



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

LETICIA DOS SANTOS SOUZA

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE UMA QUITINASE
DE *Parkia multijuga* COM AÇÃO ANTIFÚNGICA

FORTALEZA

2018

LETICIA DOS SANTOS SOUZA

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE UMA QUITINASE DE
Parkia multijuga COM AÇÃO ANTIFÚNGICA

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira.

Co-orientadora: Msc. Mariana Reis Arantes.

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S239p Souza, Letícia dos Santos.
Purificação e caracterização bioquímica de uma quitinase de *Parkia multijuga* com ação antifúngica / Letícia dos Santos Souza. – 2018.
97 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências,
Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2018.

Orientação: Prof. Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira.
Coorientação: Profa. Ma. Mariana Reis Arantes.

1. *Parkia multijuga*. 2. Quitinase. 3. Fungos Fitopatogênicos. I. Título.

CDD 570

LETICIA DOS SANTOS SOUZA

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE UMA QUITINASE DE
Parkia multijuga COM AÇÃO ANTIFÚNGICA

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira.

Co-orientadora: Msc. Mariana Reis Arantes.

Aprovada em: 05/12/18.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira (Orientador)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Lucas Pinheiro Dias

Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

Aos meus pais.

A minha irmã e amiga Larissa.

Ao meu querido esposo Edson.

Aos meus amigos do LPVD.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus, que me abençoa imensamente todos os dias, que tem me dado força, coragem e perseverança para não desistir dos meus sonhos e que mantem minha esperança e fé que dias melhores virão.

À minha família, por todo o apoio nessa jornada maravilhosa e estressante que é a Universidade.

À minha mãe, que é meu exemplo de força, que nunca me deixou faltar nada, que se dedicou e trabalhou muito para me proporcionar uma ótima educação, que me ensinou os valores que levarei por toda minha vida.

À minha querida e chorona irmã Larissa, que não me abandona mesmo nos momentos mais difíceis, que se alegra e se desespera junto a mim, que é minha companheira para o que der e vier, que é minha melhor amiga.

Ao meu irmãozinho Miguel, que me ensinou o que é amor incondicional e o que é ter verdadeiras responsabilidades como irmã mais velha.

Ao meu querido e amado esposo Edson, por todo apoio, paciência, críticas e incentivos, que não me deixou desistir diante das dificuldades, que me ama incondicionalmente e me proporciona experiências maravilhosas.

Ao Professor Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira, por ter me acolhido no LPVD, por todo zelo, conhecimento e paciência dedicado a este trabalho. Por ter feito parte da minha construção como cientista, por ter enriquecido minha formação. Por ter confiado esta pesquisa a mim.

Ao Professor Dr. Thalles Barbosa Grangeiro, por ter aceitado participar da banca examinadora deste trabalho, por todas as suas colocações e sugestões que ajudaram a enriquecer o trabalho.

À minha linda e maravilhosa co-orientadora e chefe Mariana Reis, por ter me adotado como filha científica. Por toda paciência, tempo, sabedoria e ensinamentos dedicados á mim. Por ter me incentivado e motivado a realizar este trabalho, mesmo quando tive vontade de desistir. Por todos os puxões de orelhas, por todo carinho e confiança. Por ser minha amiga e virginiana.

Ao meu querido e maravilhoso co-co-orientador Lucas Pinheiro, por ter me acolhido como IC agregada. Por todo o conhecimento e ideias que compartilhou comigo para enriquecer este trabalho. Por toda a ajuda com os ensaios antifúngicos, que sem ele os ensaios não teriam sido realizados. Por todo o tempo dedicado na construção e correção da escrita deste trabalho. Por ser um ótimo amigo e exemplo de pesquisador.

À Nadine linda, que me incentivou, que aumentou minha auto-estima, que é um dos meus exemplos de pessoa incrível. Que juntamente com o Lucas, me ajudou com os ensaios antifúngicos. Que sempre me diz pra não deixar a peteca cair.

À Helen, por toda dedicação e paciência. Por estar sempre disposta a me ajudar. Por toda a ajuda e orientação nos ensaios, que sem ela não teriam sido realizados. Pelo tempo dedicado a correção deste trabalho.

Ao Handerson, por toda a ajuda com os ensaios quitinásicos.

Aos meus amigos do LPVD, que durante a realização dos experimentos me ajudaram muito. Que me fizeram rir mesmo nos momentos mais estressantes. Por terem me mostrado que nada é tão ruim que não possa piorar. Por terem me acolhido na família LPVD.

Agradeço.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

As atividades experimentais que compõem esta monografia foram realizadas com o apoio dos seguintes Programas/ Instituições:

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ - através das atividades de capacitação no ensino e pesquisa em Bioquímica realizadas em parceria com o **Laboratório de Proteínas Vegetais de Defesa - LPVD**, sob a coordenação do Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira.

CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO (CNPq) E CORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO PESSOAL E DE ENSINO SUPERIOR (CAPES) – Através da concessão de bolsa de Iniciação Científica ao autor deste trabalho e por terem contribuído para a melhoria nas condições experimentais e na formação de recursos humanos dentro do Programa de Iniciação Científica da UFC.

“Há coisas mais importantes, como amizade e bravura.”

Hermione Granger

“São nossas escolhas, mais do que as nossas capacidades que mostram quem realmente somos.”

Alvo Dumbledore

RESUMO

Os fungos destacam-se por ocasionar grandes perdas nas principais culturas agrícolas e desencadear doenças em animais e humanos. Grandes investimentos são voltados para o desenvolvimento de drogas, mas muitos fungos desenvolvem resistência aos tratamentos. Assim, a busca por novas moléculas antifúngicas tornou-se incessante. O presente trabalho teve como objetivo a prospecção de proteínas de sementes de *Parkia multijuga* com ação antimicrobiana, que possam ser utilizadas como alternativas de controle de fungos de importância para agricultura e saúde humana. Inicialmente, o tampão glicina 0,1 M, pH 9,0, acrescido de NaCl 0,15 M foi estabelecido como sendo o melhor tampão de extração de proteínas. Em seguida, o extrato proteico e o resíduo resultante foram fracionados utilizando diferentes métodos e solventes, para obtenção das frações albumina, globulina, prolamina e glutelinas básica e ácida. A fração globulínica apresentou atividade contra os fungos *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Botrytis cinerea*, *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*. Diante desses resultados, deu-se prosseguimento com a caracterização de proteínas bioativas presentes nas frações proteicas, sendo detectadas as atividades quitinásicas e beta-1,3-glucanásicas, proteínas tóxicas a fungos. Como passo posterior, a fração globulínica foi submetida à cromatografia de troca iônica em matriz de DEAE-celulose. O pico eluído com tampão glicina 0,1 M, pH 9,0, acrescido de NaCl 0,4 M, apresentou uma banda proteica em SDS-PAGE e aumento da atividade quitinásica específica em 44 vezes quando comparada à atividade encontrada na fração globulínica. A quitinase purificada apresentou massa molecular aparente de 65 kDa, mostrou ter pH ótimo 7,0, temperatura ótima de atividade a 45 °C. A quitinase apresentou atividade contra os fungos *Glomerella cingulata* e *Penicillium herquei*, os quais apresentaram aumento da permeabilidade celular. Com isso, a Pm-Chi mostrou possuir potencial biotecnológico para ser aplicada como alternativa de controle a pragas agrícolas.

Palavras-chave: *Parkia multijuga*, quitinase, fungos fitopatogênicos.

ABSTRACT

The fungi stand out because they cause great losses in the main agricultural crops and trigger diseases in animals and humans. Big investments are focused on drug development, but many fungi develop resistance to treatments. Thus, the search for new antifungal molecules has become incessant. The present work aimed to prospect proteins from *Parkia multijuga* seeds with antimicrobial action, which could be used as alternatives to control fungi of importance for agriculture and human health. Initially, the 0.1 M glycine buffer, pH 9.0, with 0.15 M NaCl was established as the best protein extraction buffer. Then, the protein extract was fractionated using different methods and solvents to obtain the albumin, globulin, prolamin and acid and basic glutelin fractions. The globulin fraction was active against *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Botrytis cinerea*, *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*. In view of these results, we proceeded with the characterization of bioactive proteins present in the globulin fraction, being detected the chitinase and beta-1,3-glucanase activities, proteins toxic to fungi. As a further step, the globulin fraction was subjected to ion exchange chromatography on a DEAE-cellulose matrix. Proteins eluted with 0.1 M glycine buffer, pH 9.0, with 0.4 M NaCl, presented a protein band on SDS-PAGE and increased chitinase activity by 44-fold when compared to the activity found in the globulin fraction. The purified chitinase had an apparent molecular weight of 65 kDa, showed a pH optimum of 7.0 and optimum temperature of activity at 45 °C. Chitinase showed activity against the fungi *Glomerella cingulata* and *Penicillium herquei*, which showed increased cellular permeability. With this, *Pm*-Chi was shown to have biotechnological potential to be used as an alternative for agricultural pest control.

Key words: *Parkia multijuga*, chitinase, phytopathogenic fungi.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Árvore da espécie <i>Parkia multijuga</i>	31
Figura 2	Fluxograma de fracionamento das proteínas de acordo com a solubilidade em vários solventes	36
Figura 3	Teor de proteínas dos extratos das sementes de <i>P. multijuga</i>	48
Figura 4	Perfis proteicos de extratos das sementes de <i>P. multijuga</i> após eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE-SDS; 12,5%)	49
Figura 5	Teor de proteínas das frações obtidas a partir do extrato total de sementes de <i>P. multijuga</i>	50
Figura 6	Perfis proteicos das frações obtidas a partir do extrato total de sementes de <i>P. multijuga</i> após eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE-SDS; 12,5%).....	50
Figura 7	Germinação dos esporos de <i>F. oxysporum</i> incubados com as frações proteicas do extrato obtido de sementes de <i>P. multijuga</i>	53
Figura 8	Germinação dos esporos de <i>F. solani</i> incubados com as frações proteicas do extrato obtido de sementes de <i>P. multijuga</i>	54
Figura 9	Germinação dos esporos de <i>B. cinerea</i> incubados com as frações proteicas do extrato obtido de sementes <i>P. multijuga</i>	55
Figura 10	Curva de crescimento do <i>F. oxysporum</i> na presença das frações proteicas do extrato obtido de sementes de <i>P. multijuga</i>	56
Figura 11	Curva de crescimento do fungo <i>F. solani</i> na presença das frações proteicas do extrato obtido das sementes de <i>P. multijuga</i>	56
Figura 12	Curva de crescimento do fungo <i>B. cinerea</i> na presença das frações proteicas do extrato obtido das sementes de <i>P. multijuga</i>	57
Figura 13	Curvas de crescimento das leveduras <i>C. krusei</i> (A), <i>C. parapsilosis</i> (B), <i>C. tropicalis</i> (C) e <i>C. albicans</i> (D) na presença das frações proteicas do extrato obtido das sementes de <i>P. multijuga</i>	58
Figura 14	Perfil da fração globulina (20 mg), oriunda do extrato obtido das sementes de <i>P. multijuga</i> , após cromatografia de afinidade em matriz de quitina equilibrada com tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0, e a fração retida eluída com tampão glicina-HCl 0,1 M, pH 2,6, ambos acrescido de NaCl 0,15 M	60
Figura 15	Perfil da fração globulina (20 mg), oriunda do extrato obtido das sementes de <i>P. multijuga</i> , após cromatografia de afinidade em matriz de quitina equilibrada com tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0, contendo NaCl 0,15 M, e a fração retida eluída com HCl 0,1 M.....	60
Figura 16	Perfil da fração globulina, oriunda do extrato obtido das sementes de <i>P. multijuga</i> , após cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephacel	61

Figura 17 Perfil do pico 2, retido na matriz de DEAE-Sephacel, após eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE-SDS; 12,5%)	62
Figura 18 Zimograma para confirmação da atividade quitinolítica da <i>Pm</i> -Chi (pico retido em DEAE-Sephacel)	65
Figura 19 Perfil da fetuina e <i>Pm</i> -Chi após PAGE-SDS (12,5%) e coloração de Schiff	65
Figura 20 – Determinação do pH ótimo de <i>Pm</i> -Chi	66
Figura 21 Temperatura ótima de atividade quitinolítica da <i>Pm</i> -Chi	66
Figura 22 Perfil de eluição da <i>Pm</i> -Chi após aplicação em coluna de quitina	67
Figura 23 Fotomicrografia típica dos esporos de <i>G. cingulata</i> usada para avaliação de sua germinação e crescimento na presença de <i>Pm</i> -Chi	68
Figura 24 Fotomicrografia típica dos esporos de <i>P. herquei</i> usada para avaliação de sua germinação e crescimento na presença de <i>Pm</i> -Chi	68
Figura 25 Fotomicrografia típica usada para avaliação da permeabilidade da superfície celular de esporos de <i>P. herquei</i> após incubação com <i>Pm</i> -Chi	70
Figura 26 Fotomicrografia típica usada para avaliação da permeabilidade da superfície celular de esporos de <i>G. cingulata</i> após incubação com <i>Pm</i> -Chi.....	71
Figura 27 Fotomicrografia típica usada para avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em esporos de <i>G. cingulata</i> incubados com <i>Pm</i> -Chi.....	72
Figura 28 Fotomicrografia típica usada para avaliação da indução da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em esporos de <i>P. herquei</i> incubados com <i>Pm</i> -Chi	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Proteínas bioativas presentes nas frações proteicas obtidas a partir da farinha delipidada de sementes de <i>P. multijuga</i>	51
Tabela 2	Purificação e rendimento da quitinase presente em sementes de <i>Parkia multijuga</i> (<i>Pm-Chi</i>).....	63

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1. Fungos fitopatogênicos	21
2.2. Fungos leveduriformes – patógenos hospitalares.....	24
2.3. Proteínas vegetais como alternativas para controle de patógenos de plantas.....	25
2.4. Quitinases	26
2.4.1. Classificação das quitinases	27
2.4.2. Diversidade de funções das quitinases	28
2.4.3. Quitinases de plantas.....	28
2.5. <i>Parkia multijuga</i> Benth	30
3. OBJETIVOS	32
3.1. Objetivo geral.....	32
3.2. Objetivos específicos.....	32
4. MATERIAIS	33
4.1. Reagentes químicos.....	33
4.2. Material biológico	33
5. MÉTODOS.....	34
5.1. Extração das proteínas.....	34
5.2. Obtenção das frações proteicas	34
5.3. Determinação de proteínas totais solúveis	37
5.4. Eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida, em condições desnaturantes (PAGE-SDS)	37
5.5. Ensaio de inibição do crescimento de fungos leveduriformes patogênicos	38
5.6. Ensaio de inibição da germinação de esporos e de inibição de crescimento de fungos fitopatogênicos	38
5.7. Detecção de proteínas antifúngicas	39
5.7.1. Detecção de quitinase (QUI)	40
5.7.2. Detecção de β -1,3-glucanase	40
5.7.3. Detecção de inibidores de proteases serínicas.....	41
5.7.4. Detecção de inibidores de proteases cisteínicas	42

5.8. Purificação da Quitinase <i>Pm-Chi</i>	43
5.8.1. Cromatografia de afinidade em matriz de quitina	43
5.8.2. Cromatografia de troca iônica em matriz de DEAE-Sephacel	43
5.9. Caracterização bioquímica da quitinase <i>Pm-Chi</i>	44
5.9.1. Eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida para detecção de atividade quitinásica (zimograma).....	44
5.9.2. Eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida para detecção de carboidratos na <i>Pm-Chi</i>	45
5.9.3. Avaliação do pH ótimo da <i>Pm-Chi</i>	45
5.9.4. Cromatografia de afinidade da quitinase isolada de sementes de <i>P. multijuga</i> (<i>Pm-Chi</i>) em matriz de quitina.....	45
5.9.5. Avaliação da temperatura ótima da <i>Pm-Chi</i>	46
5.10. Avaliação da atividade antifúngica da <i>Pm-Chi</i>	46
5.11. Avaliação parcial de mecanismo da ação antifúngica da <i>Pm-Chi</i>	46
5.11.1. Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em fungos tratados com a quitinase	46
5.11.2. Avaliação da integridade da membrana celular de fungos fitopatogênicos tratados com a quitinase	47
6. RESULTADOS	48
6.1. Extração de proteínas de sementes de <i>P. multijuga</i>	48
6.2. Obtenção de frações proteicas a partir do extrato de sementes de <i>P. multijuga</i>	49
6.3. Detecção de proteínas antifúngicas nas frações proteica do extrato das sementes de <i>P. multijuga</i>	51
6.4. Ensaio de inibição de crescimento e germinação de fungos filamentosos e leveduriformes.....	52
6.5. Purificação da quitinase <i>Pm-Chi</i>	59
6.6. Caracterização bioquímica da quitinase <i>Pm-Chi</i>	64
6.6.1. Zimograma para confirmação da atividade quitinásica da <i>Pm-Chi</i>	64
6.6.2. Detecção de glicosilação na quitinase <i>Pm-Chi</i>	64
6.6.3. Determinação do pH ótimo da <i>Pm-Chi</i>	64
6.6.4. Temperatura ótima de atividade quitinolítica da <i>Pm-Chi</i>	64
6.6.5. Avaliação da afinidade da <i>Pm-Chi</i> por quitina	67
6.7. Germinação e crescimento de fungos filamentosos na presença de <i>Pm-Chi</i>	67
6.8. Parcial mecanismo de ação da <i>Pm-Chi</i>	69

6.8.1. CIM da <i>Pm</i> -Chi	69
6.8.2. Efeito da <i>Pm</i> -Chi sobre a permeabilidade celular dos esporos de <i>P. herquei</i> e <i>G. cingulata</i>	69
7. DISCUSSÃO	74
8. CONCLUSÃO.....	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

1. INTRODUÇÃO

A agricultura em todo o mundo sofre grandes perdas devido a doenças causadas por fungos. O controle dessas doenças tem sido feito principalmente por meio da utilização de defensivos agrícolas. São produtos como inseticidas, fungicidas, herbicidas, vermífugos e solventes que no país, apresentam uma taxa de 3,2 kg de defensivos por hectare, em 2018, o Brasil completa 10 anos na liderança de maior consumidor de defensivos agrícolas do planeta (Ministério do Meio Ambiente, 2018). Apenas no Brasil, o consumo anual desses compostos tem sido superior a 300 mil toneladas de produtos comerciais, representando um aumento no consumo de defensivos de 700% nos últimos quarenta anos, contrapondo-se a um aumento de apenas 78% na área agrícola nesse período (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2018).

O uso indiscriminado e sem acompanhamento de defensivos agrícolas industrializados, os quais são utilizados 7,3 litros por habitante, tem induzido o surgimento de populações resistentes de patógenos de plantas, fazendo com que os agricultores aumentem, por sua conta, a dose dos produtos utilizados, como forma de manter sob controle as doenças e a viabilidade econômica da produção. Conseqüentemente, o desenvolvimento de produtos agrícolas com baixo nível residual de pesticidas é cada vez mais demandado. O uso de produtos derivados da indústria química no controle de doenças na agricultura moderna tem sido amplamente questionado pela sociedade, em decorrência dos efeitos adversos causados por estes (KOEPF *et al.*, 1986; PAULA JR. *et al.*, 2006).

A exploração da atividade biológica de compostos do metabolismo primário e secundário de plantas constitui, ao lado da indução da resistência, uma forma efetiva de controle de doenças em plantas cultivadas (COLIN, 2006). Similarmente à perspectiva de uso na Agricultura, muitas plantas podem ser utilizadas como fonte de moléculas bioativas de relevância na Saúde, subsidiando a produção de novos medicamentos para o tratamento de infecções causadas por fungos leveduriformes. Os mecanismos de ação dessas biomoléculas obtidas a partir das plantas são diversificados, em contraste com os antibióticos convencionais, representando, dessa forma, uma fonte promissora de novas drogas (ALMEIDA, 2010).

Com isso, a ação de vários extratos brutos, óleos essenciais e compostos isolados de extratos de plantas sobre o desenvolvimento de diversos microrganismos, como fungos filamentosos, leveduras e bactérias já foi avaliada (TEGEGNE; PRETORIUS; SWART, 2008; TOMAZONI *et al.*, 2017; SOUSA *et al.*, 2018). Dentre os diversos compostos químicos produzidos pelas plantas, as proteínas constituem um grupo especial de moléculas bioativas, apresentando grande potencial para aplicação biotecnológica no combate a pragas no campo, bem como no controle de fungos patogênicos a humanos. Várias são as proteínas vegetais com propriedades bioativas, incluindo lectinas, inibidores de proteases e de alfa-amilases, proteínas inativadoras de ribossomos e toxinas (MORAIS *et al.*, 2010; FREIRE *et al.*, 2012). De modo geral, essas proteínas têm sido detectadas em todos os tecidos vegetais, tendo sido isoladas de raízes, caules, bulbos, folhas, frutos, sementes e flores.

Organismos patogênicos podem ser controlados pela degradação de estruturas vitais (cutículas e membranas de insetos, parede celular de fungos e casca de ovos de nematóides) onde a quitina desempenha um papel fundamental e pode ser considerada uma molécula alvo para agentes biocidas (SPINDLER *et al.*, 1990; COHEN, 1993; COHEN, 2001; SHAIK; DESHPANDE, 1993; HERRERA-ESTRELLA; CHET, 1999). Dessa forma, o uso de quitinases como ferramenta de controle biológico se torna uma alternativa de grande interesse, visto que estas enzimas possuem o mecanismo de ação bem conhecido e devido à variedade de fungos cujo crescimento pode ser inibido pelo seu uso biotecnológico (SHAKHBAZAU; KARTEL, 2008; KABIR *et al.*, 2016).

Parkia multijuga Benth, conhecida popularmente como faveira-benguê ou varjão, pertence à família Fabaceae, sendo uma planta de grande porte e de comportamento perene. Está presente no México, na Colômbia, no Peru, no Equador, no Brasil etc. Sua distribuição em solo brasileiro se restringe à região Amazônica (Bioma Amazônia), principalmente nos estados do Amazonas, Pará, Rondônia e Mato Grosso (CARVALHO, 2009). Vários estudos demonstram o potencial de utilização das sementes de *P. multijuga*. A presença de proteínas antifúngicas contra *Sclerotium rolfsii* e *Moniliophthora perniciosa* em frações de glutelinas básicas obtidas a partir das sementes de *P. discolor* e *P. multijuga* (ROLIM *et al.*, 2009; SANTOS, 2012) já foi relatada, bem como a presença de inibidores de proteases que, possivelmente, tenham ação contra microrganismos (CHEVREUIL, 2014), e atividades antibacteriana contra

Staphylococcus aureus, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* (AJAIYEOBA, 2002), *Bacillus subtilis* e *Bacillus pumilus* (OUOBA *et al.*, 2007).

Nosso grupo de pesquisa detectou a presença de quitinase na fração globulina obtida a partir do extrato proteico oriundo de sementes de *P. multijuga*. Nesse trabalho em particular, o foco foi avaliar se a quitinase oriunda de fração proteica do extrato obtido de sementes de *P. multijuga* apresenta atividade antifúngica contra espécies de fungos fitopatogênicos e leveduriformes. Diante disso, o presente estudo foi proposto com o intuito de responder aos seguintes questionamentos:

- Quais condições possibilitariam uma maior extração das proteínas de sementes de *P. multijuga*?
- As frações proteicas oriundas do extrato total obtido de sementes de *P. multijuga* seria capaz de inibir, *in vitro*, o crescimento de espécies de fungos fitopatogênicos e leveduriformes?
- Quais proteínas com potencial para exercer atividade antifúngica estariam presentes nessas frações proteicas?
- Existe uma quitinase presente em frações proteicas de sementes de *P. multijuga* ativa contra fungos miceliais e leveduriformes?
- Quais seriam as principais características bioquímicas dessa quitinase?

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Fungos fitopatogênicos

A agricultura brasileira é um dos principais setores que geram renda para o país, sendo 4,45% do Produto Interno Bruto (PIB) nacional, chegando a US\$ 228,21 bilhões em 2018. Atualmente, o Brasil é um dos líderes mundiais em manufatura e exportação de fibras, alimentos e energia de origem vegetal, sendo um dos maiores produtores de café, milho, soja, cana-de-açúcar (açúcar e etanol), óleos vegetais, laranjas e uvas (CONAB, 2018)

Contudo, pragas agrícolas e fitopatógenos como insetos, nematoides, vírus, fungos e bactérias são responsáveis por grandes perdas na agricultura, por causarem danos e provocarem doenças na lavoura. Estudos recentes apontam uma perda média anual de até 7,7% da produção agrícola brasileira, ou o equivalente a 25 milhões de toneladas, devido ao ataque de moscas, lagartas e doenças que atacam as plantas (SUGAYAMA *et al.*, 2015).

Os fungos são conhecidos popularmente como mofo e bolores. Durante muito tempo, os fungos foram confundidos com vegetais. No entanto, eles são organismos aclorofilados e, portanto, não realizam fotossíntese. Atualmente, estão agrupados em um reino próprio, Fungi, dividido em seis filos. Mais de 70 mil espécies de fungos já foram descritas e, a cada ano, são descobertas entre 1,5 e 2 mil novas espécies. Segundo estimativas, existem mais de 1,5 milhões de espécies de fungos (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 1992).

