de xilanase XIP-III [<i>Triticum aestivum</i>]
8	26571	5.31	82	R.VLYSAPVHLWDSSR.L	ARJ33356.1	Cadeia parcial de lectina A [<i>Swartzia simplex</i> var. <i>grandiflora</i>]	

Tabela 7 - Identificação de proteínas a partir dos “spots’ do SDS-PAGE por espectrometria de massa ESI-Q-TOF (continuação).

Espécie	Spot	Teórico	Escore proteico	Sequência dos peptídeos identificados	ID (NCBI)	Descrição e origem das proteínas identificadas	
<i>S. recurva</i>	9	36632	4.84	90	K.QASNYGGVMLWDR.Y	O48642	Cadeia ácida da endoquitinase classe III (<i>Glycine max</i>)
	10	Não ionizado					
	11	33130	5.62	91	K.IAVVTGGDSGIGR.A	KHN04002.1	Semelhante a glucose e ribitol desidrogenase 1 [<i>Glycine soja</i>]
		61549	6.33	62	R.FDGVNIENK.E	gi 604346784	Proteína hipotética MIMGU_mgv1a004395mg [<i>Erythranthe guttata</i>]
		30327	4.56	60	K.ALKDG VIR.C	gi 674886847	BnaC04g22750D [<i>Brassica napus</i>]
	12	11209	9.43	58	R.ALQDRLR.K	gi 595946307	Proteína hipotética PRUPE [<i>Prunus persica</i>]
		46311	9.00	58	R.ALQDRIR.L	gi 901796833	Proteína hipotética ZOSMA [<i>Zostera marina</i>]
	13	16812	4.73	79	K.AVEAIQSVETVEGDGGPGTIK.K	XP_019456193.1	PREDITA: proteína induzida por estresse tipo SAM22 [<i>Lupinus angustifolius</i>]
		48265	9.25	55	K.ISDDKDR.G	gi 302840148	Proteína CENPE tipo cinesina [<i>Volvox carteri f. nagariensis</i>]
	14	105934	5.90	54	K.ASIEGDESDIVLK.Q	gi 674936746	BnaA08g23240D [<i>Brassica napus</i>]
		38640	8.42	53	R.RGVSENGANR.M	gi 308801395	Glioxilase [<i>Ostreococcus tauri</i>]

Tabela 7 - Identificação de proteínas a partir dos “spots’ do SDS-PAGE por espectrometria de massa ESI-Q-TOF (continuação).

Espécie	Spot	Teórico	Escore proteico	Sequência dos peptídeos identificados	ID (NCBI)	Descrição e origem das proteínas identificadas			
<i>Z. trunciflora</i>	15	19738	8.01	97	-.EVVVDSGDGEMLR.N	gi 381413021	Sequencia parcial, inibidor de tripsina Kunitz [<i>Inga laurina</i>]		
		34574	7.40	71	K.AYPAFGTTGDDATR.K	gi 30844172	Quitinase [<i>Euonymus europaeus</i>]		
		28269	8.75	71	R.SFPAFGTTGDDATR.K	gi 425886502	Quitinase classe II [<i>Acacia koa</i>]		
		35583	5.91	58	R.GPIQLSWNYNYGPAGR.A	gi 425886498	Quitinase classe Ia [<i>Acacia koa</i>]		
		35927	7.79	489	R.AIGVDLLNPNPDLVATDPVISFK.T K.TALWFWMTQSPKPSCHDVTGR.W R.LSGYGTVTNIINGGLECGR.G	gi 1800141	Quitinase classe I [<i>Medicago sativa</i>]		
		19738	8.01	134	R.HGDHLCSLAVVSAR.Y -.EVVVDSGDGEMLR.N	gi 381413021	Sequencia parcial, inibidor de tripsina Kunitz [<i>Inga laurina</i>]		
		16	27541	5.58	80	K.ELAGQPDVDGFLVGGASLKPEFVDIIK.S	gi 729401952	PREDITA: semelhante a triosefosfato isomerase citosólica [<i>Tarenaya hassleriana</i>]	
			28269	8.75	76	R.SFPAFGTTGDDATR.K	gi 425886502	Quitinase classe II [<i>Acacia koa</i>]	
			51414	6.15	60	K.GVADLLSR.Y	gi 922355872	Provável bística [<i>Medicago truncatula</i>]	
			57856	8.90	57	R.IDAYQDTLYAHSNR.Q	gi 470114123	PREDITA: pectinesterase [<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>]	
			36316	6.30	56	R.GPIMLSWNYNYGPAGR.A	gi 507961	Quitinase [<i>Hordeum vulgare</i>]	
			19738	8.01	196	R.HGDHLCSLAVVSAR.Y -.EVVVDSGDGEMLR.N R.SLGEAVMLGDK.Q	gi 381413021	Sequencia parcial, inibidor de tripsina Kunitz [<i>Inga laurina</i>]	
			17	28269	8.75	76	R.SFPAFGTTGDDATR.K	gi 425886502	Quitinase classe II [<i>Acacia koa</i>]
			37118	8.05	58	R.LPGYGVITNIINGGLECGR.G	gi 227774	Cadeia básica da quitinase	

Tabela 7 - Identificação de proteínas a partir dos “spots’ do SDS-PAGE por espectrometria de massa ESI-Q-TOF (continuação).

Espécie	Spot	Teórico	Escore proteico	Sequência dos peptídeos identificados	ID (NCBI)	Descrição e origem das proteínas identificadas	
<i>Z. trunciflora</i>	18	3277	8.26	130	-.ANFEIVNNCPYTVWAAASPGGGR.R	gi 68064400	Proteína semelhante a taumatina
		19738	8.01	100	-.EVVVDSGDGEMLR.N	gi 381413021	Sequencia parcial, inibidor de tripsina Kunitz [<i>Inga laurina</i>]
		10874	9.40	50	K.FTVAELIQGGTWLK.S	gi 88659668	Sequencia parcial pectin metilesterase [<i>Eucalyptus globulus subsp. globulus</i>]
	19	19738	8.01	267	R.HGDHLCSLAVVSAR.Y -.EVVVDSGDGEMLR.N R.SLGEAVMLGDK.Q -.EVVVDSGDGEMLRNGGK.Y	gi 381413021	Sequencia parcial, inibidor de tripsina Kunitz [<i>Inga laurina</i>]
		35639	8.82	63	K.GFYTYDAFIKAAK.A	gi 3126965	Cadeia básica da quitinase [<i>Elaeagnus umbellata</i>]

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.5 Ensaio enzimáticos

A atividade proteolítica de cada um dos cinco extratos totais contra o substrato inespecífico azocaseína apresentou resultados distintos entre as espécies, variando de 0,01 unidade de atividade (UA) em *Z. trunciflora* para 0,40 em *S. longistipitata* (TABELA 8). Através de zimograma foi verificado, nos extratos de *S. longistipitata* e *D. caudata*, proeminente proteólise enquanto nos demais, se comparado a esses, fracamente ou não detectado. (FIGURA 6). Os dois ensaios para medição de proteólise, reproduziram dados quantitativos e qualitativos, confirmando-se mutuamente.

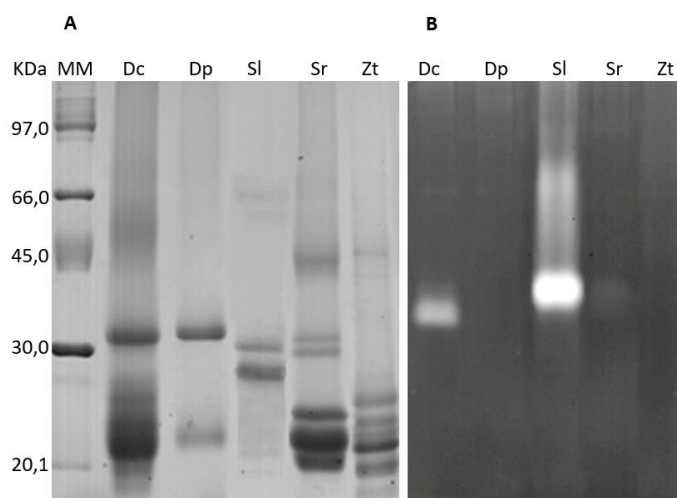
Tabela 8 - Atividade proteolítica dos extratos proteicos

Espécie	UA	(UA/mg)
	pH 6,5	pH 6,5
<i>D. caudata</i>	0,16 ± 0,01	155,62 ± 16,3
<i>D. parviflora</i>	0,23 ± 0,03	225,69 ± 37,2
<i>S. longistipitata</i>	0,40 ± 0,10	402,90 ± 105,2
<i>S. recurva</i>	0,04 ± 0,02	35,80 ± 23,0
<i>Z. trunciflora</i>	0,01 ± 0,00	7,80 ± 6,8

Fonte: Elaborada pelo autor. Atividade proteolítica dos extratos proteicos em pH 6,5, utilizando 1% de azocaseína como substrato a 37 °C. Os valores representam a média de três repetições independentes e o desvio padrão da média.

UA: unidade de atividade.

Figura 6 - SDS-PAGE e Zimograma para atividade proteolítica dos extratos proteicos



Fonte: Elaborada pelo autor. (A) SDS-PAGE (12,5%) dos extractos de proteínas. Adicionou-se 40 µg de proteína em cada poço. (B) Zimograma contendo 0,1% de gelatina para detecção de peptidases nos extractos de proteínas. O gel foi incubado durante a noite a 37 ° C em tampão de fosfato de sódio 50 mM, pH 6,5 contendo DTT 3 mM. MM: peso molecular; *D. caudata*, *D. parviflora*, *S. longistipitata*, *S. recurva* e *Z. trunciflora*, respectivamente 1, 2, 3, 4 e 5. Adicionou-se 10 µg de proteína em cada poço.

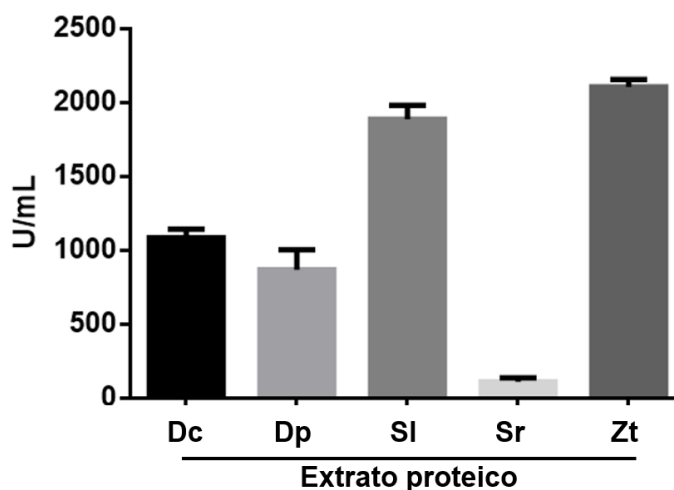
Como verificado no primeiro ensaio, a desigualdade de proteólise entre os extratos foi bem diversificada, assim também os perfis proteicos no segundo ensaio, notavelmente distintos em massa molecular e intensidade. Essas diferenças provavelmente sejam resultado de diversos números de genes de proteases e processamento de proteínas nas diferentes espécies (LU *et al.*, 2015).

Os extratos de *D. caudata* e *S. longistipitata* apresentaram satisfatório e abundante proteólise, respectivamente, no zimograma evidenciando a presença de proteases. Considerando o resultado da atividade proteolítica em solução é possível admitir que os demais extratos apresentassem tais proteínas, ainda que em menor quantidade. Como demonstrado por Lu *et al.* (2015) estas proteínas são fundamentais durante a germinação de sementes, pois podem realizar a degradação de proteínas armazenadas, liberando produtos para construção de outras.

A atividade quitinolítica foi verificada positivamente em quatro dos cinco extratos testados (FIGURA 7). As proteínas de *S. longistipitata* e *Z. trunciflora* processaram fortemente a quitina seguidas pelas de *D. caudata* e *D. parviflora* que proporcionaram uma menor liberação de GlcNAc em relação as duas primeiras. O

extrato das sementes de *S. recurva* apresentou um resultado muito inferior ao das outras espécies no ensaio.

Figura 7 - Atividade quitinolítica dos extratos proteicos



Fonte: Elaborada pelo autor. A atividade quitinásica foi expressa em (U) e, 1 U foi definido como uma quantidade de GlcNAc/mL/h liberada em 1 nmol de enzima a 37 ° C. Dc, Dp, Sl, Sr e Zt representam *D. caudata*, *D. parviflora*, *S. longistipitata*, *S. recurva* e *Z. trunciflora*.

