



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

JULIANY FATIMA NOBERTO DE QUEIROZ

ANÁLISE BIOQUÍMICA E PROTEÔMICA PARCIAL DAS PROTEÍNAS DO LÁTEX
DA PLANTA MEDICINAL *Himatanthus drasticus* E SUAS AÇÕES EM DEFESA
VEGETAL

FORTALEZA

2017

JULIANY FATIMA NOBERTO DE QUEIROZ

**ANÁLISE BIOQUÍMICA E PROTEÔMICA PARCIAL DAS PROTEÍNAS DO LÁTEX
DA PLANTA MEDICINAL *Himatanthus drasticus* E SUAS AÇÕES EM DEFESA
VEGETAL**

Trabalho de Final de Curso apresentado ao Programa de Graduação em Bacharelado em Biotecnologia, pertencente ao Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Viana Ramos

FORTALEZA

2017

JULIANY FATIMA NOBERTO DE QUEIROZ

ANÁLISE BIOQUÍMICA E PROTEÔMICA PARCIAL DAS PROTEÍNAS DO LÁTEX DA
PLANTA MEDICINAL *Himatanthus drasticus* E SUAS AÇÕES EM DEFESA VEGETAL

Monografia apresentada do Curso de Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Biotecnologia.

Aprovada em ___ / ___ / ___

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Danielle Aragão Pereira (Examinador)
Secretária da Educação do Estado do Ceará (Seduc)

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

Dedico este trabalho a minha mãe, pelo amor incondicional.

APOIO INSTITUCIONAL

Este trabalho foi realizado com o suporte das seguintes instituições:

- Universidade Federal do Ceará (UFC) por meio do Laboratório de Plantas Laticíferas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, coordenado pelo Professor Márcio Viana Ramos e por meio do Laboratório de Biotecnologia de Proteases Vegetais, coordenado pelo Professor Dr. Cleverton Diniz Teixeira de Freitas;
- Universidade de Fortaleza (UNIFOR), por meio do Núcleo de Biologia Experimental (NUBEX) e do Laboratório de Desenvolvimento de Fármacos, coordenados pelo Professor Dr. Renato de Azevedo Moreira e pela Professora Dra. Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira;
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES);
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP).

AGRADECIMENTOS

A Deus por sua soberania.

Aos meus pais, Expedita Noberto de Queiroz e Manuel Barbosa de Queiroz, por apoiarem meus estudos. Ao meu irmão Emanuelton Antony por sua amizade e companheirismo. À minha pequena sobrinha Lívia que, ao nascer, me trouxe muita felicidade e me mostrou novamente a beleza da vida. Ao meu primo João Paulo por todo o incentivo aos meus estudos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Márcio Viana Ramos por todos os ensinamentos e conselhos e por sua amizade durante estes quatro anos de iniciação científica em seu laboratório. Pela confiança em mim depositada durante a execução deste trabalho. Por seu incentivo durante as inscrições do Programa Ciência sem Fronteiras. Seu apoio foi essencial para essa conquista.

Ao Prof. Dr. Cleverson Diniz Teixeira de Freitas por todas as dúvidas esclarecidas durante minha vida acadêmica dentro e fora do laboratório. Por ter aceitado avaliar este trabalho.

À Prof. Dra. Danielle Pereira Aragão por ter aceitado participar da banca examinadora deste trabalho. Por sua amizade, conselhos e ensinamentos durante o período no qual estivemos juntas no laboratório.

À Mayara Patrícia Viana Matos por desde a primeira vez que me acompanhou no processamento do látex de *Himatanthus drasticus* até todo o conhecimento científico gerado com os seus trabalhos anteriores com este material. Por sua amizade e alegria.

À Dra. Caroline de Araújo Viana por todos os conhecimentos compartilhados, por sua tão especial amizade mesmo durante meu intercâmbio. Por sua ajuda na realização dos experimentos. Pela sua personalidade tão positiva e sua alegria contagiante.

Ao doutorando Daniel de Brito pela sua amizade única e por sempre nos fazer sentir mais amados e felizes com seus abraços e palavras de apoio inesperados.

Aos doutorandos Beatriz Nishi, Deborah Carvalho, Maria Zelândia e Wallace Teixeira e ao mestrando João Pedro Brasil pela ajuda nos experimentos, dúvidas esclarecidas e amizade.

Aos demais amigos e companheiros de laboratório, incluindo aqueles que não fazem mais parte do grupo: Ayrles, Bárbara, Hugo, Isabel, Rafaela, Júnior, Camila Freitas, Camila Monteiro, Diego, Rayanne, Eilton, Igor, Mauro, Sandro, Bruna, Aline e Letícia, pela amizade e momentos de descontração.

Aos amigos “Reveladores” do Bacharelado em Biotecnologia: Ludmilla, Guilherme, Eduardo, Janise, Priscila, Luca, Amanda e Débora, por todos os momentos de alegria, gargalhadas, conselhos, estudos um dia antes das provas e pela amizade especial de cada um de vocês. À Debora e à Amanda, em especial, pelo companheirismo, ajuda e irmandade durante o nosso intercâmbio na Austrália. Ao Guilherme e Amanda pela ajuda nas correções; ao Luca por todo seu apoio durante os difíceis meses pós-retorno da Austrália.

Aos demais amigos do Bacharelado em Biotecnologia, em especial, Natália Frota, que me apresentou ao Prof. Márcio Viana Ramos.

A todos os professores do Bacharelado em Biotecnologia pelos ensinamentos tão importantes para minha formação acadêmica e pelo esforço contínuo na busca de tentar melhorar este curso.

Ao Gilmar e à Professora Dr. Cristina Paiva pelo excelente trabalho, respectivamente, como secretário e como coordenadora do Bacharelado em Biotecnologia e por sempre me ajudarem com aquilo que estivesse ao seu alcance.

A todos do Departamento de Bioquímica de Biologia Molecular da UFC, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Em especial, a Pedro Filho pelo tempo concedido para a realização dos ensaios de atividade quitinolítica.

À Marina Lobo e ao Pepeu pela sua disposição em realizar as análises de espectrometria de massas.

A todos os amigos que fiz durante meu intercâmbio na Austrália. Em especial, à linda família que me recebeu em sua casa pelos primeiros sete meses: Kirsty, Nick e o pequeno Brooklyn; ao Ollie, por sua companhia tão especial e por todos os momentos inesquecíveis compartilhados comigo; e às minhas queridas *housemates*, Amanda, Natália, Gabi e Tamiris, com as quais eu vivi os melhores meses na terra dos cangurus.

Muito obrigada a todos!

*“Preste atenção aos seus pensamentos
porque eles se tornam palavras.
Preste atenção a suas palavras porque
elas se tornam ações.
Preste atenção a suas ações porque
elas se tornam hábitos.
Preste atenção a seus hábitos porque
eles se tornam seu caráter.
Preste atenção a seu caráter porque
ele é o seu destino...”*

The Talmud

RESUMO

O látex consiste de um fluído rico em biomoléculas, armazenado em células denominadas laticíferos, exsudado quando a planta sofre injúria mecânica. Os seus componentes e suas aplicações em diversos setores, como o da agricultura, têm sido tema de estudo de muitos trabalhos científicos. *Himatanthus drasticus* é uma planta laticífera cujo látex é utilizado como fitoterápico pela população do estado do Ceará para o tratamento e prevenção de diversas doenças. Este trabalho objetivou estudar aspectos bioquímicos e proteômicos das proteínas do látex desta planta, além de prospectar atividades biotecnológicas destas biomoléculas contra pragas agrícolas. A fração HdLP-90 foi obtida pela precipitação proteica do látex, pós remoção da borracha por centrifugação, com 90% de saturação de sulfato de amônio. O percentual em massa de HdLP-90 no látex total foi de aproximadamente 5,6%. O teor de proteínas solúveis foi estimado em $0,66 \pm 0,01$ mg/mL pelo método de Bradford. A análise por meio de eletroforese unidimensional revelou a presença de pelo menos oito bandas proteicas na faixa de 97 kDa a 14,4 kDa. As cromatografias em coluna de DEAE-Sepharose *Fast Flow*, tanto em pH 8,0 (Tris-HCl 0,05 M) como em pH 5,0 (Acetato de Sódio 0,05 M) não foram capazes de separar as proteínas de HdLP-90 de modo eficiente. Entretanto, quando foi utilizado o tampão Acetato de Sódio 0,05 M pH 5,0, o processo cromatográfico foi mais eficiente na remoção de contaminantes, já que o pico cromatográfico majoritário (PII HdLP-90 DEAE-sepharose ff pH 5,0) é desprovido dos pigmentos marrons presentes em HdLP-90. A eletroforese bidimensional deste pico cromatográfico revelou a presença de proteínas focalizadas na faixa de pH entre 4,0 e 4,6. A análise em MS, após cromatografia dirigida no AKTA-FPLC, identificou as proteínas deste pico como sendo osmotina ou proteína do tipo taumatina. O *Dot Blot* realizado com anticorpos anti-osmotina corroborou com este resultado. Nenhuma das amostras proteicas do látex de *H. drasticus* foi capaz de degradar o substrato azocaseína e nem foram reconhecidas por *Dot Blot* utilizando anticorpos anti-protease, indicando a ausência de proteases nestas amostras. A presença de quitinases foi confirmada por meio de ensaio quitinolítico utilizando quitina coloidal como substrato. As atividades biológicas contra fitopatógenos revelaram que HdLP-90 não exerceu efeito deletério sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*, mas causou elevada toxicidade sobre o desenvolvimento das larvas e dos insetos adultos de *Callosobruchus maculatus*. A metodologia executada nesse trabalho permitiu a obtenção de uma fração proteica concentrada do látex de *H. drasticus*, que possui

osmotinas e quitinases, e, estas podem estar relacionadas com a forte atividade inseticida contra *C. maculatus*.

Palavras-chaves: fluido laticífero, bioquímica, proteômica

ABSTRACT

Latex is a fluid which contains many biomolecules. It is stored in cells called laticifers and it is exuded when the plant is damaged mechanically. Its components and its applications in some fields, such as the agricultural one, have been the subject of many scientific works. *Himatanthus drasticus* is a latex plant whose latex is used by the population of the Ceará State as a phytotherapeutic to treat and prevent some diseases. The aim of this work was to study biochemical and proteomics aspects of proteins from this latex besides to prospect biotechnological activities from these biomolecules against agricultural crops. The HdLP-90 fraction was obtained through ammonium sulphate precipitation (90% saturation) of the latex, post removal of the rubber through centrifugation. HdLP-90 makes up approximately 5.6% of the total latex mass. The soluble protein content was estimated as $0,66 \pm 0,01$ mg/mL through the Bradford protein assay. Unidimensional electrophoresis analysis revealed the presence of at least eight protein bands in between 97 kDa and 14.4 kDa. The chromatographic processes carried out in DEAE-Sepharose Fast Flow column, either in pH 8,0 (Tris-HCl 0,05 M) and pH 5,0 (Sodium Acetate 0,05 M), were not capable of separating the proteins from HdLP-90 efficiently. When Sodium Acetate 0,05 M pH 5,0 buffer was used, however, more contaminants were removed once the major chromatographic peak (PII HdLP-90 DEAE-Sepharose ff pH 5,0) lacks the brown pigments present in HdLP-90. The bidimensional electrophoresis of this peak revealed that most of the proteins were focalized in the pH interval of 4,0 to 4,6. MS analysis, post chromatography carried out in AKTA-FPLC, identified the proteins from this peak as osmotin-like or thaumatin-like proteins. The Dot Blot using anti-osmotin antibodies corroborated this result. None of the protein samples from *H. drasticus* latex were able to degrade azocasein substrate. They were not also recognized by Dot Blot using anti-protease antibodies, which indicates the absence of proteases in those samples. The presence of chitinases was confirmed through chitinolytic assay using colloidal chitin as substrate. The biological activities against phytopathogens showed that HdLP-90 did not cause deleterious effect on the mycelial growth of *Colletotrichum gloeosporioides*. Despite this, it caused large toxicity on larval and adult insect development of *Callosobruchus maculatus*. The methodology performed in this study allowed us to obtain a concentrated protein fraction from the *H. drasticus* latex, which contains ostomins and chitinases, and, these may be related to the strong insecticidal activity against *C. maculatus*.