Estes organismos obtêm sua energia pela ruptura de moléculas orgânicas, podendo ocupar desta forma diversos nichos ecológicos, atuando como parasitas, sapróbios ou então estabelecendo relações simbióticas, como por exemplo com algas formando os líquens (ADAMS, 2004; AGRIOS, 2005).

Todos os fungos são eucariotos e podem ser unicelulares, a exemplo das leveduras e quitrídias, ou multicelulares, como o bolor negro do pão (*Rhizopus stolonifer*). Normalmente, suas células são binucleadas e agrupam-se em filamentos, podendo ou não apresentar septos entre elas. A presença de septos, entretanto, não altera as funções

metabólicas entre as células. Esses filamentos celulares são denominados hifas e o agrupamento intenso de hifas constitui o micélio (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996). Os fungos são organismos fundamentais para o equilíbrio da natureza. As espécies saprofágicas, juntamente com as bactérias heterotróficas, constituem os principais decompositores da biosfera. Além da importância ambiental, os fungos também possuem valor econômico e aplicações na produção de alimentos e medicamentos (ABREU *et al.*, 2015). No entanto, na maior parte das vezes, os fungos são lembrados somente pelos danos que algumas espécies causam, seja ocasionando problemas de saúde, como alergias e micoses em animais, ou parasitando plantas.

A parede celular dos fungos é constituída de polímeros lineares de β -1,4-N-acetil-D-glucosamina (quitina) ou celulose (como no caso dos oomicetos), α -1,3-glucanos, β -1,3-glucanos e β -1,6-glucanos, lipídios, peptídeos e uma matriz proteica. A proporção, concentração e/ou disposição destes elementos pode variar de acordo com a espécie ou entre as fases do ciclo de vida destes organismos (HARDHAM; MITCHEL, 1998; CANTU *et al.*, 2009; MITCHELL *et al.*, 2016).

Para o estabelecimento da infecção fúngica na planta, inicialmente, ocorre a liberação de moléculas adesivas, que são responsáveis pela fixação do fungo à superfície vegetal. Em seguida, ocorre a secreção de enzimas hidrolíticas capazes de hidrolisar a parede celular vegetal e outros componentes, possibilitando a penetração e nutrição do fungo. Por último, ocorre a diferenciação de estruturas de infecção especializadas, que dão continuidade à colonização (HARDHAM; MITCHEL, 1998; RIBEIRO *et al.*, 2007; POCIECHA *et al.*, 2013).

Fungos são organismos extremamente adaptáveis, podendo usar qualquer tipo de superfície como habitat para se desenvolverem (por exemplo, azulejo de banheiros, peles, folhas, matéria em decomposição). Portanto, eles são muito eficientes em colonizar e utilizar plantas, seres humanos e animais como hospedeiros (COX; PERFECT, 1993).

Contudo, aproximadamente 10% da espécies conhecidas de fungos são capazes de colonizar plantas e uma fração menor é capaz de causar doenças. Entretanto, entre os agentes causais de doenças infecciosas, os fungos fitopatogênicos são responsáveis por um elevado índice de perda nas culturas de várias espécies (KNNIGE, 1996; BECKER-RIIT; CARLINI, 2012). Por este motivo, existem muitos estudos sobre a

interação destes fungos com plantas cultivadas (GALLI *et al.*, 2005; TOFFOLATTI *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2014).

O ataque de plantas pelas várias espécies de fungos pertencentes às três principais classes de Oomycotas, Ascomycotas, e Basidiomycotas causa sérias perdas na agricultura e, conseqüentemente, na economia de países que são produtores de alimentos, como o Brasil, tendo sérias implicações sociais. Espécies de fungos tais como *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. lindemuthianum*, *Botrytis cinerea*, *Aspergillus niger*, *A. parasiticus*, *Penicillium janthinellum*, *P. expansum*, *Trichoderma harzianum*, *Pythium aphanidermatum*, *Didymella bryoniae*, *Pyricularia grisea*, *Rhizopus stolonifer*, *Taphrina deformans*, *Thanatephorus cucumeris*, são alguns, entre centenas deles, que promovem doenças e podridões durante a produção e armazenamento de vários grãos e alimentos como, feijões, milho, amendoim tomate, melão, pepino, trigo, cevada, soja, nozes, entre outros (UTKHEDE; BOGDANOFF, 2003).

Além disso, alguns desses fungos produzem micotoxinas que se acumulam nos alimentos, causando severas intoxicações neurológicas, gastrointestinais e câncer em pessoas que deles se alimentam (SANTOS; PEREIRA, 2011). As micotoxinas são produzidas principalmente por espécies de fungos que pertencem aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, e ainda *Claviceps* e *Paelomyces* (SOARES, *et al.* 2013).

A aplicação indiscriminada de defensivos agrícolas tem trazido uma série de transtornos e modificações para o ambiente, tanto pela contaminação das comunidades de seres vivos que o compõe, quanto pela contaminação do solo, água e alimentos, além de contribuir para o aumento do número de pragas resistentes (BONALDO *et al.*, 2007). Uma alternativa para evitar tais danos e, dessa forma, buscar o manejo ecológico de pragas, seria a substituição dos agrotóxicos por compostos naturais obtidos de plantas (ZOTTICH *et al.*, 2011). Diversos estudos demonstram a ação de extratos brutos, óleos essenciais e compostos purificados de plantas contra fungos filamentosos, leveduras, bactérias, vírus, insetos e vermes (YE; NG, 2009; WONG *et al.*, 2012; MARTINS, 2015; DIAS, 2016).

2.2. Fungos leveduriformes – patógenos hospitalares

Os fungos são organismos que podem ser encontrados no solo, na matéria orgânica em decomposição, no ar, na água, e, ocasionalmente, podem estar presentes no ambiente hospitalar (CAGGIANO *et al.*, 2008). Nas últimas décadas, foi visto que estes organismos emergiram agressivamente como patógenos, particularmente por terem desenvolvido resistência à antifúngicos, sendo associados à surtos de infecções superficiais na população saudável e infecções invasivas de alta letalidade em hospitais (WANKE; LAZÉRA; NUCCI, 2000). No Brasil, são registrados quase 4 milhões de casos de infecções fúngicas por ano, destes, 2,8 milhões são infecções causadas por espécies do gênero *Candida* (FIORAVANTI, 2016; GIACOMAZZI *et al.*, 2016).

Espécies de *Candida* são adaptadas ao corpo humano e fazem parte da sua microbiota. Entre 20 a 50% da população saudável possui *Candida* na cavidade bucal e 20 a 80% no trato gastrointestinal. Entre as mulheres, cerca de 20 a 30% apresentam colonização por *Candida* na vagina. Espécies desse gênero também podem ser encontradas no trato urogenital de homens e na pele da população em geral. Contudo, em determinadas condições, espécies desse gênero deixam de apresentar comportamento comensal e tornam-se patogênicas, sobretudo quando há o comprometimento das barreiras teciduais e do sistema imunológico e, também, quando a flora bacteriana competidora é eliminada. Nessas condições, tais leveduras passam a multiplicar-se e invadir tecidos, ocasionando infecções (DIGNANI; SOLOMKIN; ANAISSIE, 2003; ÁLVARES; SVIDZINSKI; CONSOLARO, 2007; VALLE; RENDE; OKURA, 2010).

O gênero *Candida* tem gerado grande preocupação na área médica. Cerca de 80% das infecções fúngicas documentadas são causadas por *Candida*, principalmente em pacientes imunocomprometidos, o que tem elevado criticamente as taxas de morbidade e mortalidade de pacientes em hospitais em todo o mundo (LACERDA, 2002; COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; GULATI; NOBILE, 2016).

A maioria dos casos de candidemia registrados em hospitais do Brasil e no mundo é provocada por *C. albicans*, espécie responsável por cerca de 40 a 90% das infecções documentadas, com uma taxa de mortalidade na faixa de 30 a 50%. A espécie apresenta diversas estratégias que favorecem a colonização no hospedeiro, tais como a capacidade

de aderir a diferentes substratos e de formar biofilmes. Além disso, *C. albicans* apresenta dimorfismo celular, flexibilidade metabólica e é capaz de produzir toxinas e enzimas extracelulares (SANGLARD; ODDS, 2002; NAGLIK; CHALLACOMBE; HUBE, 2003; SANTANA *et al.*, 2010; RUIZ; PEREIRA, 2016).

Além da *C. albicans*, outras espécies de *Candida* também apresentam relevante importância quanto a etiologia de casos de candidíase e candidemia em todo o mundo, tais como *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. dubliniensis*. Estas espécies têm recebido atenção especial dos órgãos de saúde, pois as infecções causadas por elas são graves e difíceis de tratamento. Isso ocorre, particularmente devido ao fato de muitas destas cepas apresentarem forte resistência aos antifúngicos existentes no mercado, além de exibirem habilidade à formação de biofilmes (ABI-SAID *et al.*, 1997; COLOMBO *et al.*, 2006; REX, 2000; FIORAVANTI, 2016).

2.3. Proteínas vegetais como alternativas para controle de patógenos de plantas

As plantas frequentemente estão expostas a uma série de fatores adversos que prejudicam seu crescimento, desenvolvimento e sua produtividade. Dentre os agentes causadores de estresse aos vegetais, há aqueles de natureza abiótica (temperaturas extremas, falta/excesso de água, ventos e metais pesados) e os de natureza biótica (herbívoros, fungos, bactérias, vírus e nematóides) (SOARES; MACHADO, 2007).

Para assegurar a sobrevivência e perpetuação da espécie, os vegetais recorrem a diversas estratégias que, em conjunto, representam as defesas pré-formadas ou constitutivas e as defesas pós-formadas ou induzidas (NURNBERGER *et al.*, 2004). De um modo geral, todas atuam no sentido de tornar as plantas mais tolerantes às condições ambientais adversas e de dificultar, ou mesmo impedir, a alimentação ou penetração do organismo invasor nos tecidos vegetais (ANDRADE, 2008). As defesas constitutivas englobam as barreiras físicas (ceras, espinhos, tricomas, parede celular etc.) e compostos químicos pré-formados (terpenóides, glicosídeos cianogênicos, compostos fenólicos, ácidos hidroxâmicos etc.). Já as defesas induzidas compreendem mecanismos de proteção que são ativados após contato com o agressor, envolvendo, muitas vezes, a síntese de moléculas pertencentes ao metabolismo primário e/ou secundário do vegetal (XAVIER-FILHO, 1993).

Dentre as moléculas que fazem parte do metabolismo primário, merecem destaque as proteínas, estando envolvidas em vários processos biológicos como, por exemplo, biossíntese da membrana e parede celular, metabolismo de compostos primários e secundários, absorção e transporte de água e nutrientes a partir do solo, defesa vegetal, além de muitos outros (GOKULAKANNAN; NIEHAUS, 2010; VALLEDOR; JORRÍN, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2012). Incluídas na vasta classe das proteínas, há aquelas consideradas tóxicas, pois são capazes de interferirem negativamente em algum parâmetro biológico de organismos que tenham entrado em contato com quantidades determinadas dessas moléculas, através de vias específicas (SOARES *et al.*, 2012), estando representadas por lectinas, polifenoloxidasas, peroxidases, fenilalanina-amônia liase, proteínas ligantes à quitina, toxinas e inibidores de proteases serínicas e cisteínicas (CONSTABEL; RYAN, 1998; SIQUEIRA-JÚNIOR *et al.*, 2002; PELEGRINI; FRANCO, 2005; VAZ *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2010; GIFONI *et al.*, 2012). Tais classes de proteínas bioativas têm recebido atenção especial, em virtude da potencialidade de aplicações na agricultura e na saúde.

No setor agrônomo, muitas proteínas têm sido evidenciadas não somente por mostrar ação direta sobre diversos patógenos vegetais, mas, também, por aumentar a resistência de plantas por meio de técnicas de transgenia (VINCENT; WONG; NG, 2007; DEO PRASAD; JHA; CHATTOO, 2008; LANDIM, 2011; NETO, 2014; BUZINELLO, 2018).

2.4. Quitinases

Na natureza existe uma grande diversidade de oligossacarídeos e polissacarídeos, desempenhando os mais diversos papéis que vão desde reserva de energia até à sinalização. Da mesma forma, há também uma grande diversidade de enzimas que hidrolisam ligações glicosídicas, pertencentes à superfamília das hidrolases de glicosil, e que atuam tanto sobre a ligação glicosídica entre dois ou mais carboidratos como entre misturas de carboidratos e demais biomoléculas. Esta superfamília é composta por 81 famílias de enzimas que hidrolisam os mais variados substratos (HENRISSAT, 1991).

Quitinases [EC 3.2.1.14] são enzimas que realizam a clivagem de ligações β -1,4 da quitina liberando oligômeros de GlcNAc (CAZYPEDIA CONSORTIUM, 2017; HARA et al., 2013; KOLOSOVA; BREUIL; BOHLMANN, 2014).

2.4.1. Classificação das quitinases

Baseado no mecanismo de ação catalítico, Sahai e Manocha (1993) sugeriram uma nomenclatura que classifica enzimas quitinolíticas em duas categorias: endoquitinases (EC 3.2.1.14) e exoquitinases, que ainda podem ser divididas em quitobiosidases (EC 3.2.1.29) e β -N-acetilhexosaminidases (3.2.1.52) (ADRANGI *et al.*, 2010).

Endoquitinases (EC 3.2.1.14) são definidas como enzimas que catalisam a hidrólise randômica de ligações β -1,4 de GlcNAc em sítios internos ao longo de todo o comprimento das microfibrilas de quitina. Os produtos da reação são múltiplos solúveis de GlcNAc, de baixa massa molecular, como quitotetraose, quitotriose e diacetilquitobiose. Exoquitinases, que são divididas em dois subgrupos: quitobiosidases ou quitina-1,4- β -quitobiosidases (EC 3.2.1.29), que catalisam a liberação progressiva de unidades de diacetilquitobiose a partir da ponta não redutora da quitina, onde monossacarídeos e oligossacarídeos não são formados; e β -N-acetilhexosaminidases (EC 3.2.1.52), uma enzima quitinolítica que também atua em cortes de extremidades em diacetilquitobiose e muitos análogos de quitina, incluindo quitotriose e quitotetraose, resultando em monômeros de GlcNAc. Essa definição inclui, inerentemente, a atividade da quitobiase que hidrolisa especificamente diacetilquitobiose, formando monômeros de GlcNAc (CHERNIN *et al.*, 1998; KHOUSHAB; YAMABHAI, 2010).

A maior parte das quitinases caracterizadas pertencem às famílias das GH18 e GH19, sendo essa classificação baseada no grau de identidade das sequências primárias, bem como, das semelhanças estruturais (ADRANGI; FARAMARZI, 2013). Além disso, outras quitinases pertencentes a outras duas famílias também foram, recentemente, identificadas (GH23 e GH 48) (LANDIM *et al.*, 2017). Pode-se observar que dentro de cada família das quitinases é usado um determinado mecanismo molecular para degradar a quitina. Na família GH18, por exemplo, o mecanismo de catalise, envolve a retenção da configuração anomérica do

substrato, ocorrendo um mecanismo de duplo deslocamento, o grupo carboxila de um resíduo da enzima protona o oxigênio da ligação glicosídica e o grupo acetoamido do próprio substrato realiza um ataque nucleofílico, desta forma, é formando um íon oxazolinium intermediário (CHEN *et al.*, 2018; HENRISSAT; BAIROCH, 1993; SASAKI *et al.*, 2002). Enquanto que na família GH19 a hidrólise se dá, por meio de catálise ácida, pela inversão do carbono anomérico, que passa de β a α (OHNO *et al.*, 1996). Então, dois resíduos de aminoácidos são requeridos para a catálise. Um deles age como ácido, doador de prótons na reação e o outro age como base, que ativa a molécula de água nucleofílica e estabiliza o composto intermediário, carregado (BRAMELD; GODDARD, 1998; ISELI *et al.*, 1996).

2.4.2. Diversidade de funções das quitinases

As quitinases estão presentes em todos os reinos e dependendo do organismo, têm funções diferentes. Por exemplo, as quitinases bacterianas estão envolvidas em processos nutricionais, utilizando quitina para a transferência de carbono e azoto (FUKAMIZO, 2000). Em leveduras e outros fungos, estão envolvidas em processos de reestruturação da parede celular e divisão celular (KURANDA & ROBBINS, 1991). Uma vez que muitas quitinases são induzidas em resposta à infecção patogénica, pensa-se que estão principalmente envolvidas na defesa contra fungos, que contêm quitina na sua parede celular. A atividade lisozimática, que em alguns casos é observada, juntamente com atividade de quitinase, tem sido interpretada como um mecanismo de defesa da planta contra possíveis ataques bacterianos.

2.4.3. Quitinases de plantas

A abundância de quitinases em plantas é surpreendente tendo em conta o fato das plantas não produzirem quitina. As quitinases foram localizadas em todos os órgãos e tecidos vegetais, tanto no apoplasto como no vacúolo, com diferentes estruturas moleculares e especificidades de substrato (KASPRZEWSKA, 2003). O envolvimento de quitinases como um mecanismo de defesa ativa ou passiva contra agentes patogénicos tem sido relatado e comprovado experimentalmente (CABANAS, 2013;

KOPPARAPU, 2011). Em geral, a indução rápida e a acumulação de quitinases correlaciona-se com a resistência ao ataque de agentes patogênicos (KABIR *et al.*, 2016).

As quitinases de plantas foram agrupadas em sete classes de acordo com as suas sequências, sendo as características que determinam a classe de quitinase a que pertencem as seguintes: sequência N-terminal, localização da enzima, pH isoelétrico, peptídeo sinal e indutores (PATIL *et al.*, 2000). Cada classe pertence a uma das duas famílias de glicosidase na qual se verificam dois mecanismos hidrolíticos diferentes (ISELI *et al.*, 1996; KASPRZEWSKA, 2003). As classes I, II, VI e V pertencem à família 19 de glicosidase e abrangem os enzimas cuja origem são plantas (COHEN-KUPIEC & CHET, 1998; ISELI *et al.*, 1996) partilhando homologia no seu domínio catalítico juntamente com o seu sinal peptídico. Nesta família foram mais tarde incluídas as classes VI, VII. Por sua vez, a família 18 inclui quitinases provenientes de fungos, animais e bactérias bem como algumas quitinases de plantas da classe III e V (ISELI *et al.*, 1996).

Em plantas, os genes das quitinases são expressos principalmente durante a interação da planta com o patógeno. Entretanto, também são expressos constitutivamente, proporcionando as plantas maior resistência a infecções fúngicas (KÁLAI *et al.*, 2008; REGALADO *et al.*, 2000; TOBIAS *et al.*, 2017). A indução da expressão de genes de quitinases pode ocorrer principalmente por agentes patogênicos ou substâncias químicas exógenas. Os próprios oligômeros de GlcNAc liberados pela ação dessas quitinases sobre a quitina dos agentes patogênicos atuam como indutores da expressão de genes de quitinase (YANG *et al.*, 2011)

Além disso, as quitinases também podem estar envolvidas em processos de desenvolvimento vegetal, como o alongamento celular (ZHONG *et al.*, 2002) e a embriogênese (FUKAMIZO, 2000), tolerância ao frio, atuando como proteínas anticongelantes (YEH *et al.*, 2000; de LOS REYES *et al.*, 2001; YU & GRIFFITH, 2001) e armazenamento (PEUMANS *et al.*; 2002). No caso das simbioses com bactérias fixadoras de nitrogênio, pensa-se que as quitinases estejam implicadas no mecanismo de autorregulação, controlando o número de nódulos, bem como na formação dos nódulos (VASSÉ *et al.*, 1993; STAEHELIN *et al.*, 1995; GOORMACHTIG *et al.*, 1998; KIM & AN, 2002; FORTUNATO *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2011). Além disso, são apontadas como parte integrante do sistema de proteção dos nódulos

contra agentes patogênicos (STAEHELIN *et al.*, 2000; SALZER *et al.*, 2000, 2004; KIM *et al.*, 2005; SANTOS *et al.*, 2010; RIBEIRO *et al.*, 2011).

2.5. *Parkia multijuga* Benth

O projeto descrito neste trabalho é derivado de um projeto maior, que tem como objetivo a prospecção de proteínas bioativas de espécies amazônicas, dentre elas tem-se a *Parkia multijuga*, que foi a planta utilizada no estudo.

A espécie *Parkia multijuga*, também conhecida por faveira, paricá grande da terra firme, benguê, arara-tucupi e visgueiro, pertence à subfamília Mimosoideae, apresenta ampla distribuição em toda a Amazônia, com ocorrência em mata primária ou secundária e várzea altas em solo argiloso de toda região Amazônica (LORENZI, 1992; RAMOS *et al.*, 2000; LORENZI, 2008). É uma espécie arbórea de grande porte, de fuste cilíndrico e casca cinza ou avermelhada, exudando resina (FIGURA 1). Seu principal potencial econômico está voltado ao seu valor madeireiro (NASCIMENTO *et al.*, 2003).

Suas sementes apresentam dormência física, imposta pelo tegumento duro e impermeável à água (HOPKINS, 1986). São sementes grandes, com comprimento de até 6 cm e massa entre 3 e 9 g. Apresentam germinação do tipo hipógea e criptocotiledonar (FERRAZ *et al.*, 2004). Assim como a grande maioria das espécies florestais arbóreas da Amazônia, a semente é a principal forma de reprodução das espécies do gênero *Parkia*, desempenhando papel de fundamental importância para a dispersão e perpetuação destas espécies.

É amplamente usada na construção civil, embarcações, móveis, artigos domésticos e decorativos (SOUZA *et al.*, 2003), taboados, caixotaria, lâminas para compensados e canoas (LOUREIRO *et al.*, 2000). Pode ser empregada em plantios em áreas degradadas de preservação permanente, devido ao seu rápido crescimento em ambientes abertos (LORENZI, 2000). Sua madeira tem características físicas e mecânicas favoráveis para uso comercial, promovendo alto índice de exploração da espécie, o que diminui consideravelmente os exemplares em sua área de ocorrência natural (ROSSETO *et al.*, 2009).

Também foi estudado seu potencial biotecnológico na prospecção de proteínas, em que extratos proteicos obtidos das suas sementes apresentaram inibidores de tripsina, quimotripsina, papaína e bromelaína (CHEVREUIL, 2014; ROLIM *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2012).

Figura 1 – (A) Árvore da espécie *Parkia multijuga*; (B) Fruto e semente da árvore.



Fonte: Chevreuil *et al.*, 2014.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Purificar uma quitinase de sementes de *Parkia multijuga* com ação antifúngica, bem como determinar suas características bioquímicas e estabelecer seu mecanismo de ação sobre fungos.

3.2. Objetivos específicos

- Estabelecer as melhores condições para extração das proteínas de sementes de *P. multijuga*;
- Avaliar a atividade antifúngica das frações proteicas do extrato total obtido de sementes de *P. multijuga* contra espécies de fungos fitopatogênicos e leveduriformes;
- Avaliar a composição das frações proteicas do extrato total obtido de sementes de *P. multijuga* quanto à presença de proteínas antifúngicas;
- Purificar uma quitinase presente na fração proteica do extrato obtido de sementes de *P. multijuga*;
- Caracterizar bioquimicamente a quitinase de sementes de *P. multijuga*;
- Avaliar os efeitos da quitinase de sementes de *P. multijuga* sobre fungos filamentosos e sua superfície celular.

4. MATERIAIS

4.1. Reagentes químicos

Acrilamida, *N,N'*-metileno bisacrilamida, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), β -mercaptoetanol, albumina sérica bovina (BSA), Coomassie Brilliant Blue G-250, *N*- α -benzoil-DL-arginina-*p*-nitroanilida (BApNA), *N*- α -benzoil-DL-arginina-*p*-naftilamida (BANA), 7-dimetilaminocumarina-4-ácido acético (DMACA), papaína, trizma-base, ditioneitol (DTT) foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EUA). Os marcadores de massa molecular foram obtidos da GE Healthcare Life Science (NY, USA). Os meios de cultura Ágar-Batata-Dextrose (BDA), ágar Saboraud e caldo Saboraud foram obtidos da Himedia® (Mumbai, Índia). Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico e obtidos comercialmente.

4.2. Material biológico

As sementes de *Parkia multijuga* foram coletadas, identificadas e cedidas pelo Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia - INPA. Os fungos fitopatogênicos *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Glomerella cingulata* e *Penicillium herquei* foram provenientes da micoteca do Laboratório de Toxinas Vegetais (DBBM/UFC). Os fungos foram mantidos em meio BDA estéril, em câmara de crescimento com umidade entre 40-50%, temperatura 30 °C, no escuro. As leveduras patogênicas *Candida albicans* (ATCC 10231), *Candida tropicalis* (isolado clínico), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) e *Candida krusei* (ATCC 6258) foram provenientes da micoteca do Laboratório de Proteínas Vegetais de Defesa (DBBM/UFC). As leveduras foram conservadas em meio YPD acrescido de 20% de glicerol, congeladas a -80 °C.