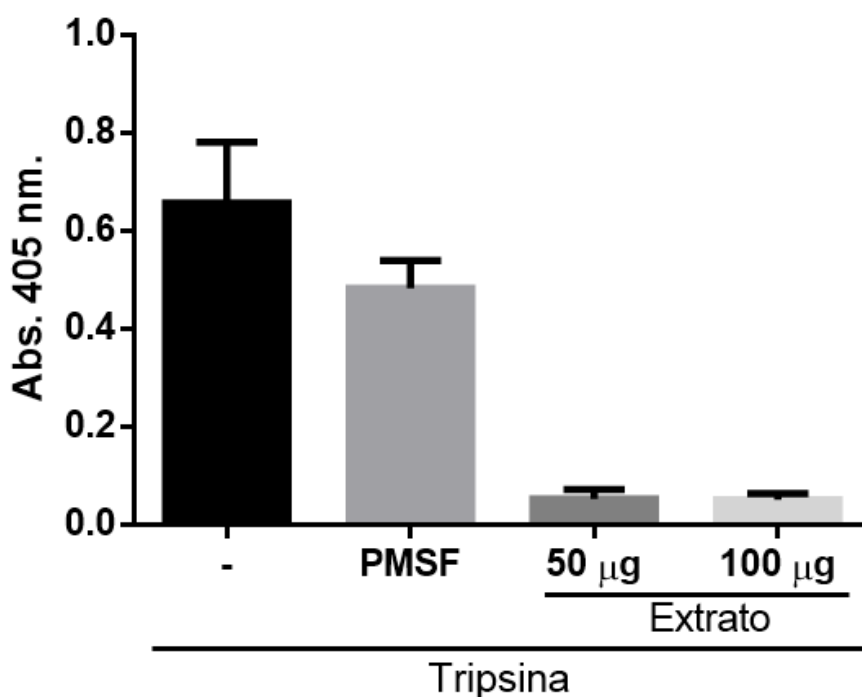
As atividades elevadas nos ensaios proteolítico e quitinolítico do extrato total de *S. longistipitata* corroboram sua atividade mais forte em relação a inibição do crescimento das hifas de espécies de *Aspergillus* em comparação com *S. recurva* que não apresentou proteólise e demonstrou pouca atividade quitinolítica. A combinação de atividades quitinolíticas e proteolíticas também pode explicar a inibição mais forte sobre *Aspergillus* por *D. caudata*, comparado com *D. parviflora*. Embora *D. parviflora* tenha inibido um maior número de fungos, o fez em menor percentagem de inibição do crescimento das hifas (TABELA 5). Este conjunto de dados indicou que as sementes foram fontes de quitinases, proteínas de defesa bem conhecidas nas plantas, mas provavelmente estas não obrigatoriamente foram responsáveis por todo o resultado de inibição do crescimento fúngico. De acordo com Brurberg; Nes e Eijsink (1996) um grande sistema quitinolítico não reflete necessariamente um bom potencial de degradação da quitina.

Esse resultado, portanto, reforça a possível estratégia das plantas de combinar proteínas de defesa para potencializar o ataque a patógenos, ação semelhante ocorre em fungos no sinergismo de proteases. Esse duelo entre plantas e fungos resultou na diversificação e adaptação que molda os estilos de vida dos

patógenos. A combinação de quitinases com outras PR - proteínas aumentando a resistência a fungos tem sido bem relatada na literatura (AMIAN *et al.*, 2011; JASHNI *et al.*, 2015; SRIDEVI *et al.*, 2008).

Entre todos os extratos das cinco espécies estudadas, o de *Z. trunciflora* foi o mais eficiente na inibição do crescimento de hifas dos sete fungos fitopatogênicos testados (TABELA 3). Sem apresentar proteólise, mas com forte atividade quitinolítica, o extrato foi testado também quanto sua capacidade de inibir proteases (FIGURA 8) uma vez que estas PR proteínas foram identificadas no extrato total através de MS/MS (TABELA 7).

Figura 8 – Inibição da atividade proteolítica do tipo serínica



Fonte: autor. A atividade inibidora de tripsina, do extrato total de *Z. trunciflora*, foi testada utilizando BApNA como substrato em Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 e PMSF como inibidor. Concentrações diferentes (50 e 100 µg) do extrato foram fervidas e avaliadas. O ensaio foi realizado em triplicata.

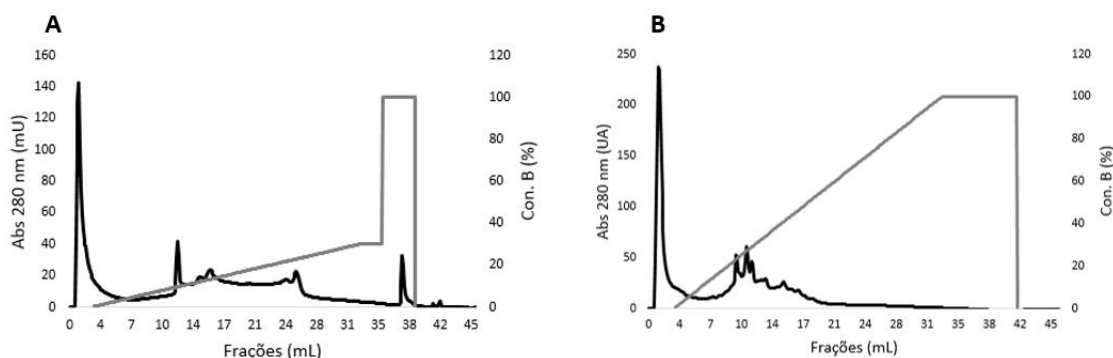
É possível que a ação de inibidores de proteases somada a de quitinases, no extrato de *Z. trunciflora*, tenha proporcionado a maior inibição do crescimento de hifas observada no ensaio (TABELA 3). A secreção de proteases e a contrapartida de inibidores de proteases é uma tática co-evolucionária entre plantas e fungos na natureza. Essa batalha desempenha um importante papel na susceptibilidade desencadeada por efector em fungos e imunidade desencadeada por efector nas plantas (JASHNI *et al.*, 2015; MÜLLER *et al.*, 2017; VAN DER HOORN, 2008).

Inibidores de tripsina já foram detectados em sementes de leguminosas arbóreas da Amazônia como *Tachigali plumbea*, *Sesbania exasperata*, *Ormosia costulata* var. *trifoliolata*, *Parkia pendula*, *P. discolor*, *P. multijuga* e *P. nitida* (CHEVREUIL *et al.*, 2009, 2014), *Caesalpinia ferrea* e *Swartzia polyphylla* (BARIANI *et al.*, 2012). Outros estudos demonstraram a presença de inibidores de tripsina e quimiotripsina em extratos de sementes de *Cassia brasselari*, *C. occidentalis*, *Dialium guianensis*, *Inga rubiginosa*, *I. umbratica*, *I. velutina* e *Mimosa guilandinae*, já *I. fagifolia* e *Cassia grandis* apenas inibidores de tripsina (CALDERON *et al.*, 2001).

4.6 Purificação das proteínas

Os extratos totais das cinco espécies endêmicas da Floresta Amazônica brasileira foram fracionados por cromatografia de troca iônica ou afinidade. As estratégias de purificar as proteínas dos extratos de *S. recurva* e *Z. trunciflora* não foram eficientes em nenhuma das alternativas (FIGURA 9).

Figura 9 - Cromatografia de troca iônica dos extratos proteicos de *S. recurva* e *Z. trunciflora*

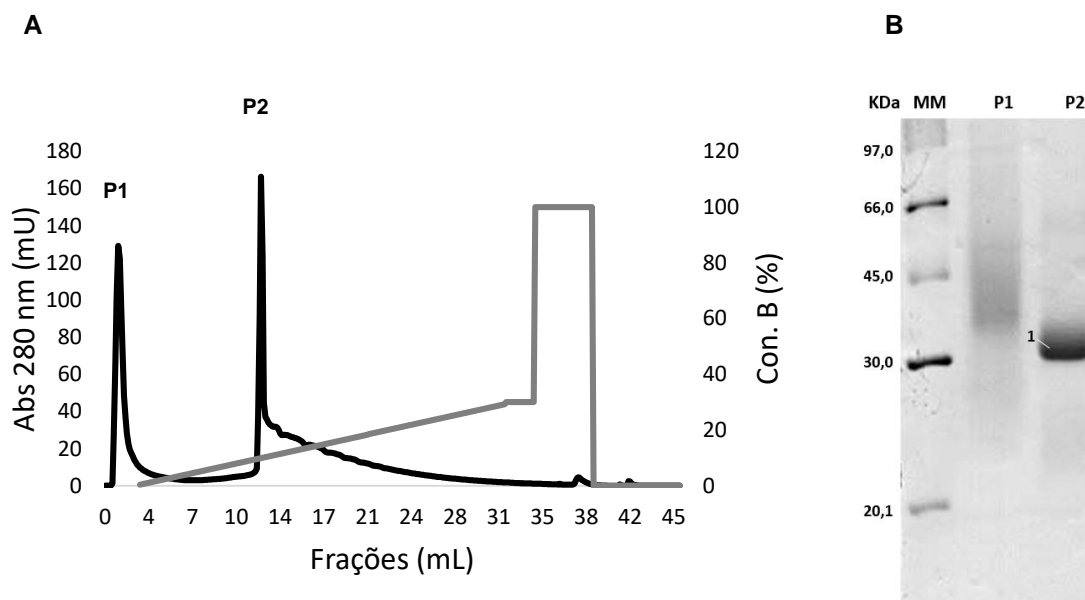


Fonte: Elaborada pelo autor. A: Cromatografia de troca iônica do extrato proteico de *S. recurva* em coluna Mono-S com pH 5,0. As proteínas foram eluídas com tampão acetato de sódio 50 mM em um gradiente de NaCl (0-0,3 M). B: Cromatografia de troca iônica do extrato proteico de *Z. trunciflora* em coluna Mono-Q com pH 5,0. As proteínas foram eluídas com tampão acetato de sódio 50 mM em um gradiente de NaCl (0-10 M).

Os extratos de *D. caudata*, *D. parviflora* e *S. longistipitata* foram fracionados com sucesso e permitiram identificar proteínas parcialmente purificadas. Através de cromatografia de troca iônica em coluna Mono-Q (pH 5,0), o extrato de *D. caudata* foi fracionado produzindo dois picos: PI, não retido, e PII, retido (FIGURA 10 A). Através de SDS-PAGE foi observado uma única banda proteica com massa molecular aparente de 30 kDa em PII (FIGURA 10 B) e identificada como quitinase por MS/MS

(FIGURA 10 C). O resultado confirma com o ensaio de atividade quitinolítica (FIGURA 7).

Figura 10 - Cromatografia de troca iônica do extrato proteico de *D. caudata* em coluna Mono-Q (pH 5,0)



C

Spot	Teórico		Escore proteico	Sequência dos peptídeos identificados	ID (NCBI)	Descrição e origem das proteínas identificadas
	MM	pI				
1	33030	9.80	90	R.YGGVMLWSR.Y	gi 5919201	class III chitinase [Benincasa hispida]
	46181	5.03	86	K.SSNYGGVMLWSR.Y	gi 950968238	PREDICTED: acidic endochitinase-like [Vigna radiata var. radiata]

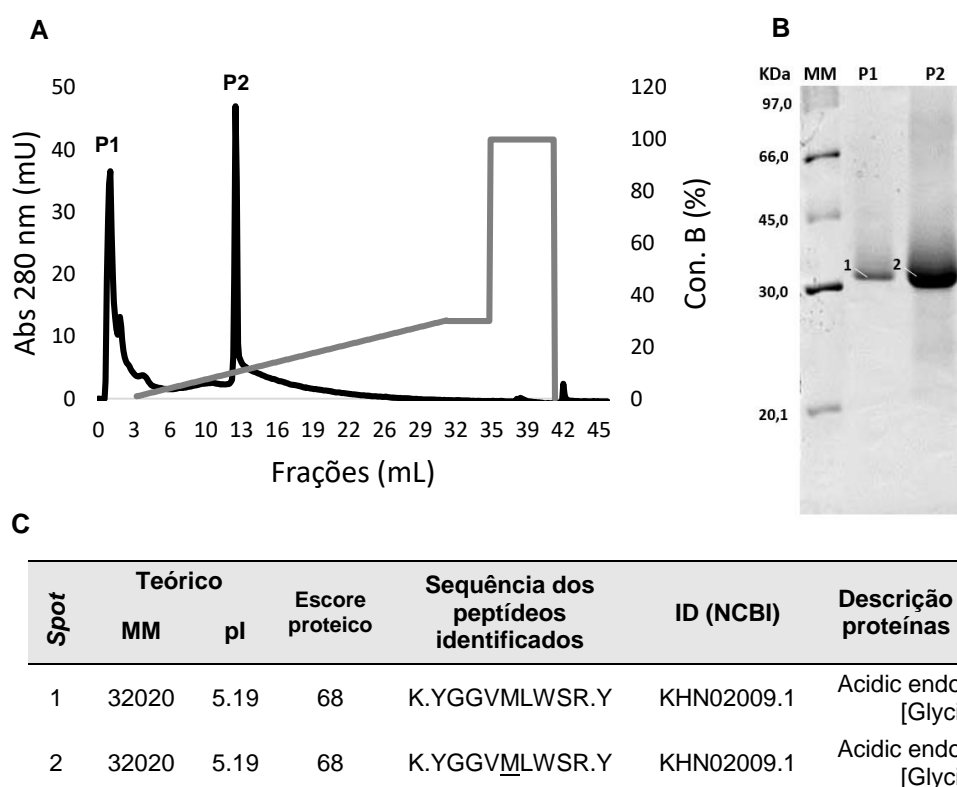
Fonte: Elaborada pelo autor. A: As proteínas foram eluídas com tampão acetato de sódio 50 mM em um gradiente de NaCl (0-0,3 M). B: eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) das frações obtidas a partir do extrato proteico de *D. caudata* em coluna Mono-Q. (MM) marcadores de massa molecular. As frações (P1 e P2) foram aplicadas em cada poço, as proteínas foram visualizadas após a coloração com 0,1% de Coomassie Brilliant Blue R-350. C: Identificação de proteínas a partir de spot's em SDS-PAGE por espectrometria de massa ESI-Q-TOF.