Kew-words: laticer fluid, *Himatanthus drasticus*, biochemistry, proteomics

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Representação esquemática dos tipos de laticíferos e sua formação na planta..... 24
- Figura 2** – (a) Arvore e (b) fruto de *H. drasticus*; (c) comercialização do leite de janaguba em mercados populares do Ceará..... 28
- Figura 3** – Infestação de *C. maculatus* em sementes de feijão-caupi..... 37
- Figura 4** – Esquema de obtenção das frações proteica do látex de *H. drasticus*..... 43
- Figura 5** – Reações catalisadas por lipases do tipo não-específica e 1,3 específica 47
- Figura 6** – Esquema do preparo da farinha de feijão e das sementes artificiais..... 54
- Figura 7** – Espectro de absorção da fração HdLP-90..... 56
- Figura 8** – Perfis proteicos de HdLP e de HdLP-90..... 58
- Figura 9** – SDS-PAGE 12,5% das frações HdLP, HdLP-90..... 59
- Figura 10** – Perfil cromatográfico e eletroforético de HdLP-90 em coluna de DEAE-Sephrose *Fast Flow*..... 60
- Figura 11** – Amostras proteicas liofilizadas do látex de *Himantanthus drasticus*..... 61
- Figura 12** – Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (15%) do PII resultante da cromatografia de troca iônica da fração HdLP-90 em coluna de DEAE-Sephrose *Fast Flow* equilibrada com acetato de sódio 0,05 M pH 5,0..... 62
- Figura 13** – Cromatograma do PII (pH 5,0) em coluna MonoQ acoplada ao sistema AKTA-FPLC..... 63
- Figura 14** – Reconhecimento de osmotinas no látex de *Himantanthus drasticus* semelhantes a osmotina do látex de *Calotropis procera* por meio de *Dot Blot*..... 65

Figura 15 – Reconhecimento de proteases no látex de <i>Himantanthus drasticus</i> semelhantes a proteases de CpPII por meio de <i>Dot Blot</i>	66
Figura 16 – Atividade quitinolítica de frações proteicas do látex de <i>Himantanthus drasticus</i>	67
Figura 17 – Avaliação do efeito das frações proteicas do látex de <i>H. drasticus</i> sobre o crescimento micelial do fungo <i>C.gloeosporioides</i>	68
Figura 18 – Avaliação do efeito inseticida da fração HdLP-90 sobre o desenvolvimento de <i>C. maculatus</i>	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Compostos químicos e proteínas comumente presentes no látex.....	26
Tabela 2	– Literatura científica acerca de algumas propriedades farmacológicas do látex de <i>H. drasticus</i> ou de frações destes.....	30
Tabela 3	– Potencial antifúngico de algumas osmotinas de plantas.....	33
Tabela 4	– Rendimento do fracionamento do látex de <i>H. drasticus</i>	57
Tabela 5	– Sequências de aminoácidos determinadas por ESI-Q-TOF a partir das sete subfrações de PII de HdLP-90 (pH 5,0) aplicado no sistema FPLC-AKTA <i>Purifier</i>	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	– Análise de Variância
anti-CpOsm	– Anticorpo primário anti-osmotina de <i>Calotropis procera</i> produzidos em coelho
anti-igG	– Anticorpo secundário anti-iGg de coelho produzido em cabra, conjugado com fosfatase alcalina
B.O.D	– Demanda Bioquímica de Oxigênio
BSA	– Albumina Sérica Bovina
CHAPS	– 3-[(3-cloamidopropil)-dimetilamonio]-1-propanosulfonato
CpLP	– Fração proteica total do latex de <i>Calotropis procera</i>
DEAE	– Matriz cromatográfica positiva fraca que possuem ligantes do tipo dietilaminoetil
DMAB	– 4-(dietilamino)-benzaldeído
DTT	– Ditioneitol
EDTA	– Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	– <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
FPLC	– <i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
HdLP	– Fração proteica total do látex de <i>Himatanthus drasticus</i>
HdLP-90	– <i>Himatanthus drasticus latex proteins</i> precipitadas com 90% de saturação de sulfato de amônio
IPG <i>buffer</i>	– Solução de anfólitos
kDa	– kilodalton (1000 Da)
MS	– Espectrometria de Massas
NAG	– N-acetil-D-glucosamina
NCBI	– <i>National Center for Biotechnology Information</i>
nkat	– nanokatal
PBS (tampão)	– Tampão fosfato-salino
PVPP	– Polivinilpolipirrolidona
SDA	– <i>Sabourad Dextrose Agar</i>
SDS	– Docecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	– Eletroforese em Gel de Poliacrilamida na presença de SDS

TCA – Ácido tricloroacético
Tris – Tris-hidroxi-amino-metano
YPD – *Yeast Peptone Dextrose*

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	23
1.1	Látex.....	23
<i>1.1.1</i>	<i>Aspectos gerais.....</i>	<i>23</i>
<i>1.1.2</i>	<i>Composição química e bioquímica do látex.....</i>	<i>26</i>
<i>1.2.3</i>	<i>Plantas laticíferas.....</i>	<i>28</i>
<i>1.2.3.1</i>	<i>Himatanthus drasticus.....</i>	<i>28</i>
1.2	Osmotinas.....	32
1.3	Quitinases.....	34
1.4	Pragas agrícolas.....	36
<i>1.4.1</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides.....</i>	<i>37</i>
<i>1.4.2</i>	<i>Callosobruchus maculatus.....</i>	<i>37</i>
2.	JUSTIFICATIVA.....	39
3.	OBJETIVOS.....	40
3.1	Objetivos gerais.....	40
3.2	Objetivos específicos.....	40
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
4.1	Reagentes.....	41
4.2	Material Biológico.....	41

4.2.1	<i>Látex</i>	41
4.2.2	<i>Fungo</i>	42
4.2.3	<i>Insetos</i>	42
4.2.4	<i>Sementes de Vigna unguiculata</i>	42
4.3	Coleta do látex	42
4.4	Fracionamento do látex	43
4.5	Caracterização Bioquímica e Proteômica Parcial	45
4.5.1	<i>Espectro de Absorção</i>	45
4.5.2	<i>Dosagem de proteínas</i>	45
4.5.3	<i>Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sepharose Fast Flow</i>	45
4.5.4	<i>Cromatografia de troca iônica em coluna Mono-Q acoplada ao sistema FPLC</i>	46
4.5.5	<i>Espectrometria de massas</i>	46
4.5.5.1	<i>Pesquisa em banco de dados</i>	47
4.5.6	<i>Eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida</i>	47
4.5.7	<i>Eletroforese bidimensional</i>	49

4.5.8	Ensaio enzimáticos	50
4.5.8.1	<i>Detecção da atividade proteolítica total</i>	50
4.5.8.2	<i>Atividade quitinolítica</i>	51
4.5.9	Dot Blot	52
4.6	Ensaio biológicos	53
4.6.1	Ensaio antifúngico	53
4.6.1.1	<i>Cultivo do fungo e obtenção da solução de esporos</i>	53
4.6.1.2	<i>Ensaio de inibição do crescimento micelial</i>	53
4.6.2	Ensaio inseticida	54
4.6.2.1	<i>Preparo da farinha de feijão e das sementes artificiais</i>	54
4.6.2.2	<i>Avaliação do desenvolvimento larval</i>	55
4.6.2.3	<i>Avaliação do desenvolvimento dos insetos adultos</i>	56
4.6.2.4	<i>Análise estatística</i>	56
5.	RESULTADOS	57
5.1	Caracterização Bioquímica e Proteômica Parcial	57
5.1.1	Caracterização Enzimática Parcial	67

5.2	Ensaio biológico.....	68
5.2.1	<i>Atividade antifúngica</i>	68
5.2.2	<i>Atividade inseticida</i>	69
6.	DISCUSSÃO.....	72
7.	CONCLUSÃO.....	77
	REFERÊNCIAS	78

1. INTRODUÇÃO

1.1 Látex

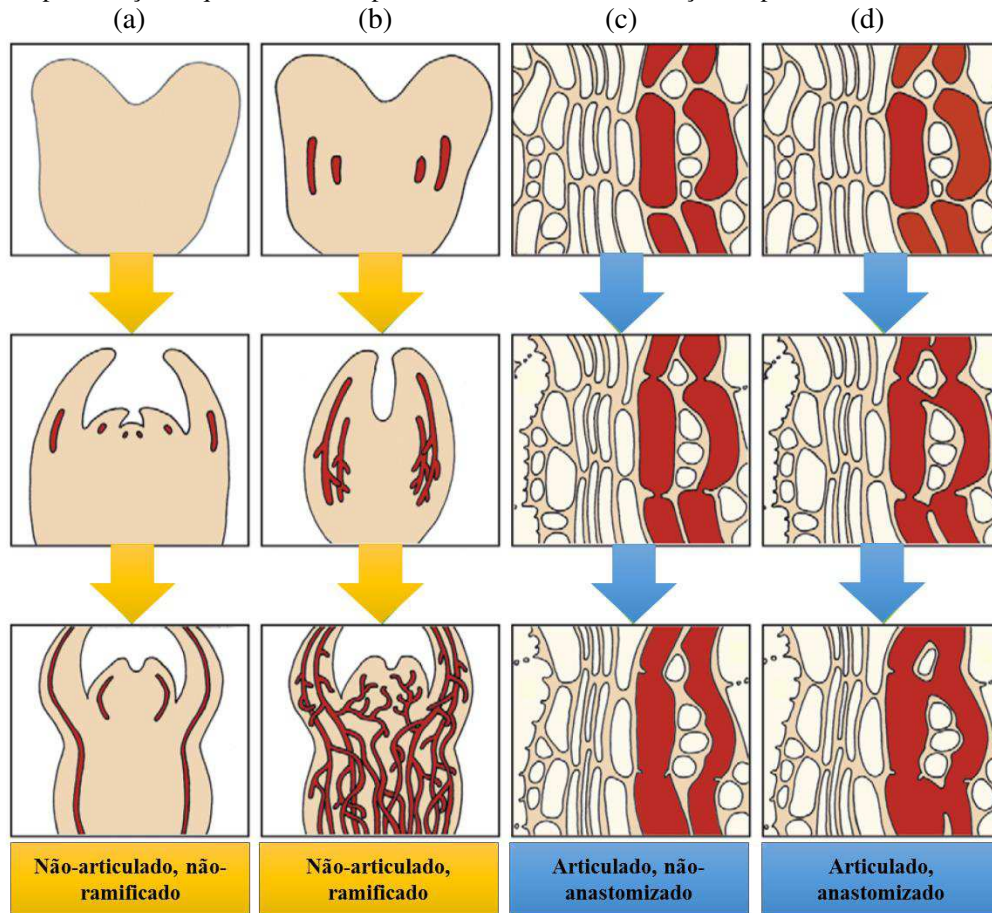
1.1.1 Aspectos gerais

O látex consiste de um fluido armazenado em células vegetais especializadas chamadas laticíferos. Muitos autores definem o látex como sendo o conteúdo de vacúolos presentes nestas células. No entanto, estudos mais recentes consideram o látex como sendo o próprio citoplasma dos laticíferos (DEMARCO, 2014). Este fluido é exsudado quando algum tecido vegetal sofre injúria (KONNO, 2011, UPADHYAY, 2011).

Os laticíferos podem estar presentes em diversas partes das plantas como caule, raízes, folhas e frutos (KONNO, 2011, UPADHYAY, 2011). São classificados em dois grupos, articulados ou não-articulados, de acordo com seu desenvolvimento e morfologia. Os laticíferos não-articulados são originados a partir de uma única célula, cujo extensão é posteriormente alongada, podendo formar ou não ramificações. Desta forma, podem ser denominados laticíferos não-articulados ramificados ou não-ramificados (Figura 1 – A e B). Por outro lado, os laticíferos articulados são gerados a partir de múltiplas células e, eventualmente, podem conectar-se através de conexões entre paredes celulares adjacentes, sendo chamados de laticíferos articulados anastomizados ou não-anastomizado (Figura 1 – C e D) (HAGEL; YEUNG; FACCHINI, 2008).

A coloração do látex pode variar conforme a espécie da planta, podendo, por exemplo, ser branco, vermelho, amarelo, laranja ou até mesmo transparente. A sua coloração pode mudar uma vez exsudado e, conseqüentemente, exposto ao ar (PICKARD, 2008, UPADHYAY, 2011).

Figura 1 – Representação esquemática dos tipos de laticíferos e sua formação na planta



Fonte: Adaptado de HAGEL; YEUNG; FACCHINI (2008). A e B: formação de laticíferos não-articulados a partir de uma única célula. C e D: formação de laticíferos articulados a partir de múltiplas células. Em vermelho: laticíferos.

As funções do látex na planta têm sido objeto de estudo de diversos trabalhos científicos. Dentre as diversas hipóteses, há evidências de que além de promover a recuperação de danos físicos já causados ao tecido vegetal, o látex atua na proteção vegetal contra o ataque de herbívoros e de microrganismos (GAGLIARDI; CORDEIRO; DEMARCO, 2016). Propriedades colantes presentes em alguns látices podem proporcionar defesa vegetal contra insetos, uma vez que possibilitam o seu aprisionamento e imobilização. Além disso, estudos têm evidenciado que a defesa vegetal contra herbivoria está relacionada com os componentes presentes no fluido laticífero, como alcaloides, cardenolídeos (KONNO, 2011) e proteínas (RAMOS *et al.*, 2007,

2010). Com relação ao efeito deletério do látex sobre microrganismos, o potencial antifúngico de proteases e osmotinas laticíferas contra importantes espécies de fungos fitopatogênicos foi relatado na literatura (FREITAS *et al.*, 2011a,b, SOUZA *et al.*, 2011).

A produção de látex representa uma forma de defesa vegetal constitutiva, já que este fluído atua como uma barreira física presente na planta antes do ataque de herbívoros ou patógenos. Além disso, o látex possui diversas biomoléculas e compostos químicos que estão também envolvidos nessa primeira linha de resistência vegetal (MEDEIROS; FERREIRA; DIANESE, 2003, SYTWALA; GÜNTHER; MELZIG2015). O látex contém também PR-proteínas (proteínas relacionadas à patogênese), cujas sínteses podem ser induzidas por meio dos mecanismos de resistência vegetal do tipo indutiva (SHEWRY; LUCAS, 1997, FERREIRA *et al.*, 2007).

1.1.2. Composição química e bioquímica do látex

Fluidos laticíferos podem conter uma ampla variedade de biomoléculas, como proteínas, carboidratos e ácidos graxos, e compostos químicos, tais como terpenoides, alcalóides, cardenolídeos, compostos fenólicos e borracha (DEMARCO; CASTRO; ASCENSÃO, 2013). Diversas proteínas têm sido relatadas quanto a sua presença em látex, como proteases, inibidores de proteases, glucosidases, lectinas, osmotinas, oxidases e quitinases (KONNO, 2011, FREITAS *et al.*, 2011a,b). A Tabela 1 apresenta alguns compostos químicos e bioquímicos comuns no látex, assim como algumas espécies de plantas nas quais estes já foram identificados.