5. MÉTODOS

5.1. Extração das proteínas

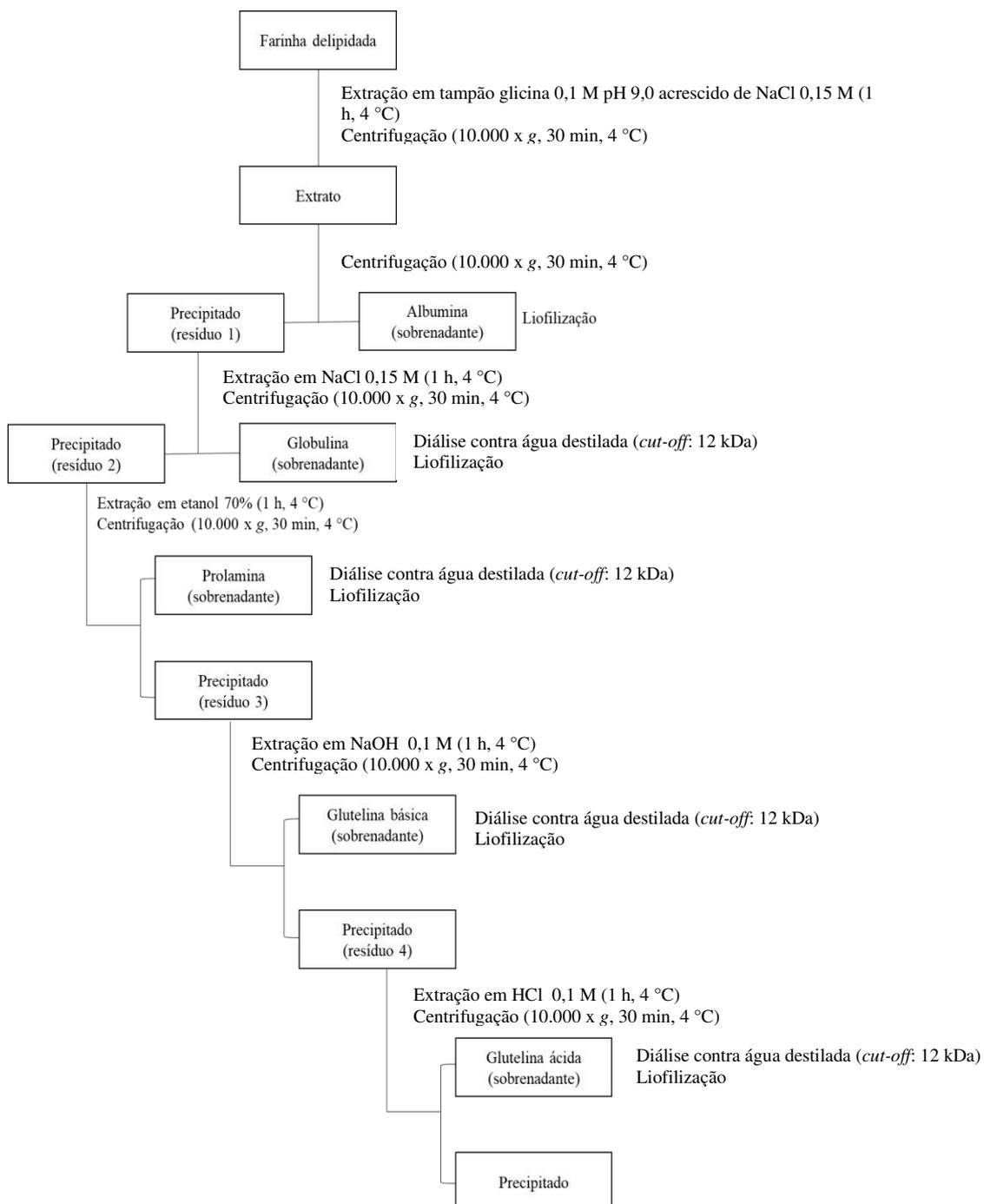
A extração das proteínas foi realizada a partir da farinha de sementes de *Parkia multijuga*. Para obtenção da farinha, os tegumentos foram removidos das sementes maduras e as amêndoas e pulverizados em moinho de grão de café. A farinha obtida foi delipidada com hexano na proporção de 1:10 (m/v). Ao final da delipidação, a farinha foi depositada em uma bandeja revestida com papel de filtro para volatilização do solvente em capela de exaustão, sendo, posteriormente, armazenada à temperatura de 4 °C. Para determinação da melhor condição de extração das proteínas, a farinha delipidada das sementes de *P. multijuga* foi posta em contato, sob agitação, com solução salina 0,15 M e com os seguintes tampões: acetato de sódio, pH 5,0; fosfato de sódio, pH 7,0; glicina-HCl, pH 2,6, glicina-NaOH, pH 9,0 e Tris-HCl, pH 8,0, todos na concentração de 0,1 M e acrescidos de 0,15 M de NaCl. A extração se deu com a adição da solução extratora na proporção de 1:10 (m/v), por 1 h, sob agitação constante a 4 °C. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 10.000 g, por 30 min, a 4 °C (centrífuga Himachi II, Hitachi, Tóquio, Japão). Os precipitados foram descartados e alíquotas do sobrenadante utilizadas para dosagem de proteínas.

5.2. Obtenção das frações proteicas

As proteínas presentes no extrato das sementes de *P. multijuga* foram separadas em função de sua solubilidade (FIGURA 4). Inicialmente, o extrato bruto foi dialisado (*cut-off* 12 kDa), na proporção 1:40, durante 2 dias com 6 trocas/dia, contra água destilada e, em seguida, centrifugado a 10.000 g por 30 min, a 4 °C (centrífuga Himachi II, Hitachi, Tóquio, Japão). O sobrenadante corresponde à fração albumínica. Para obtenção da fração globulínica, o precipitado da etapa anterior (resíduo 1) foi extraído com NaCl 0,15 M, durante 1 h, a 4 °C. Posteriormente esse material foi centrifugado (10.000 g por 30 min, a 4 °C), sendo separado em sobrenadante (fração globulínica) e precipitado (resíduo 2). A fração prolamina foi obtida pela extração do resíduo 2 com etanol 70%, durante 1 h, a 4 °C. Da mesma forma, após extração o material foi centrifugado, nas mesmas condições descritas anteriormente, separando sobrenadante

(fração prolamina) e precipitado (resíduo 3). Esse resíduo foi, então, extraído com NaOH 0,1 M, durante 1 h, a 4 °C, e separado, por centrifugação (10.000 g por 30 min, a 4 °C), em sobrenadante (fração glutelina básica) e precipitado (resíduo 4). Finalmente, a fração glutelina ácida foi extraída do resíduo 4 com HCl 0,1 M, durante 1 h, a 4 °C. Ao término da extração, o material foi centrifugado (10.000 g por 30 min, a 4 °C), o sobrenadante reservado para análise e o precipitado foi descartado. Todas as frações descritas anteriormente foram dialisadas contra água destilada, na proporção de 1/20 (*cut-off* 12 kDa), durante 2 dias com 6 trocas/dia, e liofilizadas (liofilizador Free Zone 6, Labconco, Kansas, Estados Unidos). A concentração proteica das frações foi determinada pelo método de Bradford (1976) como descrito a seguir.

Figura 2 – Fluxograma de fracionamento das proteínas de acordo com a solubilidade em vários solventes



Fonte: Próprio autor.

5.3. Determinação de proteínas totais solúveis

A determinação concentração de proteínas solúveis de cada fração obtida foi realizada seguindo a metodologia descrita por Bradford (1976). Sobre uma alíquota de 0,1 mL da amostra, não diluída ou diluída em até 10 vezes, foram adicionados 2,5 mL da solução de Bradford. Após 15 min, leituras de absorbâncias a 595 nm em espectrofotômetro (Genesys 10S UV, Thermo Fischer, Waltham, Estados Unidos) foram anotadas. A concentração de proteínas (Cp) das amostras foi calculada usando o fator de calibração (Fc) gerado a partir da curva padrão obtida usando albumina sérica bovina (BSA) como proteína padrão. A equação abaixo foi, então, empregada para o cálculo da concentração de proteína expressa em mg por ml da amostra:

$$C_p = \frac{\text{média das absorbâncias} \times F_c \times \text{diluição da amostra}}{100} = \text{mg/ml}$$

5.4. Eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida, em condições desnaturantes (PAGE-SDS)

PAGE-SDS (LAEMMLI, 1970) foi empregada para obtenção dos perfis proteicos das frações obtidas. As amostras foram solubilizadas em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 6,8, contendo SDS 10% (m/v) e azul de bromofenol 0,1% (m/v). Em seguida, as misturas foram fervidas a 98 °C por 5 min, resfriadas em banho de gelo por 10 min e centrifugadas a 10.000 g por 30 min, a 4 °C (centrífuga Mikro 200R, Hettich, Alemanha). A corrida eletroforética foi realizada sob corrente constante de 200 V, 20 mA e 10 W por gel (1 mm de espessura x 10 cm de altura x 10 cm de largura), com diferença de potencial inicial de 150 V (fonte Celectrophoresis power supply-EP3501, Armesham Pharmacia®, Armesham, Reino Unido). Como marcadores de massa molecular, as seguintes proteínas foram utilizadas: fosforilase b (97 kDa); albumina sérica bovina (66 kDa); albumina do ovo (45 kDa); anidrase carbônica (30 kDa); inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactalbumina (14,1 kDa). Para coloração das bandas proteicas foi usado Coomassie G-250 (“Blue Silver”) (CANDIANO *et al.*, 2004).

5.5. Ensaio de inibição do crescimento de fungos leveduriformes patogênicos

O ensaio de inibição do crescimento das leveduras foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Ribeiro e colaboradores (2007). Os fungos foram repicados em placas de Petri, contendo meio Agar Saboraud e incubados a 37 °C, por 24 a 48 h em câmara incubadora B.O.D. (câmara B.O.D SP-500, SP Labor, São Paulo, Brasil), antes da realização do ensaio. Em microplacas de 96 poços, 100 uL de caldo *YPD* (*Yeast Potato Dextrose*), contendo o fungo ($Abs_{600nm} = 0,05$), e 100 uL da proteína a ser testada foram adicionados em cada poço. As amostras de proteína, na concentração inicial de 200 µg/mL, foram esterilizadas usando microfiltro com poros de 0,22 µm. Alíquotas de 100 uL dos seguintes controles foram também incubados com os microrganismos alvos: nistatina (1000 UI, controle positivo); e água ultrapura (grau MilliQ), estéril, em substituição às proteínas. As leituras de absorbância foram feitas a 600 nm, sendo a primeira delas (tempo zero) descontada, posteriormente, dos valores das outras leituras de absorbância tomadas nos tempos subsequentes, ao longo de 48 h, a cada 6 horas.

5.6. Ensaio de inibição da germinação de esporos e de inibição de crescimento de fungos fitopatogênicos

As culturas dos fungos fornecidas pelo Laboratório de Proteínas Vegetais de Defesa (LPVD) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC foram repicadas, transferindo-se um disco do micélio, de aproximadamente 1 cm de diâmetro, para placas de Petri, contendo meio estéril Agar batata-dextrose (BDA). Estas culturas foram mantidas em câmara incubadora B.O.D. (câmara B.O.D SP-500, SP Labor, São Paulo, Brasil) a 37 °C, durante 7 a 15 dias, até que o fungo crescesse por todo o diâmetro da placa. Para obtenção dos esporos, 5 mL de água ultrapura (grau Milli-Q), estéril, foram adicionados e, com o auxílio de uma alça de Drigalsky, a superfície do micélio foi raspada suavemente. Essa suspensão de esporos foi filtrada em malha de trama fina para eliminação de hifas e, em seguida, a concentração de esporos foi padronizada para conter $2,0 \times 10^5$ esporos/mL, por meio de contagem em câmara de Neubauer e com o auxílio de um microscópio óptico (Sistema Olympus BX 60, Olympus Corporation, Tóquio, Japão).

O ensaio de inibição da germinação de esporos foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Ji e Kúc (1996). Em placa de germinação, 10 µL da amostra de proteína na concentração inicial de 200 µg/ml (esterilizada em filtro com poros de 0,22 µm) e 10 µL da suspensão de esporos ($2,0 \times 10^5$ esporos/mL) foram misturados. O controle negativo foi água ultrapura (grau MilliQ), estéril (10 µL), e o controle positivo foi peróxido de hidrogênio (10 µL) 0,1 M, estéril, em substituição às proteínas. As placas de germinação foram mantidas em câmara úmida a 37 °C. Após 24 h, as placas foram examinadas em microscópio óptico (microscópio binocular, Kasvi, Paraná, Brasil) para verificar o efeito inibitório, ou não, das amostras testadas sobre a germinação dos esporos. A germinação dos esporos foi considerada como tendo ocorrida quando o comprimento do tubo germinativo alcançou, pelo menos, duas vezes o diâmetro maior do esporo (Ji e Kúc, 1996). O ensaio foi realizado em triplicata.

O ensaio de inibição do crescimento micelial foi realizado seguindo a metodologia descrita por Freire e colaboradores (2002). Em microplacas, contendo 96 poços, 100 µL do meio YPD (*Yeast Potato Dextrose*) e 10 µL da suspensão de esporos ($2,0 \times 10^5$ esporos/mL) foram adicionados. As placas foram, então, incubadas por 12 h, a 37 °C, na ausência de luz, para possibilitar a germinação dos esporos. Após visualização dos tubos de germinação dos esporos, com auxílio de um microscópio óptico, 100 µL das amostras proteicas a serem testadas, previamente esterilizada em filtro com poros de 0,22 µm, foram adicionados. As amostras proteicas estavam na concentração inicial de 200 µg/mL e quitinase de 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,12 µg/mL. Alíquotas de 100 µL de peróxido de hidrogênio 0,1 M, estéril, e 100 µL de água ultrapura (grau Milli-Q), estéril, usados como controles positivo e negativo, respectivamente, também foram incubadas com os fungos, a 37 °C, em substituição às proteínas. O ensaio foi realizado em triplicata. O crescimento do fungo foi acompanhado pela leitura das absorbâncias a 630 nm, em leitor de microplacas (Espectrofotômetro de microplacas Epoch, Biotek, Vermont, Estados Unidos), a cada 12 h, até completar 72 h.

5.7. Detecção de proteínas antifúngicas

5.7.1. Detecção de quitinase (QUI)

A determinação da atividade quitinásica foi realizada seguindo a metodologia descrita por Boller (1992), que teve como parâmetro a liberação de N-acetil-D-glucosamina (NAG), a partir da ação hidrolítica das enzimas sobre a quitina coloidal. Primeiramente, para obtenção do fator de conversão, uma curva padrão foi feita utilizando diferentes concentrações de NAG. Para averiguar se a amostra apresentava atividade quitinásica, 250 μL de amostra solubilizada em tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2 (1:4) foram incubadas com 250 μL de quitina coloidal 1% (m/v), a 37 °C, durante 1 hora, sob leve agitação. A atividade enzimática foi interrompida pela fervura dos tubos, a mistura foi incubada a 100 °C por 10 min e, imediatamente, resfriada em banho de gelo. Após centrifugação (centrífuga Mikro 200R, Hettich, Alemanha) a 10.000 x g por 10 min, 300 μL do sobrenadante foram adicionados de 10 μL da enzima β -glucuronidase (EC 3.2.1.31). Essa mistura foi incubada a 37 °C por 60 min, sob leve agitação, fervida a 98 °C, por 10 min e resfriada, imediatamente, em banho de gelo. Para determinação da NAG liberada no ensaio, 190 μL de tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2 e 100 μL de tetraborato de potássio 0,6 M foram adicionados aos tubos, sendo, depois, incubados a 100 °C e resfriados em banho de gelo, por 5 min. Por fim, 1000 μL de 4-Dimetilamino-benzaldeído (DMAB ou reagente de Ehrlich) (0,05 g/mL concentração final), preparado em solução de ácido acético glacial contendo 12,5% (v/v) de ácido clorídrico 11,5 M foram adicionados aos tubos. Imediatamente após homogeneização e incubação a 37 °C, por 20 min, leituras de absorbância a 585 nm foram feitas para calcular o teor de açúcar liberado no ensaio, com base na curva padrão feita previamente ao ensaio (REISSIG; STROMINGER; LELOIR, 1955). A atividade quitinolítica foi expressa em nkat por grama de farinha (nkat/gF), sendo 1 nkat equivalente a 1 nmol de N-acetil-D-glucosamina liberada por mg da quitina coloidal por segundo (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

5.7.2. Detecção de β -1,3-glucanase

A atividade β -1,3-glucanásica foi determinada de acordo com a metodologia proposta por Boller (1992), medida em função da velocidade de degradação da laminarina (substrato) e liberação de glucose da laminarina usada como substrato.

Inicialmente, uma solução de laminarina (2 mg/mL) foi preparada em água ultrapura (grau Milli-Q), aquecida a 60 °C, por 10 min e, em seguida, dialisada exaustivamente por 2 dias com 6 trocas/dia contra água destilada (cut-off: 12kDa), na proporção de 1:4, para remoção de glucose livre. Nesse experimento, quatro soluções foram utilizadas: Solução A [25 g de carbonato de sódio, 25 g de tartarato de sódio e potássio, 20 g de bicarbonato de sódio, 200 g de sulfato de sódio anidro e água ultrapura (grau Milli-Q), q.s.p. 100 mL]; Solução B [15 g de sulfato de cobre pentahidratado, 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado e água ultrapura (grau Milli-Q) q.s.p. 100 mL]; Solução C [25 g de molibdato de amônio dissolvidos em 21 mL de ácido sulfúrico e 450 mL de água ultrapura (grau Milli-Q) e 3 g de arseniato de sódio heptahidratado dissolvidos em 25 mL de água ultrapura (grau Milli-Q)]; e Solução D [mistura da solução B com a solução A, na proporção de 1:25 (v/v), preparada no momento do ensaio]. Uma alíquota de 100 µL das amostras a serem testadas (0,5 mg/mL) foi incubada com 900 µL da solução de laminarina a 50 °C, em banho-maria, durante 30 min. Em seguida, 1 mL da solução D foi adicionado à mistura reacional e incubada a 98 °C, em banho-maria, durante 20 minutos. Após este período de incubação, a amostra foi adicionada de 1 mL da solução C e, então, resfriada a 25 °C. Os tubos foram agitados em vortex para remoção dos gases formados durante a reação e deixados em repouso por 5 min. As leituras de absorvância foram realizadas a 520 nm. Para o cálculo da quantidade de açúcar liberado, uma curva construída a partir de concentrações variadas de glucose (7 a 240 µg/mL, preparada em tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2) foi utilizada. A atividade β-1,3-glucanásica foi expressa em nKat por grama de farinha (nKat/gF), em que 1 nKat equivale a 1 nmol/mL de glucose liberado por segundo.

5.7.3. Detecção de inibidores de proteases serínicas

A presença de inibidores de proteases serínicas foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Erlanger; Kolowsky; Cohen (1961). Primeiramente, foi feita uma curva padrão utilizando alíquotas de 10 a 30 µL de tripsina (0,3 mg/mL), as quais foram colocadas em tubos de ensaio. Em seguida, o tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5, contendo CaCl₂ 0,02 M foi adicionado até o volume de 800 µL. Os tubos foram incubados a 37 °C, em banho-maria, por 10 min. Posteriormente, 500 µL da solução de BapNA (Nα-Benzoyl-DL-Arginine-p-Nitroanilide) 1,25 mM (substrato) foram

adicionados. Os tubos foram novamente colocados em banho-maria a 37 °C, por 15 min. Para parar a reação, 120 µL de ácido acético 30% foram adicionados. Após isso, leitura da absorbância a 410 nm foi realizada.

No ensaio de determinação da atividade inibitória de proteases serínicas, uma alíquota de 10 µL da enzima foi incubada com 100 µL da amostra (1 mg/mL) e 690 µL do tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5, contendo CaCl₂ 0,02 M, em banho-maria a 37 °C, por 15 min. O ensaio foi procedido conforme mencionado acima. Para a amostra em branco, a mistura reacional continha tanto a tripsina como a amostra a ser testada, mas a reação foi parada antes da adição do substrato. O resultado foi expresso em unidades de inibição (UI) por grama de farinha (UI/gF), sendo a UI definida como o decréscimo de 0,01 da absorbância, a 410 nm, em relação a atividade da enzima na ausência do inibidor (100% de atividade). O ensaio foi realizado em triplicata.

5.7.4. Detecção de inibidores de proteases cisteínicas

Para determinação da atividade inibitória de proteases cisteínicas foi utilizada a metodologia descrita por Abe e colaboradores (1992). A 60 µL de uma solução de papaína (1 mg de papaína dissolvida em água ultrapura grau Milli-Q) e diluída 50 vezes em tampão fosfato de sódio 0,25 M, pH 6,0) foram adicionados 40 µL da solução ativadora [tampão fosfato de sódio 0,25 M, pH 6,0, contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 0,002 M e ditioneitol (DTT) 0,003 M] e 200 µL da amostra teste (0,5 mg/mL) em tubos de ensaio mantidos em banho de gelo. Os tubos foram imediatamente incubados em banho-maria a 37 °C, por 10 min. Posteriormente, 200 µL do substrato N- α -benzoil-D-arginina- β - naftilamida (BANA) 0,001 M (dissolvido em 1 mL de dimetilsulfóxido e tampão fosfato de sódio 0,25 M, pH 6,0) foram acrescentados. Após 20 min, a reação foi parada pela adição de 500 µL de HCl 2% (v/v) diluído em etanol e os tubos mantidos em temperatura ambiente (23 \pm 1 °C) por mais 5 min. Decorrido esse tempo, 500 µL do cromógeno p-dimetilaminocinamaldeído (DMACA) 0,06% (m/v), dissolvido em etanol, foram adicionados. Para a amostra em branco, na mistura reacional havia tanto a papaína como a amostra a ser testada, mas a reação foi parada antes da adição do substrato. O resultado foi expresso em unidades de inibição (UI) por grama de farinha (UI/gF), sendo a UI definida como o decréscimo de 0,01 da

absorbância, a 540 nm, em relação a atividade da enzima na ausência do inibidor (100% de atividade). O ensaio foi realizado em triplicata.

5.8. Purificação da Quitinase *Pm-Chi*

5.8.1. Cromatografia de afinidade em matriz de quitina

Como primeira tentativa de isolamento de uma proteína ligante à quitina, 2 mg de globulina foram solubilizados em tampão de extração, glicina 0,1 M pH 9,0, acrescido de 0,15 M de NaCl, e a amostra foi centrifugada (centrífuga Himachi II, Hitachi, Tóquio, Japão) a 10.000 x g, por 5 min, a 4 °C. O sobrenadante obtido foi deixado em contato por 1 h com a matriz de quitina (12/1,5 cm), previamente equilibrada, também, com o tampão de extração. O material não retido na matriz foi eluído com o tampão de equilíbrio, em um fluxo de 30 mL/h. As proteínas ligantes à quitina foram eluídas com tampão glicina 0,1 M, pH 2,6, acrescido de 0,15 M de NaCl. Frações individuais, com volume de 0,5 mL, foram coletadas com o auxílio de um coletor automático, e a absorbância lida em 280 nm para detecção da presença de proteínas. As frações retidas e apresentando leitura de absorbância acima de 0,005 foram reunidas numa única fração (fração retida) que foi dialisada (*cut-off*: 12 kDa), na proporção de 1:20, contra água destilada, liofilizadas e acondicionadas em frascos hermeticamente fechados, a 4 °C, para análises posteriores. Como segunda tentativa de isolamento da quitinase, 2 mg de globulina foram solubilizados em tampão de extração e a amostra foi centrifugada a 10.000 x g, por 5 min, a 4 °C. O sobrenadante ficou em contato por 1 h com a matriz de quitina (previamente equilibrada, também, com o tampão de extração). O material não retido foi eluído com o tampão de equilíbrio, glicina 0,1 M pH 9,0, acrescido de 0,15 M de NaCl, nas condições já descritas. As proteínas ligantes à quitina foram eluídas com solução de HCl 0,1 M. O pico retido foi reunido e dialisado (*cut-off*: 12 kDa) contra água destilada, liofilizado e acondicionado em frascos hermeticamente fechados, a 4 °C, para análises posteriores.

5.8.2. Cromatografia de troca iônica em matriz de DEAE-Sepacel

Como terceira tentativa de isolamento da quitinase, 25 mg da globulina foram solubilizados em tampão glicina 0,1 M pH 9,0, e a amostra foi centrifugada (centrífuga Himachi II, Hitachi, Tóquio, Japão) a 10.000 x g, por 5 min, a 4 °C. Posteriormente, o sobrenadante foi aplicado na matriz de DEAE-Sephacel (22/2 cm), previamente equilibrada com o tampão descrito acima. As proteínas não retidas foram eluídas com o tampão de equilíbrio da matriz, glicina 0,1 M, pH 9,0, em um fluxo de 60 mL/h. As proteínas retidas foram eluídas com o tampão glicina 0,1 M, pH 9,0, contendo NaCl nas concentrações de 0,2, 0,4 e 0,8 M, nesta sequência, em fluxo de 60 mL/h. Frações de 3 mL foram coletadas e monitoradas por leitura de absorbância a 280 nm. Os picos proteicos obtidos foram dialisados (*cut-off*: 12 kDa) por 2 dias, com 6 trocas/dias contra água destilada, na proporção de 1:20, liofilizados e acondicionados em frascos hermeticamente fechados, a 4 °C, para análises posteriores.

5.9. Caracterização bioquímica da quitinase *Pm-Chi*

5.9.1. Eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida para detecção de atividade quitinásica (zimograma)

Para detecção de atividade quitinásica, foi realizada eletroforese PAGE-SDS como descrito no tópico 5.4. Para renaturação das proteínas, o SDS foi removido após a corrida eletroforética.