Também por cromatografia de troca iônica em coluna Mono-Q (pH 5,0) o extrato de *D. parviflora* ao ser fracionado gerou dois picos: P1, não retido, e PII, retido (FIGURA 11 A). Por SDS-PAGE foi observado uma única banda proteica com massa molecular aparente próxima de 30 kDa em P1 e PII (FIGURA 11 B) e as proteínas foram identificadas como quitinases por MS/MS (FIGURA 11 C). Esses dados estão de acordo com a atividade quitinolítica e demonstram a presença de diferentes

quitinases no mesmo extrato, resultado que corrobora a capacidade do extrato dessa planta ter inibido uma maior quantidade de espécies de fungos em relação a *D. caudata* (TABELA 5).

A ação conjunta de quitinases diferentes presentes no mesmo organismo favorece uma maior eficiência da digestão das diferentes formas nas quais a quitina está presente no ambiente (PATIL; GHORMADE; DESHPANDE, 2000).

Figura 11 – Cromatografia de troca iônica do extrato proteico *D. parviflora* em coluna Mono-Q (pH 5.0)

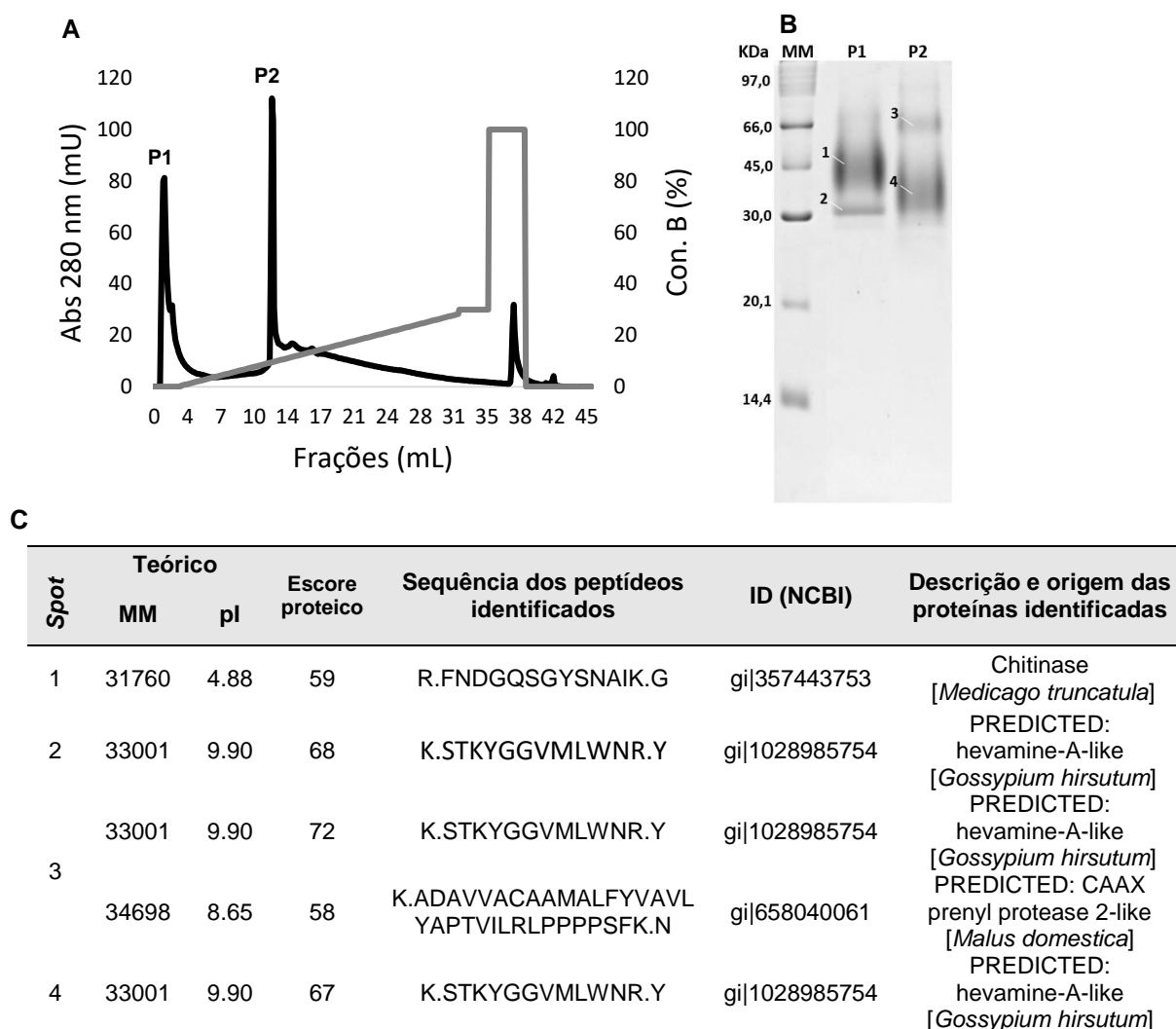


Fonte: Elaborada pelo autor. A: As proteínas foram eluídas com tampão acetato de sódio 50 mM em um gradiente NaCl (0-0,3 M). B: eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) das frações obtidas a partir do extrato proteico de *D. parviflora* na coluna Mono-Q. (MM) marcadores de massa molecular. As frações (P1 e P2) foram aplicadas em cada poço, as proteínas foram visualizadas após a coloração com 0,1% de Coomassie Brilliant Blue R-350. C: Identificação de proteínas a partir de spot's de SDS-PAGE por espectrometria de massa ESI-Q-TOF.

O fracionamento em dois picos (P1 não retido e PII retido) por cromatografia de troca iônica em coluna Mono-Q (pH 5,0) do extrato de *S. longistipitata* (FIGURA 12 A) não foi eficiente para purificação de proteínas como observado no SDS-PAGE (FIGURA 12 B). Ainda assim, as bandas foram identificadas por MS/MS (FIGURA 12 C). Este ensaio confirmou a presença de quitinases no extrato total conforme atividade

quitinolítica (FIGURA 7) e revelou a presença de protease apoiando a atividade proteolítica do mesmo extrato (FIGURA 6).

Figura 12 – Cromatografia de troca iônica do extrato proteico de *S. longistipitata* em coluna Mono-Q column com pH 5.0

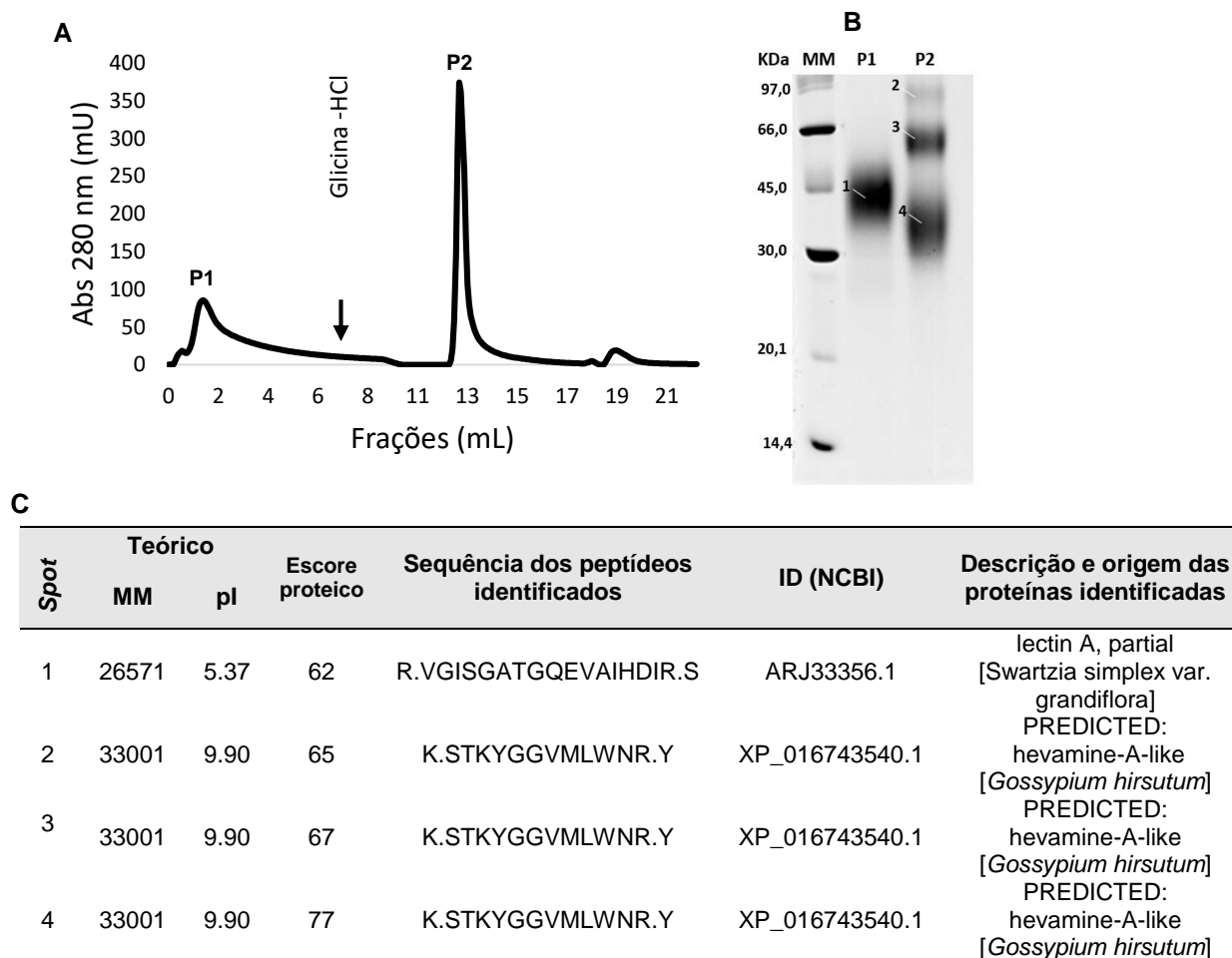


Fonte: Elaborada pelo autor. A: As proteínas foram eluídas com tampão acetato de sódio 50 mM em um gradiente de NaCl (0-0,3 M). B: eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) das frações obtidas a partir do extrato proteico de *S. longistipitata* em coluna Mono-Q. (MM) marcadores de massa molecular. As frações (P1 e P2) foram aplicadas em cada poço e as proteínas foram visualizadas após a coloração com 0,1% de *Coomassie Brilliant Blue R-350*. C: Identificação de proteínas a partir de spot's de SDS-PAGE por espectrometria de massa ESI-Q-TOF.

Através de cromatografia de afinidade em coluna *HiTrap™ Benzamidine Sepharose 4 Fast Flow* o extrato total de *S. longistipitata* foi fracionado produzindo dois picos: PI, não retido, e PII, retido (FIGURA 13 A). Através de SDS-PAGE foi observado uma única banda proteica com massa molecular aparente próxima a 45

kDa em PI e três bandas em PII com diferentes massas moleculares (FIGURA 13 B). Todas as bandas foram identificadas por MS/MS (FIGURA 13 C). PI foi reconhecido como lectina e as três bandas presentes em PII como quitinases.