Tabela 1 – Compostos químicos e proteínas comumente presentes no látex

Categoria	Compostos químicos ou biológicos	Espécies de planta e Referência
Química	Alcaloides	<i>Chelidonium majus</i> (TOMÈ; COLOMBO, 1995), <i>Papaver somniferum</i> (Papaveraceae) (ITENOV; MOLGAARD; NYMAN, 1999)
	Terpenoides	<i>Lactuca</i> spp, <i>Lactuca sativa</i> (Asteraceae) (SESSA <i>et al.</i> , 2000; REES, HARBORNE, 1985, DUSSOURD, 2003)
	Cardenólídeos	<i>Asclepias</i> spp., <i>Asclapias curassavica</i> , etc. <i>Calotropis procera</i> (Apocynaceae) (SEIBER; NELSON; LEE, 1982, MALCOLM, 1991, DUSSOURD; HOYLE, 2000; RASMANN; JOHNSON; AGRAWAL, 2009)
	Compostos fenólicos	<i>Ipomoea batatas</i> (Convolvulaceae) (SNOOK; DATA; KEYS,1994), <i>Rhus</i> (Toxicodendron) spp. (Anacardiaceae, Resin) (DAWSON, 1954)
Biológica (proteínas)	Borracha(polímero de cis-1,4-isopreno)	<i>Hevea brasiliensis</i> (Euphorbiaceae), <i>Ficus</i> spp. (Moraceae), <i>Alstoea boonei</i> (Apocynaceae), <i>Parthenium argentatum</i> , <i>Lactuca</i> spp. (Asteraceae) (MOOIBROEK; CORNISH, 2000; BUSHMAN <i>et al.</i> , 2006)
	Proteases cisteínicas	<i>Carica papaya</i> (Caricaceae), <i>Ficus carica</i> (Moraceae), <i>Morrenia brachystephana</i> , <i>Calotropis proceca</i> (Apocynaceae); (KIMMEL; SMITH, 1954, KONNO <i>et al.</i> , 2004; SGARBIERI <i>et al.</i> ,1964; ARRIBÉRE <i>et al.</i> , 1998; RAMOS <i>et al.</i> , 2010)
	Proteases serínicas	<i>Ficus elastica</i> (Moraceae), <i>Hevea brasiliensis</i> , <i>Euphorbia sapina</i> (Euphorbiaceae), <i>Wrightia tinctoria</i> (Apocynaceae) (LYNN; CLEVETTE-RADFORD,1986a,b; ARIMA <i>et al.</i> , 2000; TOMAR; KUMAR; JAGANNADHAM, 2008)
	Inibidores de proteases cisteínicas	<i>Calotropis proceca</i> (Apocynaceae) (RAMOS <i>et al.</i> , 2010)
	Inibidores de proteases serínicas	<i>Ficus carica</i> (Moraceae), <i>Carica papaya</i> (Caricaceae), <i>Hevea brasiliensis</i> (Euphorbiaceae) (KIM <i>et al.</i> , 2003; AZARKAN <i>et al.</i> , 2004; KEHR, 2006)
	Oxidases	<i>Hevea brasiliensis</i> (Euphorbiaceae) (WITITSUWANNAKUL <i>et al.</i> , 2002), <i>Ficus carica</i> (Moraceae) (KIM <i>et al.</i> , 2003)

Fonte: Adaptada de KONNO (2011).

Em geral, os metabólitos presentes no látex são produtos finais de reação não reaproveitados em outras vias metabólicas primárias. Muitos destes, na verdade, são citotóxicos. Desta forma, acredita-se que estes compostos são armazenados nos laticíferos como uma estratégia de autoproteção, além das demais funções já mencionadas (HAGEL; YEUNG; FACCHINI, 2008).

1.1.3 Plantas laticíferas

A produção de látex é um mecanismo biológico bastante difundido entre as plantas. Estima-se que mais de 20.000 espécies de plantas, que compreendem mais de 40 famílias, são produtoras de látex (LEWINSOHN, 1991), o que representa 8,9% das Angiospermas (KONNO, 2011). Este número de espécies aumenta para 35.000 quando são incluídas as coníferas e as plantas exsudadoras de resina, fluido semelhante ao látex (FARREL; DUSSOURD; MITTER, 1991). As plantas laticíferas mais comuns e estudadas são pertencentes às famílias Apocynaceae, Asclepiadaceae ou Euphorbiaceae (HAGEL; YEUNG; FACCHINI, 2008).

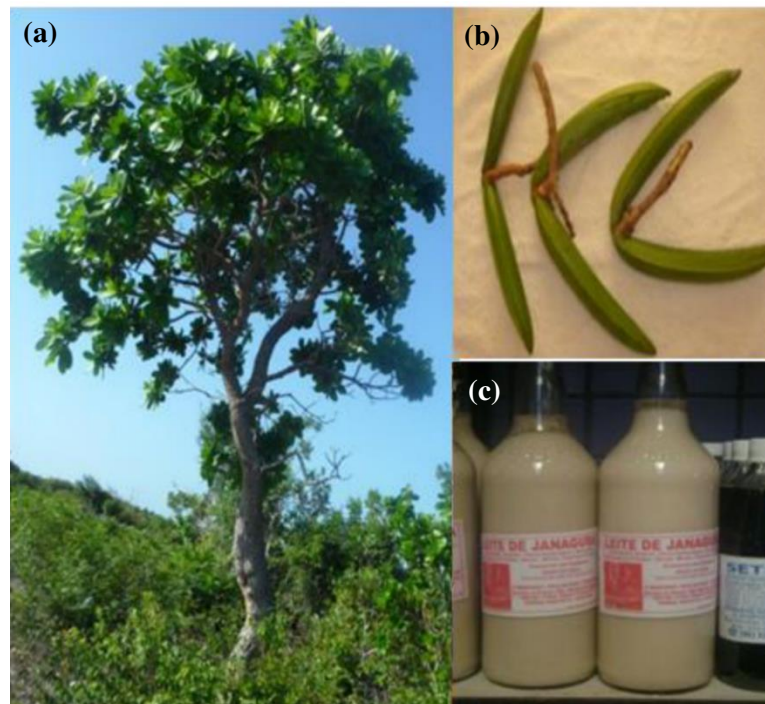
Plantas laticíferas têm sido utilizadas pelo homem para vários fins. Algumas culturas aborígenes da Ásia utilizam o látex de *Antiaris spp.* para a produção de toxinas as quais são utilizadas na fabricação de flechas. Os látices de *Hevea brasiliensis* (Euphorbiaceae), conhecida como seringueira, e de *Ficus elastica* (Maraceae) têm sido utilizados como matéria-prima para a produção da borracha comercial (HAGEL; YEUNG; FACCHINI, 2008). O látex de *Himatanthus drasticus* (Apocynaceae), por sua vez, tem sido utilizado pela medicina popular no Estado do Ceará para o tratamento de várias doenças, como gastrite e úlcera, e para a estimulação do sistema imunológico (AMARO *et al.*, 2006, MODESTO, 1997). Várias espécies estão sendo alvo de investigações científicas, tais como *Calotropis procera*, *Cryptostegia grandiflora* e *Plumeria rubra*, todas pertencentes à família Apocynaceae (FREITAS *et al.*, 2011a,b, ALBUQUERQUE *et al.* 2009; PATIL *et al.*, 2012).

1.2.3.1 *Himatanthus drasticus*

Himatanthus drasticus é uma planta laticífera pertencente à família Apocynaceae. Espécimes desta planta podem ser encontrados numa vasta extensão territorial do Brasil, que engloba toda a região Nordeste mais os estados de Minas Gerais, Roraima e Pará, até outros países sul-americanos ao norte do território brasileiro. No Brasil, *H. drasticus* possui diversos nomes populares, dentre estes, janaguba no estado do Ceará, jonoaguba no Rio Grande do Norte, tiborna, jasmim-manga e raivosa nos estados da Bahia e de Minas Gerais e pau-de-leite no Piauí. (AMARO *et al.*, 2006, PLUMEL, 1991)

Himatanthus drasticus apresenta porte arbóreo e pode atingir 7 m de altura (Figura 2 – a). As folhagens são densas nas extremidades dos ramos. O seu fruto é polispérmico (em média 42 sementes), seco, deiscente, do tipo folículo e apresenta formato em chifre cilíndrico levemente arqueado (Figura 2 – b). De acordo com Amaro *et al.* (2006), há desuniformidades quanto às dimensões do seu fruto. A literatura relata que o comprimento pode variar entre 12 e 30 cm, enquanto largura e espessura podem estar dentro dos intervalos de 1,8-3,0 cm e 2,0-2,9 cm, respectivamente (BARROSO *et al.* 1999). A semente é alada, com testa áspera, rugosa e de coloração amarelo-madeira e sulcada, apresenta hilo saliente e bem visível, endosperma delgado, plano e de coloração amarelada (AMARO *et al.*, 2006).

Figura 2 – (a) Arvore e (b) fruto de *H. drasticus*; (c) comercialização do leite de janaguba em mercados populares do Ceará



Fonte: adaptado de MATOS *et al.* (2013).

No Ceará, o látex de *Himatanthus drasticus* é popularmente conhecido como leite de janaguba e, assim como em todos os Estados nordestinos, é utilizado pela população local para o

tratamento de diversas doenças (Figura 2 – c). Amaro *et al.* (2006) cita a sua ampla utilização pela medicina popular do Nordeste com a finalidade de curar o câncer. Outras espécies do gênero *Himatanthus*, por exemplo *Himatanthus sucuuba*, também têm sido exploradas com fins medicinais. É sabido que o uso de plantas medicinais e preparações caseiras é uma prática comum no tratamento de enfermidades que afetam populações de baixa renda desta região devido a diversos fatores, tais como a disponibilidade da flora, a carência do sistema público de saúde e a transmissão de hábitos culturais ao longo das gerações (MATOS, 1989, MATOS, *et al.*, 2013). Entretanto, este último fator tem disseminado a administração oral de látices extraídos de plantas desse gênero para outras localidades mais afastadas da região Nordeste (REBOUÇAS *et al.*, 2011)

Em geral, o látex (coletado da casca da árvore em água 1:1 v/v) é tomado três vezes ao dia em doses de aproximadamente 200 mL (MOUSINHO *et al.*, 2011). Várias são as patologias tratadas por meio da administração do leite de jabaguba pela medicina popular como gastrite, úlcera, inflamações, verminoses, diabetes, micoses e hemorroidas. Além disso, ele também é ingerido com o intuito de prevenir certos problemas de saúde, como o câncer. Neste caso, o seu consumo é realizado diariamente. Apesar desta vasta lista de indicações de tratamento e/ou prevenção de doenças, nem todos possuem confirmação científica (MATOS, 2010). A Tabela 2 sumariza alguns relatos presentes na literatura acerca de algumas propriedades medicinais do leite de jabaguba investigadas cientificamente.

Tabela 2 – Literatura científica acerca de algumas propriedades farmacológicas do látex de *H. drasticus* ou de frações deste

Investigação farmacológica	Modo de administração do látex ou fração deste	Resultado	Referência
Proteção contra a formação de úlceras induzidas por etanol em camundongos	Látex administrado por gavagem	+tivo: atividade antiulceral -tivo: atividade citotóxica <i>in vitro</i> ;	LEITE <i>et al.</i> , 2009
Efeito antitumoral (Sarcoma 180 e Walker 256 carcinosarcoma)	Fração proteica HdLP	+tivo: via intraperitoneal -tivo: via oral +tivo: propriedade imunoestimulante	MOLSINHO <i>et al.</i> , 2011
Atividade anti-inflamatória	Fração acetato de lupeol isolada do látex	+tivo: modelo estudado (camundongos)	LUCETTI <i>et al.</i> , 2010.
Proteção contra lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos	Fração HdLP administrada via intraperitoneal	+tivo: função gastroprotetora	MARQUES, 2012
Atividade antitumoral (cancêr de pulmão em camundongos)	Látex administrado via oral	-tivo: redução da progressão do câncêr de pulmão	FRANÇA <i>et al.</i> , 2011
Atividades anti-inflamatória e antinociceptiva	Látex (via oral) e fração HdLP (via intraperitoneal)	+tivo: ambas as atividades	MATOS <i>et al.</i> , 2013

Fonte: autoria própria (2017). (+tivo): resultado positivo; (-tivo): resultado negativo.

1.2 Osmotinas

Osmotinas são proteínas catiônicas multifuncionais expressas em condições de baixo potencial osmótico (ABDIN; KIRAN; ALAM, 2011). Estas biomoléculas pertencem à família das PR5-proteínas, que, e em plantas, estão envolvidas nos processos de osmoregulação e defesa contra patógenos, como fungos fitopatogênicos. Entretanto, sabe-se que membros dessa família também podem ser encontrados em outros organismos, como animais e fungos. Além das osmotinas, taumatinas e zeamatinas são outros exemplos de PR-5 proteínas já identificadas (VIGERS; ROBERTS; SELITRENNIKOFF, 1991, TONG *et al.*, 2016,).

A primeira osmotina isolada foi de espécimes de tabaco cultivadas sob altas concentrações de NaCl, condição que induz o seu acúmulo na planta (SINGH *et al.*, 1987). Estudos mostraram que 12% do conteúdo proteico total de células de tabaco aclimatadas em 0,428 M de NaCl é representado por osmotinas. Além da aclimação ao estresse salino ou hídrico, sua síntese e acúmulo são regulados por outros sinais ambientais, como, infecção causada pelo vírus do mosaico do tabaco, dessecação, frio, luz ultravioleta e feridas, e por pelo menos 10 hormônios, tais como ácido abscísico, auxinas e etileno (SINGH *et al.*, 1987, NOORI; SOKHANSANJ, 2008, VIKTOROVA *et al.*, 2012).

Estudos de caracterização revelaram que as osmotinas de *Nicotiana tabacum* possuem massa molecular em torno de 26 kDa, são catiônicas, apresentam ponto isoelétrico entre 7,8 e 8,2, que varia conforme a sua isoforma. Quanto a sua estrutura, esta possui 244 resíduos de aminoácidos, dos quais 12% formam alfa-hélice e 37% formam folha-beta, apresenta três domínios e é semelhante às estruturas da taumatina e zeamatina. As osmotinas são encontradas predominantemente em corpos de inclusão presentes em vacúolos, destino celular determinado por seu domínio C-terminal. A região N-terminal, por sua vez, sinaliza seu prévio transporte através do retículo endoplasmático (SINGH *et al.*, 1987, VIKTOROVA *et al.*, 2012).