No caso deste gel é adicionado glicol-quitina (TRUDEL & ASSELIN, 1989) como substrato para a enzima. A amostra foi solubilizada em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 6,8, contendo SDS 10% e azul de bromofenol 0,1%, fervida a 98 °C, por 5 min e, em seguida, resfriada em banho de gelo por 10 min e centrifugada (centrífuga Mikro 200R, Hettich, Alemanha) a 12.000 x g por 15 min, a 4 °C. A corrida eletroforética foi realizada sob corrente constante de 20 mA, 200 V e 10 W por gel (1 mm de espessura x 10 cm de altura x 10 cm de largura), com diferença de potencial inicial de 150 V (fonte Celectrophoresis power supply-EPS3501, Armesham Pharmacia®, Armesham, Reino Unido). Após a corrida eletroforética, o gel foi colocado em solução de Triton 1% (v/v) para remoção de SDS. Em seguida, foi corado com solução de calcofluor White M2R

0,01% (m/v) em 0,5 M de Tris-HCl pH 8,9, por 10 min. O gel foi, então, lavado com água destilada para possibilitar sua visualização sob luz UV (ST LEGER *et al.* 1993).

5.9.2. Eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida para detecção de carboidratos na *Pm-Chi*

Para determinar se a *Pm-Chi* é glicoproteína, a metodologia descrita por Zacharius e colaboradores (1969) foi empregada. A eletroforese foi realizada em PAGE-SDS, como descrito no tópico 5.4. Após a corrida, as proteínas foram fixadas no gel imergindo o mesmo em solução de ácido acético a 7,5% (v/v) por 2 h, seguido por imersão em ácido periódico a 0,2% (v/v) a 4 ° C por 45 min, e, finalmente, no reagente de Schiff a 4 ° C durante 45 min. Para revelação, o gel foi imerso em metabissulfito de potássio a 0,5% (m/v) preparado em 0,05 M de HCl. Como marcador de uma glicoproteína, fetuína foi utilizada.

5.9.3. Avaliação do pH ótimo da *Pm-Chi*

Para avaliar o pH ótimo de atividade da quitinase purificada, o ensaio foi realizado como descrito no tópico 5.7.1., mas utilizando diferentes tampões, todos na concentração de 0,05 M, na faixa de pHs entre 2-10: Glicina-HCl (pH 2); Citrato de sódio (pH 3 e 4); Acetato de sódio (pH 4,5-5,5); Fosfato de sódio (pH 6 e 7); Tris-HCl (pH 8); e Glicina-NaOH (pH 9 e 10).

5.9.4. Cromatografia de afinidade da quitinase isolada de sementes de *P. multijuga* (*Pm-Chi*) em matriz de quitina

Para determinar se a quitinase isolada é uma proteína ligante à quitina uma amostra liofilizada (2,65 mg), rica em quitinase, foi solubilizada em tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,0 acrescido de 0,15 M de NaCl, centrifugada (centrífuga Mikro 200R, Hettich, Alemanha) a 10.000 x g, por 5 min, a 4 ° C. Posteriormente, o sobrenadante foi aplicado na matriz de quitina (6/2 cm), previamente equilibrada com tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,0 acrescido de 0,15 M de NaCl. As proteínas não

retidas foram eluídas com o tampão de equilíbrio em um fluxo de 30 mL/h, coletando-se frações de 1 mL. As proteínas retidas foram eluídas em soluções de HCl 0,1 M e ácido acético 0,1 M, nesta sequência, sendo monitoradas por leitura de absorbância a 280 nm. Os picos foram dialisados (*cut-off*: 12 kDa) por 2 dias com 6 trocas/dias contra água destilada, na proporção 1:20, liofilizados e acondicionados em frascos hermeticamente fechados, a 4 °C, para análises posteriores.

5.9.5. Avaliação da temperatura ótima da *Pm-Chi*

Para avaliar a temperatura ótima de atividade da quitinase purificada, o ensaio foi realizado conforme descrito no item 5.7.1, nas temperaturas de 30, 37, 40, 45, 50, 60, 70 e 80 °C. A temperatura ótima para a enzima foi considerada aquela na qual a maior atividade enzimática (100%) foi observada.

5.10. Avaliação da atividade antifúngica da *Pm-Chi*

Para este ensaio, protocolo do teste de atividade antifúngica descrito no item 5.6. foi utilizado. Para tanto, a *Pm-Chi*, na concentração inicial de 100 µg/mL, foi diluída até a concentração final de 3,12 µg/mL e sua ação inibitória sobre o crescimento dos fungos fitopatogênicos avaliada. O ensaio foi realizado em triplicata e a concentração inibitória mínima (CIM) foi calculada.

5.11. Avaliação parcial de mecanismo da ação antifúngica da *Pm-Chi*

5.11.1. Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em fungos tratados com a quitinase

Em microplacas, contendo 96 poços, 100 µL do meio YPD (*Yeast Potato Dextrose*) foram adicionados e 10 µL da suspensão de esporos dos fungos *Glomerella cingulata* e *Penicillium herquei* ($2,0 \times 10^5$ esporos/mL), sendo as placas incubadas por 16 h, a 37 °C, na ausência de luz, para possibilitar a germinação dos esporos. A

produção de EROS induzida pela quitinase foi verificada de acordo com Maurya *et al.* (2011). As suspensões de células desses fungos foram previamente tratadas com a quitinase e com água estéril (controle negativo), depois foram incubadas com 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) a 10 μ M, 37 °C, por 30 minutos. As células foram centrifugadas (centrífuga Mikro 200R, Hettich, Alemanha) a 3000 g por 5 min, a 22 °C e lavadas três vezes com NaCl 0,15 M. As células foram visualizadas sob microscópio de fluorescência (Sistema Olympus BX 60, Olympus Corporation, Tóquio, Japão), com comprimento de onda de excitação de 488 nm e comprimento de onda de emissão de 525 nm.

5.11.2. Avaliação da integridade da membrana celular de fungos fitopatogênicos tratados com a quitinase

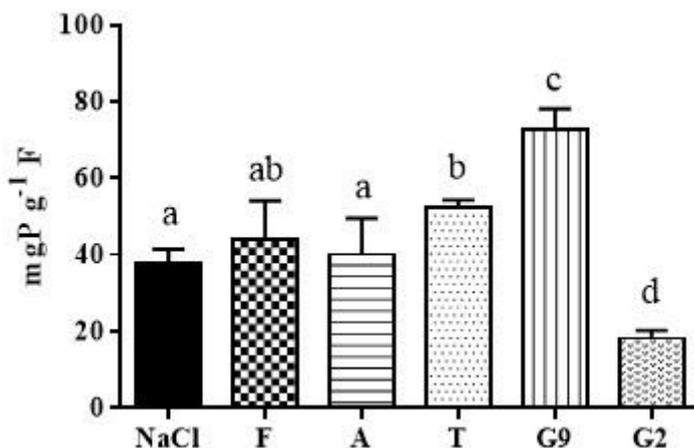
A germinação de esporos dos fungos *G. cingulata* e *P. herquei* foi realizada antes de adicionar a quitinase, seguindo a metodologia de germinação descrita no tópico 5.6. Células desses fungos foram incubadas por 16 h a 37 °C, com água estéril (controle negativo) e quitinase. Em seguida, as células tratadas (100 μ L de suspensão) foram incubadas com 10 μ M de iodeto de propídio (PI) (REGENTE *et al.*, 2014) em microtubos por 1 h a 37 °C, sob moderada agitação. Após incubação, as células tratadas foram lavadas com NaCl 0,15 M, por 3 vezes, e fixadas em lâminas de vidro para microscópio. As células foram examinadas sob microscópio fluorescente (Sistema Olympus BX 60, Olympus Corporation, Tóquio, Japão) com comprimento de onda de excitação de 490 nm e comprimento de onda de emissão de 520 nm.

6. RESULTADOS

6.1. Extração de proteínas de sementes de *P. multijuga*

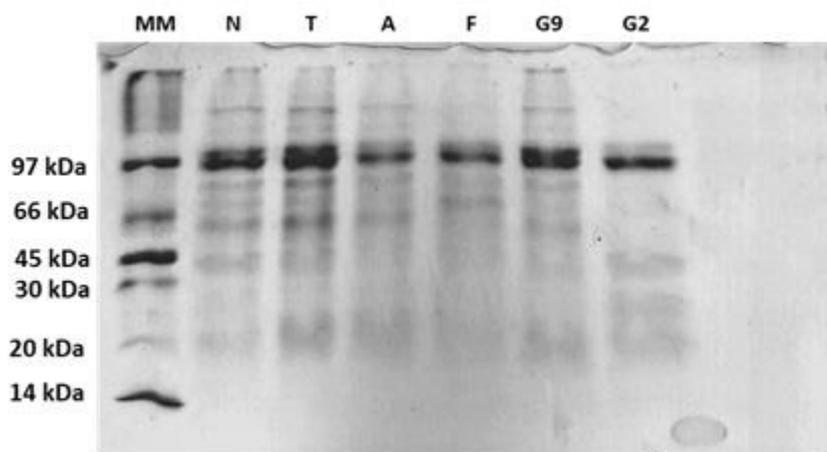
A ordem decrescente dos tampões e soluções que melhor extraíram proteínas foi: glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0 ($72,54 \pm 5,60$ mgP/gF), fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0 ($59,47 \pm 0,86$ mgP/gF), Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0 ($43,75 \pm 10,27$ mgP/gF), acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0 ($40,02 \pm 9,54$ mgP/gF), solução de NaCl 0,15 M ($37,65 \pm 3,80$ mgP/gF) e glicina-HCl, 0,1 M, pH 2,6 ($18,08 \pm 2,08$ mgP/gF) conforme visualizado na Figura 3. Os perfis proteicos de cada extrato estão mostrados na Figura 4.

Figura 3 – Teor de proteínas dos extratos das sementes de *P. multijuga*



As soluções extratoras utilizadas foram: solução salina 0,15 M (NaCl) e tampões fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0 (F), acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0 (A), Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0 (T), Glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0 (G9) e Glicina-HCl 0,1 M, pH 2,6 (G2), todos acrescidos de NaCl 0,15 M. Os resultados estão expressos em mg de proteína por g de farinha (mgP g⁻¹F). Barras indicam desvio padrão entre as repetições. Letras iguais representam valores que não diferiram ($P < 0,05$) de acordo com o teste ANOVA seguido de teste de comparação múltipla de Tukey.

Figura 4 - Perfis proteicos de extratos das sementes de *P. multijuga* após eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE-SDS; 12,5%)

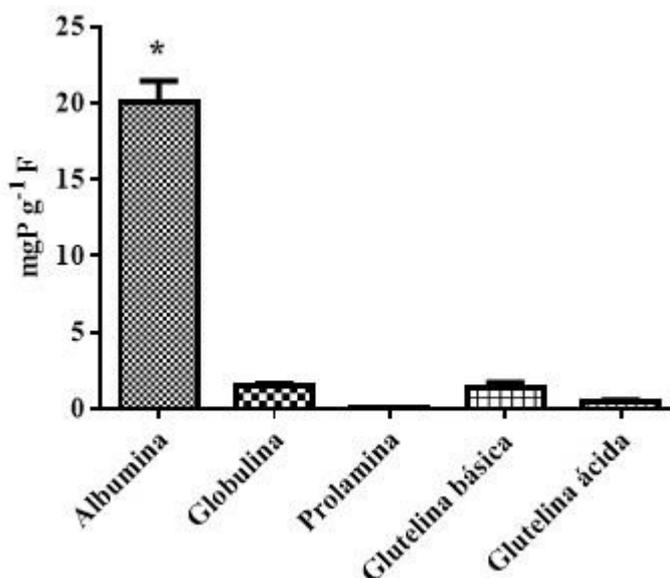


Marcador de massa molecular (MM) e extratos preparados em NaCl 0,15 M (N) e nos tampões fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0 (F), acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0 (A), Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0 (T), Glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0 (G9) e Glicina-HCl 0,1 M, pH 2,6 (G2), todos acrescidos de NaCl 0,15 M. O gel foi corado com *Comassie Blue* G-250. Quantidade de proteína aplicada por raia: 10 µg.

6.2. Obtenção de frações proteicas a partir do extrato de sementes de *P. multijuga*

Em função do elevado teor proteico, o extrato das sementes de *P. multijuga* preparado em tampão Glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0, contendo NaCl 0,15 M, foi selecionado para dar continuidade ao estudo. As proteínas presentes nesse extrato foram fracionadas em função de sua solubilidade. A fração albumínica apresentou o maior teor proteico (20,04 mgP/gF), seguida pelas frações globulínica (3,96 mgP/gF) e glutelínica básica (3,75 mgP/gF) (FIGURA 5). Essas frações foram analisadas por SDS-PAGE (FIGURA 6). Menor número de bandas proteicas foi encontrado na fração das globulinas e glutelinas ácidas e básicas quando comparadas com a fração das albuminas. Além disso, com o método utilizado para revelação do gel, não foi possível visualizar nenhuma banda proteica na fração das prolaminas.

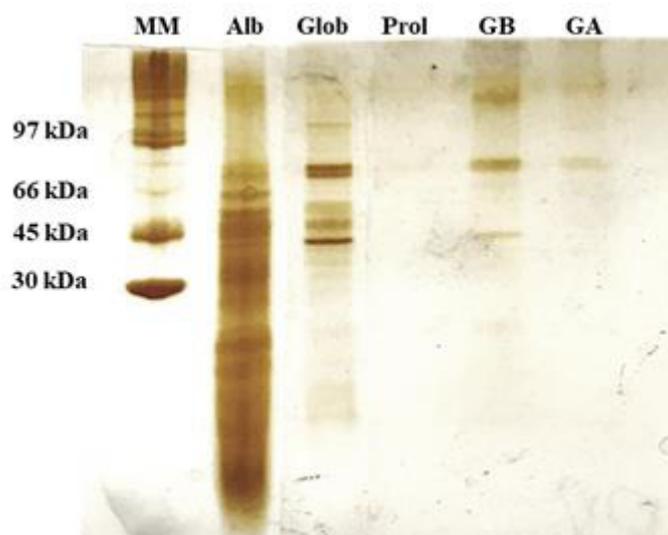
Figura 5 - Teor de proteínas das frações obtidas a partir do extrato total de sementes de *P. multijuga*



Fonte: Próprio autor

Os resultados foram expressos em mg de proteína por g de farinha (mgP g⁻¹F). Barras indicam desvio padrão entre as repetições. O símbolo (*) representa diferença entre valores ($P < 0,05$) de acordo com o teste ANOVA seguido de teste de comparação múltipla de Turkey.

Figura 6 - Perfis proteicos das frações obtidas a partir do extrato total de sementes de *P. multijuga* após eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE-SDS; 12,5%)



Fonte: Próprio autor

Nas raías encontram-se o marcador de massa molecular (MM) e as frações Albumina (Alb), Globulina (Glob), Prolamina (Prol), Glutelina básica (GB) e Glutelina ácida (GA). O gel foi revelado utilizando nitrato de prata pelo método de Mohr. Quantidade de proteína aplicada por raía: 10 µg.

6.3. Detecção de proteínas antifúngicas nas frações proteica do extrato das sementes de *P. multijuga*

Como parte da caracterização bioquímica das frações proteicas (albumina, globulina, prolamina e glutelinas básica e ácida), várias atividades vinculadas à presença de proteínas bioativas contra fungos foram analisadas, dentre elas: quitinásica, β -1,3-glucanásica, inibitória de tripsina e inibitória de papaína. A fração globulina apresentou atividade quitinásica superior à aquelas apresentadas por prolamina e glutelina ácida, e todas as frações apresentaram atividade glucanásica (TABELA 1). A fração albumina apresentou maior atividade inibitória de tripsina e papaína, seguida da fração prolamina.

Tabela 1 - Proteínas bioativas presentes nas frações proteicas obtidas a partir da farinha delipidada de sementes de *P. multijuga*

Atividade	Albumina	Globulina	Prolamina	Glutelina básica	Glutelina ácida
Quitinásica ^a (nkat/gF)	ND	2,0 ± 1,0	1,0 ± 0,5	ND	1,0 ± 0,4
β -1,3- glucanásica ^b (nkat/gF x 10 ⁻⁵)	9,80 ± 2,20	4,3 ± 0,00	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,00
Inibitória de Tripsina ^c (UI/gF)	456,6 ± 4,1	5,6 ± 0,04	23,3 ± 1,2	4,8 ± 0,18	4,7 ± 0,08
Inibitória de Papaína ^c (UI/gF)	347,3 ± 18,5	5,3 ± 0,22	30,6 ± 1,8	4,0 ± 0,51	2,3 ± 0,3

^ankat/gF – η mol de *N*-acetil-D-gluscoamina liberado por segundo por mg de proteína;

^bnKat/gF – η mol de glucose liberado por segundo por mg de proteína;

^cUI/gF – uma unidade de inibição (UI) é definida como a diminuição de 0,01 de absorbância (corrigida) em relação àquela do controle positivo (100% de atividade da protease, na ausência do inibidor), induzida por 1 mL da amostra teste.

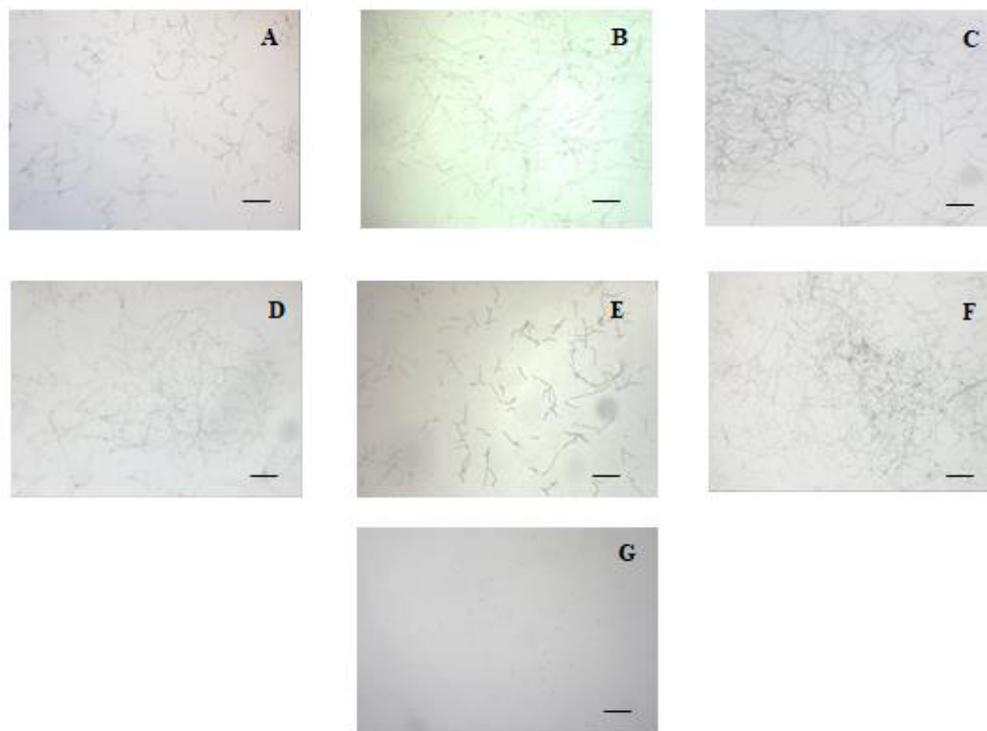
6.4. Ensaios de inibição de crescimento e germinação de fungos filamentosos e leveduriformes

As Figuras 7 e 8, atestam que as frações proteicas obtidas das sementes de *P. multijuga* não tiveram nenhum efeito negativo sobre a germinação dos esporos de *Fusarium oxysporum* e *F. solani*, respectivamente. Os esporos germinados de *F. oxysporum* apresentaram taxa de crescimento maior que o controle negativo (FIGURA 7 F) quando tratados com albumina, globulina, prolamina e glutelinas básica e ácida (FIGURA 7 A-E). Entretanto, a germinação do fungo *B. cinerea* foi inibida quando os esporos foram tratados com as frações albumina e globulina (FIGURA 9 B e C), sendo que as demais frações não apresentaram este mesmo efeito (FIGURA 9).

Em relação ao ensaio de inibição do crescimento vegetativo ou micelial, a fração globulina (200 µg/ml) reduziu em 53% o crescimento de *F. oxysporum* (FIGURA 10). Já o fungo *F. solani*, teve seu crescimento reduzido em 42%, 49%, 22% e 35% quando tratado com as frações albumina, globulina, prolamina e glutelina básica (todas na concentração de 200 µg/ml), respectivamente (FIGURA 11). Quanto ao fungo *B. cinerea*, este apresentou retardo de 33%, 28% e 46% no seu crescimento quando tratado com as frações globulina, prolamina e glutelina básica (todas na concentração de 200 µg/ml), respectivamente (FIGURA 12).

Além de fungos filamentosos, o efeito antifúngico das frações proteicas obtidas das sementes de *P. multijuga* também foi avaliado contra espécies de fungos leveduriformes do gênero *Candida* (FIGURA 13). Nenhuma das frações testadas apresentou atividade contra *C. parapsilosis* e *C. krusei*. Em relação à *C. tropicalis*, as frações prolamina e globulina, ambas na concentração de 0,2 mg/mL, inibiram em 23% e 39%, respectivamente, seu crescimento, após 48 de incubação. Apenas a globulina (0,2 mg/mL) inibiu (40%) o crescimento de *C. albicans* (FIGURA 13).

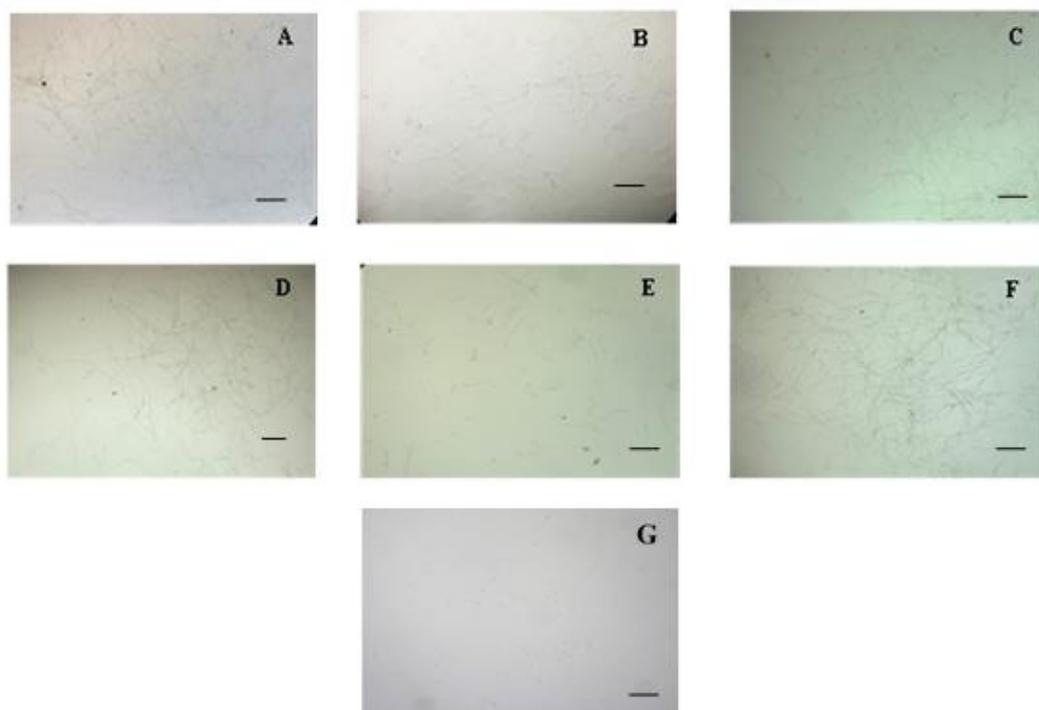
Figura 7 - Germinação dos esporos de *F. oxysporum* incubados com as frações proteicas do extrato obtido de sementes de *P. multijuga*



Fonte: Próprio autor

A suspensão de esporos foi colocada em contato por 24 h com as frações Água (A), Albumina (B), Globulina (C), Prolamina (D), Glutelina básica (E) e Glutelina ácida (F) na concentração de 0,2 mg e peróxido de hidrogênio 0,1 M (G, controle positivo). Barra: 2,5 μm .