Figura 13 – Perfil cromatográfico em coluna HiTrap™ Benzamidine Sepharose 4 Fast Flow do extrato proteico de *S. longistipitata*.



Fonte: Elaborada pelo autor. A: As proteínas foram eluídas com 50 mM de tampão Glicina-HCl pH 3,0. B: eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) das frações obtidas a partir do extrato proteico de *S. longistipitata* em coluna Mono-Q. (MM) marcadores de massa molecular. As frações (P1 e P2) foram aplicadas em cada poço, as proteínas foram visualizadas após a coloração com 0,1% de Coomassie Brilliant Blue R-350. C: Identificação de proteínas a partir de spot's em SDS-PAGE por espectrometria de massa ESI-Q-TOF.

Fernandes *et al.* (2012) purificou e caracterizou uma lectina em sementes de *Swartzia laevicarpa* e descreveu as relações filogenéticas da proteína com outras, traçando filogenia com outras plantas. Há três anos a mesma autora relatou novas lectinas em sementes de espécies amazônicas não avaliadas anteriormente

(FERNANDES *et al.*, 2015) o que respalda a presença da lectina no extrato de *S. longistipitata*.

4.7 Avaliação da Integridade da Membrana Celular

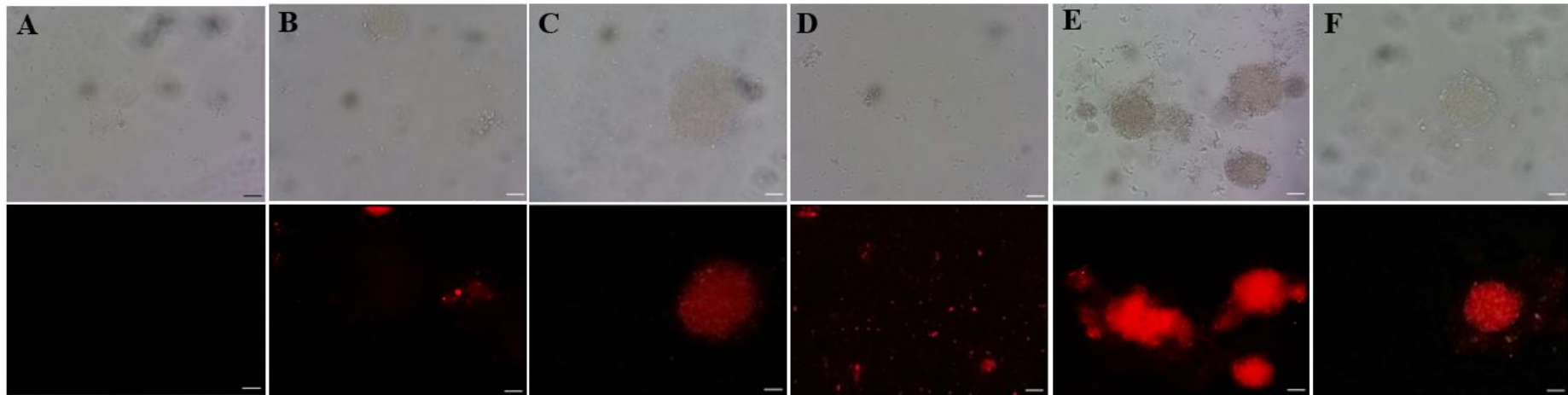
As proteínas parcialmente purificadas foram testadas contra esporos de *F. oxysporum* para examinar sua possível atividade antifúngica. Conforme revelado na figura 14, todas as proteínas testadas foram capazes de induzir a absorção de iodeto de propídio, sugerindo alteração na permeabilidade da membrana de esporos.

O aumento da permeabilidade da membrana celular nos esporos de *F. oxysporum* quando expostos as quitinases isoladas, pode ser resultado da capacidade que algumas destas proteínas tem em hidrolisar a quitina, um dos principais constituintes das paredes celulares dos fungos, levando assim a vulnerabilidade da membrana celular. Essa vulnerabilidade pode permitir que a membrana celular seja desestabilizada e sofra várias alterações como despolarização ou formação de poros levando sua perda de funções e morte celular (LEE; LEE, 2015; LEE *et al.*, 2015; NETO *et al.*, 2017; VAIKUNTAPU *et al.*, 2016).

A hipótese para a lectina ter aumentado a permeabilidade celular nos esporos dos fungos *in vitro*, sem uma ação combinada com quitinases como pode ocorrer na natureza, é que esta tenha provocado efeitos indiretos baseados em ligações com carboidratos expostos na superfície da parede celular dos fungos. Uma vez que lectinas de plantas não tem acesso direto a membrana de fungos devido à presença da parede celular (PEUMANS; VAN DAMME, 1995).

A relação de lectinas de sementes com efeitos antifúngicos é relatada em diversos estudos na literatura (CHARUNGCHITRAK *et al.*, 2011; FREIRE *et al.*, 2002; KUKU *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2012; NG *et al.*, 2002; SITOHY; DOHEIM; BADR, 2007).

Figure 14 - Permeabilização da membrana celular medida pelo iodeto de propídio.



Fonte: Elaborado pelo autor. Os esporos de *Fusarium oxysporum* (2×10^6 células por mL^{-1}) foram incubados com diferentes amostras durante 60 min a 27°C . A absorção de iodeto de propídio foi observada por fluorescência usando um sistema de medição de fluorescência (Microscopia do Sistema Olympus, comprimento de onda de excitação 400-500 nm, comprimento de onda de emissão 600-700 nm). (A) Esporos não tratados. (B) $0,06\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de PII *D. caudata*, (C) $0,01\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de PI *D. parviflora*, (D) $0,04\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de PII *D. parviflora*, (E) $0,54\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de PI *S. longistipitata* e (F) $0,96\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de PII *S. longistipitata*. Barras: $5\mu\text{m}$.

5 CONCLUSÃO

Os ensaios proteômicos e colorimétricos realizados neste estudo indicaram que as quitinases estavam presentes em todos os cinco extratos de semente das espécies endêmicas analisadas, o que pode estar relacionado com as atividades antifúngicas observadas. Essa atividade de inibição do crescimento de hifas das espécies de fungos testadas, sugere que a especificidade contra diferentes fungos pode desempenhar papel seletivo importante como estratégia defensiva. Além disso, quitinases foram parcialmente purificadas e alteraram a permeabilidade da membrana celular de esporos de *F. oxysporum*.

Portanto, este trabalho acrescenta à literatura dados bioquímicos preliminares, sobre plantas endêmicas da Amazônia brasileira, que podem contribuir para o entendimento do sucesso adaptativo (plantas x fungos) dessas espécies em um ecossistema de elevada complexidade.

REFERÊNCIAS

- ADRANGI, S.; FARAMARZI, M.A. From bacteria to human: A journey into the world of chitinases. **Biotechnology Advances**, [s.l.], v. 31, p. 1786–1795, 2013.
- ADRANGI, S.; FARAMARZI, M.A.; SHAHVERDI, A.R.; SEPEHRIZADEH, Z. Purification and characterization of two extracellular endochitinases from *Massilia timonae*. **Carbohydrate Research**, [s.l.], v. 345, p. 402–407, 2010.
- ALECIO, M.R.; FAZOLIN, M.; COELHO NETO, R.A.; CATANI, V.; ESTRELA, J.L.V.; ALVES, S.B.; CORREA, R.S.; ANDRADE NETO, R.C.; GONZAGA, A.D. Ação inseticida do extrato de *Derris amazônica* Killip para *Cerotoma arcuatus* Olivier (Coleoptera: Chrysomelidae). **Acta amazonica**, [s.l.], v. 40, n. 4, p. 719-728, 2010.
- ALVES, H. P.; PIMENTA, N. L.; HANADA, R. E. Phytocosmetic companies as an alternative for local development in the Amazon. **Business and Management Review**, [s.l.], v. 4, n. 33, p. 33-41, 2014.
- AMIAN, A. A.; PAPENBROCK, J.; JACOBSEN, H. J.; HASSAN, F. Enhancing transgenic pea (*Pisum sativum* L.) resistance against fungal diseases through stacking of two antifungal genes (chitinase and glucanase). **GM Crops**, [s.l.], v. 2, p. 104–109, 2011.
- AOKI, Y.; TAKAHASHI, S.; TAKAYAMA, D.; OGATA, Y.; SAKURAI, N.; SUZUKI, H.; ASAWATRERATANAKUL, K.; WITITSUWANNAKUL, D.; WITITSUWANNAKUL, R.; SHIBATA, D.; KOYAMA, T. Identification of laticifer-specific genes and their promoter regions from a natural rubber producing plant *Hevea brasiliensis*. **Plant Science**, [s.l.], v. 225, p. 1-8, 2014.
- ARAGÃO, L.E.O.C., POULTER, B.; BARLOW, J.B.; ANDERSON, L.O.; MALHI, Y.; SAATCHI, S.; PHILLIPS, O.L.; GLOOR, E. Environmental change and the carbon balance of Amazonian forests. **Biological Reviews**, [s. l.], v. 2, p. 913–931, 2014.
- BAETZ, U.; MARTINOIA, E. Root exudates: the hidden part of plant defense. **Trends in Plant Science**, [s.l.], v. 19, n. 2, p. 90-98, 2014.
- BARIANI, A.; GONÇALVES, J. F. C.; CHEVREUIL, L. R.; CAVALLAZZI, J. R. P.; SOUZA, L. A. G.; BENTES, J. L. S.; PANDO, S. C. Purificação parcial de inibidores de tripsina de sementes de *Caesalpinia ferrea* e *Swartzia polyphylla* e o efeito dos extratos protéicos sobre fungos fitopatogênicos. **Summa Phytopathologica**, [s.l.], v.38, n.2, p.131-138, 2012.
- BARROS, H. R. M.; GARCÍA-VILLALBA, R.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; GENOVESE, M. I. Evaluation of the distribution and metabolism of polyphenols derived from cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) in mice gastrointestinal tract by UPLC-ESI-QTOF. **Journal of Functional Foods**, [s.l.], v. 22, p. 477-489, 2016.

BERGALLO, H. G.; BERGALLO, A. C.; ROCHA, H. B.; & ROCHA, C. F. D. Invasion by *Artocarpus heterophyllus* (Moraceae) in an island in the Atlantic Forest Biome, Brazil: distribution at the landscape level, density and need for control. **Journal of Coastal Conservation**, [s.l.], v. 20, n. 3, p. 191-198, 2016.

BILGRAMI, K.S.; SINHA, K.K.; SINHA, A.K. Inhibition of aflatoxin production and growth of *Aspergillus flavus* by eugenol and onion and garlic extracts. **Indian Journal of Medical Research**, [s.l.], v.96, p.171-175, 1992.

BOBBARALA, V.; KATIKALA, P. K.; NAIDU, K. C.; PENUMAJJI, S. Antifungal activity of selected plant extracts against phytopathogenic fungi *Aspergillus niger* F2723. **Indian Journal of Science and Technology**, [s.l.], v. 2, n. 4, p. 87-90, 2009.

BOGDANOV, I. V.; SHENKAREV, O.; FINKINA, E. I.; MELNIKOVA, D. N.; RUMYNSKIY, E. I.; ARSENIYEV, A. S.; OVCHINNIKOVA, T. V. A novel lipid transfer protein from the pea *Pisum sativum*: isolation, recombinant expression, solution structure, antifungal activity, lipid binding, and allergenic properties. **BMC plant biology**, [s.l.], v. 16, n. 1, p. 107, 2016.

BORGOGNONI, C.F.; POLAKIEWICZ, B.; PITOMBO, R.N.M. Estabilidade de emulsões de d-limoneno em quitosana modificada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [s.l.], v. 26, n. 3, p. 502-508, 2006.

BOWLES, D.J. Defense related proteins in higher plants. **Biochemistry**, [s.l.], v. 59, p. 837-907, 1990.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, [s.l.], v. 72, p. 248-254, 1976.

BRITO, M. S.; MELO, M. B.; ALVES, J. P. A.; FONTENELLE, R. O. S.; MATA, M. F.; ANDRADE, L. B. S. Partial purification of trypsin/papain inhibitors from *Hymenaea courbaril* L. seeds and antibacterial effect of protein fractions. **Hoehnea**, [s.l.], v. 43, n. 1, p. 11-18, 2016.

BROEKAERT, W.F.; CAMMUE, B.P.A.; VANDERLEYDEN, J. An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. **FEMS Microbiology Letters**, [s.l.], v. 69, p. 61-66, 1990.