As funções das osmotinas na proteção vegetal contra fungos, contra frio e estresses hídrico e salino são bem conhecidas. Além disso, a homologia com inibidor de tripsina alfa-amilase, a capacidade de se ligar a receptores humanos para adiponectina e a habilidade de interação com citocininas também são outros aspectos das osmotinas relatados na literatura científica. A sua participação na regulação de respostas vegetal ocorre por meio de sinalização

celular. Isto é devido ao fato de que ela não possui motivos de ligação ao DNA e, portanto, não atua como regulador de transcrição para genes que expressam proteínas de resposta a estresses bióticos e abióticos (ABDIN; KIRAN; ALAM, 2011, VIKTOROVA *et al.*, 2012).

Como citado anteriormente, osmotinas são proteínas que possuem multidomínios, que podem exercer sua função individualmente ou em conjunto com outras proteínas. Quinases são um dos exemplos de proteínas que podem interagir com domínios de osmotinas. Isto é muito interessante do ponto de vista bioquímico, uma vez que quinases são proteínas envolvidas em muitos processos celulares, tais como: ativação enzimática por meio da transferência de grupos fosfato, síntese de macromoléculas, localização e degradação de proteínas (ABDIN; KIRAN; ALAM, 2011).

A atividade antifúngica de osmotinas em plantas tem sido objeto de estudo de diversos trabalhos científicos. De acordo com Abad *et al.* (1996), osmotinas têm a capacidade de inibir o crescimento de hifas e a germinação de esporos de fungos. Ambos os processos parecem estar relacionados com o aumento da permeabilidade da membrana plasmática de células fúngicas a prótons. Consequentemente, as células dos fungos são incapacitadas de manter o gradiente interno de pH. A Tabela 3 mostra alguns estudos que investigaram o potencial antifúngico dessas proteínas contra várias espécies de fungos.

Tabela 3 – Potencial antifúngico de algumas osmotinas de plantas

Osmotina	Fungos	Referência
	<i>Phytophthora infestam</i>	WOLOSHUK <i>et al.</i> 1991
Osmotina de <i>Nicotiana tabacum</i>	<i>Trichoderma lortgihrachiatum</i> , <i>P. infestans</i> , <i>Colletotrichum graminicola</i> , <i>C. laginarium</i> , <i>C. sublineolum</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. moniliforme</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F. roseum</i> ,	ABAD <i>et al.</i> , 1996
	<i>Cercospora beticola</i> , <i>Trichoderma reesei</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Neurospora crassa</i>	VIGGERS <i>et al.</i> , 1992
	<i>Cryptococcus neoformans</i>	TZOU <i>et al.</i> , 2010
Osmotina de <i>Calotropis procera</i>	<i>Fusarium solani</i> , <i>Neurospora sp.</i> , <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	FREITAS <i>et al.</i> , 2011a
Osmotina de <i>Vitis vinifera</i>	<i>Phomopsis viticola</i> , <i>Botrytis cinerea</i>	MONTEIRO <i>et al.</i> , 2003

Fonte: Autoria própria (2017).

A tabela 3 cita a atividade antifúngica da osmotina de *Calotropis procera*, que é uma planta laticífera. Entretanto, há poucos estudos científicos que evidenciam a presença dessas proteínas em látex. *Hevea brasiliensis* foi a primeira planta produtora de látex onde uma osmotina foi identificada (SUBROTO *et al.*, 2001). Looze *et al.* (2009) purificou e caracterização uma taumatina do látex de *Carica papaya*. Entretanto, o trabalho de Freitas *et al.* (2015) mostrou que osmotinas de outras 5 plantas laticíferas, incluindo *H. drasticus*, não possuem efeitos deletérios contra ambos os fungos testados, os quais foram *Fusarium solani* e *Colletotrichum gloeosporioides*).

1.3 Quitinases

Quitinases (EC 3.2.1.14) são enzimas que catalisam a hidrólise de quitina, um polímero de carboidratos não ramificado formado por resíduos de β -1,4-N-acetilglicosamina. Quitina é o segundo biopolímero mais abundante na natureza, depois da celulose. Pode ser encontrada no exoesqueleto de insetos, carapaça de crustáceos e parede celular de fungos e algumas

algas. Entretanto, quitinases são sintetizadas por vários organismos, incluindo aqueles que não possuem quitina em sua composição, como as plantas (VERBURG; HUYNH 1991, SAHAI; MONOCHA, 1993, COHEN-KUPIEC; CHET, 1998).

As quitinases são classificadas em endoquitinases e exoquitinases. Endoquitinases clivam ligações β -1,4-glicosídicas entre resíduos localizados em regiões internas da quitina aleatoriamente, gerando múltiplos solúveis de GlcNAc, de baixa massa molecular, como quitotetraose, quitotriose ediacetilquitobiose. Exoquitinases, por sua vez, são ainda subdivididas em dois grupos: quitobiosidades (EC 3.2.1.29) e quitina-1,4- β -quitobiosidases (EC 3.2.1.30). O primeiro grupo catalisa a liberação gradual de diacetilquitobiose a partir da extremidade não redutora do polímero de quitina. Quitina-1,4- β -quitobiosidases hidrolisa produtos gerados a partir da ação enzimática de endoquitinases e quitobiosidades, gerando monômeros de GlcNAc (SAHAI; MONOCHA, 1993, COHEN-KUPIEC; CHET, 1998).

As funções de quitinases variam conforme os diferentes organismos no quais elas podem ser encontradas. Em bactérias, estas enzimas atuam em processos relacionados a parasitismo e nutrição (por meio da geração de fontes de carbono e nitrogênio). Em fungos, protozoários e invertebrados, quitinases estão envolvidas na morfogênese. Este processo dá-se por meio do remodelamento da estrutura da parede celular e divisão celular para fungos, cujos alguns mecanismos de patogênese também são mediados por essas enzimas. Quitinases também estão envolvidas em mecanismos de defesa de plantas e de vertebrados (COHEN-KUPIEC; CHET, 1998, PATIL; GHORMADE; DESHPANDE, 2000, KASPRZEWSKA, 2003, ADRANGI; FARAMARZI, 2013). Baculovírus, que é usado no controle biológico de pragas, possui quitinases também associadas a processos de patogêneses (GOODAY, 1995). Em humanos, quitinases parecem estar envolvidas na defesa contra fungos patogênicos (ESCOTT *et al.*, 1996, AERTS *et al.* 1996, ADRANGI; FARAMARZI, 2013).

Quitinases de plantas são classificadas como PR-proteínas (proteínas relacionadas à patogênese), cuja expressão pode ser induzida por fatores bióticos e abióticos, incluindo, ataque por microrganismos e herbívoros, estresses salino e hídrico, feridas e reguladores de crescimento (COLLINGE *et al.*, 1993, COHEN-KUPIEC; CHET, 1998, KASPRZEWSKA, 2003). Devido a importante função desempenhada por quitinases na defesa vegetal contra patógenos que possuem

quitina em sua composição, alguns estudos têm objetivado produzir plantas transgênicas que expressam essas enzimas (AL AHMADI *et al.*, 2008; AMIAN *et al.*, 2011; RAO *et al.*, 2011).

Quitinases foram identificadas no látex de algumas plantas laticíferas, tais como *Hevea brasiliensis* (MARTIN, 1991), *Carica papaya* (AZARKAN *et al.*, 1997) e *Euphorbia characias* (SPANÒ *et al.*, 2015). Recentemente, Freitas *et al.* (2016) isolou e caracterizou quitinases de *Calotropis procera* que possuem atividade contra insetos e fungos.

1.4 Pragas agrícolas

Pragas agrícolas representam um risco para a produção de alimentos mundial, cuja demanda é crescente devido ao aumento populacional ao longo dos anos. Estima-se que na metade deste século, a população mundial atingirá o platô de nove bilhões de pessoas. Estudos sugerem que a produção de alimentos precisará aumentar entre 70% e 100% em 2050 para atender as necessidades nutricionais da população mundial. Isto se caracteriza como um grande desafio para os agricultores, para a ciência agrônômica e para a biotecnologia, já que há na natureza muitos organismos causadores de danos às culturas agrícolas, tais como insetos, nematódeos, bactérias, vírus e fungos (GODFRAY *et al.*, 2010, OERKE, 2006).

Os insetos-pragas são os principais causadores de danos para as culturas de alimentos na agricultura mundial (ESTRUCH *et al.*, 1997, LIU *et al.*, 2016). De acordo Maxmen (2013), estes organismos são responsáveis por aproximadamente 15% das perdas de culturas agrícolas no mundo. Estudos anteriores mostraram que esse número era duas vezes maior uma década atrás (ESTRUCH *et al.*, 1997). Esta redução, entretanto, pode ser atribuída à introdução do uso de vários pesticidas sintéticos, como os inseticidas organofosfatos, carbamatos e fungicidas. Apesar dos benefícios econômicos gerados por essa prática, a aplicação intensiva de pesticidas pode resultar em sérias implicações para a saúde humana e para a fauna, flora e meio ambiente (AKTAR; SENGUPTA; CHOWDHURY, 2009).

Aproximadamente 80% das doenças vegetais podem ser resultado da ação de fungos e oomicetos, como *Pythium* e *Phytophthora* sp. Estima-se que mais de 8000 espécies de fungos são fitopatogênicas. Em 2003, as perdas agrícolas causadas por esses organismos atingiram 12% da produção mundial de alimentos (BECKER-RITT; CARLINI, 2012).

Dessa forma, o desenvolvimento de estratégias ecologicamente sustentáveis para o combate a essas pragas agrícolas é almejado por muitos cientistas. Existe uma tendência à prospecção de biomoléculas com potencial inseticida e/ou fungicida, cujos malefícios ao homem e à natureza sejam inexistentes, ou pelo menos, atenuados quando comparados aos dos pesticidas (GHINI; BETTIOL, 2000, BECKER-RITT; CARLINI, 2012)

1.4.1 *Colletotrichum gloeosporioides*

Colletotrichum é um dos principais gêneros de fungos fitopatogênicos responsáveis pela antracnose. Esta é uma doença vegetal caracterizada pelo aparecimento de manchas coloridas nas folhas, caule, frutos e flores da planta. O tecido vegetal infectado por este fungo tende a murchar, secar e morrer. A maioria das culturas agrícolas é susceptível a, pelo menos, uma espécie deste gênero (DEAN *et al.*, 2012, GAUTAM, 2014).

Colletotrichum gloeosporioides pertence à família Phyllachoraceae. O seu ataque às plantas se dá através de sítios onde o tecido vegetal já foi danificado ou está enfraquecido. Durante a interação planta-patógeno, o fungo produz algumas estruturas específicas responsáveis pelo processo de infecção, como os conídios (GAUTAM, 2014). Esta espécie ataca uma grande variedade de culturas agrícolas tropicais e subtropicais. A antracnose causada por *C. gloeosporioides* é a principal doença que ocorre na mangueira. Na manga, os conídios germinam e penetram a epiderme do tecido vegetal. Posteriormente, ocorre o crescimento das hifas que permanecem quiescentes até o fruto amadurecer (WEI *et al.*, 2017).

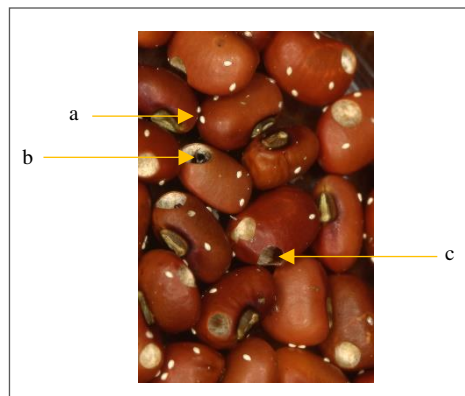
1.4.2 *Callosobruchus maculatus*

Callosobruchus maculatus é um inseto pertencente à ordem Coleoptera e a família Bruchidaea. É considerada a principal peste que ataca as sementes armazenadas de *Vigna*

unguiculata, o feijão-caupi, que é um alimento muito importante em regiões tropicais e subtropicais devido ao seu alto teor proteico e baixo custo (TIROESELE; THOMAS; SEKETEME, 2014). Na Nigéria, *C. maculatus* é um dos principais insetos que atacam inhame e grãos de soja, além do feijão caupi (ADEBAYO; OKE, 2017).

C. maculatus deixa excrementos e ovoposita sobre as sementes de *Vigna unguiculata*, onde as larvas se desenvolvem até a eclosão dos insetos adultos, causando grandes perdas quantitativas e qualitativas às sementes do feijão (Figura 3). O uso de pesticidas no controle destes insetos é uma prática comum entre os agricultores. No entanto, sabe-se que isto pode trazer riscos à saúde humana além de poder acarretar o desenvolvimento de populações de insetos resistentes a esses compostos químicos (TORRES *et al.*, 2016).

Figura 3 – Infestação de *C. maculatus* em sementes de feijão-caupi



Fonte: adaptada de www.flickr.com/photos/11349606@N00/351790619. (a) ovos, (b) inseto adulto preste a eclodir, (c) buracos nas sementes onde as larvas se desenvolveram.

2. JUSTIFICATIVA

A prospecção por moléculas naturais com possível aplicação biotecnológica é uma tendência em crescimento na pesquisa científica mundial.

O látex de *Himatanthus drasticus* é um produto natural consumido pela população do Nordeste brasileiro para vários fins medicinais. Devido a sua grande popularidade e disponibilidade comercial, o leite de janaguba tem sido estudado com o intuito de comprovar o seu potencial farmacológico cientificamente. Entretanto, a literatura científica sobre as propriedades bioquímicas das proteínas desse látex ainda é bastante restrita.

Portanto, o presente trabalho justifica-se pela fundamental importância de dados de caracterização bioquímica e proteômica no entendimento da função biológica de biomoléculas. Este tipo de estudo torna-se ainda mais relevante pelo fato de que várias atividades etnofarmacológicas do látex de *H. drasticus* têm sido confirmadas, além do fato de que este já é utilizado pela população como um produto natural medicinal há muito tempo. Dessa forma, as informações geradas nesse trabalho poderão futuramente reforçar o potencial das proteínas do látex de *H. drasticus* na sua utilização como bioproduto, quer seja na agricultura (devido ao conhecimento gerado acerca da função das proteínas na defesa vegetal), na indústria farmacêutica ou outros.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Avaliar aspectos bioquímicos e proteômicos das proteínas do látex da planta medicinal *Himatanthus drasticus*, assim como investigar suas ações em defesa vegetal contra pragas agrícolas.