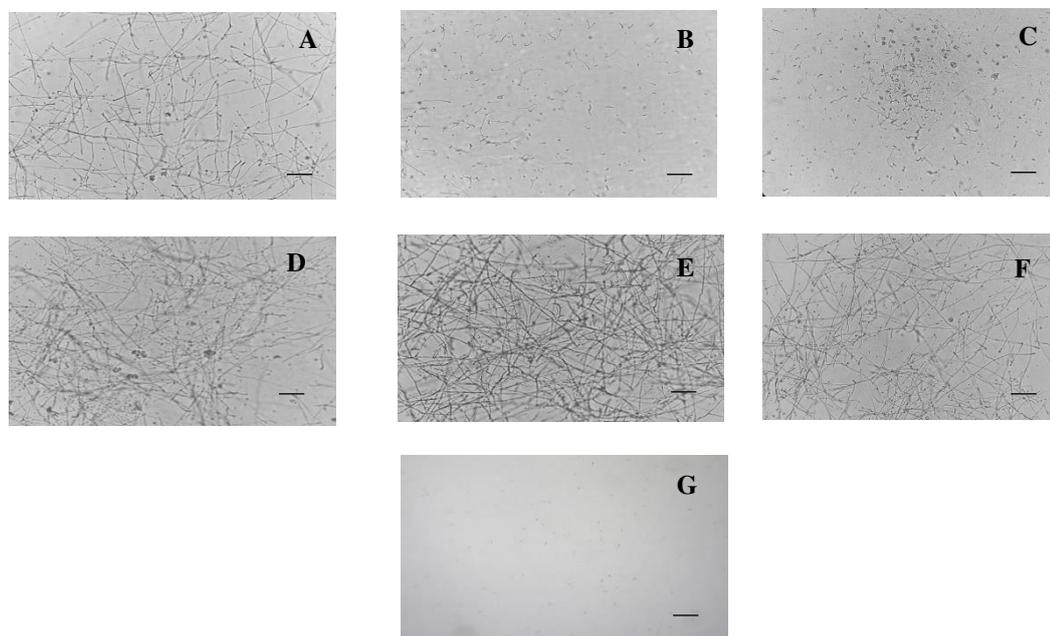
Figura 8 - Germinação dos esporos de *F. solani* incubados com as frações proteicas do extrato obtido de sementes de *P. multijuga*



Fonte: Próprio autor

A suspensão de esporos foi colocada em contato por 24 h com água (A), e com as frações Albumina (B), Globulina (C), Prolamina (D), Glutelina básica (E) e Glutelina ácida (F) na concentração de 0,2 mg/mL e peróxido de hidrogênio 0,1 M (G, controle positivo). Barra: 2,5 μ m.

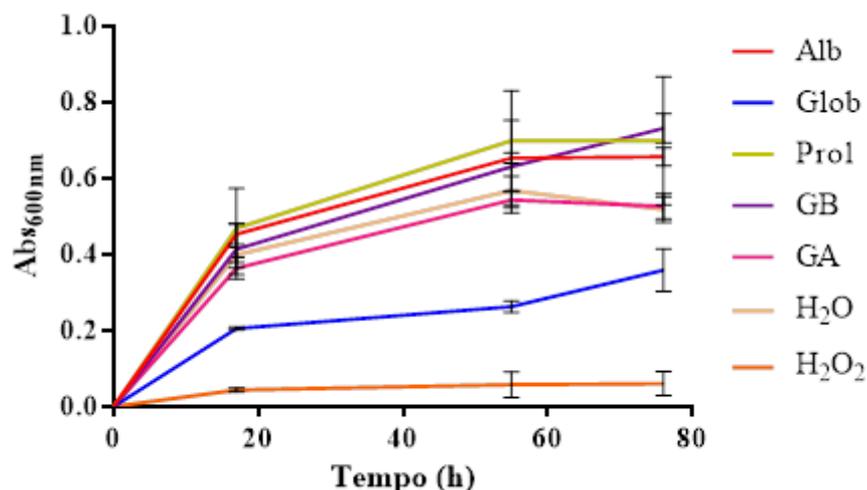
Figura 9 - Germinação dos esporos de *B. cinerea* incubados com as frações proteicas do extrato obtido de sementes *P. multijuga*



Fonte: Próprio autor

A suspensão de esporos foi colocada em contato por 24 h com água (A), e com as frações Albumina (B), Globulina (C), Prolamina (D), Glutelina básica (E) e Glutelina ácida (F) na concentração de 0,2 mg/ml e peróxido de hidrogênio 0,1 M (G, controle positivo) . Barra: 2,5 μ m.

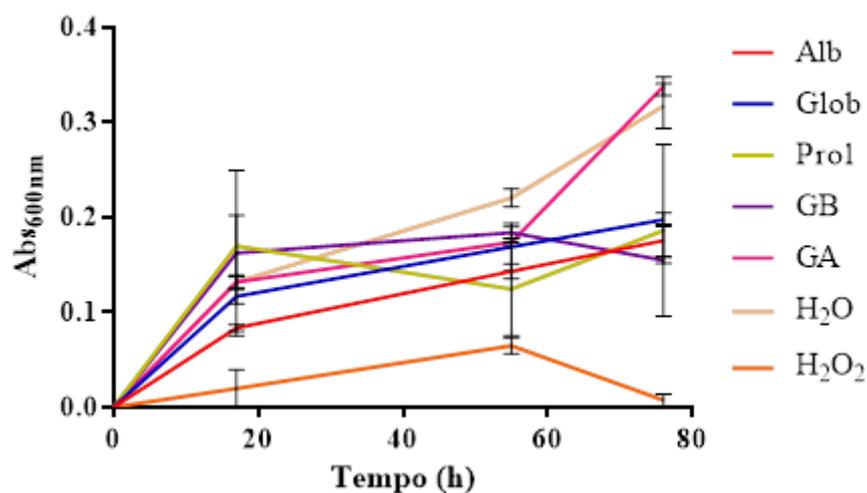
Figura 10 – Curva de crescimento do *F. oxysporum* na presença das frações proteicas do extrato obtido de sementes de *P. multijuga*



Fonte: Próprio autor

As células de *F. oxysporum* foram tratadas com as frações albumina (Alb), globulina (Glob), prolamina (Prol) e glutelinas ácida (GA) e básica (GB) na concentração de 0,2 mg/mL e em água (H₂O, controle negativo) e peróxido de hidrogênio 0,1 M (H₂O₂, controle positivo).

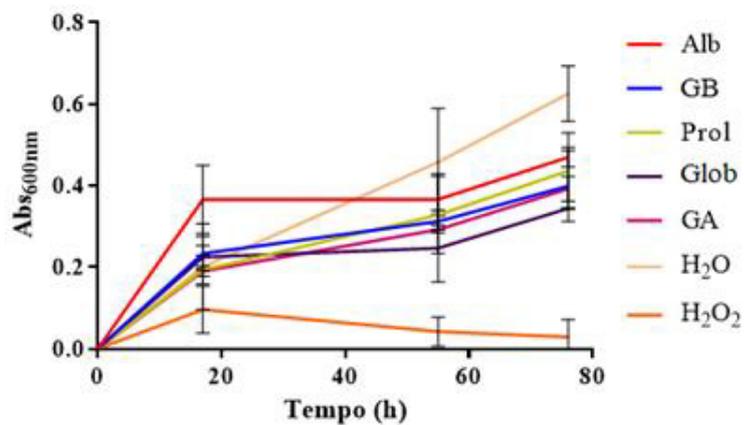
Figura 11 – Curva de crescimento do fungo *F. solani* na presença das frações proteicas do extrato obtido das sementes de *P. multijuga*



Fonte: Próprio autor

As células de *F. solani* foram tratadas com as frações albumina (Alb), globulina (Glob), prolamina (Prol) e glutelinas ácida (GA) e básica (GB) na concentração de 0,2 mg/mL e em água (H₂O, controle negativo) e peróxido de hidrogênio 0,1 M (H₂O₂, controle positivo).

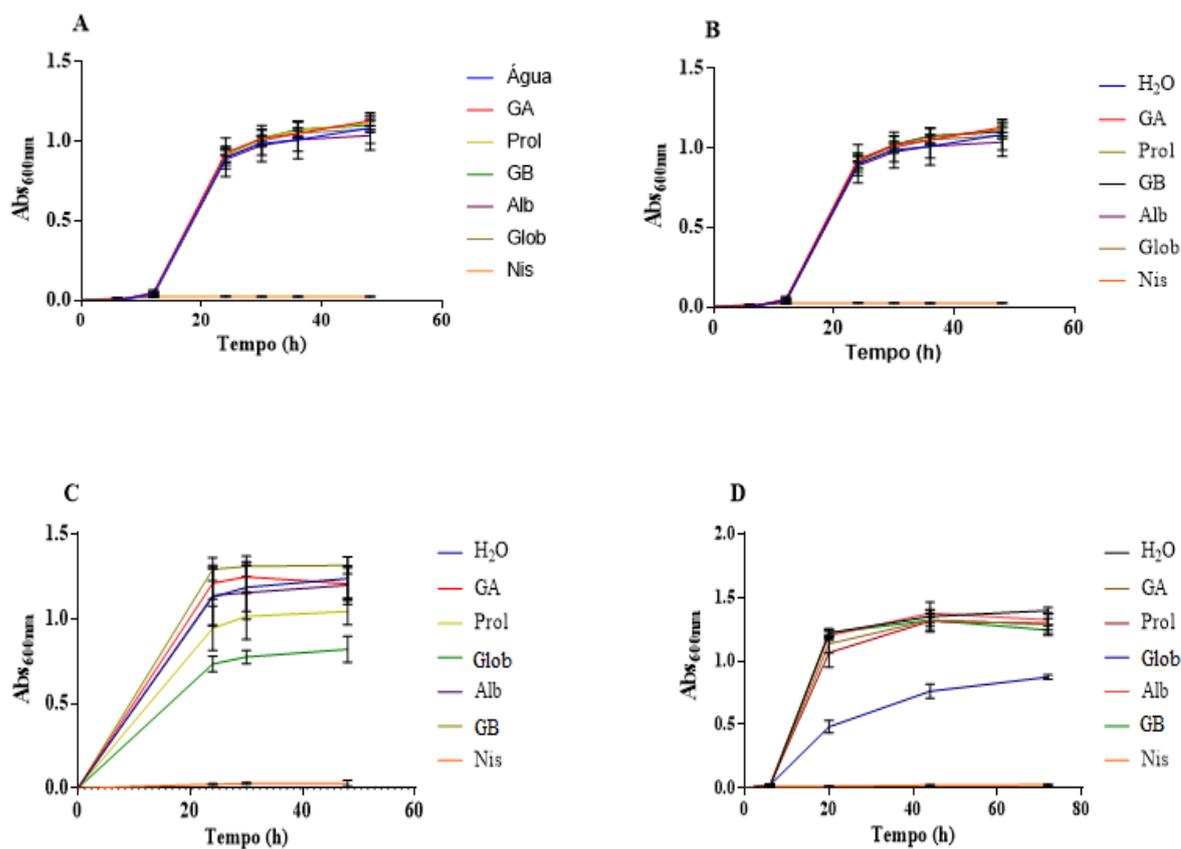
Figura 12 – Curva de crescimento do fungo *B. cinerea* na presença das frações proteicas do extrato obtido das sementes de *P. multijuga*



Fonte: Próprio autor.

As células de *B. cinerea* foram tratadas com as frações albumina (Alb), globulina (Glob), prolamina (Prol) e glutelinas ácida (GA) e básica (GB) na concentração de 0,2 mg/mL e em água (H_2O , controle negativo) e peróxido de hidrogênio 0,1 M (H_2O_2 , controle positivo).

Figura 13 - Curvas de crescimento das leveduras *C. krusei* (A), *C. parapsilosis* (B), *C. tropicalis* (C) e *C. albicans* (D) na presença das frações proteicas do extrato obtido das sementes de *P. multijuga*



Fonte: Próprio autor

As células de *Candida spp.* foram tratadas com as frações albumina (Alb), globulina (Glob), prolamina (Prol) e glutelinas ácida (GA) e básica (GB) na concentração de 0,2 mg/mL, em água (H₂O, controle negativo) e nistatina (Nis, 1000 UI, controle positivo).

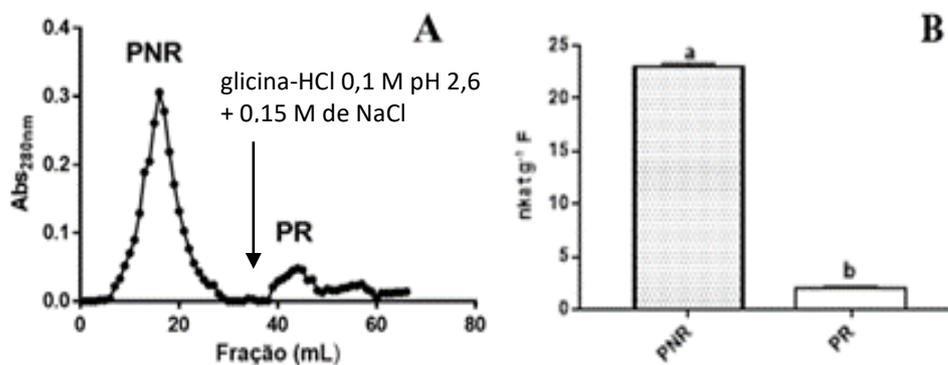
6.5. Purificação da quitinase *Pm-Chi*

A fração globulínica foi selecionada para dar continuidade ao estudo, em função de sua alta atividade quitinásica e por apresentar atividade antifúngica contra, pelo menos, quatro das espécies de fungos testados (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *F. oxysporum* e *B. cinerea*). Inicialmente, a fração globulínica foi aplicada numa coluna de quitina (cromatografia de afinidade), sendo fracionados dois picos: o primeiro correspondente às proteínas não retidas na matriz de quitina, eluído com o tampão de equilíbrio glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0, e o segundo, eluído com tampão glicina-HCl 0,1 M, pH 2,6, ambos acrescidos de NaCl 0,15 M (FIGURA 14 A). Apenas o pico correspondente às proteínas não retidas apresentou atividade quitinásica, indicando que, nas condições em que a cromatografia foi conduzida, a quitinase não se ligou a matriz de quitina (FIGURA 14 B). Na segunda tentativa de purificação, a fração globulina foi aplicada a uma nova cromatografia de afinidade em matriz de quitina, equilibrada em tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0, resultando, novamente, em dois picos: o pico de proteínas não retidas, eluído com o tampão de equilíbrio; e o pico de proteínas retidas, eluídas com HCl 0,1 M (FIGURA 15 A). Apenas o pico de proteínas não retidas apresentou atividade quitinásica, indicando, novamente, que a quitinase não se ligou a matriz de quitina, nesta condição a pH 9,0 (FIGURA 15 B).

Sendo assim, a fração globulina foi submetida a cromatografia de troca iônica em matriz de DEAE-Sephacel, equilibrada com o tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0. As proteínas não retidas foram eluídas com o tampão de equilíbrio, enquanto as proteínas retidas foram eluídas com o tampão de equilíbrio acrescido de NaCl nas concentrações de 0,2 M, 0,4 M e 0,8 M (FIGURA 16 A). A mais elevada atividade quitinásica foi detectada no pico retido 2, eluído em tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0 acrescido de NaCl 0,4 M (FIGURA 16 B).

Visto que o pico retido 2 apresentou maior atividade quitinásica, o mesmo foi submetido a eletroforese (PAGE-SDS, 12,5%) para visualização de seu perfil proteico. A Figura 17 mostra que o pico retido 2 apresentou apenas uma banda proteica, tanto na ausência como na presença de β -mercaptoetanol (raias 1 e 2), com massa molecular aparente de 66 kDa. A proteína pura foi denominada *Pm-Chi* (*Parkia multijuga* Chitinase). A estratégia de purificação adotada para obtenção da *Pm-Chi* resultou num índice de purificação de 44,03 vezes, com rendimento proteico de 0,9% (TABELA 2).

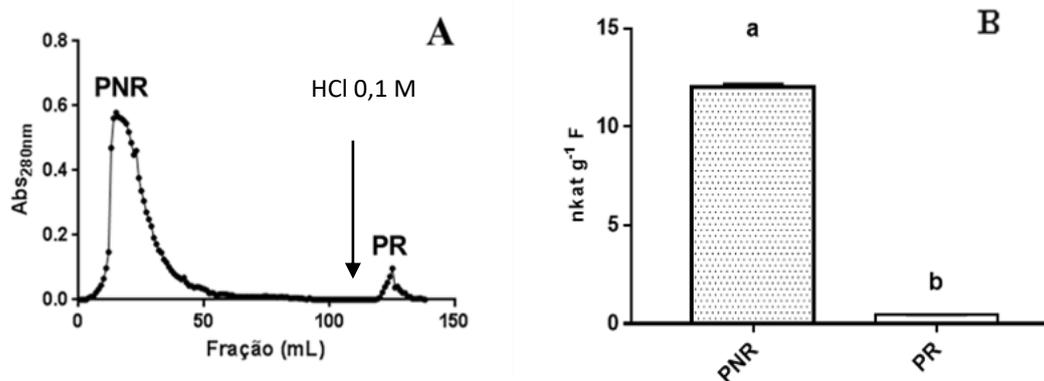
Figura 14 - Perfil da fração globulina (20 mg), oriunda do extrato obtido das sementes de *P. multijuga*, após cromatografia de afinidade em matriz de quitina equilibrada com tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0, e a fração retida eluída com tampão glicina-HCl 0,1 M, pH 2,6, ambos acrescido de NaCl 0,15 M



Fonte: Dados da pesquisa.

(A) As proteínas não retidas (PNR) foram eluídas com o tampão de equilíbrio e as proteínas retidas (PR) foram eluídas com o tampão glicina 0,1 M, pH 2,6 acrescido de 0,15 M de NaCl. Fluxo: 12 mL/h; Fração: 0,2 mL. (B) Atividade quitinásica das frações coletadas durante a cromatografia em matriz de quitina. Os resultados foram expressos em nkat por g de farinha (nkat g⁻¹ F).

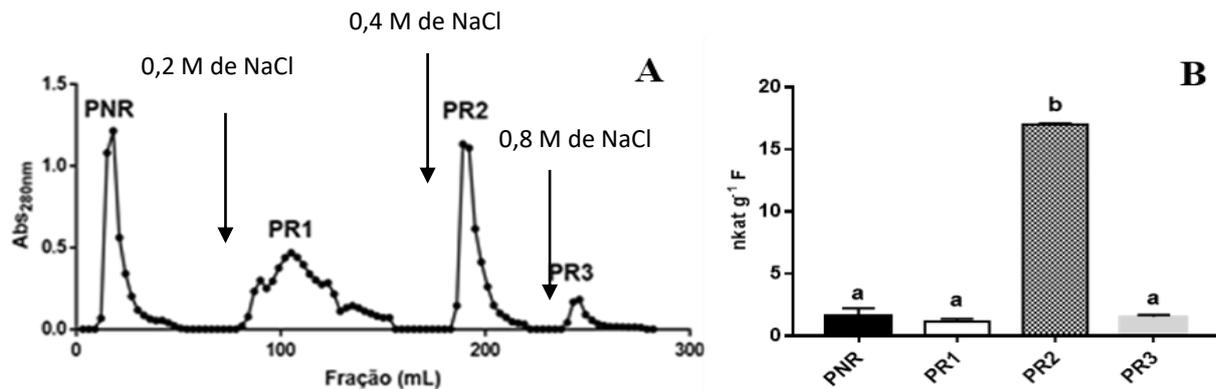
Figura 15 - Perfil da fração globulina (20 mg), oriunda do extrato obtido das sementes de *P. multijuga*, após cromatografia de afinidade em matriz de quitina equilibrada com tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0, contendo NaCl 0,15 M, e a fração retida eluída com HCl 0,1 M



Fonte: Dados da pesquisa.

(A) As proteínas não retidas (PNR) foram eluídas com o tampão de equilíbrio e as proteínas retidas (PR) foram eluídas com HCl 0,1 M. Fluxo: 12 mL/h; Fração: 0,2 mL. (B) Atividade quitinásica das frações coletadas durante a cromatografia em coluna de quitina. Os resultados foram expressos em nkat por g de farinha (nkat g⁻¹ F).

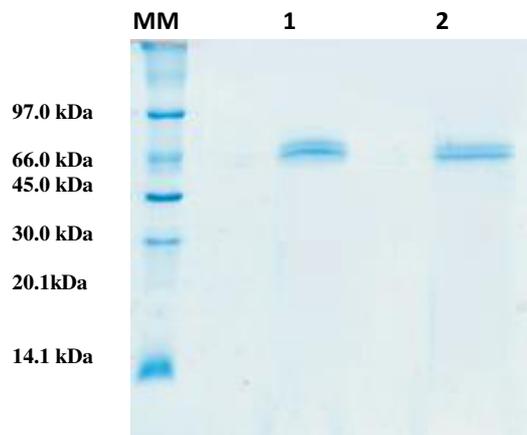
Figura 16 – Perfil da fração globulina, oriunda do extrato obtido das sementes de *P. multijuga*, após cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephacel



Fonte: Dados da pesquisa.

A fração globulina (25 mgP/ml), obtida a partir do fracionamento do extrato das sementes de *P. multijuga*, foi aplicada em matriz de DEAE-Sephacel (22/2 cm), equilibrada com tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0. (A) As proteínas retidas foram eluídas com o tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0 contendo NaCl nas concentrações 0,2 M (PR1), 0,4 M (PR2) e 0,8 M (PR3). Fluxo: 60 mL/h; Fração: 3 mL. (B) Atividade quitinásica das frações coletadas durante a cromatografia em coluna de quitina. Os resultados foram expressos em nkat por g de farinha (nkat g⁻¹ F).

Figura 17 - Perfil do pico 2, retido na matriz de DEAE-Sephacel, após eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE-SDS; 12,5%)



Fonte: Próprio autor.

Nas raias encontram-se o marcador de massa molecular (MM), o pico retido em tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0 acrescido de NaCl 0,4 M (1) e o mesmo pico retido tratado com β -mercaptoetanol (2). O gel foi corado com a metodologia descrita por Neuhoff e colaboradores (1988). Quantidade de proteína aplicada por raia: 15 μ g.

Tabela 2 – Purificação e rendimento da quitinase presente em sementes de *P.-multijuga* (*Pm-Chi*)

Etapa de purificação	Proteína total (mg) ^a	Atividade total (U) ^b	Atividade específica (U mg ⁻¹) ^c	Índice de purificação ^d	Rendimento proteico (%) ^e
Extrato	72,54 ± 5,600	87,62 ± 4,11	1,20 ± 0,05	1,0	100,00
Globulina	3,96 ± 0,430	76,67 ± 2,54	19,35 ± 0,64	16,12	5,46
<i>Pm-Chi</i>	0,66 ± 0,005	34,88 ± 2,14	52,84 ± 3,25	44,03	0,90

Fonte: Próprio autor.

^a Teor de proteína obtido a partir de 1 g de farinha de sementes de *P. multijuga*

^b A atividade foi mensurada em tampão acetato de sódio 0,05 M (pH 5,2) a 37 °C, usando 1% de quitina coloidal como substrato e expressa em U, sendo a quantidade de enzima que libera 1 μmol de NAG

^c A atividade específica obtida em cada etapa foi calculada como sendo a razão entre a sua atividade total e a concentração de proteína

^d O índice de purificação obtido em cada etapa foi calculado como sendo a razão entre a sua atividade específica e aquela do extrato bruto.

^e O rendimento proteico foi calculado como sendo a razão entre a quantidade de proteína total em cada etapa e aquela do extrato bruto, multiplicado por 100.

6.6. Caracterização bioquímica da quitinase *Pm*-Chi

6.6.1. Zimograma para confirmação da atividade quitinásica da *Pm*-Chi

O zimograma (FIGURA 18) mostra que a *Pm*-Chi apresenta atividade quitinásica na banda de massa molecular aparente de 66 kDa e confirma a presença de atividade quitinolítica na mesma.

6.6.2. Detecção de glicosilação na quitinase *Pm*-Chi

A Figura 19 mostra que apenas a fetuína (raia 1), uma proteína glicosilada usada como controle positivo, foi revelada pelo reagente de schiff, mas a *Pm*-Chi não (raia 2), indicando que, esta última, não é uma glicoproteína.

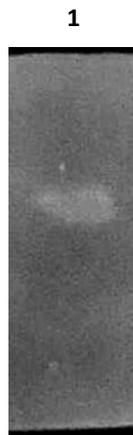
6.6.3. Determinação do pH ótimo da *Pm*-Chi

A *Pm*-Chi apresentou maior atividade quitinásica quando incubada com o tampão fosfato de sódio pH 7,0 (FIGURA 20).

6.6.4. Temperatura ótima de atividade quitinolítica da *Pm*-Chi

A Figura 21 revela que a *Pm*-Chi apresentou maior atividade quitinásica quando o ensaio foi conduzido a 45 °C.

Figura 18 - Zimograma para confirmação da atividade quitinolítica da *Pm*-Chi (pico retido em DEAE-Sephacel)



Fonte: Próprio autor.

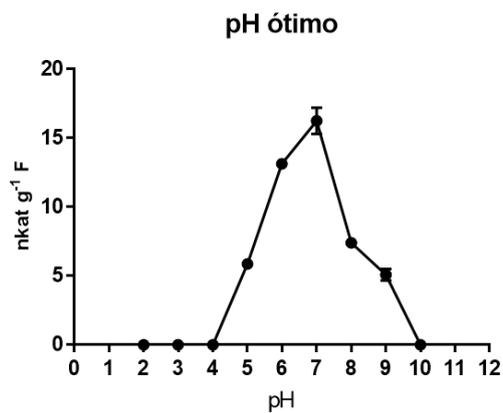
O gel foi corado segundo a metodologia descrita por Leger e colaboradores (1993). Quantidade de proteína aplicada por raia: 10 μ g.