BRUCE, T.J. Interplay between insects and plants: dynamic and complex interactions that have coevolved over millions of years but act in milliseconds. **Journal of Experimental Botany**, [s.l.], v.66, n. 2, p. 455-465, 2015.

BRUNNER, F.; STINTZI, A.; FRITIG, B.; LEGRAND, M. Substrate specificities of tobacco chitinases. **Plant Journal**, [s.l.], v. 14, n. 2, p. 225-34, 1998.

BRURBERG, M. B.; NES, I. F.; EIJSINK, V. G. H. Comparative studies of chitinases A and B from *Serratia marcescens*. **Microbiology**, [s.l.], v. 142, n. 7, p. 1581-1589, 1996.

CALDERON, L. A.; TELES, R. C. L.; LEITE, J. R. S. A.; BLOCK, C. JR.; ASTOLFI-FILHO, S.; FREITAS, S. M. Serine protease inhibitors from Amazon Leguminosae seeds: purification and preliminary characterization of two chymotrypsin inhibitors from *Inga umbratica*. **Protein and Peptide Letters**, [s.l.], v. 8, n. 6, p. 485-493, 2001.

CARDONA, R.; DELGADO, N. Herencia de la resistencia al hongo *Rhizoctonia solani* en dos poblaciones de arroz. **Revista de la Facultad de Agronomía**, [s.l.], v. 33, n. 3, p. 311-324, 2017.

CARDOSO, D.; SÄRKINEN, T.; ALEXANDER, S.; AMORIM, A. M.; BITTRICH, V.; CELIS, M.; DALY, D. C.; FIASCHI, P.; FUNK, V. A.; GIACOMIN, L. L.; GOLDENBERG, R.; HEIDEN, G.; IGANCI, J.; KELLOFF, C. L.; KNAPP, S.; LIMA, H. C.; MACHADO, A. F. P.; SANTOS, R. M.; MELLO-SILVA, R.; MICHELANGELI, F. A.; MITCHELL, J.; MOONLIGHT, P.; MORAES, P. L. R.; MORI, S. A.; NUNES, T. S.; PENNINGTON, T. D.; PIRANI, J. R.; PRANCE, G. T.; QUEIROZ, L. P.; RAPINI, A.; RIINA, R.; RINCON, C. A. V.; ROQUE, N.; SHIMIZU, G.; SOBRAL, M.; STEHMANN, J. R.; STEVENS, W. D.; TAYLOR, C. M.; TROVÓ, M.; VAN DER BERG, C.; VAN DER WEF, H.; VIANA, P. L.; ZARTMA, C. E.; FORZZA, R. C. Amazon plant diversity revealed by a taxonomically verified species list. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s.l.], v. 114, n. 40, p. 10695-10700, 2017.

CARLINI, C. R.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon, Kidlington**, [s.l.], v. 40, p. 1515 –1539, 2002.

CELOTO, M.I.B.; PAPA, M.F.S.; SACRAMENTO, L.V.S.; CELOTO, F.J. Atividade antifúngica de extratos de plantas a *Colletotrichum gloeosporioides*. **Acta Scientiarum**, [s.l.], v.30, n.1, p.1-5, 2008.

CHARUNGCHITRAK, S.; PETSOM, A.; SANGVANICH, P.; KARNCHANATAT, A. Antifungal and antibacterial activities of lectin from the seeds of *Archidendron jiringa* Nielsen. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 126, n. 3, p. 1025-1032, 2011.

CHERNIN, L.S.; WINSON, M.K.; THOMPSON, J.M.; HARAN, S.; BYCROFT, B.W.; CHET, I.; WILLIAMS, P.; STEWART, G.S.A.B. Chitinolytic activity in *Chromobacterium violaceum*: Substrate analysis and regulation by quorum sensing. **Journal of Bacteriology**, [s.l.], v. 180, n. 17, p. 4435-4441, 1998.

CHEVREUIL, L. R.; GONÇALVES, J. F. C.; BARIANI, A.; RODRIGUES, J. V. F. C.; PANDO, S. C. Detecção de inibidores de tripsina e atividade hemaglutinante em sementes de leguminosas arbóreas da Amazônia. **Acta Amazonica**, [s.l.], v. 39, p. 199-205, 2009.

CHEVREUIL, L. R.; GONÇALVES, J. F. C.; CALDERON, L. A.; SOUZA, L. A. G.; PANDO, S. C.; BORGES, E. E. L. Partial purification of trypsin inhibitors from *Parkia* seeds (*Fabaceae*). **Hoehnea**, [s.l.], v. 41, n. 2, p. 181-186, 2014.

CHOUDHURY, F. K.; RIVERO, R.; BLUMWALD, E.; MITTLER, R. Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. **The Plant Journal**, [s.l.], v. 90, n. 5, p. 856-867, 2017.

COHEN-KUPIEC, R.; CHET, I. The molecular biology of chitin digestion. **Current Opinion in Biotechnology**, [s.l.], v. 9, p. 270-277, 1998.

CORBY, H. D. L. 1981. The systematic value of leguminous root nodules, p.657-670. In: Pohlhill, R.M.; Raven, P.H. (EdS.). *Advances in Legume Systematics. Part 2. Proceedings of the International Legume Conference*. Royal Botanical Gardens, London.

CORRÊA, R.S. 2006. Toxicidade de extratos de *Lonchocarpus floribundus* Benth (Timbó) sobre *Toxoptera citricidus* Kirkaldy (Pulgão preto dos citros) em condições experimentais. Dissertação de mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas. 68pp.

COX, P.M.; PEARSON, D.; BOOTH, B.B.; FRIEDLINGSTEIN, P.; HUNTINGFORD, C.; JONES, C.D.; LUKE, C.M. Sensitivity of tropical carbon to climate change constrained by carbon dioxide variability. **Nature**, [s.l.], v. 494, p. 341–344, 2013.

DA SILVA, G. S.; CANUTO, K. M.; RIBEIRO, P. R. V.; BRITO, E. S.; NASCIMENTO, M. M.; ZOCCOLO, G. J.; COUTINHO, P. P.; JESUS, R. M. Chemical profiling of guarana seeds (*Paullinia cupana*) from different geographical origins using UPLC-QTOF-MS combined with chemometrics. **Food Research International**, [s.l.], v. 102, p. 700-709, 2017.

DAHIYA, N.; TEWARI, R.; HOONDA, G.S. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v.71, p. 773-782, 2006.

DANGL, J. L.; JONES, J. D. G. Plant pathogens and integrated defense responses to infection. **Nature**, [s.l.], v. 411, p. 826-833, 2001.

DAMERVAL, C.; DE VIENNE, D.; ZIVY, M.; THIELLEMENT, H. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. **Electrophoresis**, [s.l.], v. 7, n. 1, p. 52-54, 1986.

DE JESUS MIRANDA, V.; PORTO, W. F.; DA ROCHA FERNANDES, G.; POGUE, R.; NOLASCO, D. O.; ARAUJO, A. C. G.; COTA, L. V.; FREITAS, C. G.; DIAS, S. C.; FRANCO, O. L. Comparative transcriptomic analysis indicates genes associated with local and systemic resistance to *Colletotrichum graminicola* in maize. **Scientific reports**, [s.l.], v. 7, n. 1, p. 2483, 2017.

DE OLIVEIRA MENEGUETTI, D. U., DA CUNHA, R. M., LIMA, R. A., DE SOUZA, F. A., MILITÃO, S. L. T., & FACUNDO, V. A. Antimalarial ethnopharmacology in the Brazilian Amazon. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, [s.l.], v. 35, n.4, p. 577-587, 2014.

DI ROSA, M.; DISTEFANO, G.; ZORENA, K.; MALAGUARNERA, L. Chitinases and immunity: ancestral molecules with new functions. **Immunobiology**, [s.l.], v. 221, n. 3, p. 399-411, 2016.

- DONOGHUE, M. J., & EDWARDS, E. J. Biome shifts and niche evolution in plants. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, [s.l.], v. 45, p. 547–572. 2014.
- DOS SANTOS, M. R. A.; LIMA, R. A.; SILVA, A. G.; TEIXEIRA, C. A. D.; LIMA, D. K. S.; POLLI, A. R.; FACUNDO, V. A. Atividade inseticida do extrato de raiz de *Piper hispidum* H.B.K. (Piperaceae) sobre *Hypothenemus hampei* Ferrari. **Saúde e Pesquisa**, [s.l.], v. 4, n. 3, 2011.
- DURAND, A.; HUGHES, R.; ROUSSEL, A.; FLATMAN, R.; HENRISSAT, B.; JUGE, N. Emergence of a subfamily of xylanase inhibitors within glycoside hydrolase family 18. **The FEBS Journal**, [s.l.], v. 272, n. 7, p. 1745-1755, 2005.
- EKE, P.; CHATUE, G. C.; WAKAM, L. N.; KOUIPOU, R. M. T.; FOKOU, P. V. T.; BOYOM, F. F. Mycorrhiza consortia suppress the fusarium root rot (*Fusarium solani* f. sp. Phaseoli) in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Biological Control**, [s.l.], v. 103, p. 240-250, 2016.
- EBRAHIM, S.; USHA, K.; SINGH, B. Pathogenesis-related (PR)-proteins: chitinase and β -1,3-glucanase in defense mechanism against malformation in mango (*Mangifera indica* L.). **Scientia Horticulturae**, [s.l.], v. 130, p. 847–52, 2011
- FAWCETT, C. H.; SPENCER, D. M. Plant chemotherapy with natural products. **Annual Review of Phytopathology**, [s.l.], v. 18, p. 403-418, 1970.
- FEARNSIDE, P. M. Environment: deforestation soars in the Amazon. **Nature**, [s.l.], v. 521, n. 7553, p. 423, 2015.
- FERNANDES, A. V., RAMOS, M. V., COSTA, J. H., VASCONCELOS, I. M., MOREIRA, R. A., MORENO, F. B. M. B., GONÇALVES, J. F. C., Lectin genes and their mature proteins: Still an exciting matter, as revealed by biochemistry and bioinformatics analyses of newly reported proteins. **Biochemical Systematics and Ecology**, [s.l.], v. 60, p. 46-55, 2015.
- FERNANDES, A. V. Caracterização bioquímica e avaliação da atividade antifúngica de lectinas de sementes de *Fabaceae* da Amazônia. 2012. Tese (Doutorado em Biotecnologia), Universidade Federal Do Amazonas, Manaus, 2012.
- FERNANDES, A. V., RAMOS, M. V., VASCONCELOS, I. M., MOREIRA, A. C.O. M., MORENO, F. B. M. B., PEREIRA, J. O., GONCALVES, J. F. C., Purification and characterization of a lectin of the Swartzieae Legume Taxa. **Protein and peptide letters**, [s.l.], v. 19, n. 10, p. 1082-1088, 2012.
- FIORI, A.C.G.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; VIDA, J.B.; SCAPIM, C.A.; CRUZ, M.E.S.; PASCHOLATI, S.F. Antifungal activity of leaf extracts and essential oils of some medicinal plants against *Didymella bryoniae*. **Journal of Phytopathology**, [s.l.], v.148, p.483-487, 2000.

FOLLADOR, M.; VIEZZER, J.; EGLER, M.; BECHER, M.; HACH, L.; PEREIRA, V.; ROCHA, A.; VAZ, C.; VIEIRA, T.; AMONI, M.; HARTZELL, S. (2018). Modelling Potential Biophysical Impacts of Climate Change in the Atlantic Forest: Closing the Gap to Identify Vulnerabilities in Brazil. In **Climate Change Adaptation in Latin America**. Springer, Cham. 2018, P. 33-63.

FORZZA, R. C.; BAUMGRATZ, J. F. A.; COSTA, A. C.; HOPKINS, M.; LEITMAN, P. M.; LOHMANN, L. G.; MARTINELLI, G.; MORIM, M. P.; COELHO, M. A. N.; PEIXOTO, A. L.; PIRANI, J. R.; QUEIROZ, L. P.; STEHMANN, J. R.; WALTER, B. M. T.; ZAPPI, D. INSTITUTO DE PESQUISAS JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil** [online]. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. Introdução: as angiospermas do Brasil, p. 78-89. Vol. 1.

FREIRE, M. G. M.; GOMES, V. M.; CORSINI, R. E.; MACHADO, O. L. T.; SIMONE, S. G.; NOVELLO, J. C.; MARANGONI, S.; MACEDO, M. L. R. Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth. **Plant Physiology Biochemistry**, [s.l.], v. 40, p. 61-68, 2002.

FREITAS, C. D. T.; VIANA, C. A.; VASCONCELOS, I. M.; MORENO, F. B. B.; LIMA-FILHO, J. V.; OLIVEIRA, H. D.; MOREIRA, R. A.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O.; RAMOS, M. V. First insights into the diversity and functional properties of chitinases of the latex of *Calotropis procera*. **Plant Physiol Biochem**, [s.l.], v. 108, p. 361–371, 2016.