3.2 Objetivos específicos

- Obter a fração proteica do látex de *H. drasticus* por meio de precipitação com sulfato de amônio.
- Separar as proteínas do látex por meio de cromatografia de troca iônica.
- Analisar o perfil proteico das frações obtidas por meio de eletroforeses uni e bidimensionais em gel de poliacrilamida na presença de SDS.
- Quantificar as proteínas solúveis e verificar a presença de proteases nas frações proteicas do látex.
- Identificar as proteínas presentes nas frações do látex por espectrometria de massas.
- Verificar a presença de quitinases nas frações proteicas do látex.
- Avaliar o efeito das proteínas do látex sobre o crescimento micelial do fungo fitopatogênico *Colletotrichum gloeosporioides*.
- Avaliar o efeito da fração proteica total do látex sobre o desenvolvimento de larvas e insetos adultos de *Callosobruchus maculatus*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS

4.1 Reagentes

Alguns reagentes e materiais para eletroforese, como Tris, acrilamida e glicina foram adquiridos de Amresco (São Paulo). Outros como tampão IPG, CHAPS, ureia, tiureia, marcadores de massa molecular, dodecil sulfato de sódio e immobiline dry-strips foram obtidos da GE Healthcare. As colunas de troca iônica DEAE-Sepharose *Fast Flow* e Mono-Q também foram adquiridas deste mesmo fabricante.

Azocaseína, *Coomassie Brilliant Blue* R-250, persulfato de amônio, membranas de diálise com poros de exclusão de 12 kDa e ácido tricloro-acético (TCA) foram obtidos de Sigma-Aldrich Co (São Paulo). Ácido etileno-diamino-tetra-acético (EDTA), *Nitro Blue Tetrazolium* (NBT), ditioneitol (DTT), ureia e tiureia foram obtidos da Amersham Bioscience. Tripsina (EC 3.4.21.4) grau de sequenciamento foi obtida de Promega.

Para os ensaios biológicos com fungos, o meio de cultura Yeast Peptone Dextrose (YPD) foi adquirido de Himedia, Índia. Os filtros para seringa de 0,22 µm foram obtidos de Merk Millipore, Alemanha.

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

4.2. Material Biológico

4.2.1 Látex

O material vegetal utilizado nesse trabalho foi o látex da planta medicinal *Himathanthus drasticus*, a qual pertencente à família Apocynaceae. O fluido laticífero foi coletado de plantas sadias localizadas na cidade de Fortaleza, Ceará. A exsicata de identificação do espécime é 40408, e está depositada no Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici.

4.2.2 Fungo

O fungo *Colletotrichum gloeosporioides* foi obtido da micoteca mantida pelo Laboratório de Bioquímica e Biologia de Proteínas Vegetais do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici.

4.2.3 Insetos

Os insetos utilizados neste trabalho são da espécie *Callosobruchus maculatus*, pertencentes à Ordem Coleoptera e família Bruquidae, e foram obtidos a partir de colônias mantidas pelo Laboratório de Bioquímica e Biologia de Proteínas Vegetais, localizado no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.

4.2.4 Sementes de *Vigna unguiculata*

As sementes de *Vigna unguiculata* utilizadas para a preparação da farinha de feijão foram obtidas de supermercados do comércio de Fortaleza, Ceará.

MÉTODOS

4.3 Coleta do látex

A coleta do látex de *Himatanthus drasticus* foi realizada mensalmente por um coletor capacitado. O processo de coleta consiste na realização de injúrias no caule da planta que causam o gotejamento do fluido laticífero, o qual é coletado em vasilhas e posteriormente diluído em água na proporção 1:1 (v/v). O látex é então armazenado em garrafas de vidro de 1 litro até o processamento.

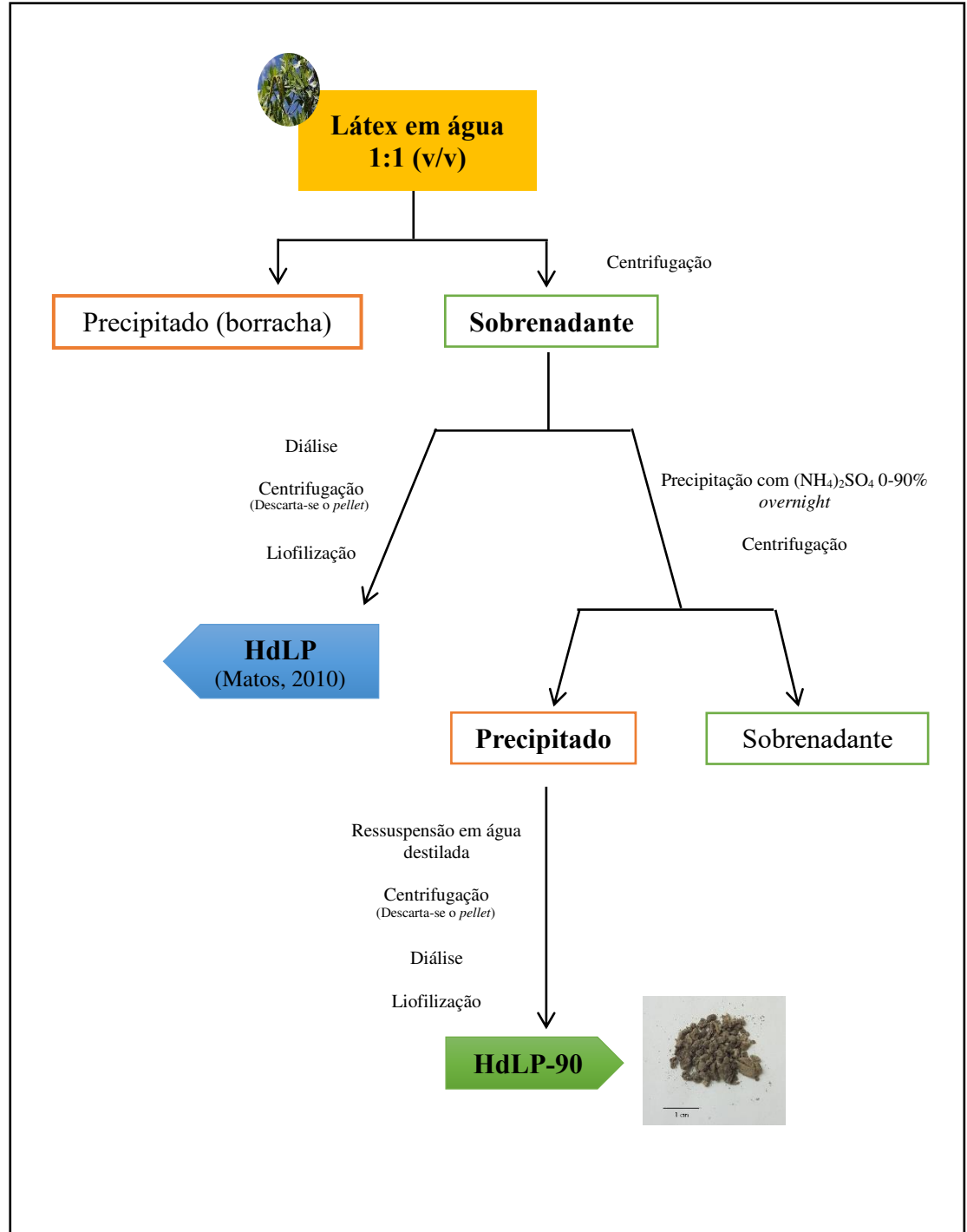
4.4 Fracionamento do látex

De acordo com a metodologia de Matos (2010), o látex recém-coletado em água foi fracionado mediante realização de etapas de centrifugação e diálise. Estas permitem, respectivamente, a precipitação da fração insolúvel rica em dímeros de isopreno (borracha) e a remoção de metabólitos hidrofílicos e de pequeno tamanho molecular menor que 12 kDa. A fração proteica obtida foi denominada HdLP.

Na metodologia desenvolvida no presente estudo, o látex em água foi centrifugado a $9000 \times g$ a 4°C por 30 minutos. O precipitado (borracha) foi então descartado, enquanto o sobrenadante foi submetido ao procedimento de precipitação proteica com 90% de saturação de sulfato de amônio (Figura 4). Nesta etapa, após completa dissolução da massa de sulfato de amônio adicionada pouco a pouco, o sistema foi mantido em repouso *overnight* a 4°C . O material foi então novamente centrifugado nas mesmas condições. Desta vez, o sobrenadante foi descartado, enquanto o *pellet* foi ressuscitado em um volume de água destilada equivalente a, pelo menos, 1/3 do volume inicial de extrato que foi precipitado. Após agitação branda, a solução de proteínas foi submetida à outra etapa de centrifugação para separação de qualquer material proteico que não foi solubilizado. O sobrenadante foi imediatamente dialisado contra água destilada a 4°C em membranas de diálise com poros de exclusão de 12 kDa. A etapa de diálise foi realizada durante 3 dias, sendo realizadas 3 trocas de água destilada diariamente. O volume retido no interior das membranas de diálise foi então recuperado e liofilizado. A fração liofilizada foi denominada HdLP-90 e foi objeto de estudo deste trabalho.

No estudo de determinação do rendimento proteico do fracionamento do látex associado à metodologia de precipitação proteica utilizada neste trabalho, a borracha também foi recuperada, liofilizada e posteriormente analisada.

Figura 4 - Esquema de obtenção das frações proteica do látex de *H. drasticus*



Fonte: autoria própria (2017).

4.5 Caracterização Proteômica e Bioquímica Parcial

4.5.1 Espectro de absorção

A absorção da fração HdLP-90 no intervalo do comprimento de onda entre 200 e 780 nm foi registrada com o intuito de verificar a presença de moléculas proteicas. Para tanto, preparou-se uma solução de 10 mg HdLP-90/mL NaCl 0,15 M, a qual foi centrifugada a 5000 x g a 4 °C durante 10 minutos. O sobrenadante foi recuperado e utilizado neste ensaio. As leituras das absorbâncias foram feitas em espectrofotômetro, aumentando o comprimento de onda na ordem de 40 nm. Cubeta de quartzo foi utilizada para a faixa de comprimento de onda de 200 a 380 nm, enquanto, para o intervalo entre 380 e 780 nm, cubeta de plástico foi utilizada.

4.5.2 Dosagem de proteínas

A quantidade de proteínas solúveis nas diferentes frações do látex de *H. drasticus* obtidas durante a realização deste trabalho foi estimada pelo método colorimétrico descrito por Bradford (1976). Este método é baseado na ligação entre as proteínas presente na amostra analisada e o corante *Coomassie Brilliant Blue G-250*, cujo aumento na absorbância a 595 nm, devido a esta interação, é monitorado. Alíquotas de 100 µL de amostra foram adicionadas a 2,5 mL do reagente de Bradford. As soluções foram levemente agitadas e após 10 minutos (nunca ultrapassando o máximo de 1 hora) tiveram suas absorbâncias lidas a 595 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata. Albumina sérica bovina (BSA) foi utilizada como padrão para a construção da curva de calibração.

4.5.3 Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sepharose Fast Flow

A fração HdLP-90 foi submetida a cromatografias de troca iônica em coluna de DEAE-Sepharose *Fast Flow*. Foram realizados dois protocolos de cromatografia, os quais se diferenciam apenas pelo tampão utilizado para o equilíbrio da coluna. Inicialmente, foi usado o tampão Tris-HCl 0,05 M pH 8,0, o qual foi posteriormente substituído pelo tampão Acetato de Sódio 0,05 M

pH 5,0. Quanto ao preparo de amostra, 100 mg de HdLP-90 foram dissolvidos em 10 mL do tampão de equilíbrio da matriz e centrifugados a $10.000 \times g$ a 4°C durante 20 minutos. O sobrenadante obtido foi aplicado na coluna. Para a eluição dos picos retido e não retidos foram utilizados a solução tampão de equilíbrio da coluna e o mesmo tampão, acrescido de NaCl 0,05 M e de NaCl 0,5 M, respectivamente. Estas concentrações salinas foram estabelecidas com a aplicação de gradientes salinos lineares em experimentos prévios. Frações de 2,0 mL foram coletadas em tubos de ensaio com auxílio do coletor automatizado Frac-920 (GE) acoplado a uma bomba, sob fluxo de 15 mL/h. A absorbância das frações coletadas foi medida a 280 nm por espectrofotometria. Os picos obtidos foram recuperados e dialisados exaustivamente em membranas com poros de exclusão de 14 kDa contra água destilada a 4°C por 72 horas e, em seguida, liofilizados.

O pico não retido foi nomeado como PI HdLP-90 Sepharose ff pH 5,0. O pico retido, por sua vez, foi chamado de PII HdLP-90 Sepharose ff pH 5,0.

4.5.4 Cromatografia de troca iônica em coluna Mono-Q acoplada ao sistema FPLC

O pico PII HdLP-90 Sepharose ff pH 5,0 foi submetido a cromatografia de troca iônica em coluna Mono-Q acoplada ao sistema de FPLC (*Fast Performance Liquid Chromatography*). A coluna foi previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 0,025 M pH 8,5. Quanto ao preparo de amostra, 1,0 mg de amostra foi dissolvido em 1,0 mL da mesma solução de equilíbrio da coluna e centrifugado a $12.000 \times g$, a 25°C , por 10 minutos. O sobrenadante foi filtrado em membranas de $0,22 \mu\text{m}$ (Millipore®) e, posteriormente, aplicado na coluna. As proteínas retidas na matriz foram eluídas utilizando gradiente linear de NaCl, durante 25 minutos, a um fluxo de 60 mL/h, e o conteúdo proteico determinado em 280 nm. As frações obtidas foram reunidas e utilizadas em análises subsequentes.