Figura 19 - Perfil da fetuína e *Pm*-Chi após PAGE-SDS (12,5%) e coloração de Schiff

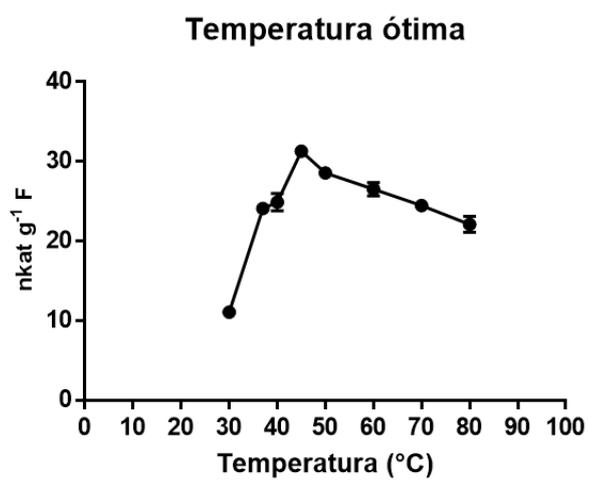


Fonte: Próprio autor.

Nas raias encontram-se a fetuína (1) e o pico retido em tampão glicina pH 9,0 acrescido de NaCl 0,4 M (2). O gel foi corado com a metodologia descrita por Schiff. Quantidade de proteína aplicada por raia: 45 μ g.

Figura 20 – Determinação do pH ótimo de *Pm-Chi*

Fonte: Dados da pesquisa.

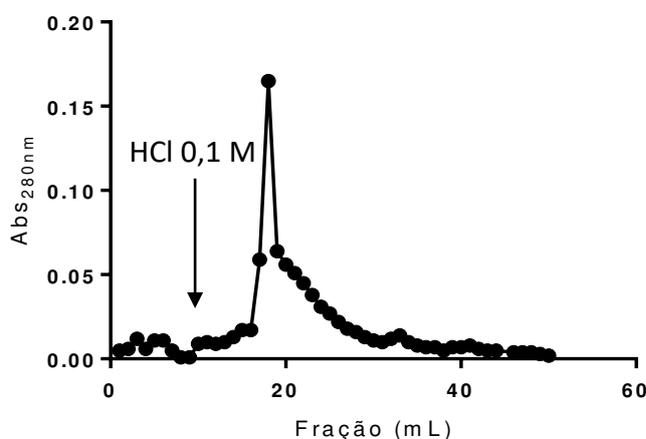
Figura 21 – Temperatura ótima de atividade quitinolítica da *Pm-Chi*

Fonte: Dados da pesquisa.

6.6.5. Avaliação da afinidade da *Pm-Chi* por quitina

Visto que o pH ótimo de atividade quitinásica da *Pm-Chi* foi 7,0, então, para averiguar uma possível interação da quitinase purificada com a quitina, *Pm-Chi* (2,65 mg) foi aplicada em matriz de quitina. A Figura 22 mostra que a *Pm-Chi* se liga a quitina.

Figura 22 - Perfil de eluição da *Pm-Chi* após aplicação em coluna de quitina



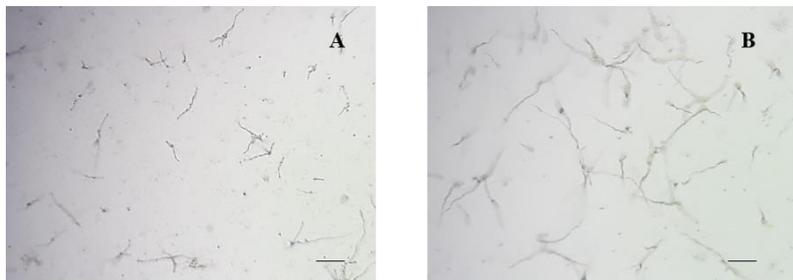
Fonte: Dados da pesquisa.

A *Pm-Chi* (2,65 mgP) foi aplicada em coluna de quitina, equilibrada com tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,0. As proteínas não retidas foram eluídas com o tampão de equilíbrio e as proteínas retidas foram eluídas com HCl 0,1 M. Fluxo: 30 mL/h; Fração: 0,5 mL.

6.7. Germinação e crescimento de fungos filamentosos na presença de *Pm-Chi*

A Figura 23 mostra que a *Pm-Chi* teve apenas baixo efeito inibitório sobre a germinação dos esporos de *G. cingulata*. A Figura 24 revela que a *Pm-Chi* inibiu a germinação de esporos de *P. herquei*.

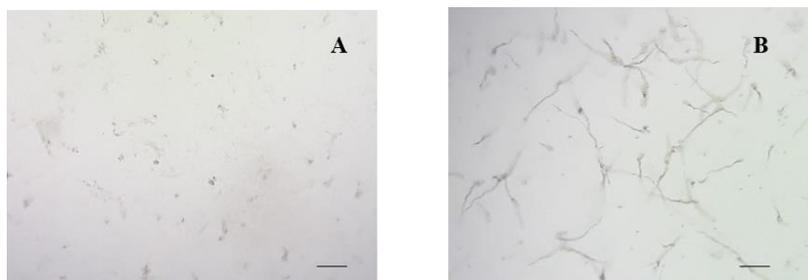
Figura 23 - Fotomicrografia típica dos esporos de *G. cingulata* usada para avaliação de sua germinação e crescimento na presença de *Pm-Chi*



Fonte: Próprio autor.

A suspensão de esporos foi colocada em contato por 24 h com a *Pm-Chi* (A) na concentração de 17,80 mg/mL e com água (B). Barra: 2,5 µm.

Figura 24 - Fotomicrografia típica dos esporos de *P. herquei* usada para avaliação de sua germinação e crescimento na presença de *Pm-Chi*



Fonte: Próprio autor.

A suspensão de esporos foi colocada em contato por 24 h com a *Pm-Chi* (A) na concentração de 17,80 mg/mL e com água (B). Barra: 2,5 µm.

6.8. Parcial mecanismo de ação da *Pm-Chi*

6.8.1. CIM da *Pm-Chi*

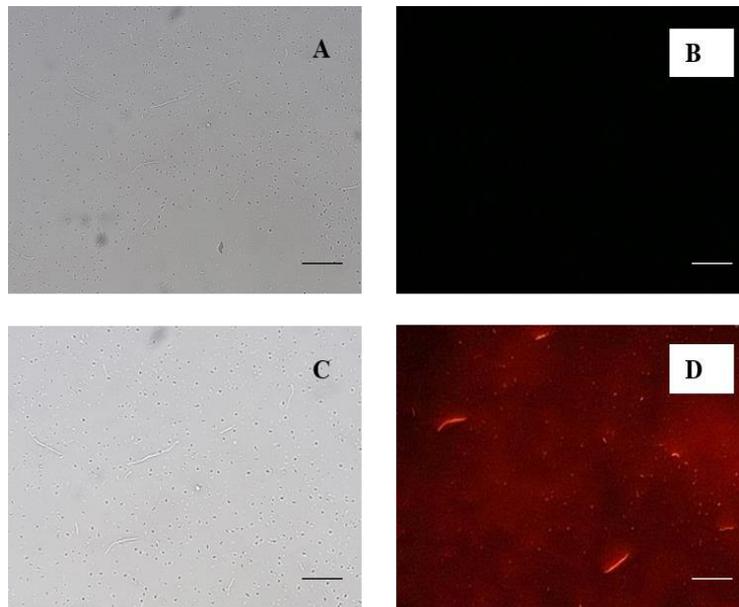
A concentração mínima da *Pm-Chi* para inibir 50% do crescimento do fungo *G. cingulata* foi 21,87 µg/ml e para inibir 90% de seu crescimento foi 44,74 µg/ml. A concentração mínima de *Pm-Chi* para inibir 50% e 90% do crescimento de *P. herquei* foi de 17,80 µg/ml e 43,94 µg/ml, respectivamente. Essas concentrações foram utilizadas nos ensaios cujos resultados estão apresentados a seguir.

6.8.2. Efeito da *Pm-Chi* sobre a permeabilidade celular dos esporos de *P. herquei* e *G. cingulata*

O tratamento dos esporos de *P. herquei* e *G. cingulata* com *Pm-Chi* (17,80 µg/mL em *P. herquei* e 21,87 µg/ml em *G. cingulata*), por 24 h, promoveu emissão de fluorescência, evidenciando o aumento da permeabilidade da superfície celular (FIGURAS 25 e 26, respectivamente). Não houve emissão de fluorescência quando estes esporos foram incubados com água esteril.

Outro parâmetro avaliado foi a capacidade da *Pm-Chi* em induzir a formação de EROs. A Figura 27 mostra que a *Pm-Chi*, na concentração de 21,87 µg/mL, não promoveu emissão de fluorescência nas células de *G. cingulata*, típica da reação do DCFH-DA com peroxidases endógenas, um indicativo da formação de EROs. Incubação com água estéril (controle) não induziu a síntese de EROS. A Figura 28 mostra que a *Pm-Chi*, na concentração de 17,80 µg/ml, também, não promoveu emissão de fluorescência nas células de *P. herquei*. A água foi usada como controle negativo e, também, não resultou em emissão de fluorescência.

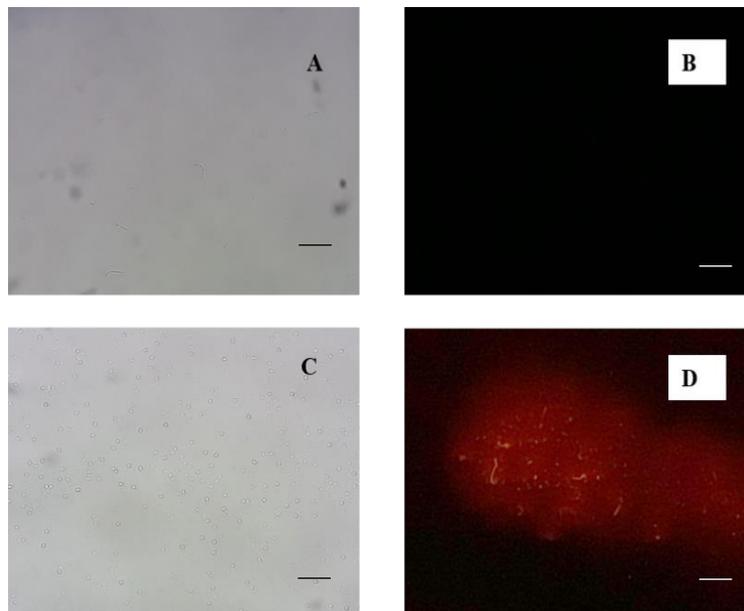
Figura 25 - Fotomicrografia típica usada para avaliação da permeabilidade da superfície celular de esporos de *P. herquei* após incubação com *Pm*-Chi



Fonte: Próprio autor.

Fotomicrografia em microscópio de fluorescência de esporos de *P. herquei* previamente incubados com água estéril (A e B) e *Pm*-Chi (C e D) durante 24 h, seguida da adição de iodeto de propídeo 0,001 M e incubação por 30 minutos. A coloração avermelhada indica fluorescência decorrente da entrada do iodeto de propídeo por conta da alteração na permeabilidade da superfície celular. Aumento de 400x. Barra: 2,5 μ m.

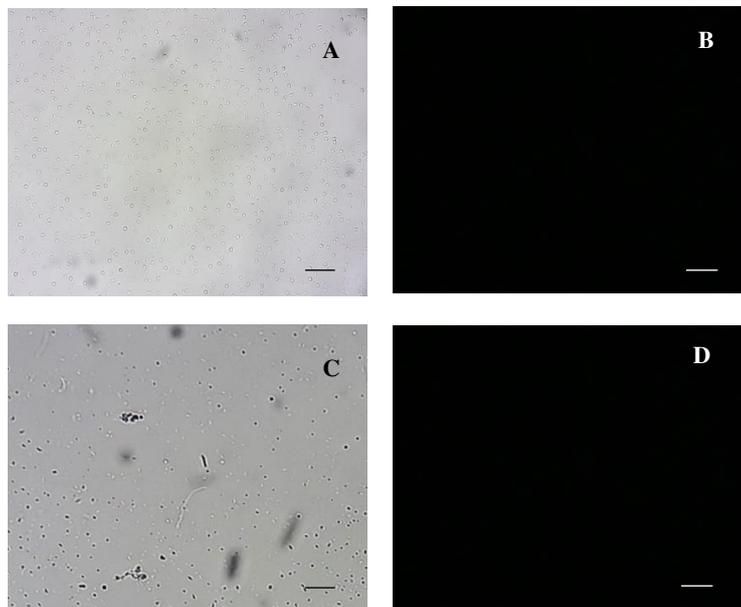
Figura 26 - Fotomicrografia típica usada para avaliação da permeabilidade da superfície celular de esporos de *G. cingulata* após incubação com *Pm*-Chi



Fonte: Próprio autor.

Fotomicrografia em microscópio de fluorescência de esporos de *G. cingulata* previamente com água estéril (A e B) e *Pm*-Chi (C e D) durante 24 h, seguida da adição de iodeto de propídeo 0,001 M e incubação por 30 minutos. A coloração avermelhada indica fluorescência decorrente da entrada do iodeto de propídeo por conta da alteração na permeabilidade da superfície celular. Aumento de 400x. Barra: 2,5 μ m.

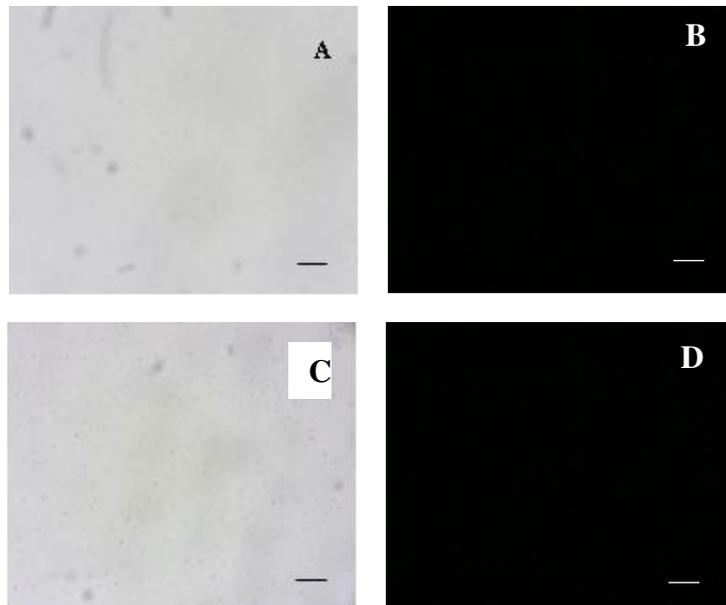
Figura 27 - Fotomicrografia típica usada para avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em esporos de *G. cingulata* incubados com *Pm-Chi*



Fonte: Próprio autor.

Fotomicrografia típica usada para avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) em esporos de *G. cingulata* incubados com *Pm-Chi*, previamente incubadas com água (A e B) ou *Pm-Chi* (C e D), por 24 h. Barra: 2,5 μm .

Figura 28 - Fotomicrografia típica usada para avaliação da indução da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO_s) em esporos de *P. herquei* incubados com *Pm-Chi*



Fonte: Próprio autor.

Fotomicrografia típica usada para avaliação da indução da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO_s) em esporos de *P. herquei* incubados com *Pm-Chi*, previamente incubadas com água (A e B) ou *Pm-Chi* (C e D), por 24 h. Barra: 2,5 μ m.

7. DISCUSSÃO

Nas plantas, as quitinases estão presentes principalmente em sementes, caules, tubérculos e flores, podendo ser encontradas em sementes de várias espécies, onde atuam como proteínas de reserva e participam da defesa contra insetos e microrganismos (MASUDA *et al.*, 2015). As quitinases vêm sendo isoladas de muitas plantas, incluindo o tabaco (PU *et al.*, 1996), grão de bico (SAIKIA *et al.*, 2005), pepino, feijão preto (CHU *et al.*, 2005), tomate (WU *et al.*, 2001), uvas (SLUYTER *et al.*, 2005), cevada (KIRUBAKARAN e SAKTHIVEL, 2007), romã (KOPPARAPU *et al.*, 2011), maçã (CABANAS, 2013). As quitinases antifúngicas exercem ação hidrolítica sobre a quitina da parede celular fúngica levando à lise celular (CAZYPEDIA CONSORTIUM, 2017), como exemplos, elas apresentam atividade antifúngica contra os fungos *Alternaria sp.*, *Bipolaris oryzae*, *B. cinerea*, *Curvularia lunata*, *F. oxysporum*, *F. udum*, *Mycosphaerella arachidicola*, *Pestalotia theae*, *Rhizoctonia solani*, *Trichoderma sp.* e *Aspergillus niger* (SAIKIA *et al.* 2005; CHU e NG 2005; KABIR *et al.*, 2016). Assim, tendo em vista a importante ação de quitinase como moléculas antifúngicas, as sementes de *P. multijuga* foram selecionadas como objeto de estudo, por serem importantes fontes de proteínas e por serem de uma espécie de planta amazônica com grande potencial biotecnológico (VITALE & BOLLINI, 1995).

A primeira etapa do trabalho foi a escolha da solução para extração das proteínas presentes na farinha das sementes de *P. multijuga*. Como observado na Figura 3, o tampão glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0 acrescido de NaCl 0,15 M foi a solução que extraiu a maior quantidade de proteínas quando comparada com o restante das soluções extratoras testadas. O próximo passo foi fracionar o extrato utilizando diferentes solventes (NaCl 0,15 M, etanol 70%, NaOH 0,1 M e HCl 0,1 M) para obtenção das frações albumina, globulina, prolamina e glutelinas básica e ácida. Conforme é visualizado na Figura 5, a fração com o maior teor de proteínas foi da albumina (20,04 mgP/gF), seguida das demais, que não apresentaram diferenças significativas entre si. Esses dados são contrários aos resultados obtidos por (SANTOS, 2012), que observou maior quantidade de proteínas na fração globulina de sementes de *Parkia pendula*. Esses resultados indicam que a concentração de proteínas varia entre as espécies, confirmando que as concentrações relativas dessas reservas podem variar entre as

espécies e até entre espécies pertencentes à mesma família (CORTE *et al.*, 2006). As globulinas são proteínas insolúveis em água e solúveis em soluções salinas diluídas (OSBORNE, 1924), elas são as proteínas mais representativas das sementes de leguminosas (60% a 90% das leguminosas), encontrando-se presentes não só nas dicotiledóneas, mas também nas monocotiledóneas (incluindo cereais e palmeiras) e esporos de pteridófitas (TEMPLEMAN *et al.*, 1987).

As frações obtidas foram, então, avaliadas quanto sua atividade contra fungos filamentosos e leveduriformes. A fração globulina (200 µg/ml) reduziu o crescimento micelial de *F. oxysporum* (FIGURA 10), mas nenhum efeito foi observado sobre a germinação dos seus esporos (FIGURA 7). Já o fungo *F. solani*, teve seu crescimento micelial inibido quando tratado com as frações albumina, globulina, prolamina e glutelina básica (todas na concentração de 200 µg/ml) (FIGURA 11), sendo que nenhuma das frações testadas inibiu a germinação dos seus esporos (FIGURA 8). O fungo *B. cinerea* teve seu crescimento vegetativo inibido quando tratado com as frações albumina, globulina, prolamina, e glutelina básica (todas na concentração de 200 µg/ml) (FIGURA 12). Apesar de algumas proteínas apresentarem capacidade de inibir ambas as etapas do desenvolvimento fúngico, há aquelas que inibem uma única fase. Uma urease da soja (SBU), por exemplo, inibiu somente a germinação de *F. solani*, não exercendo nenhum efeito no crescimento desse fungo. Já Melo e colaboradores (2005) verificaram que a lectina (250 µgP/mL) de *Luetzelburgia auriculata* foi capaz de inibir o crescimento das hifas dos fungos *Colletotrichum lindemunthianum*, *F. solani* e *Aspergillus niger*, entretanto não apresentou qualquer efeito sobre a germinação dos esporos. A ocorrência de atividade inibitória de crescimento micelial dos fungos e a ausência de atividade inibitória de germinação de esporos, pode ser decorrente da concentração/disposição dos elementos que compõem a parede celular dos fungos que, são diferentes entre as fases do ciclo de vida desses organismos. A parede celular dos fungos é constituída de polímeros lineares de β-1,4-N-acetil-D-glucosamina (quitina) ou celulose (como no caso dos oomicetos), α-1,3-glucanos, β-1,3-glucanos e β-1,6-glucanos, lipídios, peptídeos e uma matriz proteica. A proporção, concentração e/ou disposição destes elementos pode variar de acordo com a espécie ou entre as fases do ciclo de vida destes organismos (MITCHELL *et al.*, 2016).

Em relação ao efeito antifúngico contra as leveduras, *C. albicans* teve seu crescimento reduzido pela fração globulina, e *C. tropicalis* pelas frações prolamina e

globulina (FIGURA 13). Similarmente ao verificado com as frações proteicas obtidas do extrato de sementes de *P. multijuga*, diversos extratos, assim como compostos isolados de plantas, já demonstraram atividade inibitória do crescimento de leveduras do gênero *Candida*. O extrato aquoso de *Arctium minus* mostrou atividade inibitória contra *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. stellatoideia* e *C. dubliniensis* (LUBIAN *et al.*, 2010). Os extratos de *Eleutherine plicata*, *Psidium guajava* e *Syzygium aromaticum* reduziram o crescimento de *C. albicans* (MENEZES *et al.*, 2009). Uma proteína antifúngica, denominada SBTX, foi isolada das sementes de soja e exibiu atividade contra *C. albicans* e *C. parapsilosis* (MORAIS *et al.*, 2010).

Após identificação do potencial antifúngico das frações proteicas de sementes de *P. multijuga*, experimentos foram conduzidos buscando a detecção de atividades que pudessem ser relacionadas à atividade antifúngica detectada previamente. Nesse contexto, atividades inerentes às seguintes proteínas foram detectadas: quitinase, glucanase, inibidor de tripsina e inibidor de papaína (TABELA 1). Para todas essas proteínas, há evidências de envolvimento na defesa de plantas. A presença de inibidores de proteases serínicas em sementes quiescentes da espécie estudada já havia sido relatada por Chevreuil (2014).

Há muitos estudos relatando o envolvimento de inibidores de proteinases (serínicas e cisteínicas), com as estratégias naturais de defesa das plantas contra insetos e patógenos (LAWRENCE; KOUNDAL, 2002; CHOI *et al.*, 2002; LOPES *et al.*, 2009). O inibidor de tripsina purificado das sementes do ingá branco (*Inga laurina*) mostrou ser ativo contra larvas dos insetos *Diatraea saccharalis* e *Heliothis virescens* (RAMOS *et al.*, 2012) e contra as leveduras *C. tropicalis* and *Candida buinensis* (MACEDO *et al.*, 2016). O inibidor obtido a partir de extratos de cascas de maçã inibiu as proteases do fungo *Colletotrichum acutatum* (GREGORI; GUIDARELLI; MARI, 2010). Já o inibidor de tripsina purificado de sementes de *Inga vera* apresentou ação fungicida para *Candida buinensis* e se mostrou como agente bacteriostático para *Escherichia coli*. Além dessas atividades, essa proteína mostrou ação inseticida, tendo inibido as proteases intestinais de *Anagasta kuehniella*, *Spodoptera frugiperda*, *Corcyra cephalonica*, *Heliothis virescens* e *Helicoverpa zea* (BEZERRA *et al.*, 2016).

Em relação às quitinases, há dados mostrando que a superexpressão de seus genes em plantas foi capaz de aumentar a resistência a patógenos, uma vez que tais enzimas catalisam a hidrólise da quitina, um dos principais componentes da parede celular de

fungos (CABANAS, 2013; LANDIM, 2011). Um exemplo de quitinase com atividade antifúngica foi aquela purificada a partir de sementes de *Vicia faba*. Essa proteína apresentou potente atividade contra os fungos *Pythium aphanidermatum*, *F. solani*, *Physalospora piricola*, *Alternaria alternate*, *B. cinerea* e *F. oxysporum* (WANG *et al.*, 2012).

Quanto às β -1,3-glucanases da alfafa, cevada, tabaco e soja, elas evitaram doenças fúngicas nestas plantas. A superexpressão heteróloga de genes de glucanase de soja reforça a proteção de batatas contra infecções de *Phytophthora infestans* e kiwi de *B. cinerea* (GROVER e GOWTHAMAN, 2003). Uma glucanase de batata aumentou a resistência em linho contra *F. culmorum* e *F. oxysporum* (WRÓBEL-KWIATKOWSKA *et al.*, 2004). Os genes que codificam β -1,3-glucanases de cevada, trigo, alfafa, tabaco e soja quando expressos, concomitantemente, com os genes para proteínas do tipo taumatina, peroxidases, quitinases e α -1-purotionina, em diferentes plantas cultivadas, tornam-nas mais resistentes contra infecção fúngica (BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2012).

A fração globulínica foi selecionada para dar continuidade devido sua boa atividade antifúngica e a presença, nessa fração, de quitinases, proteínas reconhecidas antifúngicas. Nesse sentido, partimos então para a purificação de, pelo menos, uma quitinase presente nessa fração. A quitinase, denominada de *Pm-Chi*, foi purificada usando cromatografia de troca iônica em matriz de DEAE-Sephacel (FIGURA 16 A). A enzima purificada (*Pm-Chi*) apresentou aumento de atividade específica de, aproximadamente, 44,03 vezes, em relação ao extrato, e rendimento de 0,9% (TABELA 2). *Pm-Chi* mostrou rendimento proteico semelhante aos de quitinases purificadas a partir de sementes relatadas na literatura, como a quitinase de sementes de *Pyrus ussuriensis*, que apresentou rendimento proteico de 1,5% (HAN *et al.*, 2016).