FREITAS, R. E.; MENDONÇA, M. A. A. Expansão Agrícola no Brasil e a Participação da Soja: 20 anos. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, [s.l.], v. 54, n. 3, p. 497-516, 2016.

FRIOLANI, M., DALECK, C. R., REPETTI, C. S., & ALESSI, A. C. Use of rubber tree (*Hevea brasiliensis*) latex biomembrane in diaphragmatic injuries in rabbits—an experimental study. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, [s.l.], v. 4, n. 1, p. 41-43, 2017.

FUNASAKI, M.; BARROSO, H. S.; FERNANDES, V. L. A.; MENEZES, I. S. Amazon rainforest cosmetics: chemical approach for quality control. **Química Nova**, [s.l.], v. 39, n. 2, p. 194-209, 2016.

GENTRY, A.H. A field guide to the families and genera of woody plants of North West South America (Colômbia, Equador, Peru) with supplementary notes on herbaceous taxa. **Journal of Tropical Ecology**, [s.l.], v. 12, n. 5, p. 722-727, 1996.

GOMAA, E. E. D. G.; ESMAIEL, N. M.; SALEM, M. Z. M.; GOMAA, S. E. In Vitro Screening for Antimicrobial Activity of Some Medicinal Plant Seed Extracts. **International Journal of Biotechnology for Wellness Industries**, [s.l.], v. 5, n. 4, p. 142-152, 2016.

- GOMES, C. E. M.; BARBOSA, A. E. A. D.; MACEDO, L. L. P.; PITANGA, L. C. M.; MOURA, F. T.; OLIVEIRA, A. S.; MOURA, R. M.; QUEIROZ, A. F. S.; MACEDO, F. P.; ANDRADE, L. B. S.; VIDAL, M. S.; SALES, M. P. Effect of trypsin inhibitor from *Crotalaria pallida* seeds on *Callosobruchus maculatus* (cowpea weevil) and *Ceratitidis capitata* (fruit fly). **Plant physiology and biochemistry**, [s.l.], v. 43, n. 12, p. 1095-1102, 2005.
- GOMES, G. V. L.; SOLA, M. R.; MAROSTEGAN, L. F. P.; JANGE, C. G.; CAZADO, C. P. S.; PINHEIRO, A. C.; VICENTE, A. A.; PINHO, S. C. Physico-chemical stability and in vitro digestibility of beta-carotene-loaded lipid nanoparticles of cupuacu butter (*Theobroma grandiflorum*) produced by the phase inversion temperature (PIT) method. **Journal of Food Engineering**, [s.l.], v. 192, p. 93-102, 2017.
- GONÇALVES, A.E.S.S., LAJOLO, F.M., GENOVESE, M.I. Chemical composition and antioxidant/antidiabetic potential of Brazilian native fruits and commercial frozen pulps. **Journal of Agriculture Food and Chemical**, [s.l.], v. 58, p. 4666–4674, 2010.
- GORJANOVIĆ, S. A Review: Biological and technological functions of barley seed pathogenesis-related proteins (PRs). **Journal of the Institute of Brewing**, [s.l.], v. 115, n. 4, p. 334–360, 2009.
- HAN, P.; YANG, C.; LIANG, X.; LI, L. Identification and characterization of a novel chitinase with antifungal activity from ‘Baozhu’ pear (*Pyrus ussuriensis Maxim.*). **Food chemistry**, [s.l.], v. 196, p. 808-814, 2016.
- HASMA, H.; OTHMAN, A. B.; FAUZI, M. S. Barrier integrity of punctured gloves: NR superior to vinyl and nitrile. **Journal of Rubber Research**, [s.l.], v. 6, n. 4, p. 231-240, 2003.
- HEGEDUS, D.; ERLANDSON, M.; GILLOTT, C.; TOPRAK, U. New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. **Annual Review of Entomology**, [s.l.], v.54, p. 285–302, 2009.
- HÉMATY, K.; CHERK, C.; SOMERVILLE, S. Host–pathogen warfare at the plant cell wall. **Current opinion in plant biology**, [s.l.], v. 12, n. 4, p. 406-413, 2009.
- HENNIG, M.; JANSONIUNS, J.N.; VAN SCHELTINGA, A.C.T.; DIJKSTRA, B.W.; SCHLESIER, B. Crystal structure of Concanavalin B at 1.65 Å resolution. An "inactivated" chitinase from seeds of *Canavalia ensiformis*. **Journal of Molecular Biology**, [s.l.], v. 254, n. 2, p. 237-246, 1995.
- HOUSTON, K.; TUCKER, M.; CHOWDHURY, J.; SHIRLEY, N.; LITTLE, A. The plant cell wall: a complex and dynamic structure as revealed by the responses of genes under stress conditions. **Frontiers in plant science**, [s.l.], v. 7, p. 984, 2016.
- IBGE. (2004). Mapa de Biomas. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/geociencias/default_prod.shtm. Acesso em: 04 out. 2014.

IBGE. (2017). Cadastro de Municípios localizados na Amazônia Legal. Disponível em:<<http://www.ibge.gov.br/home/geociencias/geografia/amazonialegal.shtm?c=2>>. Acesso em: 7 ago. 2017.

IBGE. (2017). Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Disponível em:<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201706_7.shtm>. Acesso em: 7 ago. 2017.

IHA, O. K.; ALVES, F. C. S. C.; SUAREZ, P. A. Z.; SILVA, C. R. P.; MENEGHETTI, M. R.; MENEGHETTI, S. M. P. Potential application of *Terminalia catappa* L. and *Carapa guianensis* oils for biofuel production: Physical-chemical properties of neat vegetable oils, their methyl-esters and bio-oils (hydrocarbons). **Industrial Crops and Products**, [s.l.], v. 52, p. 95-98, 2014.

JAIN, A.; SINGH, S.; SARMA, B.K.; SINGH, H.B. Microbial consortium-mediated reprogramming of defence network in pea to enhance tolerance against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of Applied Microbiology**, [s.l.], v.112, p. 537-550, 2012.

JASHNI, M. K.; MEHRABI, R.; COLLEMARE, J.; MESARICH, C.; DE WIT, P. J. G. M. The battle in the apoplast: further insights into the roles of proteases and their inhibitors in plant–pathogen interactions. **Frontiers in plant science**, [s.l.], v. 6, p. 584, 2015.

JESUS, F. L. M.; ALMEIDA, F. B.; DUARTE, J. L.; OLIVEIRA, A. E. M. F. M.; CRUZ, R. A. S.; SOUTO, R. N. P.; FERREIRA, R. M. A.; KELMANN, R. G.; CARVALHO, J. C. T.; LIRA-GUEDES, A. C.; GUEDES, M.; SOLANS, C.; FERNANDES, C. Preparation of a Nanoemulsion with *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae) Oil by a Low-Energy/Solvent-Free Method and Evaluation of Its Preliminary Residual Larvicidal Activity. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, [s.l.], v. 2017, 2017.

JOHNSON, R. S.; DAVIS, M. T.; TAYLOR, J. A.; PATTERSON, S. D. Informatics for protein identification by mass spectrometry. **Methods**, [s.l.], v. 35, p. 223-236, 2005.

KARLSSON, M.; STENLID, J.; LINDAHL, B. Functional differentiation of chitinases in the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Fungal Ecology**, [s.l.], v. 22, p. 52-60, 2016.

KASPRZEWSKA, A. Plant chitinases – Regulation and Function. **Celular & Molecular Biology Letters**, [s.l.], v.8, p. 809-824, 2003.

KAWASE, T; YOKOKAWA, S.; SAITO, A.; FUJII, T.; NIKAIDOU, N.; MIYASHITA, K.; WATANABE, T. Comparison of Enzymatic and Antifungal Properties between Family 18 and 19 Chitinases from *S. coelicolor* A3(2). **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, [s.l.], v. 70, n. 4, p. 988-998, 2006.

KRUIJT, B.; MEIR, P.; JOHNSON, M.; RAMMIG, A.; FAUSET, S.; BAKER, T.; GALBRAITH, D.; VON RANDOW, C.; VERBEECK, H. Modelling Amazonian carbon budgets and vegetation dynamics in a changing climate. In: **Interactions Between Biosphere, Atmosphere and Human Land Use in the Amazon Basin**, [s.l.], v. 2016. p. 331-366, 2016.

LANGNER, T; GÖHRE, V. Fungal chitinases: function, regulation, and potential roles in plant/pathogen interactions. **Current genetics**, [s.l.], v. 62, n. 2, p. 243-254, 2016.

KUKU, A.; ODEKANYIN, O.; ADENIRAN, K.; ADEWUSI, M.; OLONADE, T. Purification of a mannose/glucose-specific lectin with antifungal activity from pepper seeds (*Capsicum annum*). **African Journal of Biochemistry Research**, [s.l.], v. 3, n. 6, p. 272-278, 2009.

LAWAL, O. U.; FAGBOHUN, E. D. Studies on bio-deterioration, aflatoxin contamination and nutritive values of processed cashew (*Anacardium occidentale* L) nuts during storage. **Nature and Science**, [s.l.], v. 11, n. 9, p. 127-133, 2014.

LEE, H.; HWANG, J. S.; LEE, J.; KIM, J. I.; LEE, D. G. Scolopendin 2, a cationic antimicrobial peptide from centipede, and its membrane-active mechanism. **Biochimica et Biophysica Acta**, [s.l.], v. 1848, p. 634–642, 2015.

LEE, W.; LEE, D. G. Fungicidal mechanisms of the antimicrobial peptide Bac8c. **Biochimica et Biophysica Acta**, [s.l.], v. 1848, p. 673–679, 2015.

LEANDRO, L.; DA VEIGA-JUNIOR, V.; BEZERRA, A.; DO O PESSOA, C. Composição química e atividade citotóxica dos óleos essenciais das folhas e talos de *Eperua duckeana* Cowan. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, [s.l.], v. 14, n. 1, 2015.

LEHANE, M.J.; WU, D.; LEHANE, S.M. Midgut specific immune molecules are produced by the blood-sucking insect *Stomoxys calcitrant*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s.l.], v. 94, p. 11502–11507, 1997.

LEQUEU, J.; FAUCONNIER, M.L.; CHAMMAI, A.; BRONNER, R.; BLEE, E. Formation of plant cuticle: evidence for the occurrence of the peroxygenase pathway. **The Plant Journal**, [s.l.], v. 36, p. 155-16, 2003.

LEWIS, G.P.; SCHRIRE, B.; MACKINDER, B. & LOCK, M. **Legumes of the World**. The Royal Botanic Garden. Kew. 2005.

LI, L.; YI, H. Differential expression of Arabidopsis defense-related genes in response to sulfur dioxide. **Chemosphere**, [s.l.], v. 87, p.718–24, 2012.

LIMA, B. S.; SILVA, L. F. R.; MELO, M. R. S.; COSTA, J. S.; PICANÇO, N S.; LIMA, E. S.; VASCONCELLOS, M. C.; BOLETIN, A. P. A.; SANTOS, J, M. P.; AMORIN, R. C. N.; CHAVES, F. C. M.; COUTINHO, J. P.; TADEI, W. P.; KRETTLI, A. U.; POHLIT, A. M. In vitro and in vivo anti-malarial activity of plants from the Brazilian Amazon. **Malaria Journal**, [s.l.], v. 14, p. 508, 2015.

LIMA, H.C. *Phaseolus* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. 2010.

LIMA, H.C.; QUEIROZ, L.P.; MORIM, M.P.; SOUZA, V.C.; DUTRA, V.F.; BORTOLUZZI, R.L.C.; IGANCI, J.R.V.; FORTUNATO, R.H.; VAZ, A.M.S.F.; SOUZA, E.R. de; FILARDI, F.L.R.; VALLS, J.F.M.; GARCIA, F.C.P.; FERNANDES, J.M.; MARTINS-DA-SILVA, R.C.V.; FORTUNA-PEREZ, A.P.; MANSANO, V.F.; MIOTTO, S.T.S.; TOZZI, A.M.G.A.; MEIRELES, J.E.; LIMA, L.C.P.; OLIVEIRA, M.L.A.A.; FLORES, A.S.; TORKE, B.M.; PINTO, R.B.; LEWIS, G.P.; BARROS, M.J.F.; RIBEIRO, R.D.; SCHUTZ, R.; PENNINGTON, T.; KLITGAARD, B.B.; RANDO, J.G.; SCALON, V.R.; CARDOSO, D.B.O.S.; COSTA, L.C.; SILVA, M.J.; MOURA, T.M.; BARROS, L.A.V.; SILVA, M.C.R.; QUEIROZ, R.T.; SARTORI, A.L.B.; CAMARGO, R. 2010. *Fabaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB000115>>. Acesso em: 22 mai. 2011.