4.5.5 Espectrometria de massas

As frações resultantes das cromatografias de troca iônica em coluna Mono-Q acoplada ao sistema FPLC foram digeridas com tripsina modificada grau de sequenciamento. Os produtos da digestão trípica foram então analisados por espectrometria de massas (MS) através de um

sistema de UPLC-ESI-QUAD-TOF. Para tanto, os peptídeos oriunda da digestão por tripsina foram separados em coluna de fase reversa nanoACQUITY HSS T3 C18 (75 μm x 200 mm), aplicando um gradiente de acetonitrila de 7% a 40%, contendo 0,1% de ácido fórmico, sob o fluxo de 500 nL/minuto (PANIS *et al.*, 2013).

4.5.5.1 Pesquisa em banco de dados

Os dados obtidos pelo MS foram processados usando o software ProteinLynx Global Server v. 2.4 (Waters). Os dados foram submetidos à busca na plataforma MASCOT (Matrix Science Ltd. – www.matrixscience.com). As buscas foram realizadas utilizando o banco de dados do NCBI restringido para Viridiplantae (*Green Plants*) e, posteriormente, para todas as entradas. Carbamidometilação das cisteínas e oxidação das metioninas foram consideradas, respectivamente, como modificação fixa e como modificação variável. Na hidrólise por tripsina, foi considerada a possível perda de um sítio ativo de clivagem, e a tolerância das massas dos peptídeos e dos fragmentos foi de $\pm 0,05$ Da.

4.5.6 Eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida

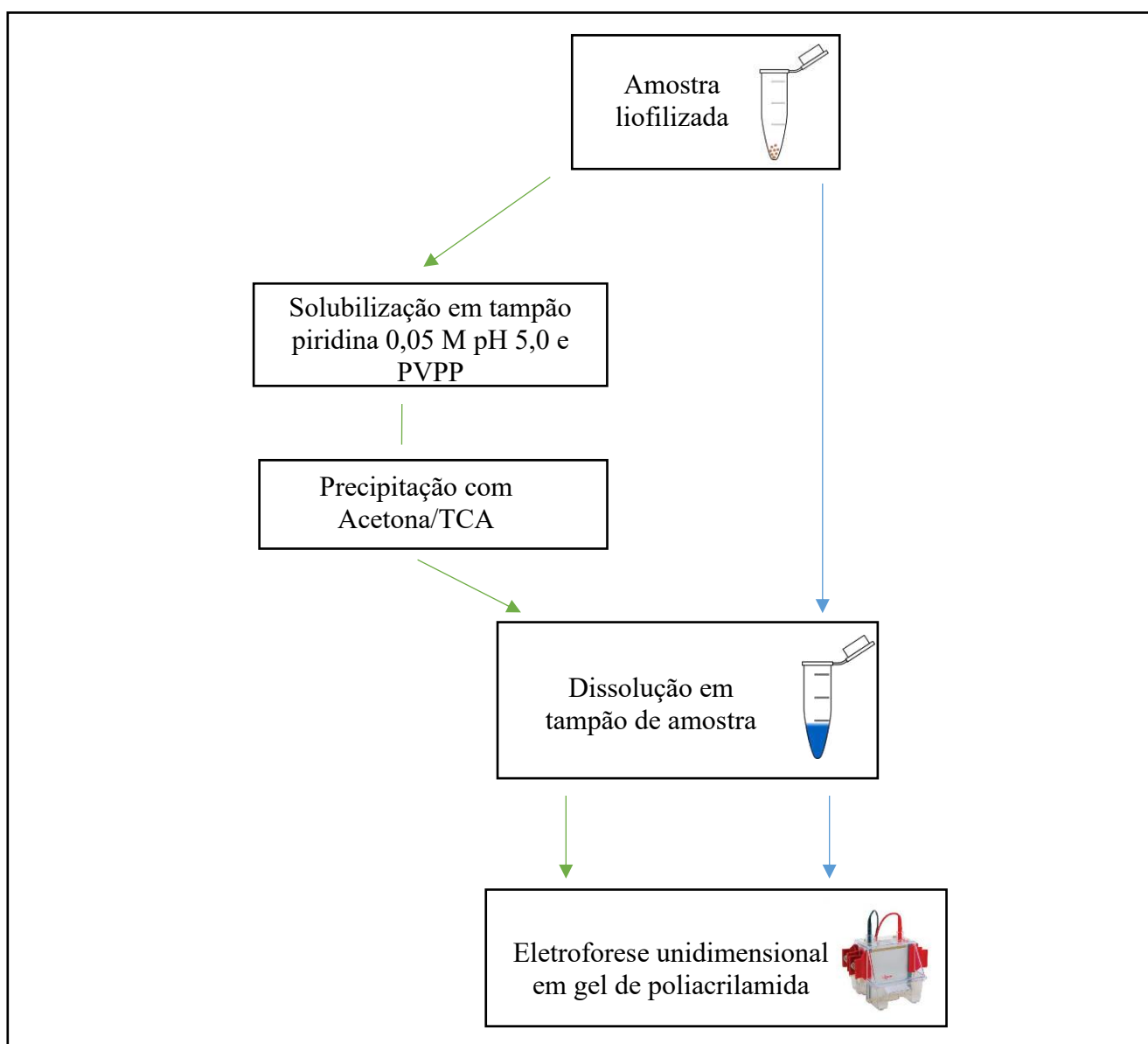
Eletroforeses unidimensionais em gel de poliacrilamida 12,5% foram realizadas com o intuito de determinar a massa molecular aparente das diferentes frações proteicas obtidas neste trabalho, além de avaliar os resultados das cromatografias. Para tanto, seguiu-se o método descrito por Laemmli (1970) com algumas adaptações para o uso de géis de separação em placa, em sistema vertical.

Cada gel de eletroforese é formado por um gel de empilhamento, o qual é montado sobre um gel de separação. O gel de empilhamento foi preparado de forma a conter 5% de poliacrilamida, em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 e SDS 1%. Os géis de separação foram feitos com tampão Tris-HCl 3 M, pH 8,9, SDS 1% e 12,5% de poliacrilamida.

A fração HdLP-90 e HdLP foi dissolvida em tampão Tris-HCl 0,0625 M pH 6,8 contendo 1% de SDS, 10% de glicerol sem agente redutor. Em seguida, as soluções foram submetidas à centrifugação a 5000 x g a 25 °C por 10 minutos. Aos sobrenadantes obtidos foram

adicionados traços de azul de bromofenol 0,02% e cristais de sacarose, para a marcação da frente de corrida eletroforética. Essas mesmas frações proteicas foram previamente submetidas à metodologia de solubilização de proteínas em tampão piridina-HCl pH 5,0 seguida de precipitação com acetona/metanol conforme o protocolo de amostras para 2D-E (tópico 3.5.7) antes de terem seu perfil proteico avaliado por SDS-PAGE (Figura 5).

Figura 5 - Esquema de preparo de amostras para aplicação em eletroforese unidimensional



Fonte: autoria própria (2017).

Os marcadores de massa molecular fosforilase B (97,0 kDa), albumina sérica bovina (66,0 kDa), ovoalbumina (45,0 kDa), anidrase carbônica (30,0 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e lactoalbumina (14,4 kDa) foram aplicados no primeiro poço de cada gel para a estimação da massa molecular aparente das bandas proteicas visualizadas nos géis.

As corridas eletroforéticas foram realizadas sob amperagem de 15,0 mA por gel, voltagem inicial de 120 V, a 25 °C. Foi usado como tampão de corrida Tris-HCl 0,025 M pH 8,3, contendo glicina 0,192 M e 0,1% de SDS. As corridas ocorreram em aproximadamente 2 horas. Ao final das corridas, os géis foram corados por 4 horas com uma solução de metanol, ácido acético e água destilada (4:1:5; v:v:v) contendo o corante *Coomassie Brillhante Blue R-250* e, posteriormente, revelados com a solução anterior, desta vez, desprovida de corante.

4.5.7 Eletroforese bidimensional

A massa molecular aparente e o ponto isoelétrico das proteínas presentes no PII HdLP-90 Sepharose ff pH 5,0 foram determinados através de eletroforese bidimensional (2D-E), conforme o método descrito por GÖRG *et al.* (2000).

Neste experimento, 10,0 mg da fração PII HdLP-90 Sepharose ff pH 5,0 foram adicionadas de 20,0 mg de PVPP e, em seguida, dissolvidos em 400,0 µL de tampão de extração piridina/HCl pH 5,0. A mistura resultante foi agitada por 2 horas a 4 °C e, posteriormente, centrifugada a 20.000 x g a 4 °C por 20 minutos. O volume obtido de sobrenadante foi precipitado com quatro volumes de acetona gelada contendo TCA 10% por 12 horas a -20 °C. Transcorrido esse período, o material foi centrifugado nas mesmas condições anteriores e o precipitado foi submetido a três etapas de lavagem com metanol gelado e duas lavagens com acetona gelada, intercaladas com etapas de centrifugações. Após a última centrifugação, o microtubo contendo o *pellet* de proteínas foi posto no dessecador para a secagem de qualquer resquício de metanol e acetona. O *pellet* foi dissolvido em no máximo 100,0 µL de uma solução composta por ureia 7,0 M e tirourea 2,0 M, compostos responsáveis pela solubilização das proteínas. A mistura resultante foi centrifugada novamente nas mesmas condições anteriores e o teor de proteínas solúveis do sobrenadante foi estimado pelo método de Bradford (1976). Determinou-se então o volume de

amostra necessário para aplicação de 200 µg de proteína por IPG *strip*. A solução de proteínas em ureia e tiourea foi então adicionada de tampão de reidratação (ureia 7 M, tiourea 2 M, DTT 1%, CHAPS 1%, IPG buffer 2% e azul de bromofenol 0,002%) de modo a não ultrapassar a proporção de 1:1. A faixa de pH (4-7) das IPG strips assim como o comprimento (11 cm) destas foram ajustados de acordo com os resultados obtidos.

A etapa de focalização isoeétrica foi realizada utilizando o equipamento Ettan™ IPGPhor IITM (GE-Healthcare) como indicado pelo fabricante. Após a focalização isoeétrica, as tiras de pH foram congeladas *overnight* a -20 °C. Posteriormente, as fitas foram descongeladas e deixadas sob agitação em solução de equilíbrio (Tris-HCl 0,050 M pH 7,0, glicerol 30%, ureia 6 M, SDS 2% e azul de bromofenol) contendo DTT 10,0 mg/mL por 20 minutos e, em seguida, por mais 20 minutos contendo iodoacetamida 25,0 mg/mL.

A segunda dimensão foi realizada em sistema vertical, em géis de poliacrilamida na concentração de 15% (14 x 14 cm), conforme o método descrito por Laemmli (1970), adaptado para o uso de géis de separação em placas. A corrida eletroforética foi realizada sob amperagem de 20 mA por gel, voltagem inicial de 200 V, a 25 °C. Os géis foram corados e revelados seguindo o procedimento para *Coomassie Brilliant Blue* coloidal (G-250).

Os géis foram digitalizados no *ImageScanner* (Amersham Biosciences) e as imagens foram obtidas pelo programa *LabScan* v. 5.0 (GE Healthcare) e analisadas no programa *ImageMaster 2D Platinum* 6.0 (GE Healthcare).

4.5.8 Ensaio enzimáticos

4.5.8.1 Detecção da atividade proteolítica total

Azocaseína foi utilizada como substrato não específico para investigar a atividade proteolítica total presente nas frações HdLP, HdLP-90 e PII HdLP-90 Sepharose ff pH 5,0. Para tanto, 5,0 mg de cada amostra foram dissolvidos em 1,0 mL de tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,0 (pH do látex) e centrifugados a 10.000 x g por 10 minutos a 10 °C. Alíquotas de 200 µL dos sobrenadantes foram utilizadas no ensaio, que foi realizado em triplicata. O volume 40,0 µL de uma solução de DTT 0,003 M permaneceu em contato com as alíquotas por 10 minutos antes de

200,0 μL de azocaseína 1% ser adicionado ao meio reacional. O volume de reação foi completado para 400,0 μL com o tampão usado para a dissolução das amostras, e a mistura final foi incubada a 37 °C por 1 hora. Em seguida, as reações foram interrompidas mediante adição de 400,0 μL de ácido tricloroacético (TCA) 12,0%. As amostras foram então centrifugadas nas mesmas condições anteriores e 400,0 μL de sobrenadante foram alcalinizados com 400,0 μL de NaOH 2,0 M. O grupo controle consistiu dos mesmos reagentes, porém neste, o substrato foi adicionado após a interrupção das reações. As leituras espectrofotométricas dos produtos da reação foram realizadas a 420 nm. Uma unidade de atividade (UA) foi definida como a quantidade de enzima capaz de aumentar a absorbância em 0,01 em uma hora (XAVIER-FILHO *et al.*, 1989).

4.5.8.2 Atividade quitinolítica

A atividade quitinolítica foi mensurada seguindo o método colorimétrico descrito por Oliveira, Gondim e Vasconcelos (2010). O princípio do ensaio consiste na liberação de N-acetil-D-glucosamina (NAG) a partir da ação hidrolítica das enzimas presentes na amostra sobre a quitina coloidal. Para tanto, 250 μL de quitina coloidal foram adicionados a 250 μL das frações HdLP, HdLP-90 e PII HdLP-90 Sepharose ff pH 5,0 (1 mg/mL) e incubados a 37 °C por 1 hora. Em seguida, a reação foi interrompida por fervura a 98 °C, por 5 minutos. Após o resfriamento em banho de gelo por 5 minutos, as amostras foram centrifugadas a 12000 x g por 20 minutos a 10 °C. A seguir, 10 μL da enzima glucoronidase foram adicionados a 300 μL de cada sobrenadante e incubados novamente, a 37 °C, por 1 hora. Esta segunda etapa também foi interrompida por meio de fervura a 98 °C seguido de resfriamento em gelo ambos por 5 minutos. Para determinação da quantidade de NAG liberada, 310 μL dos hidrolisados foram acrescidos de 190 μL de tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2 e 100 μL de tetraborato de potássio 0,6 M. A mistura reacional foi fervida a 98 °C, por 5 minutos. Após resfriamento, foram adicionados 1 mL da solução de *p*-dimetilaminobenzaldeído (DMAB) e incubado a 37 °C por 20 minutos. Decorrido este período, as leituras das absorbâncias foram imediatamente feitas no comprimento de onda de 585 nm. A atividade quitinolítica foi expressa em nanokatal (nkat) por μg de proteína. O ensaio foi realizado em triplicata. No controle negativo, a quitina coloidal foi adicionada somente após a reação ter sido interrompida por meio da primeira etapa da fervura.