Pm-Chi apresentou massa molecular aparente de 65 kDa, em condições desnaturantes (FIGURA 17, raia 1). A massa molecular da maioria das quitinases varia de 30 kDa a 60 kDa (PATIL *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2009; IKEDA *et al.*, 2009), existindo, também, relatos de quitinases com menor massa, como a quitinase de *Panax notoginseng*, com 15 kDa (LAM & NG, 2003), e de maior massa, como a quitinase de *Bombyx mori*, 75 kDa (KABIR *et al.*, 2006). A massa molecular de *Pm-Chi* (65 kDa) está dentro da faixa relatada para quitinases. Através da coloração com o reagente de Schiff foi possível verificar que *Pm-Chi* não é uma proteína glicosilada (FIGURA 19), assim como a quitinase purificada de *Pyrus ussuriensis* (HAN *et al.*, 2016), diferindo

das quitinases purificadas das sementes de *Punica granatum* (KOPPARAPU *et al.*, 2011) e *Trichosanthes dioica* (KABIR *et al.*, 2015), que são glicoproteínas.

O pH ótimo encontrado para *Pm-Chi* é 7,0 (FIGURA 20). A maioria das quitinases de planta possuem pH ótimo entre 3,0 e 5,0 (ZHANG *et al.*, 2013). Contudo, quitinases de *F. microcarpa*, *Carica papaya*, *Ananas cosomus*, *Vicia faba* e *Avena sativa* exibiram pH ótimo entre pH 5,4 e 9,0 (CHEN *et al.*, 2007; SØRENSEN *et al.*, 2010; TAIRA *et al.*, 2005b; TAIRA *et al.*, 2005a; WANG *et al.*, 2012). Em relação à temperatura ótima, *Pm-Chi* mostrou o máximo de atividade a 45 °C (FIGURA 21). O ótimo de temperatura de *Pm-Chi* é similar aqueles apresentados por quitinases purificadas a partir de sementes de repolho, milho e *A. pavonina*, 40 a 50 °C, 45 a 55 °C e 60 °C, respectivamente (CHANG *et al.*, 1992; LIN *et al.*, 1992; SANTOS *et al.*, 2004). Após estabelecimento do pH ótimo da *Pm-Chi*, a enzima foi submetida à cromatografia de afinidade em matriz de quitina. Esta foi realizada nas condições de pH ótimo para visualizar se a quitinase se liga a quitina. Nestas condições, a *Pm-Chi*, de fato, interagiu com a matriz de quitina à semelhança de algumas outras quitinases (KABIR *et al.*, 2015).

A *Pm-Chi* mostrou potente atividade contra fungos fitopatogênicos, reduzindo de forma considerável o crescimento vegetativo de *P. herquei* e *G. cingulata*. A *Pm-Chi* mostrou, também, alto efeito inibitório da germinação de esporos de *P. herquei* (FIGURA 24), porém apresentou baixo efeito inibitório na germinação de esporos de *G. cingulata* (FIGURA 23). A quitinase foi capaz de provocar aumento na permeabilidade da membrana plasmática dos esporos de *P. herquei* e *G. cingulata* (FIGURAS 25 e 26). A *Pm-Chi* não induziu formação de EROs em *G. cingulata* (FIGURA 27) ou em *P. herquei* (FIGURA 28). O efeito deletério de quitinases sobre fungos é algo bem estabelecido e vários trabalhos confirmam isso (LAM; NG, 2001; CHU; NG, 2005; WANG *et al.*, 2005). Como os fungos contêm quitina, na estrutura da parede celular, a indução de quitinases em plantas é uma das principais respostas de defesa ao ataque destes patógenos (PATIL; GHORMADE; DESHPANDE, 2000). Apesar da grande maioria das quitinases apresentarem pronunciado efeito antifúngico sobre diversas espécies, algumas apresentam efeito específico sobre uma ou poucas espécies de fungos. Por exemplo, uma quitinase isolada de *Phaseolus vulgaris* foi capaz de inibir o crescimento apenas de *F. oxysporum* e *M. arachidicola* (CHU; NG, 2005). Situação semelhante foi observada para acaconina, uma quitinase isolada de *Acacia confusa*, que apresentou efeito antifúngico apenas sobre *R. solani* (LAM; NG, 2010) e para uma

quitinase de *Ananas comosus* que apresentou atividade antifúngica somente contra *Trichoderma viride* (TAIRA; TOMA; ISHIHARA, 2005). Os diferentes espectros de ação antifúngica entre as quitinases podem ser devido à microestrutura de superfície, bem como, pela proporção de quitina presente na parede celular dos fungos. Ou seja, essas enzimas podem, facilmente, interagir com a quitina presente na parede celular, desde que este polissacarídeo estrutural esteja disposto de uma maneira que permita a exposição de seus feixes de fibras na superfície da parede. Quanto mais acessível estiver o substrato para as quitinases, mais rapidamente a quitina será hidrolisada e maior será a atividade antifúngica (YAN *et al.*, 2008).

Considerando o importante papel das quitinases na defesa de plantas, vários estudos têm sido realizados para produção de plantas transgênicas que expressem várias quitinases ou uma combinação de quitinases e outras PR-proteínas, na tentativa de aumentar a sua resistência contra patógenos, gerando resultados promissores (AL AHMADI *et al.*, 2008; AMIAN *et al.*, 2011; RAMANARAO *et al.*, 2011).

Com base no exposto, os resultados obtidos no presente trabalho permitem incluir a espécie *P. multijuga* como uma fonte de moléculas ativas no controle de fungos. Em especial, a quitinase isolada dessa espécie vegetal, a *Pm-Chi*, que apresenta potencial biotecnológico no controle de fungos fitopatogênicos. Porém, mais estudos devem ser conduzidos a fim de completar a caracterização bioquímica desta enzima, como determinação de seu ponto isoelétrico, estabilidade a diferentes pHs e temperaturas, efeito de íons e agentes redutores na atividade quitinásica, e, possivelmente, análise de efeito sinérgico desta enzima juntamente com β -1,3-glucanases, para averiguar se há potencialização da sua atividade antifúngica.

8. CONCLUSÃO

A *Pm-Chi* se mostrou ser uma quitinase ligante à quitina, com pH ótimo 7,0, temperatura ótima a 45 °C, e não sendo uma proteína glicosilada, os parâmetros estão dentro do padrão observado em quitinases obtidas a partir de sementes de plantas. Essa quitinase mostrou potente atividade antifúngica contra os fungos fitopatogênicos *Glomerella cingulata* e *Penicillium herquei*, cujo modo de ação parece resultar do comprometimento da integridade da superfície celular desses fungos. A *Pm-Chi* tem relevância biotecnológica, podendo ser explorada para aplicação na agricultura como alternativa para o controle de patógenos e pragas agrícolas, porém, mais testes devem ser conduzidos para uma completa caracterização bioquímica e elucidação completa do mecanismo de ação antifúngica desta quitinase.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, M.; ABE, K.; KURODA, M.; ARAI, S. Corn kernel cysteine proteinase inhibitor as a novel cystain superfamily member of plant origin: molecular cloning and expression. **European Journal of Biochemistry**, v. 209, p. 933-937, 1992.
- ABI-SAID, D.; ANAISSIE, E.; UZUN, O.; RAAD, I.; PINZCOWSKI, H.; VARTIVARIAN, S. The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. **Clinical Infectious Diseases**, v. 24, n. 6, p. 1122-1128, 1997.
- ABREU, J. A. S.; ROVIDA, A. F. S.; PAMPHILE, J. A. Fungos de interesse: aplicações biotecnológicas. **Uningá Review**, v. 21, n. 1, p. 55-59, 2015.
- ADAMS, D.J. Fungal cell wall chitinases and glucanases. **Microbiology**, v. 150, p. 2029-2035, 2004.
- ADRANGI, S.; FARAMARZI, M. A. From bacteria to human: A journey into the world of chitinases. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1786–1785, 2013.
- AGRIOS, G.N. Plant Pathology. **Elsevier Academic Press**. 5 ed. 2005.
- AJAIYEGBA, Edith O. Phytochemical and antibacterial properties of *Parkia biglobosa* and *Parkia bicolor* leaf extracts. **African Journal of Biomedical Research**, v. 5, 2002.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. 3 ed. New York: John Wiley; Sons, p. 632, 1996.
- ALMEIDA, R. G. Avaliação de proteínas antimicrobianas de flores de *Hibiscus rosa-sinensis* L. ativas contra microrganismos patogênicos. **Monografia de Conclusão do Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas**. Universidade Católica de Brasília, 2010.
- ÁLVARES, C. A.; SVIDZINSKI, T. I. E.; CONSOLARO, M. E. L. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 5, p. 319-327, 2007.
- ANDRADE, L. B. S. Inibidores de proteases cisteínicas de raízes de *Crotalaria pallida*: Isolamento, purificação, caracterização e avaliação de sua ação contra *Meloidogyne incógnita*. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal do Ceará. 2008.
- AZEVEDO, J. L. Fungos - Uma Introdução à Biologia, Bioquímica e Biotecnologia. São Paulo: **Educs**, p. 512, 2004.

- BABU, R.M.; SAJEENA, A.; SEETHARAMAN, K.; REDDY, M.S. Advances in genetically engineered (transgenic) plants in insect management - an overview. **Crop Protection**, v. 22, p. 1071-1086, 2003.
- BECKER-RITT, A. B., MARTINELLI, A. H. S., MITIDIERI, S., FEDER, V., WASSERMANN, G. E., SANTI, VAINSTEIN, M. H., OLIVEIRA, J. T. A., FIUZA, L., M. PASQUALI, G., CARLINI, C. R. **Antifungal activity of plant and bacterial ureases**. *Toxicon*, v. 50, p. 971–983, 2012.
- BEZERRA, C. S.; OLIVEIRA, C. F. R.; MACHADDO, O. L. T.; MELLO, G. S.V.; PITTA, M. G. R.; RÊGO, M. J. B. M.; NAPOLEÃO, T. H.; PAIVA, P. M. G.; RIBEIRO, S. F. F.; GOMES, V. M.; SILVA, O. N.; MARIA-NETO, S.; FRANCOH, O. L.; MACEDO, M. L. R. Exploiting the biological roles of the trypsin inhibitor from *Inga vera* seeds: A multifunctional Kunitz inhibitor. **Process Biochemistry**, v. 51, p. 792–803, 2016.
- BHATTACHARYA, D.; NAGPURE, A.; GUPTA, R.K. Bacterial chitinases: properties and potential, **Crit. Rev. Biotechnol.** v. 27, p.21–28, 2007.
- BOLLER, T. Biochemical analysis of chitinase and β -1, 3-glucanases. **Molecular Plant Pathology: A Practical Approach**, v. 2, p. 23-30, 1992.
- BONALDO, S. M.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S.; FIORI-TUTIDA, A. C. G. Contribuição ao estudo das atividades antifúngica e elicitora de fitoalexinas em sorgo e soja por eucalipto (*Eucalyptus citriodora*). **Summa Phytopathologica.**, v. 33, n. 4, p. 383-387, 2007.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p. 248-254, 1976.
- BRAMELD, K. A; GODDARD, W. A. The role of enzyme distortion in the single displacement mechanism of family 19 chitinases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 8, p. 4276–4281, abr. 1998.
- BUZINELLO, T. C. Padrão de expressão de aquaporinas em plantas de arroz tolerantes e sensíveis ao arsênio. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2018.

CABANAS, A. S. P. Avaliação da atividade antifúngica de quitinases de macieira.

Dissertação de Mestrado. Universidade de Lisboa, 2013.

CAGGIANO, G.; IATTA, R.; LANEVE, A.; MANCA, F.; MONTAGNA, M. T. Observational study on candidaemia at a university hospital in southern Italy from 1998 to 2004. **Mycoses**, v. 51, n. 2, p. 123-128, 2008.

CANDIANO, G.; BRUSCHI, M.; MUSANTE, L.; SANTUCCI, L.; GHIGGERI, G. M.; CARNEMOLLA, B.; ORECCHIA, P.; ZARDI, L. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, v. 25, p. 1327-1333, 2004.

CANTU, D.; GREVE, L.G.; LABAVITCH, J.M.; POWELL, A.L.T. Characterization of the cell wall of the ubiquitous plant pathogen *Botrytis cinerea*. **Mycological Research**, v. 113, p. 1396-1403, 2009.

CARLINI, C.R.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon**, 40, 1515-1539, 2002.

CARVALHO, P.E.R. Faveira-benguê *Parkia multijuga*. Colombo, **EMBRAPA-CNPQ**, 6p. (EMBRAPA-CNPQ. Comunicado Técnico, 227), 2009.

CAZYPEDIA CONSORTIUM. **OUP accepted manuscript**, (Nota técnica), 2017.

CHAN, Y.S., ZHANG, Y.; NG, T.B. Brown kidney bean Bowman-Birk trypsin inhibitor is heat and pH stable and exhibits anti-proliferative activity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, p. 1306-1314, 2013.

CHANG, C.T.; LO, H.F.; WU, C.J.; SUNG, H.Y. Purification and properties of chitinase from cabbage, **Biochemistry. Int.** 28, p.707–715, 1998.

CHEN, W. et al. Structural analysis of group II chitinase (ChtII) catalysis completes the puzzle of chitin hydrolysis in insects. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 8, p. 2652–2660, fev. 2018.

CHEN, Y. T.; HSU, L. H.; HUANG, P.; TSAI, T. C.; LEE, G. C.; SHAW, J. F. Gene cloning and characterization of a novel recombinant antifungal chitinase from papaya (*Carica papaya*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 714–722, 2007.

- CHEVREUIL, L. R. Purificação, caracterização química e atividade de proteases e inibidores de proteases durante a germinação e em eventos pré e pós-germinativos de sementes de *Parkia multijuga*. **Tese de Doutorado em Botânica**. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. 2014.
- CHOI, D.; KIM, S. G.; KIM, K. W.; PARK, E. W. Silicon-induced cell wall fortification of rice leaves: a possible cellular mechanism of enhanced host resistance to blast. **Phytopatology**. v. 92, p. 1095-1103, 2002.
- COHEN, E. Chitin synthesis and degradation as targets for pesticide action. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 22, p. 245-261, 1993.
- COHEN, E. Chitin synthesis and inhibition: a revisit. **Pest Management Science**, v. 57, p. 946-950, 2001.
- COLIN, B. Produtos orgânicos tóxicos. **Química Ambiental**, 2 ed. Porto Alegre: Bookman, 2006.
- COLOMBO, A. L, GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida spp.* **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 599-607, 2003.
- COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; PARK, B. J.; NOUÉR, S. A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; DA MATTA, D. A.; WARNOCK, D.; MORGAN, J. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 8, p. 2816-2823, 2006.
- Companhia Nacional de Abastecimento. 2018. **Safras**. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras>>. Acesso em: 21 de novembro de 2018.
- CONSTABEL, C. P.; RYAN, C. A. A survey of wound- and methyl jasmonate-induced leaf polyphenol oxidase in crop plants. **Phytochemistry**, v. 47, p. 507-511, 1998.
- CORTE, V.B.; BORGES, E.E.DE.L.; PONTES, C.A.; LEITE, I.T.DE.A.; VENTRELLA, M.C. & MATHIAS, A. DE. A. Mobilização de reservas durante a germinação das sementes e crescimento das plântulas de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. (Leguminosae Caesalpinoideae). **Revista Árvore**, 30 (6): 941-949, 2006.
- COX, G.; PERFECT, J. Fungal infections. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 6, p. 422-426, 1993.

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

de LOS REYES, B.G., TALIAFERRO, C.M., ANDERSON, M.P., MELCHER, U., MCMAUGH, S. Induced expression of the class II chitinase gene during cold acclimation and dehydration of bermudagrass (*Cynodon sp.*). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 103, p. 297–306, 2001.

DEO PRASAD, B.; JHA, S.; CHATTOO, B. B. Transgenic indica rice expressing *Mirabilis jalapa* antimicrobial protein (Mj-AMP2) shows enhanced resistance to the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. **Plant Science**, v. 175, p. 364-371, 2008.

DIAS, L. P. Purificação e caracterização de um inibidor de tripsina das flores de *Cassia fistula* linn. com atividade antimicrobiana. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Ceará, 2012.

DIGNANI, M. C.; SOLOMKIN, J. S.; ANAISSIE, E. J. *Candida*. **Medical Mycology**, v. 1, p. 195-239, 2003.

ERLANGER, B. F.; KOKOWSKY, N.; COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Archives of Biochemistry Biophysics**, v. 95, p. 271-8, 1961.

FIORAVANTI, C. O ataque silencioso dos fungos, espécies de *Candida* e *Aspergillus* causam infecções resistentes a medicamentos e matam mais que malária e tuberculose. **Revista Pesquisa FAPESP**, ed. 243, p. 243-245, 2016.

FIORAVANTI, C. O ataque silencioso dos fungos, espécies de *Candida* e *Aspergillus* causam infecções resistentes a medicamentos e matam mais que malária e tuberculose. **Revista Pesquisa FAPESP**, ed. 243, p. 243-245, 2016.

FORTUNATO, A., SANTOS, P., GRAÇA, I., GOUVEIA, M.M., MARTINS, S.M., RICARDO, C.P.P., PAWLOWSKI, K., RIBEIRO, A. Isolation and characterization of *cgchi3*, a nodule-specific gene from *Casuarina glauca* encoding a class III chitinase. **Physiologia Plantarum**, v. 130, p. 418–426, 2007.

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

FREIRE, M. G. M.; FRANCO, O. L.; KUBO, C.E. MIGLIOLO, L.; VARGAS, R. H.; OLIVEIRA, C. F.; PARRA, J. R.; MACEDO, M. L. R. Structural insights regarding an insecticidal *Talisia esculenta* protein and its biotechnological potential for *Diatraea saccharalis* larval control. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 161, p. 86-92, 2012.

FUKAMIZO, T. Chitinolytic enzymes: Catalysis, substrate binding, and their application. **Current Protein and Peptide Science**, v. 1, p. 105-124, 2000.

GALLI, J.A.; PANIZZI, R.C.; FESSEL, S.A.; SIMONI, F.; ITO, M.F. Effect of *Colletotrichum dematium* var. *truncata* and *Cercospora Kikuchii* on soybean seed germination. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 27, p. 182-187, 2005.

GERHARDT, L.B.D., SACHETTO-MARTINS, G., CONTARINI, M.G., SANDRONI, M., FERREIRA, R.D., DE LIMA, M.V., CORDEIRO, M.C., DE OLIVEIRA, D.E., MARGIS-PINHEIRO, M. Arabidopsis thaliana class IV chitinase is early induced during the interaction with *Xanthomonas campestris*. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v. 419, p. 69–75, 1997.

GIACOMAZZI, J.; BAETHGEN, L.; CARNEIRO, L. C.; MILLINGTON, M. A; DENNING, D. W.; COLOMBO, A. L.; PASQUALOTTO, A. C. The burden of serious human fungal infections in Brazil. **Mycoses**, v. 59, p. 145-50, 2016.

GIFONI, J. M., OLIVEIRA, J. T. A., OLIVEIRA, H. D., BATISTA, A. B., PEREIRA, M. L., GOMES, A. S., OLIVEIRA, H. P., GRANGEIRO, T. B., VASCONCELOS, I. M. A novel chitin binding protein from *Moringa oleifera* seed with potential for plant disease control. **Peptide Science**, v. 98, p. 406-415, 2012.

GOKULAKANNAN, G. G.; NIEHAUS, K. Characterization of the *Medicago truncatula* cell wall proteome in cell suspension culture upon elicitation and suppression of plant defense. **Journal of Plant Physiology**, v. 167, p. 1533-1541, 2010.

GOODAY, G. W. Physiology of microbial degradation of chitin and chitosan. **Biodegradation**, v. 1, p. 177-190, 1990.

GOORMACHTIG, S., LIEVENS, S., VAN DE VELDE, W., VAN MONTAGU, M., HOLSTERS, M. Srchi13, a novel early nodulin from *Sesbania rostrata*, is related to acidic class III chitinases. **The Plant Cell**, v. 10, p. 905–915, 1998.

GULATI, M.; NOBILE, C. J. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. **Microbes and Infection**, v. 18, p. 310-321, 2016.

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**, v. 196, p. 808-814, 2016.

HARA, M. et al. Involvement of Gln679, in addition to Trp687, in chitin binding activity of the chitin-binding domain of chitinase A1 from *Bacillus circulans* WL-12. **Journal of Biochemistry**, v. 154, n. 2, p. 185–193, 2013.

HARDHAM, A. R.; MITCHELL, H. J. Use of molecular cytology to study the structure and biology of phytopathogenic and mycorrhizal fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 24, p. 252-284, 1998.

HARMAN, G.E., HAYES, C.K., LORITO, M., BROADWAY, R.M., DI PIETRO, A., PETERBAUER, C.K., TRONSMO, A. Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: purification of chitobiosidase and endochitinase. **Phytopathology**, v. 83, p. 313–318, 1993.

HENRISSAT, B.; BAIROCH, A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities. **Biochemical Journal**, v. 293, p. 781-788, 1993.

HERRERA-ESTRELLA, A.; CHET, I. Chitinases in biological control. **EXS**, v. 87, p. 171-184, 1999.

HILLEN, T.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; MESQUINI, R. M.; CRUZ, M. E. S.; STANGARLIN, J. R.; NOZAKI, M. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais no controle de alguns fitopatógenos fúngicos in vitro e no tratamento de sementes. **Rev. bras. plantas med.** vol.14, n.3, pp.439-445, 2012.

HOPKINS, H.C.F. *Parkia* (Leguminosae: Mimosoideae). Flora Neotropica Monograph. **The New York Botanical Garden**, New York. p.124, 1986.

HOWARD, J.B., GLAZER, A.N. Studies on the physicochemical and enzymatic properties of Papaya lysozyme. **Journal of Biological Chemistry**, v. 242, p. 5715–5723, 2003.

IKEDA, M.; MIYAUCHI, K.; MOCHIZUKI, A.; MATSUMIYA, M. Purification and characterization of chitinase from the stomach of silver croaker *Pennahia argentatus*, **Protein Express. Purif**, v. 65, p. 214–222, 2009.

- ISELI, B. et al. Plant chitinases use two different hydrolytic mechanisms. **FEBS Letters**, v. 382, n. 1–2, p. 186–188, 1996.
- JI, C.; KUC, J. Antifungal activity of cucumber β -1,3-glucanase and chitinase, *Physiol. Molecular Plant Pathology*, v. 49, p. 257-265, 1996.
- KABIR, K.E.; HIROWATARI, D.; WATANABE, K.; KOGA, D., Purification and characterization of a novel isozyme of chitinase from *Bombyx mori*, *Biosci. Biotechnol. Biochemistry*, v. 70, p. 252–262, 2006.
- KABIR, R. S.; RAHMAN, M. M.; TASNIM, S.; KARIM, M. R.; KHATUN, M.; HASAN, I.; AMIN, R.; ISLAM, S. S.; NURUJJAMAN, M.; KABIR, A. H.; SANA, N. K.; OSEKI, Y.; ASADUZZAMAN, A. K. M. Purification and characterization of a novel chitinase from *Trichosantes dioica* seed with antifungal activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 84, p. 62-68, 2016.
- KÁLAI, K. et al. Comparative study of constitutive and inducible promoters in tobacco. **South African Journal of Botany**, v. 74, n. 2, p. 313–319, 2008.
- KASPRZEWSKA, A. Plant chitinases – regulation and functions. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 8, p. 809–824, 2003.
- KIM, H.B.; AN, C.S. Differential expression patterns of an acidic chitinase and a basic chitinase in the root nodule of *Elaeagnus umbellata*. **Molecular Plant—Microbe Interactions**, v. 15, p. 209–215, 2002.
- KNOOGE, W. Fungal infection of plants. **Plant Cell**, v. 8, p. 1711-1722, 1996.
- KOEPF, H. H. et al., **Agricultura Biodinâmica**. 4. Ed. São Paulo: Nobel, 1986.
- KOLOSOVA, N.; BREUIL, C.; BOHLMANN, J. Cloning and characterization of chitinases from interior spruce and lodgepole pine. **Phytochemistry**, v. 101, p. 32-39, 2014.
- KOPPARAPU, N. K.; LIU, Z.; YAN, Q.; JIANG, Z.; ZHANG, S. A novel thermostable chitinase (PJC) from pomegranate (*Punica granatum*) juice. **Food Chemistry**, v. 127, p. 1569–1575. 2011.
- KURANDA, M., ROBBINS, P.W. Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p. 19758-19767, 1991.

LACERDA, R. A. Produção científica nacional sobre infecção hospitalar e a contribuição da enfermagem: ontem, hoje e perspectivas. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 10, n. 1, p. 55-63, 2002.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 27, p. 680-685, 1970.

LAM, S.K.; NG, T.B. Isolation of a small chitinase-like antifungal protein from *Panax notoginseng* (sanchi ginseng) roots, *Int. J. Biochem. Cell Biol*, v. 33, p. 287–292, 2003.