LIOTTI, R. G.; FIGUEIREDO, M. I. S.; SILVA, G. F.; MENDONÇA, E. A. F.; SOARES, M. A. Diversity of cultivable bacterial endophytes in *Paullinia cupana* and their potential for plant growth promotion and phytopathogen control. **Microbiological Research**, [s.l.], v. 207, p. 8-18, 2018.

LI, T.; YIN, X.; LIU, D.; MA, X.; LV, H.; SUN, S. Isolation and characterization of a novel lectin with antifungal and antiproliferative activities from *Sophora alopecuroides* seeds. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, [s.l.], v. 44, n. 7, p. 606-13, 2012.

LORENZI, H. 2002. Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. v. 2, 2ª Ed. Nova Odessa, Editora Plantarum, SP, 394 pp.

LU, H.; CHANDRASEKAR, B.; OELJEKLAUS, J.; MISAS-VILLAME, J. C.; WANG, Z.; SHINDO, T.; BOGYO, M.; KAISER, M.; VAN DER HOORN, R. A. L. Subfamily-specific fluorescent probes for cysteine proteases display dynamic protease activities during seed germination. **Plant physiology**, [s.l.], v. 168, n. 4, p. 1462-1475, 2015.

MACHADO, A. F.; CASTRO E SILVA, A.; RIBEIRO, H. C. T.; PROCÓPIO, A. R. D. L.; PINHEIRO, C. C. D. S.; MARTINS, J. R. D. S.; & SILVA, W. C. Biological activity of ethylic acetate, ethanolic and aqueous extracts of timbo (*Lonchocarpus floribundus*) on cattle tick. **Acta Amazonica**, [s.l.], v. 43, n. 2, p. 135-142, 2013.

MANSANO, V. F.; PINTO, R. B.; TORKE, B. M. 2015. *Swartzia* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.

MARTINEZ-MEDINA, A.; FLORS, V.; HEIL, M.; MAUCH-MANI, B.; PIETERSE, C. M. J.; POZO, M. J.; TON, J.; VAN DAM, N. M.; CONRATH, U. Recognizing plant defense priming. **Trends in plant science**, [s.l.], v. 21, n. 10, p. 818-822, 2016.

MÉLIDA, H.; SOPEÑA-TORRES, S.; BACETE, L.; GARRIDO-ARANDIA, M., JORDÁ, L.; LÓPEZ, G.; MUÑOZ-BARRIOS, A.; PACIOS, L. F.; MOLINA, A. Non-branched β -1, 3-glucan oligosaccharides trigger immune responses in Arabidopsis. **The Plant Journal**, [s.l.], v. 93, n. 1, p. 34-49, 2018.

MELO, V.M.M.; MEDEIROS, D.A.; RIOS, F.J.B.; CASTELAR, L.I.M.; CARVALHO, F.F.U. Antifungal properties of proteins (agglutinins) from the red alga *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux. **Botanica Marina**, [s.l.], v. 40, p. 281–284, 1997.

MIEDES, E.; VANHOLME, R.; BOERJAN, W.; MOLINA, A. The role of the secondary cell wall in plant resistance to pathogens. **Frontiers in plant science**, [s.l.], v. 5, p. 358, 2014.

MIRANDA JÚNIOR, R. N. C.; DOLABELA, M. F.; DA SILVA, M. N.; PÓVOA, M. M.; MAIA, J. G. S. Antiplasmodial activity of the andiroba (*Carapa guianensis* Aubl., Meliaceae) oil and its limonoid-rich fraction. **Journal of ethnopharmacology**, [s.l.], v. 142, n. 3, p. 679-683, 2012.

MMA. (2011). Subsídios para a Elaboração do Plano de Ação para a Prevenção e Controle do Desmatamento na Caatinga. Disponível em:<http://www.mma.gov.br/estruturas/168/_arquivos/diagnostico_do_desmatamento_na_caatinga_168.pdf>. Acessado em: 26 nov. 2014.

MONGE, E. C.; TUVENG, T. R.; VAAJE-KOLTAD, G.; EIJSINK, V. G. H; GARDNER, J. G. Systems analysis of the family Glycoside Hydrolase family 18 enzymes from *Cellvibrio japonicus* characterizes essential chitin degradation functions. **Journal of Biological Chemistry**, [s.l.], p. jbc. RA117. 000849, 2018.

MÜLLER, V.; BONACCI, G.; BATTHYANY, C.; AMÉ, M. V.; CARRARI, F.; GIECO, J.; ASIS, R. Peanut seed cultivars with contrasting resistance to *Aspergillus parasiticus* colonization display differential temporal response of protease inhibitors. **Phytopathology**, [s.l.], v. 107, n. 4, p. 474-482, 2017.

NARDI, M.; LIRA-GUEDES, A. C.; ALBUQUERQUE CUNHA, H. F.; GUEDES, M. C.; MUSTIN, K.; GOMES, S. C. P. Artisanal Extraction and Traditional Knowledge Associated with Medicinal Use of Crabwood Oil (*Carapa guianensis* Aublet.) in a Peri-Urban Várzea Environment in the Amazon Estuary. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, [s.l.], v. 2016. 2016.

NETO, J. X. S.; PEREIRA, M. L.; OLIVEIRA, J. T. A.; ROCHA-BEZERRA, L. C. B.; LOPES, T. D. P.; COSTA, H. P. S.; SOUSA, D. O. B.; ROCHA, B. A. M.; GRANGEIRO, T. B.; FREIRE, J. E. C.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O.; LOBO, M. D. P.; BRILHANTE, R. S. N.; VASCONCELOS, I. M. A chitin-binding protein purified from *Moringa oleifera* seeds presents anticandidal activity by increasing cell membrane permeability and reactive oxygen species production. **Frontiers in microbiology**, [s.l.], v. 8, p. 980, 2017.

NEVES-JUNIOR, W. F. P.; FERREIRA, M.; ALVES, M. C. O.; GRAEFF, C. F. O.; MULATO, M.; COUTINHO-NETTO, J.; BERNARDES, M. S. Influence of fabrication process on the final properties of natural-rubber latex tubes for vascular prosthesis. **Brazilian Journal of Physics**, [s.l.], v. 36, n. 2B, p. 586-591, 2006.

NG, T. B.; AU, T.K.; LAM, T.L.; YE, X.Y.; WAN, D.C.C Inhibitory effects of antifungal proteins on human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase, protease and integrase. **Life Sciences**, [s.l.], v. 70, p. 927-935, 2002.

NINOMIYA, K.; MIYAZAWA, S.; OZEKI, K.; MATSUO, N.; MURAOKA, O.; KIKUCHI, T.; YAMADA, T.; TANAKA, R.; MORIKAWA, T. Hepatoprotective limonoids from *Andiroba* (*Carapa guianensis*). **International journal of molecular sciences**, [s.l.], v. 17, n. 4, p. 591, 2016.

NUNES, S.; GARDNER, T.; BARLOW, J.; MARTINS, H.; SALOMÃO, R.; MONTEIRO, D.; SOUZA JR, C. Compensating for past deforestation: Assessing the legal forest surplus and deficit of the state of Pará, eastern Amazonia. **Land Use Policy**, [s.l.], v. 57, p. 749–758, 2016.

ODDEPALLY, R.; GURUPRASAD, L. Isolation, purification, and characterization of a stable defensin-like antifungal peptide from *Trigonella foenum-graecum* (fenugreek) seeds. **Biochemistry**, [s.l.], v. 80, n. 3, p. 332-342, 2015.

OERKE, E. C.; Crop losses to pests. **Journal of Agricultural Science**, [s.l.], v. 144, p. 31-43, 2006.

OERKE, E. C.; DEHNE, H. W. Safeguarding production - losses in major crops and the role of crop protection. **Crop Protection**, [s.l.], v. 23, p. 275-285, 2004.

OLIVEIRA, M. D. M.; VARANDA, C. M. R.; FÉLIX, M. R. F. Induced resistance during the interaction pathogen x plant and the use of resistance inducers. **Phytochemistry letters**, [s.l.], v. 15, p. 152-158, 2016.

ONG, M. K.; ALI, A. Antifungal action of ozone against *Colletotrichum gloeosporioides* and control of papaya anthracnose. **Postharvest Biology and Technology**, [s.l.], v. 100, p. 113-119, 2015.

OTTOBELLI, I.; FACUNDO, V. A.; ZULIANI, J.; LUZ, C. C.; BRASIL, H. O. B.; MILITÃO, J. S. L. T.; BRAZ-FILHO, R. Estudo químico de duas plantas medicinais da Amazônia: *Philodendron scabrum* k. Krause (Araceae) e *Vatairea guianensis* aubl. (Fabaceae). **Acta Amazonica**, [s.l.], v. 41, n. 3, p. 393 – 400, 2011.

OWOLADE, O.F.; AMUSA, A.N.; OSIKANLU, Y.O.Q. Efficacy of certain indigenous plant extracts against seed-borne infection of *Fusarium moniliforme* on maize (*Zea mays* L.) in south western Nigeria. **Cereal Research Communications**, [s.l.], v.28, p.323- 327, 2000.

PARK, E. Y.; KIM, J. A.; KIM, H. W.; KIM, Y. S.; SONG, H. K. Crystal structure of the Bowman-Birk inhibitor from barley seeds internary complex with porcine trypsin. **Journal of Molecular Biology**, [s.l.], v. 343, p. 173 – 186, 2004.

PATIL, R. S.; GHORMADE, V.; DESHPANDE, M. V. Chitinolytic enzymes: an exploration. **Enzyme and Microbial Technology**, [s.l.], v. 26, p. 473–483, 2000.

PAULA-FREIRE, L. G.; ANDERSEN, M. L.; MOLSKA, G. R.; KÖHN, D. O.; CARLINI, E. L. A. Evaluation of the antinociceptive activity of *Ocimum gratissimum* L. (Lamiaceae) essential oil and its isolated active principles in mice. **Phytotherapy Research**, [s.l.], v. 27, p. 1220–1224, 2013.

PAUW, E.; ELOFF, J. N. Which tree orders in southern Africa have the highest antimicrobial activity and selectivity against bacterial and fungal pathogens of animals?. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 14, n. 1, p. 317, 2014.
PAYAN, F.; FLATMAN, R.; PORCIERO, S.; WILLIAMSON, G.; JUGE, N.; ROUSSE, A. Structural analysis of XIP-I, a xylanase protein inhibitor from wheat. **Biochemical Journal**, [s.l.], v. 372, p. 399-405, 2003.

PEIXOTO, H.; ROXO, M.; RÖHRIG, T.; RICHLING, E.; WAN, X.; WINK, M. Anti-Aging and Antioxidant Potential of *Paullinia cupana* var. *sorbilis*: Findings in *Caenorhabditis elegans* Indicate a New Utilization for Roasted Seeds of Guarana. **Medicines**, [s.l.], v. 4, n. 3, p. 61, 2017.

PEREZ, E.L. 2008. A diversidade vegetal da Amazônia e o Patrimônio Genético Mundial, p.39-52. In: Borém, A.; Lopes, M.T.G.; Clement, C.R. (Eds.). **Domesticação e melhoramento: espécies amazônicas**. Editora UFV, Viçosa.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. Lectins as plant defense proteins. **Plant physiology**, [s.l.], v. 109, n. 2, p. 347, 1995.

PHILIBERT, T.; LEE, B. H.; FABIEN, N. Current status and new perspectives on chitin and chitosan as functional biopolymers. **Applied biochemistry and biotechnology**, [s.l.], v. 181, n. 4, p. 1314-1337, 2017.

POLHILL, R. M. Papilionoideae. In: POLHILL, R. M.; RAVEN, P. H., (eds.). **Advances in Legume Systematics part I**. Royal Botanic Gardens, Kew. 1981.

PUGLIESE, A. G.; TOMAS-BARBERAN, F. A.; TRUCHADO, P.; GENOVESE, M. I. Flavonoids, proanthocyanidins, vitamin C, and antioxidant activity of *Theobroma grandiflorum* (Cupuassu) pulp and seeds. **Journal of agricultural and food chemistry**, [s.l.], v. 61, n.11, p. 2720-2728, 2013.