4.5.9 Dot Blot

Os anticorpos policlonais contra osmotina e os contra proteases foram produzidos em coelho macho de 4 meses de idade da raça Nova Zelândia, obtido do departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará. Para tanto, seguiu-se a metodologia descrita por Kundu e colaboradores (2000).

Dois *Dot Blots* foram realizados com o objetivo de confirmar os resultados obtidos na análise por espectrometria de massas da fração PII HdLP-90 Sepharose ff pH 5,0, assim como nos ensaios proteolíticos realizados. Em um destes, investigou-se a presença de osmotinas nas frações proteicas de HdLP-90 semelhantes às aquelas presentes na fração proteica total do látex de *Calotropis procera* (CpLP). No outro, foi verificado a presença de proteases semelhantes às do pico PII de CpLP em coluna CM-Sepharose *Fast Flow* pH 5,0 (PII CpLP Sepharose ff pH 5,0).

Para tanto, alíquotas de 10 µL das amostras de cada amostra (1 mg/mL) foram adicionadas em tiras de membrana de nitrocelulose, que foram deixadas em temperatura ambiente por 10 minutos para secagem das gotas. As tiras foram então bloqueadas com leite desnatado 5% em tampão PBS (NaCl 0,13 M, KCl 0,0026 M, NaHPO₄ 0,0053 M, NH₂PO₄ 0,0017 M, pH 7,4) sob agitação por 2 horas a 25 °C. Decorrido este período, a solução bloqueadora contendo leite desnatado foi descartada, e as membranas de nitrocelulose foram lavadas três vezes com o tampão PBS. Posteriormente, os anticorpos primários (anti-CpOsm ou anti-protease de *C. procera*) foram adicionados a uma nova solução bloqueadora contendo leite desnatado 5%. Repetiu-se o mesmo período de agitação. Em seguida, as membranas foram novamente lavadas com tampão PBS e incubadas com o anticorpo secundário anti-igG de coelho produzido em cabra, na diluição de 1:5.000, conjugado com fosfatase alcalina por mais duas horas a 25 °C. Finalmente, após três lavagens sucessivas idênticas às anteriores, a reação de revelação foi desenvolvida utilizando o substrato 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate-nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT), que consistiu de Tris-HCl 0,02 M pH 9,0, NaCl 0,1 M, MgCl 0,0025 M, NBT 10 mg/mL e BCIP 25 mg/mL. As membranas foram mantidas em agitação com a solução do substrato até que fossem observados círculos roxos no local onde as alíquotas das amostras foram aplicadas (pelo menos no controle positivo). BSA 1 mg/mL foi utilizada como controle negativo para os dois ensaios. Utilizou-se PII CpLP Sepharose ff pH 5,0 (1 mg/mL) como controle positivo para o *Dot Blot* com

anticorpo anti-protease. No *Dot Blot* para detecção de osmotinas, por sua vez, utilizou-se CpLP (5 mg/mL) como controle positivo.

4.6 Ensaio biológicos

4.6.1 Ensaio antifúngico

4.6.1.1 Cultivo do fungo e obtenção da solução de esporos

O fungo *Colletotrichum gloeosporioides* foi cultivado em placas de Petri contendo 25 mL meio de cultura *Sabourad Dextrose Agar* (SDA) na concentração de 65,0 g/L de água destilada. O meio foi esterilizado por autoclavagem a 120 °C, 1,5 kgf por 20 minutos. As culturas foram mantidas em câmara de germinação do tipo B.O.D., a $27 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa de 70% e fotoperíodo de 12 horas. Os fungos foram renovados através da transferência de *pellets* de uma placa contendo uma “cultura origem” para outra placa contendo apenas meio de cultura SDA. Todos os procedimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar com o auxílio de chama para a manutenção da assepsia do ambiente.

A metodologia de obtenção das suspensões de esporos seguiu o protocolo descrito por Melo e colaboradores (1997), com algumas modificações. Esta consistiu na adição de 5 mL de água destilada estéril sobre fungos crescidos em placa de Petri há duas semanas. A liberação dos esporos foi feita por meio de movimentos suaves realizados na superfície do micélio, com o auxílio de uma alça de Drigalski previamente flambada. A suspensão é então recuperada com o auxílio de pipeta automática e filtrada em malhas finas de nylon estéreis, etapa que permite a retenção das hifas remanescentes. O filtrado resultante é denominado suspensão padrão de esporo e tem sua concentração ajustada para 2×10^5 esporos/mL com o auxílio de uma câmara de Neubauer em microscópio óptico. A suspensão resultante (2×10^5 esporos/mL) foi usada nos bioensaios com fungos.

4.6.1.2 Ensaio de inibição do crescimento micelial

Este ensaio foi realizado conforme a metodologia descrita por Broekaert *et al.* (1990), com algumas adaptações. Os ensaios foram realizados em placas estéreis de microtitulação de 96 poços de fundo chato. Em cada poço, foram adicionados 90,0 µL de meio YPD (*Yeast Peptone Dextrose*) e 10,0 µL da suspensão de esporos ($2,0 \times 10^5$ esporos/mL). As placas foram mantidas na ausência de luz por 16 horas e, transcorrido este período, foram adicionados 100,0 µL das amostras testadas. As amostras analisadas neste ensaio foram soluções de HdLP-90 (previamente filtradas em membranas de 0,22 µm) e sua fração PII HdLP-90 Sepharose ff pH 5,0 e HdLP em diferentes concentrações (5,0; 2,5; 1,2 e 0,6 mg/mL Acetato de Sódio 0,05 M pH 5,0). O crescimento micelial do fungo foi monitorado por meio da leitura da absorbância a 620 nm em leitor de ELISA (Biotrak II Plate Reader, Amersham Biosciences), em intervalos de 12 horas, até um total de 48 horas. O controle positivo para o crescimento micelial foi constituído do tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,0, mesma solução na qual as amostras analisadas foram dissolvidas, enquanto peróxido de hidrogênio 0,05 M foi utilizado como controle negativo para o crescimento micelial dos fungos. O ensaio foi realizado em triplicata.

4.6.2 Ensaio inseticida

Os ensaios inseticidas consistiram da avaliação do desenvolvimento das larvas e de insetos adultos de *Callosobruchus maculatus* mantidos em dieta artificial enriquecida com a fração HdLP-90. Esta dieta foi constituída de um sistema de sementes artificiais, no qual cápsulas de gelatina foram preenchidas com farinha de feijão de corda, adicionada ou não da fração proteica em estudo. A metodologia seguida foi descrita por Macedo e colaboradores (1993), com algumas modificações.

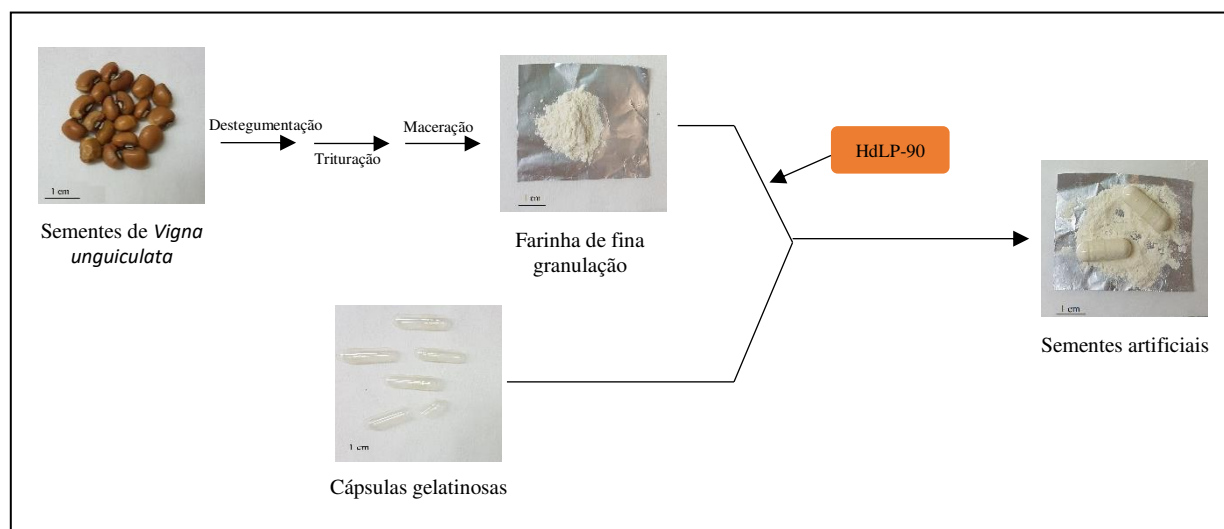
4.6.2.1 Preparo da farinha de feijão e das sementes artificiais

Sementes de *Vigna unguiculata* susceptíveis ao ataque de insetos foram utilizadas para a preparação da farinha de feijão. Para tanto, as sementes foram destegumentadas e trituradas em moinho elétrico. A farinha resultante foi então macerada em gral e pistilo para a obtenção de uma farinha de fina granulação. Diferentes concentrações da fração testada foram cuidadosa e

exaustivamente misturadas com a farinha do feijão com o auxílio de gral e pistilo para a obtenção de uma mistura homogênea (Figura 6).

As sementes artificiais foram preparadas em uma encapsuladora manual utilizando cápsulas gelatinosas nº 1 (capacidade de 0,5 mL). Uma vez prontas, as sementes foram colocadas em contato com a farinha de feijão (desprovida da fração proteica) por 24 horas antes de serem submetidas à ovoposição. Esta etapa permite que as sementes artificiais adquiram o odor característico do feijão, o que facilita a aceitação dessas pelos insetos. Cápsulas contendo apenas a farinha de feijão foram utilizadas como controle negativo.

Figura 6 – Esquema do preparo da farinha de feijão e das sementes artificiais



Fonte: Autoria própria (2017).

4.6.2.2 Avaliação do desenvolvimento larval de *Callosobruchus maculatus*

Neste ensaio, avaliou-se o efeito de quatro concentrações de HdLP-90 (0,1%, 0,5%, 1,0% e 1,5%) sobre o desenvolvimento larval de *Callosobruchus maculatus*. Cinco tratamentos foram conduzidos, os quais foram as quatro concentrações de HdLP-90 já mencionadas e o controle negativo (cápsulas contendo apenas farinha de feijão). Cada grupo experimental foi realizado em quadruplicada e consistiu de cinco sementes artificiais (totalizando vinte sementes por tratamento) acondicionadas em potes plásticos com tampa perfurada. Insetos com um dia de idade não sexados

foram introduzidos em cada pote em quantidade aleatória, porém, suficiente para atingir o número mínimo de cinco ovos por semente em um período de 24 horas. Decorrido este período, os insetos foram descartados e o número de ovos ajustado para cinco por semente com o auxílio de uma navalha. Após 22 dias, as sementes foram abertas para avaliação da sobrevivência e peso larval. A porcentagem de sobrevivência das larvas foi determinada por meio da correlação entre o número de larvas vivas com o total de ovos eclodidos.

4.6.2.3 Avaliação do desenvolvimento dos insetos adultos

Este ensaio foi realizado concomitantemente ao experimento anteriormente descrito. As mesmas condições experimentais foram seguidas, com exceção da abertura das sementes após 22 dias da ovoposição. Neste segundo ensaio, o completo desenvolvimento larval até a emergência dos adultos foi permitido. Após a primeira emergência, a eclosão dos insetos foi acompanhada durante 17 dias, nos quais o número de insetos emergentes assim como o dia da eclosão foram registrados. Desta forma, dois parâmetros puderam ser avaliados: o tempo médio de desenvolvimento e o percentual de emergência de adultos.

4.6.2.4 Análise estatística

As diferenças entre os grupos no experimento inseticida foram obtidas a partir de análise de variância (ANOVA, $n = 5$) seguida do teste de Tukey para múltiplas comparações, de acordo com a necessidade onde valores de p inferiores a 0,05 foram considerados significantes. Para tanto, utilizou-se o programa *GraphPad Prism Software* versão 5.0 (San Diego, CA).

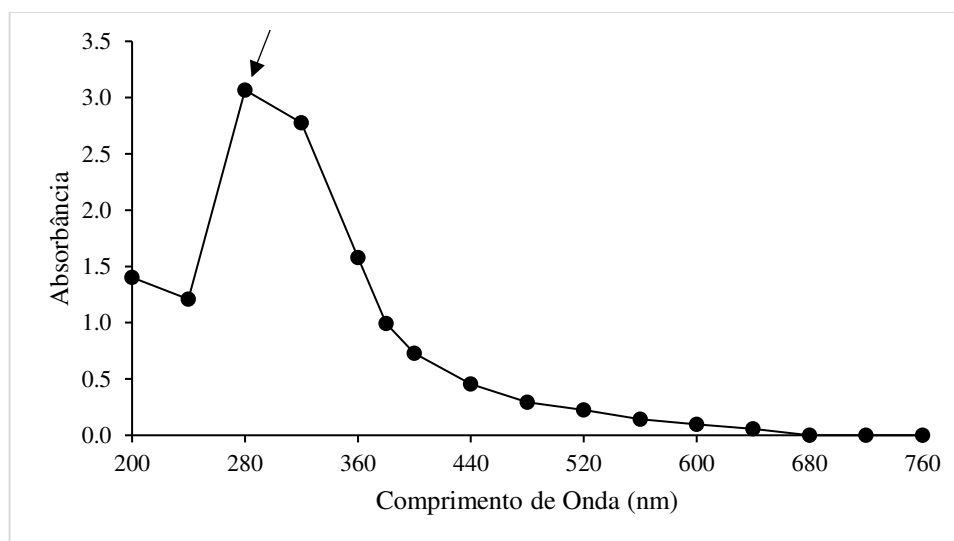
5. RESULTADOS

5.1. Caracterização Bioquímica e Proteômica Parcial

O fracionamento do látex de *Himatanthus drasticus*, o qual foi realizado por meio de etapas de centrifugação, precipitação proteica com 90% de saturação de sulfato de amônio e diálises, resultou na obtenção de uma fração constituída principalmente por borracha e outra composta por proteínas solúveis. Esta foi então denominada HdLP-90 (*Himatanthus drasticus latex proteins* precipitadas com 90% de saturação de sulfato de amônio).