LANDIM, P. G. C. Produção em *Pichia pastoris* de uma quitinase de feijão-de-corda com atividade antifúngica. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Ceará, 2011.

LAWRENCE, P. K.; KOUNDAL, K. R. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 5-6, 2002.

LEE, O.S.; LEE, B.; PARK, N.; KOO, J.C.; KIM, Y.H.; PRASAD, D.T.; KARIGAR, C.; CHUN, H.J.; JEONG, B.R.; KIM, D.H.; NAM, J.; YUN, J.G.; KWAK, S.S.; CHO, M.J.; YUN, D.J. Pn-AMPs, the hevein-like proteins from *Pharbitis nil* confers disease resistance against phytopathogenic fungi in tomato, *Lycopersicon esculentum*. **Phytochemistry**, v. 62, p. 1073-1079, 2003.

LIN, Z.F.; WU, D.; LOU, A.; ZHANG, W. Chitinase from seeds of *Zea mays* and *Coixlachrymal-jobi* L. Purification and some properties. **Process Biochem**, v. 27, p. 83–88, 1992.

LIU, C.L.; SHEN, C.R.; HSU F.F.; CHEN, J.K.; WU, P.T.; GUO, S.H.; LEE, W.C.; YU, F.W.; MACKAY Z.B.; TURK, J.; GROSS M.L. Isolation and identification of two novel SDS-resistant secreted chitinases from *Aeromonas schubertii*, **Biotechnology Progress**, v. 25, p. 124–131, 2009.

LOPES, L. L. M.; VALADARES, N. F.; MORAES, D. I.; ROSA, J. C.; ARAÚJO, H. S. S.; BELTRAMINI, L. M. Physical-chemical and antifungal properties of protease inhibitors from *Acacia plumosa*. **Phytochemistry**, v. 70, p. 871-879, 2009.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa, São Paulo: **Instituto Platarum**. p.368, 1992.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. Nova Odessa, São Paulo: **Instituto Platarum**. 5 ed. 384p. 2008.

LUBIAN, C. T.; TEIXEIRA, J. M.; LUND, R. G.; NASCENTE, P. S.; DEL PINO, F. A. B. Antifungal activity of the aqueous extract from *Arctium minus* (Hill) Bernh. (Asteraceae) on oral *Candida species*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, p. 157-162, 2010.

MARTINS, N.; BARROS, L.; HENRIQUES, M.; SILVA, S.; FERREIRA, I. C. F. R. Activity of phenolic compounds from plant origin against *Candida species*. **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 648-670, 2015.

MARTINS, T. F. Purificação e caracterização bioquímica de um inibidor tipo Bowman-Birk de sementes de *Luetzelburgia auriculata* (Allemão) Ducke. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Ceará, 2015.

MASUDA, T.; ZHAO, G.; MIKAMI, B. Crystal structure of class III chitinase from pomegranate provides the insight into its metal storage capacity. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 79, p. 45–50, 2015.

MAURYA, I. K.; PATHAK, S.; SHARMA, M.; SANWAL, H.; CHAUDHARY, P.; TUPE, S.; DESHPANDE, M.; CHAUHAN, V. S.; PRASAD, R. Antifungal activity of novel synthetic peptides by accumulation of reactive oxygen species (ROS) and disruption of cell wall against *Candida albicans*. **Peptides**, v. 32, p. 1732-1740, 2011.

MEIER, B.M., SHAW, N., SLUSARENKO, A.J. Spatial and temporal accumulation of defense gene transcripts in bean (*Phaseolus vulgaris*) leaves in relation to bacteria-induced hypersensitive cell death. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 6, p. 453–466, 1993.

MELO, V. M. M., VASCONCELOS, I. M., GOMES, V. M., CUNHA, M., SOARES, A. A., OLIVEIRA, J. T. A. A cotyledonary agglutinin from *Luetzelburgia auriculata* inhibits the fungal growth of *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium solani* and *Aspergillus niger* and impairs glucose-stimulated acidification of the incubation medium by *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Plant Science**, 169, 629-639, 2005.

MENEZES, T. O. A.; ALVES, A. C. B. A.; VIEIRA, J. M. S.; MENEZES, S. A. F.; ALVES, B. P.; MENDONÇA, L. C. V. Avaliação in vitro da atividade antifúngica de óleos essenciais e extratos de plantas da região amazônica sobre cepa de *Candida albicans*. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 38, n. 3, p. 184-191, 2009.

Ministério do Meio Ambiente. 2018. **Segurança química e agrotóxicos**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/agrotoxicos>> Acesso em: 21 de novembro de 2018.

MITCHELL, K.F., ZARNOWSKI, R., ANDES, D.R. The extracellular matrix of fungal biofilms, in: Imbert, C. (Ed.), Fungal Biofilms and Related Infections. **Adv. Exp. Med. Biol**, v. 931, p. 21-35, 2016. https://doi.org/10.1007/5584_2016_6

MOLINARI, L.M.; PEDROSO, R.B.; SCOARIS D. DE O.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P. Identification and partial characterization of a chitinase from Nile tilapia *Oreochromis niloticus*, **Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol**, v. 149, p. 81–87, 2007.

MORAIS, J. K. S.; GOMES, V. M.; OLIVEIRA, J. T. A.; SANTOS, I. S.; DA CUNHA, M.; OLIVEIRA, H. D.; OLIVEIRA, H. P.; SOUSA, D. O. B.; VASCONCELOS, I. M. Soybean toxin (SBTX), a protein from soybeans that inhibits the life cycle of plant and human pathogenic fungi. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 10356-10363, 2010.

NAGLIK, J. R.; CHALLACOMBE, J.; HUBE, B. *Candida albicans* secreted aspartil proteinases in virulence and pathogenesis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 3, p. 400-428, 2003.

NASCIMENTO, W. M. O.; RAMOS, N.P.; CARPI, V.A.F.; SCARPARE FILHO, J. A.; CRUZ, E.D. Temperatura e substrato para germinação de sementes de *Parkia platycephala* Benth. (Leguminosae-Caesalpinioideae). **Revista de Agricultura Tropical**, v. 7, p. 119-129, 2003.

NETO, A. V. L. ATIVIDADE FUNGISTÁTICA DE UMA QUITINASE RECOMBINANTE DO FEIJÃO DE CORDA [*Vigna unguiculata* (L.) (Walp.)] CONTRA *Lasiodiplodia theobromae* Pat. (Griff. e Maubl.), AGENTE CAUSAL DA RESINOSE DO CAJUEIRO (*Anacardium occidentale* L.). **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Ceará, 2014.

NURNBERGER, T.; BRUNNER, F.; KEMMERLING, B.; PIATER, L. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. **Immunological Reviews**, v.198, p.249-266, 2004.

OHNO, T. et al. A modular family 19 chitinase found in the prokaryotic organism *Streptomyces griseus* HUT 6037. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 17, p. 5065–5070, set. 1996.

OLIVEIRA, C. M.; AUAD, A. M.; MENDES S. M.; FRIZZAS M. R. Crop losses and the economic impact of insect pests on Brazilian agriculture. **Protection**, v. 56, p. 50-54, 2014.

OLIVEIRA, H. D.; SOUSA, D. O. B.; OLIVEIRA, J. T. A.; CARLINI, C. R.; OLIVEIRA, H. P.; PEREIRA, M. L.; ROCHA, R. O.; MORAIS, J. K. S.; GOMES-FILHO, E.; VASCONCELOS, I. M. Gm-TX, a new toxic protein from soybean (*Glycine max*) seeds with potential for controlling insect pests. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 634-640, 2010.

OLIVEIRA, J. T. A.; ANDRADE, N. C.; MARTINS-MIRANDA, A. S.; SOARES, A. A.; GONDIM, D. M. F.; ARAÚJO-FILHO, J. H.; FREIRE-FILHO, F. R.; VASCONCELOS, I. M. Differential expression of antioxidant enzymes and PR-proteins in compatible and incompatible interactions of cowpea (*Vigna unguiculata*) and the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 51, p. 145-152, 2012.

ONAGA, S.; TAIRA T. A new type of plant chitinase containing LysM domains from a fern (*Pteris ryukyuensis*): Roles of LysM domains in chitin binding and antifungal activity. **Glycobiology**, 18, 414–423, 2008.

OSBORNE, T.B. **The vegetable proteins**. 2.ed. London: Longmans Green and company, p. 154, 1924.

OUOBA, L. I. I. et. al. Antimicrobial activity of *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* during the fermentation of African locust bean (*Parkia biglobosa*) for Soumbala production. **Journal of applied microbiology**, 102, 963-970, 2007.

PATIL, D.N.; DATTA, M.; CHAUDHARY, A.; TOMAR, S.; SHARMA, A.K.; KUMAR, P. Isolation, purification, crystallization and preliminary crystallographic studies of chitinase from tamarind (*Tamarindus indica*) seeds, Acta Crystallogr., Sect. F: Struct. Biol. **Cryst. Commun**, v. 65, p. 343–345, 2009.

PATIL, R. S.; GHORMADE, V. V.; DESHPANDE, M. V. Chitinolytic enzymes: an exploration. **Enzyme and Microbial Technology**, 26, 473, 2000.

PAULA JÚNIOR, T. J. et al., Controle alternativo de doenças de plantas – histórico. In: VENZON, M. et al., (Eds.). **Controle alternativo de pragas e doenças**. Viçosa: EPAMIG – CTZM/UFV, 2006. P.135-62.

PELEGRINI, P. B.; FRANCO, O. L. Plant gamma-thionins: novel insights on the mechanism of action of a multi-functional class of defense proteins. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 37, p. 2239-2253, 2005.

PEREIRA, K. C.; SANTOS, C. F. Micotoxinas e seu potencial carcinogênico. **Ensaios e Ciência**, v. 15, n. 4, 2011.

PEUMANS, W.J., PROOST, P., SWENNEN, R.L., VAN DAMME, E.J. The Abundant class III chitinase homolog in young developing banana fruits behaves as a transient vegetative storage protein and most probably serves as an important supply of amino acids for the synthesis of ripening- associated proteins. **Plant Physiology**, v. 130, p. 1063–1072, 2002.

POCIECHA, E.; PLAZEK, A.; JANOWIAK, F.; DUBERT, F.; KOOLASINSKA, I.; IRLA, M. Factors contributing to enhanced pink snow mould resistance of winter rye (*Secale cereal* L.) - Pivotal role of crowns. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 81, p. 54-63, 2013.

RAMOS, F.N.; SOUZA, A.F.; LOUREIRO, M.B.; CRUZ, A.P.M.; ANDRADE, A.C.S. Comparação entre métodos de secagem de *Parkia multijuga* Benth. (Leguminosae Mimosoideae). **Revista Árvore**, v. 24, p. 175-179, 2000.

RAVEN P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 5 ed. 728p. 1992.

REGALADO, A P. et al. The *Lupinus albus* class-III chitinase gene, IF3, is constitutively expressed in vegetative organs and developing seeds. **Planta**, v. 210, n. 4, p. 543–550, 2000.

REGENTE, M.; TAVEIRA, G. B.; PINEDO, M. A sunflower lectin with antifungal properties and putative medical mycology applications. **Current Microbiology**, v. 69, p. 88–95, 2014.

REISSIG, J. L., STROMINGER, J. L., LELOIR, L. F. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars. **Journal of Biological Chemistry**, v. 217, p. 959-966, 1955.

- RIBEIRO, A., GRAÇA, I., PAWLOWSKI, K., SANTOS, P. Actinorhizal plant defence-related genes in response to symbiotic Frankia. **Functional Plant Biology**, v. 38, p. 639-644, 2011.
- RIBEIRO, S. F. F., AGIZZIO, A. P., MACHADO, O. L. T., NEVES-FERREIRA, A. G. C., OLIVEIRA, M. A., FERNANDES, K. V. S., CARVALHO, A. O., PERALES, J., GOMES, V. M. A new peptide of melon seeds which shows sequence homology with vicilin: partial characterization and antifungal activity. **Scientia Horticulturae**, v. 111, p. 399-405, 2007.
- RIBEIRO, S.F.F.; CARVALHO, A.O.; CUNHA, M.; RODRIGUES, R.; MELO, V.M.M.; MELO, E.J.T.; VASCONCELOS, I.M.; CRUZ, L.P.; GOMES, V.M. Isolation and characterization of novel peptides from chilli pepper seeds: antimicrobial activities against pathogenic yeasts. **Toxicon**, v. 50, p. 600-611, 2007.
- ROLIM, M. T., BARIANI, A., HANADA, R. E., GONÇALVES, J. F.C. Efeito de extratos de sementes de *Parkia discolor* Benth e *Parkia multijuga* Benth sobre o crescimento micelial de fungos fitopatogênicos. **XVIII Jornada de Iniciação Científica PIBIC CNPq/FAPEAM/INPA**, 2009.
- ROSSETO, J.; ALBUQUERQUE, M.C.F.; NETO, R.M.R. & SILVA, I.C.O. Germinação de sementes de *Parkia pendula* (Willd.) Benth. ex Walp. (Fabaceae) em diferentes temperaturas. **Revista Árvore**, v.33, n.1, p.47-55, 2009.
- RUIZ, L. S; PEREIRA, V. B. R. Importância dos fungos no ambiente hospitalar. **Instituto Adolfo Lutz**, v. 1, p. 1-3, 2016.
- SAHAI, A.S., MANOCHA, M.S. Chitinases of fungi and plants: Their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 11, p. 317–38, 1993.
- SALZER, P., BONANOMI, A., BEYER, K., VÖGELI, R., AESCHBACHER, R.A., LANGE, J., WIEMKEN, A., KIM, D., COOK, D.R., BOLLER, T. Differential expression of eight chitinase genes in *Medicago truncatula* roots during mycorrhiza formation, nodulation and pathogen infection. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 13, p. 763- 777, 2000.
- SANGLARD, D.; ODDS, F. C. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p. 73-85, 2002.

SANTANA, D. P.; RIBEIRO, E. L.; MENEZES, A. C. S.; NAVES, P. L. F. Novas abordagens sobre os fatores de virulência de *Candida albicans*. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 12, n. 2, p. 229-233, 2010.

SANTOS, I.S.; CUNHA, M.D.; MACHADO, O.L.T.; GOMES, V.M. A chitinase from *Adenanthera pavonina* L. seeds: purification, characterization and immunolocalisation, **Plant Sci**, v. 167, p. 1203–1210, 2004.

SANTOS, P., FORTUNATO, A., GRACA, I., MARTINS, S., GOUVEIA, M., AUGUY, F., BOGUSZ, D., RICARDO, C.P.P., PAWLOWSKI, K., RIBEIRO, A. Characterization of four defense-related genes up-regulated in root nodules of *Casuarina glauca*. **Symbiosis**, v. 50, p. 27–35, 2010.

SANTOS, P., FORTUNATO, A., RIBEIRO, A., PAWLOWSKI, K. Chitinases in root nodules. **Plant Biotechnology**, v. 25, p. 299–307, 2008.

SANTOS, R. P. et al. Características morfoanatômicas, fisiológicas e bioquímicas de sementes de *Parkia multijuga* Benth. e *Parkia pendula* (Willd.) Benth (Fabaceae-Mimosoideae) submetidas a diferentes temperaturas. **Tese de Doutorado em Ciências de Florestas Tropicais**. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. 2012.

SASAKI, C. et al. Comparative study of the reaction mechanism of family 18 chitinases from plants and microbes. **Journal of biochemistry**, v. 131, n. 4, p. 557–64, abr. 2002.

SHAIK, S. A.; DESHPANDE, M. V. Chitinolytic enzymes: their contribution to basic and applied research. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 9, p. 468-475, 1993.

SHAKHBAZAU, A.V.; KARTEL, N. A. Chitinases in bioengineering research. **Russian Journal of Genetics**, v. 44, n. 8, p. 881-889, 2008.

SIQUEIRA-JÚNIOR, C. L.; FERNANDES, K. V. S.; MACHADO, O. L. T.; CUNHA, M.; GOMES, V. M.; MOURA, D.; JACINTO, T. A 87 kDa tomato cystatin exhibits properties of a defense protein and forms protein crystals in prosystemin overexpressing transgenic plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 247-254, 2002.

SOARES, A. M. S.; MACHADO, O. L. T. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v.1, p.9-19, 2007.

SOARES, C.; ABRUNHOSA, L.; VENÂNCIO, A. Fungos produtores de micotoxinas. **Institute for Biotechnology and Bioengineering**, Universidade do Minho, Braga, 2013.

SOARES, J. R.; CARVALHO, A. O.; SANTOS, I. S.; MACHADO, O. L. T.; NASCIMENTO, V. V.; VASCONCELOS, I. M.; FERREIRA, A. T. S.; PERALES, J. E. A.; GOMES, V. M.; Antimicrobial Peptides from *Adenanthera pavonina* L. seeds: characterization and antifungal activity. **Protein and Peptide Letters**, v. 19, p. 520-529, 2012.

SØRENSEN, H. P.; MADSEN, L. S.; PETERSEN, J.; ANDERSEN, J. T.; HANSEN, A. M.; BECK, H. C. Oat (*Avena sativa*) seed extract as an antifungal food preservative through the catalytic activity of a highly abundant class I chitinase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, p. 1573–1584, 2010.

SOUZA, L.A.G.; SILVA, M.F. Bioeconmical potencial of Leguminosae from the Lower Negro River, Amazon, Brazil. **Lyonia**, 5(1): 15-24, 2003.

SPINDLER, K. D.; SPLINDER-BARTH, M.; LONDERSHAUSEN, M. Chitin metabolism: a target for drugs against parasites. **Parasitology Research**, v.76, p. 283-288, 1990.

ST LEGER, R.J.; STAPLES, R.C.; ROBERTS, D.W. Entomopathogenic Isolates of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, and *Aspergillus flavus* Produce Multiple Extracellular Chitinase Isozymes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 61, p. 81-84, 1993.

STAEHELIN, C., SCHULTZE, M., KONDOROSI, E., KONDOROSI, A. Lipochitooligosaccharide nodulation signals from *Rhizobium meliloti* induce their rapid degradation by the host plant alfalfa. **Plant Physiology**, v. 108, p. 1607–1614, 1995.

STAEHELIN, C., SCHULTZE, M., TOKUYASU, K., POINSOT, V., PROMÉ, J.C., KONDOROSI, E., KONDOROSI, A. N-deacetylation of *Sinorhizobium meliloti* Nod factors increases their stability in the *Medicago sativa* rhizosphere and decreases their biological activity. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 13, p. 72–79, 2000.

SUGAYAMA, R. L.; SILVA, M. L. da; SILVA, S. X. de B.; RIBEIRO, L. C.; RANGEL, L. E. P. Defesa vegetal: fundamentos, ferramentas, políticas e perspectivas.

Belo Horizonte: **SBDA - Sociedade Brasileira de Defesa Agropecuária**, v.1, p. 224, 2015.

TAIRA, T.; OHDOMARI, A.; NAKAMA, N.; SHIMOJI, M.; ISHIHARA, M. Characterization and antifungal activity of gazyumaru (*Ficus microcarpa*) latex chitinases both the chitin-binding and the antifungal activities of class I chitinase are reinforced with increasing ionic strength, **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 69, p. 811–818, 2005b.

TAIRA, T.; TOMA, N.; ISHIHARA, M. Purification, characterization, and antifungal activity of chitinases from pineapple (*Ananas comosus*) leaf. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, 69(1), 189–196, 2005a.

TEGEGNE, G.; PRETORIUS, J. C.; SWART, W. J. Antifungal properties of *Agapanthus africanus* L. extracts against plant pathogens. **Crop Protection**, v. 27, p. 1052-1060, 2008.

TOBIAS, P. A. et al. Identification of the *Eucalyptus grandis* chitinase gene family and expression characterization under different biotic stress challenges. **Tree Physiology**, v. 37, n. 5, p. 565–582, maio 2017.

TOFFOLATTI, S.L.; VENTURINI, G.; MAFFI, D.; VERCESI, A. Phenotypic and histochemical traits of the interaction between *Plasmopara viticola* and resistant or susceptible grapevine varieties. **BMC Plant Biology**, v. 12, p. 124-140, 2012.

TRUDEL, J.; ASSELIN, A. Detection of chitinase activity after polyacrylamide gel electrophoresis. **Analytical Biochemistry**, v. 178, p. 362-366, 1989.

UTKHEDE, R.; BOGDANOFF, C. Influence of lysozyme, yeast, azoxystrobin, and myclobutanil on fungal diseases of cucumbers grown hydroponically. **Crop Protection**, v. 22, p. 315-320, 2003.

VALLE, G. C.; RENDE, J. C.; OKURA, M. H. Estudo da incidência do gênero *Candida* em hospital público universitário. **NewsLab**, v. 17, n. 101, p. 202-12, 2010.

VALLEDOR, L.; JORRÍN, J. Back to the basics: maximizing the information obtained by quantitative two dimensional gel electrophoresis analyses by an appropriate experimental design and statistical analyses. **Journal of Proteomics**, v. 74, p. 1-18, 2011.

VASSE, J., DE BILLY, F., TRUCHET, G. Abortion of infection during the *Rhizobium meliloti*–alfalfa symbiotic interactions is accompanied by a hypersensitive reaction. **The Plant Journal**, v. 4, p. 555–566, 1993.

VAZ, A. F. M.; COSTA, M. P. B.; MELO, A. M. A.; OLIVA, M. L. V.; SANTANA, L. A.; SILVA-LUCCA, R. A.; COELHO, L. C. B. B.; CORREIA, M. T. S. Biocontrol of *Fusarium* species by a novel lectin with low ecotoxicity isolated from *Sebastiania jacobinensis*. **Food Chemistry**, n. 119, p. 1507-1513, 2010.

VINCENT, S. M. H.; WONG, T. B.; NG, T. B. A thaumatin-like antifungal protein from the emperor banana. **Peptides**, v.28, p. 760-766, 2007.

VITALE, A.; BOLLINI, R. Legume Storage Proteins. In: Kigel, J.; Galili, G. (Eds). **Seed Development and Germination**, p. 73-102, 1995.

WANG, S. Y.; WU, J. H.; RAO, P. F.; NG, T. B.; YE, X. Y. A chitinase with antifungal activity from the mung bean. **Protein Expression and Purification**, v. 40, p. 230–236, 2005.

WANG, S. Y.; YE, X. Y.; CHEN, J.; RAO, P. F. A novel chitinase isolated from *Vicia faba* and its antifungal activity. **Food Research International**, v. 45, p. 116–122, 2012

WANG, Y.; KWON, S.J.; WU, J.; CHOI, J.; LEE, Y.H.; AGRAWAL, G.K.; TAMOGAMI, S.; RAKWAL, R.; PARK, S.R.; KIM, B.G.; JUNG, K.H.; KANG, K.Y.; KIM, S.G.; KIM, S.T. Transcriptome Analysis of Early Responsive Genes in Rice during *Magnaporthe oryzae* Infection. **Plant Pathology Journal**, v. 30, p. 343-354, 2014.

WANKE, B.; LAZÉRA, M. S.; NUCCI, M. Fungal infections in the immunocompromised host. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 153-158, 2000.

WONG, J. H.; IP, D. C. W.; NG, T. B.; CHAN, Y. S.; FANG, F.; PAN, W. L. A defensinlike peptide from *Phaseolus vulgaris* cv. ‘King Pole Bean’. **Food Chemistry**, v. 135, p. 408-414, 2012.

XAVIER-FILHO, J. Sementes e suas defesas contra insetos. **Projeto Multifuncional de Biotecnologia e Alimentos**. Organizações dos Estados Americanos, p. 1-3, 1993.

YANG, H. et al. Chitinase III in pomegranate seeds (*Punica granatum* Linn.): a high-capacity calcium-binding protein in amyloplasts. **The Plant journal: for cell and molecular biology**, v. 68, n. 5, p. 765–76, 28 dez. 2011

YE, X.; NG, T. B. Isolation and characterization of juncin, an antifungal protein from seeds of Japanese Takana (*Brassica juncea* var. integrifolia). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 57, p. 4366-4371, 2009.

YEH, S.; MOFFATT, B.A.; GRIFFITH, M.; XIONG, F.; YANG, D.S.C.; WISEMAN, S.B.; SARHAN, F.; DANYLUK, J.; XUE, Y.Q.; HEW, C. Chitinase genes responsive to cold encode antifreeze proteins in winter cereals. **Plant Physiology**, v. 124, p. 1251–1263, 2000.

YU, X.M., GRIFFITH, M. Winter rye antifreeze activity increases in response to cold and drought, but not abscisic acid. **Physiologia Plantarum**, v. 112, p. 78–86, 2001.

ZACHARIUS, R. M.; ZELL, T. E.; MORRISON, J. H.; WOODLOCK, J. J. Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**. v. 30, p. 148–152, 1969.

ZOTTICH, U.; DA CUNHA, M.; CARVALHO, A. O.; DIAS, G. B.; SILVA, N. C.; SANTOS, I. S.; NASCIMENTO, V. V.; CASTRO, E. C.; MACHADO, O. L. T.; GOMES, V. M. Purification, biochemical characterization and antifungal activity of a new lipid transfer protein (LTP) from *Coffea canephora* seeds with alfa-amylase inhibitor properties. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1810, p. 375-383, 2011.