RAHMAN, A. Y. A.; USHARRAJ, A. O.; MISRA, B. B.; THOTTATHIL, G. P.; JAYASEKARAN, K.; FENG, Y.; HOU, S.; ONG, S. Y.; NG, F. L.; LEE, L. S.; TAN, H. S.; SAKAFF, M. K. L. M.; TEH, B. S.; KHOO, B. F.; BADAI, S. S.; AZIZ, N. A.; YURYEV, A.; KNUDSEN, B.; DIONNE-LAPORTE, A.; MCHUNU, N. P.; YU, Q.; LANGSTON, B. J.; FREITAS, T. A. K.; YOUNG, A. G.; CHEN, R.; WANG, L.; NAJIMUDIN, N.; SAITO, J. A.; ALAM, M. Draft genome sequence of the rubber tree *Hevea brasiliensis*. **BMC genomics**, [s.l.], v. 14, n. 1, p. 75, 2013.

RAPOSO, J. D. A.; NEVES, F. G.; DE AGUIAR, W. A.; MAGALHÃES, P. M.; SILVA, R.; MAIA, J. G. S.; MOURÃO, R. H. V. Cultivation of Guaco (*Mikania laevigata* Sch. Bip. ex Baker) in the Lower Amazon River and monitoring of coumarin, its principal active constituent. **Revista Fitos Eletrônica**, [s.l.], v. 10, N.3, p. 227-237, 2017.

RATHORE, A. S.; GUPTA, R. D. Chitinases from bacteria to human: properties, applications, and future perspectives. **Enzyme research**, [s.l.], v. 2015, 2015.

REGENTE, M.; TAVEIRA, G. B.; PINEDO, M.; ELIZALDE, M. M.; TICCHI, A. J.; DIZ, M. S. S.; CARVALHO, A. O.; LA CANAL, L.; GOMES, V. M. A sunflower lectin with antifungal properties and putative medical mycology applications. **Current microbiology**, [s.l.], v. 69, n. 1, p. 88-95, 2014.

RIBEIRO, J. E. L. S.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, M. A.; BRITO, J. M.; SOUZA, M. A. D.; MARTINS, L. H. P.; LOHMANN, L. G.; ASSUNÇÃO, P. A. C. L.; PEREIRA, E. C.; SILVA, C. F.; MESQUITA, M. R.; PROCÓPIO, L. C. Flora da Reserva Ducke: Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central. Manaus: INPA, 1999. 799p.

RODRIGUES, K.; RAMOS, D. F.; CARRION, L. L.; CURSINO, L. M.; JEFREYS, M. F.; PEDROZA, L. S.; OSÓRIO, M. I. C.; OLIVEIRA, J. L.; ANDRADE, J. I. A.; FERNANDES, C. C.; NUNEZ, C. V.; SILVA, P. E. A. Antifungal activity of brazilian amazon plants extracts against some species of candida spp. **International Journal of Pharmacology**, [s.l.], v. 5, n. 6, p. 445-53, 2014.

ROZWALKA, L.C.; LIMA, M.L.R.Z.C.; MIO, L.L.M.; NAKASHIMA, T. Extratos, decoctos e óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas na inibição de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* de frutos de goiaba. **Ciência Rural**, [s.l.], v.38, n.2, p.301-307, 2008.

SAHAI, A.S.; MANOCHA, M.S. Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. **Federation of European Microbiological Societies**, [s.l.], v.11, p. 317–338, 1993.

SANO, E. E.; ROSA, R.; BRITO, J. L. S.; FERREIRA, L. G. Land cover mapping of the tropical savanna region in Brazil. **Environmental Monitoring and Assessment**, [s.l.], v.166, p. 113-124, 2010.

SANTOS, J. C.; LEAL, I. R.; CORTEZ, J. S. A.; FERNANDES, G. W.; TABARELLI, M. Caatinga: the scientific negligence experienced by a dry tropical forest. **Tropical Conservation Science**, [s.l.], v. 4, p. 276-286, 2011.

SANTOS, M. R. A.; LIMA, M. R.; OLIVEIRA, C. L. L. G. Medicinal plants used in rondônia, Western amazon, Brazil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, [s.l.], v. 16, n. 3, p. 707-720, 2014.

SARMA, B. K.; YADAV, S. K.; SINGH, S.; SINGH, H. B. Microbial consortium-mediated plant defense against phytopathogens: readdressing for enhancing efficacy. **Soil Biology and Biochemistry**, [s.l.], v. 87, p. 25-33, 2015.

SAVATIN, D. V.; GRAMEGNA, G.; MODESTI, V.; CERVONE, F. Wounding in the plant tissue: the defense of a dangerous passage. **Frontiers in plant science**, [s.l.], v. 5, p. 470, 2014.

SCHLESIER, B. Crystal structure of Concanavalin B at 1.65 Å resolution. An SELS, J.; MATHYS, J.; DE CONINCK, B.M.; CAMMUE, B.P.; DE BOLLE, M.F. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. **Plant Physiology and Biochemistry**, [s.l.], v. 46, p. 941–950, 2008.

SCHWARZ, E. N.; RUHLMAN, T. A.; WENG, M.; KHIYAMI, M. A.; SABIR, J. S. M.; HAJARAH, N. H.; ALHARBI, N. S.; RABAH, S. O.; JANSEN, R. K. Plastome-wide nucleotide substitution rates reveal accelerated rates in Papilionoideae and correlations with genome features across legume subfamilies. **Journal of molecular evolution**, [s.l.], v. 84, n. 4, p. 187-203, 2017.

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 (common name: sucuba). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s.l.], v. 104, n. 4, p. 659-661, 2009.

SFB. (2017). Serviço Florestal Brasileiro. Disponível em:<<http://www.florestal.gov.br/snif/recursos-florestais/os-biomas-e-suas-florestas>>. Acesso em: 7 ago. 2017.

SHAKHBAZAU, A.V.; KARTEL, N.A. Chitinases in Bioengineering Research. **Russian Journal of Genetics**, [s.l.], v. 44, p. 881-889, 2008.

SILVA, N. C. M.; CONCEIÇÃO, J. G.; VENTURY, K. E.; DE SÁ, L. F. R.; OLIVEIRA, E. A. G.; SANTOS, I. S.; GOMES, V. M.G.; COSTA, M. N. C.; FERREIRA, A. T. S. F.; PERALES, J.; XAVIER-FILHO, J.; FERNANDES, K. V. S.; OLIVEIRA, A. E. A. Soybean seed coat chitinase as a defense protein against stored product pest *Callosobruchus maculatus*. **Pest management science**, 2017.

SILVA, T. P.; SILVA, E. M. J.; AMORIM, I. A.; AQUINO, A. L.; MATOS, T. E. S.; DIEGO, M. R. Levantamento de espécies vegetais e utilização em quintal agroflorestal de estabelecimento agrícola no Assentamento Alegria - MARABÁ, PARÁ. **Agroecossistemas**, [s.l.], v. 6, n. 1, p. 103-109, 2014.

SITOHY, M.; DOHEIM, M.; BADR, H. Isolation and characterization of a lectin with antifungal activity from Egyptian *Pisum sativum* seeds. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 104, n. 3, p. 971-979, 2007.

SMITH, D. L.; DUSHOFF, J.; PERENCEVICH, E. N.; HARRIS, A. D.; LEVIN, S. A. Persistent colonization and the spread of antibiotic resistance in nosocomial pathogens: resistance is a regional problem. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s.l.], v. 101, n. 10, p. 3709-3714, 2004.

SOUZA, L. A. G. 2012. **Biodiversidade e importância madeireira das Fabaceae da Amazônia brasileira**. In: Vianez, Bazilio Frasco; Varejão, Maria de Jesus Coutinho; Abreu, Raimunda Liége Souza; Sales-Campos, Ceci. (Org.). Potencial tecnológico de madeiras e resíduos florestais da Amazônia Central. 1 ed. Manaus, AM: Editora do INPA, 1, 11-30.

SPRACKLEN, D.V.;ARNOLD, S.R.; TAYLOR, C.M. Observations of increased tropical rainfall preceded by air passage over forests. **Nature**, [s.l.], v. 489, n. 7415, p. 282, 2012.

SRIDEVI, G.; PARAMESWARI, C.; SABAPATHI, N.; RAGHUPATHY, V.; VELUTHAMBI, K. Combined expression of chitinase and β -1, 3-glucanase genes in indica rice (*Oryza sativa* L.) enhances resistance against *Rhizoctonia solani*. **Plant Science**, [s.l.], v. 175, p. 283–290, 2008.

STINTZI, A.; HEITZ, T.; PRASAD, V.; WIEDEMANN-MERDINOGLUS, S.; KAUFFMANN, S.; GEOFFROY, P.; LEGRAND, M.; FRITIG, B. Plant pathogenesis related proteins and their role in defense against pathogens. **Biochimie**, [s.l.], v. 75, p. 687-706, 1993.

TALARCZYK, A; HENNIG, J. Early defense responses in plants infected with pathogenic organisms. **Cellular & Molecular Biology Letters**, [s.l.], v. 6, p. 955-970, 2001.

TORQUATO, T. M.; ROSA, S. R. F.; ROSA, M. F. F.; TAHMASEBI, R. Úlceras por pressão: proposta de um colchão inteligente derivado do látex natural (*Hevea brasiliensis*). **Ciência & Engenharia**, [s.l.], v. 24, n. 2, p. 47-57, 2016.

TRINDADE, M. B.; LOPES, J. L.; SOARES-COSTA, A.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C.; MOREIRA, R. A.; OLIVA, M. L.; BELTRAMINI, L. M. Structural characterization of novel chitin-binding lectins from the genus *Artocarpus* and their antifungal activity. **Biochimica et Biophysica Acta**, [s.l.], v. 1764, p. 146–152, 2006.

ULLAH, A.; HUSSAIN, A.; SHABAN, M.; KHAN, A. H.; ALARIQI, M.; GUL, S.; JUN, Z.; LIN, S.; LI, J.; JIN, S.; MUNIS, M. F. H. Osmotin: A plant defense tool against biotic and abiotic stresses. **Plant Physiology and Biochemistry**, 2017.

VAIKUNTAPU, P. R.; RAMBABU, S.; MADHUPRAKASH, J.; PODILE, A. A new chitinase-D from a plant growth promoting *Serratia marcescens* GPS5 for enzymatic conversion of chitin. **Bioresource technology**, [s.l.], v. 220, p. 200-207, 2016.

UNHELKAR, M. H.; DUONG, V. T.; ENENDU, K. N.; KELLY, J. E.; TAHIR, S.; BUTTS, C. T.; MARTIN, R. W. Structure prediction and network analysis of chitinases from the *Cape sundew*, *Drosera capensis*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, [s.l.], v. 1861, n. 3, p. 636-643, 2017.

UPASANI, M. L.; GURJAR, G. S.; KADDOO, N. Y.; GUPTA, V. S. Dynamics of colonization and expression of pathogenicity related genes in *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* during chickpea vascular wilt disease progression. **PloS one**, [s.l.], v. 11, n. 5, p. e0156490, 2016.

VAN DER HOORN, R. A. L. (2008). Plant proteases: from phenotypes to molecular mechanisms. **Annual Review of Plant Biology**, [s.l.], v. 59, p. 191–223, 2008.

VAN LOON, L. C.; VAN KAMMEN, A. Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. "Samsun" and "Samsun NN". Changes in protein constitution after infection with TMV. **Virology**, [s.l.], v. 40, p. 199-211, 1970.

VENTUROSO, L. R.; BACCHI, L. M. A.; GAVASSONI, W. L.; CONUS, L. A.; PONTIM, B. C. A.; BERGAMIN, A. C. Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fitopatógenos. **Summa Phytopathologica**. [s.l.], v. 37, n. 1, p. 18-23, 2011.

WATANABE, T.; KANAI, R.; KAWASE, T.; TANABE, T.; MISUTOMI, M.; SAKUDA, S.; MIYASHITA, K. Family 19 chitinase of *Streptomyces* species: characterization and distribution. **Microbiology**, [s.l.], v. 145, p. 3353-3363, 1999.

YANG, H.; PROTIVA, P.; CUI, B.; MA, C.; BGGETT, S.; HEQUET, V.; MORI, S.; WEINSTEIN, I. B.; KENNELLY, E.J. New bioactive polyphenols from *Theobroma grandiflorum* ("Cupuaçu"). **Journal of Natural Products**, [s.l.], v. 66, p.1501-1504, 2003.

YOUNES, I; RINAUDO, M. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. **Marine drugs**, [s.l.], v. 13, n. 3, p. 1133-1174, 2015.

ZAPPI, D. C.; FILARDI, F. L. R.; LEITMAN, P.; SOUZA, V. C.; WALTER, B. M. T.; PIRANI, J. R. ; MORIN, M. P.; QUEIROZ, L. P.; CAVALCANTI, T. B.; MANSANO, V. F.; FORZZA, R. C. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, [s.l.], v. 66, n. 4, p. 1085-1113, 2015.