A presença de proteínas na fração HdLP-90 foi primeiramente investigada por meio da realização de um espectro de absorção na faixa do comprimento de onda de 200 nm a 760 nm. A presença de um pico de absorbância no comprimento de onda de 280 nm é característico de amostras de natureza proteica e, logo, sugere a presença de proteínas nessa fração (Figura 7).

Figura 7 – Espectro de absorção da fração HdLP-90



Fonte: autoria própria (2017). As absorbâncias foram lidas a partir de uma solução de 10 mg HdLP-90/mL NaCl 0,15 M em espectrofotômetro, aumentando o comprimento de onda na ordem de 40 nm.

Posteriormente, avaliou-se a proporção de ambas as frações no látex. Como pode ser observado na Tabela 4, a fração proteica representa aproximadamente 5,6% do látex. A fração borracha, a qual também possui outros metabólitos secundários insolúveis além de polímeros de isopreno, corresponde a aproximadamente 94,4% e, portanto, constitui-se da fração majoritária do leite de janaguba. O teor de proteínas solúveis da fração HdLP-90 foi estimado pelo método de Bradford e calculado como sendo $0,66 \pm 0,01$ mg/mL.

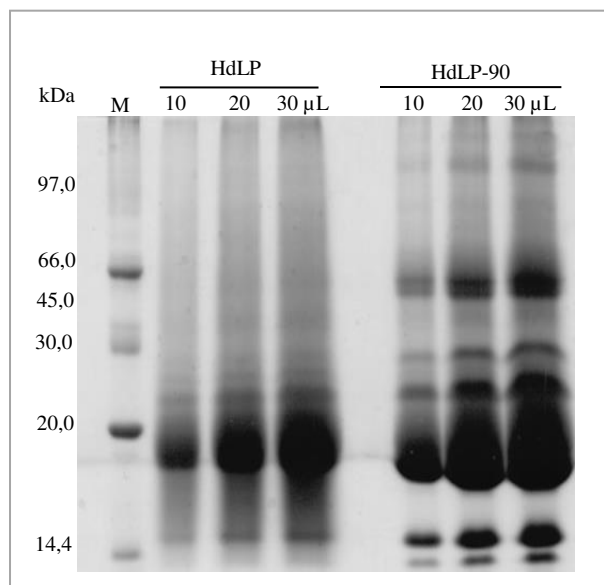
Tabela 4 – Rendimento do fracionamento do látex de *H. drasticus*

Alíquotas ^a	Fração borracha ^b		Fração proteica (HdLP-90) ^c		Total de massa proteica (mg/mL)	Teor de proteínas solúveis ^d (mg/mL)
	mg	%	mg	%		
1	478.300	94.930	25.500	5.060	0.170	0.670
2	529.800	94.810	29.000	5.180	0.190	0.660
3	490.500	93.320	32.100	6.670	0.210	0.651
Média	499.533	94.353	28.867	5.637	0.190	0.660
Desvio Padrão	±26.912	±0.897	±3.302	±0.897	±0.020	±0.010

Fonte: autoria própria (2017). ^aAlíquotas de 150 mL de látex; ^bPrecipitado resultante da primeira etapa de centrifugação após coleta do látex: constituído de borracha e outros compostos insolúveis; ^cFração proteica HdLP-90 considerada como livre de borracha e solúvel em água; ^dTeor de proteínas solúveis estimado pelo método de Bradford (1976).

O perfil proteico de HdLP-90 e HdLP foi analisado por eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida 12,5% na presença de SDS 1% (agente desnaturante) (Figura 8). A fração HdLP-90 apresentou um perfil de proteínas mais diversificado que a fração HdLP, cuja metodologia de obtenção não inclui a etapa de precipitação com 90% de sulfato de amônio. HdLP-90 apresentou bandas proteicas na faixa de 97 kDa a 14,4 kDa. Dentro deste intervalo, há pelo menos cinco bandas proteicas no perfil de HdLP-90 que estão ausentes no perfil de HdLP. Desta forma, concluiu-se que a metodologia utilizada neste trabalho proporcionou a obtenção de uma fração do látex de *H. drasticus* mais rica em termos de conteúdo proteico quando comparada a metodologia utilizada por Matos (2010) na obtenção de HdLP.

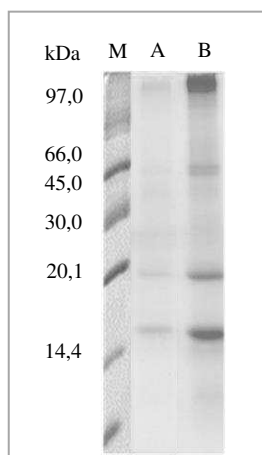
Figura 8 - Perfis proteicos de HdLP e de HdLP-90



Fonte: autoria própria (2017). SDS-PAGE 12,5%. As quantidades acima das linhas indicam o volume aplicado em cada poço a partir de soluções de 10 mg/mL. Marcador de massa molecular (M): fosforilase B (97,0 kDa); albumina sérica bovina (66,0 kDa); ovoalbumina (45,0 kDa); anidrase carbônica (30,0 kDa); inibidor de tripsina (20,1 kDa) e lactoalbumina (14,4 kDa).

A Figura 9 apresenta o perfil proteico de ambas as amostras em SDS-PAGE quando estas são submetidas ao protocolo de preparo de amostra para eletroforese bidimensional. Foram obtidos perfis mais limpos e similares para duas as frações, porém menos diversificados quando comparado ao resultado anterior (Figura 8). Pelo menos duas bandas presentes no perfil de proteínas de HdLP e HdLP-90 estão ausentes na Figura 9, como as bandas de massa molecular aparente entre 20,1 e 14,4 kDa. Apesar de a massa inicial de material liofilizado das duas frações ter sido a mesma, assim como os volumes aplicados nos poços do gel, verificou-se que a fração HdLP-90 apresentou bandas proteicas mais escuras e, portanto, mais concentradas.

Figura 9 - SDS-PAGE 12,5% das frações HdLP, HdLP-90

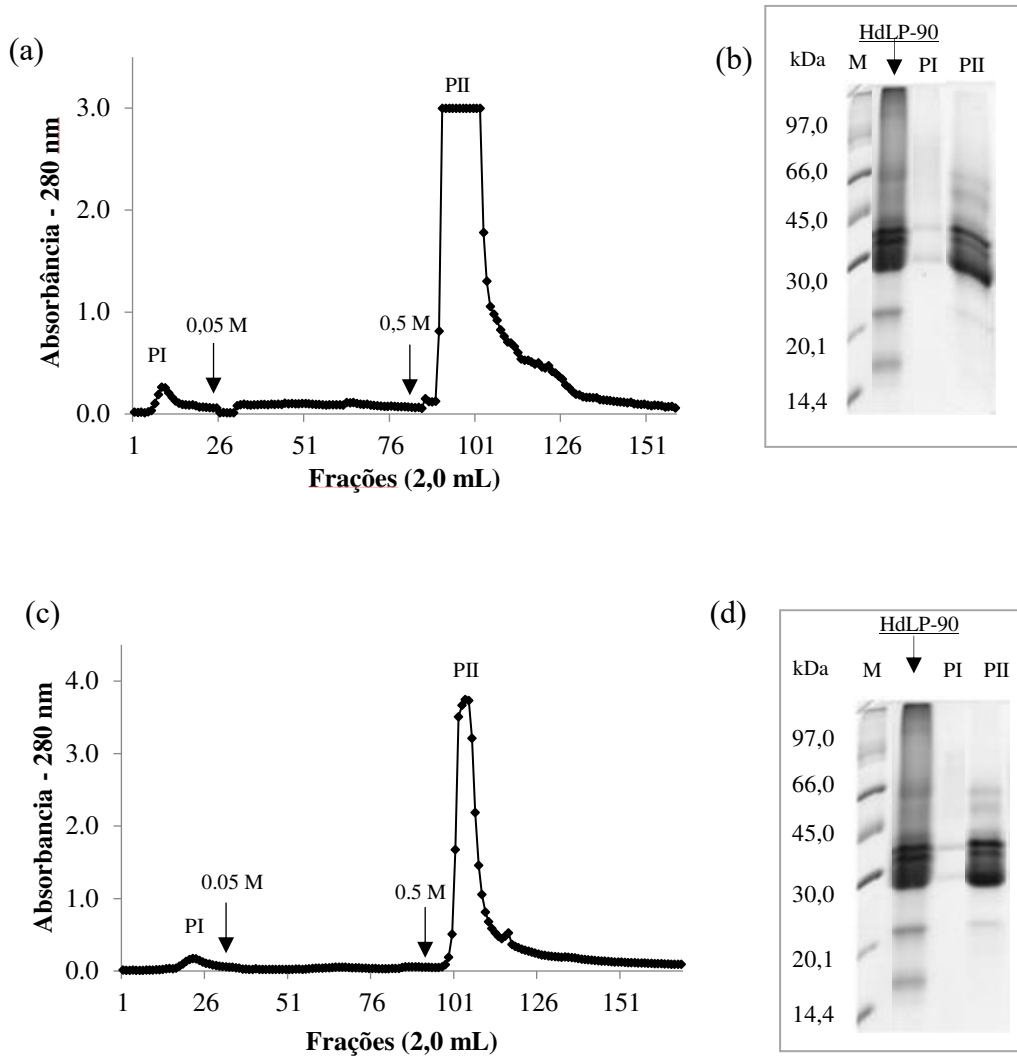


Fonte: autoria própria (2017). As amostras foram preparadas segundo o protocolo de extração de proteínas com tampão pirimidina/HCl pH 5,0 e precipitação de proteica com acetona, TCA e metanol para eletroforese bidimensional. Iniciou-se o processo com 10 mg de cada fração. Linha M: Marcadores de massa molecular. Linha A: HdLP; Linha B: HdLP-90. Foram aplicados 30 µL de amostra em cada poço.

Os resultados apresentados na Figura 9 sugerem que a fração HdLP-90 é relativamente concentrada e possui uma grande diversidade de proteínas, tendo sido, portanto, o foco de estudo dos demais experimentos realizados neste trabalho.

Baseando-se em experimentos prévios (não mostrados), verificou-se que HdLP-90 interage com matrizes cromatográficas de carga positiva (trocadora de ânions). Logo, esta fração apresenta majoritariamente proteínas de carga negativa. Desta forma, foram realizadas cromatografias de troca iônica em coluna de DEAE-Sepharose *Fast Flow*. Inicialmente, trabalhou-se com o tampão de equilíbrio Tris-HCl 0,05 M pH 8,0. Para eluição das proteínas retidas pela matriz, esta solução foi acrescida de NaCl 0,05 M e NaCl 0,5 M. O perfil cromatográfico obtido, assim como o SDS-PAGE das subfrações resultantes estão apresentados na Figura 10 - a e 9 - b, respectivamente. Posteriormente, esta cromatografia foi realizada utilizando-se o tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,0 como solução de equilíbrio da coluna. As concentrações salinas foram mantidas. Os resultados obtidos estão mostrados nos itens (c) e (d) da Figura 10.

Figura 10 - Perfil cromatográfico e eletroforético de HdLP-90 em coluna de DEAE-Sepharose *Fast Flow*



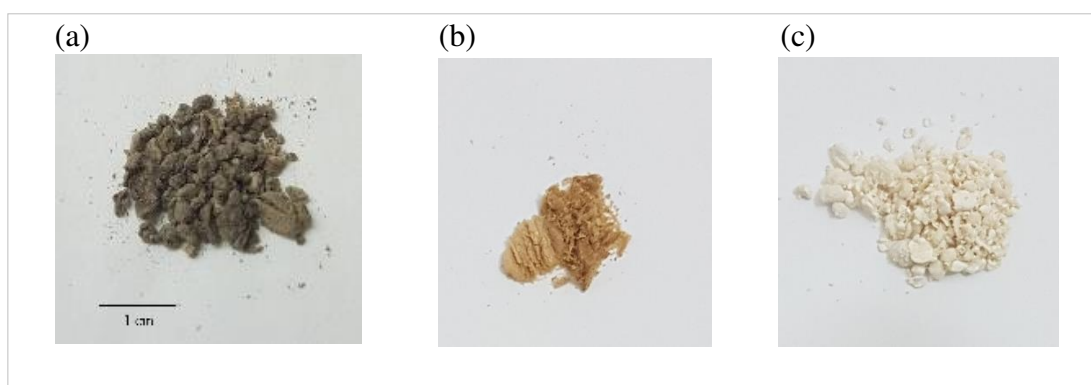
Fonte: autoria própria (2017). Foram aplicados 100 mg de HdLP-90 dissolvidos em 10 mL de tampão Tris-HCl 0,05 M pH 8,0 (a) ou Acetato de sódio 0,05 M pH 5,0 (c) (solução de equilíbrio da coluna). Foi estabelecido um fluxo de 60 mL/h e obtidas frações de 2 mL. Em (a) e (c), as setas indicam quando a solução tampão acrescida de NaCl 0,05 M e de NaCl 0,5 M foi aplicada, respectivamente. (b) e (d) representam os perfis eletroforéticos de PI e PII de HdLP-90 quando a coluna foi equilibrada com tampão Tris-HCl 0,05 M pH 8,0 (b) ou tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,0 (d).

Em ambos os cromatogramas obtidos (Figura 10 – A e C), observa-se a presença de dois picos, um não retido (PI HdLP-90 Sepharose ff pH 5,0), eluído com o tampão de equilíbrio da coluna, e um pico retido (PII HdLP-90 Sepharose ff pH 5,0), eluído com a solução de equilíbrio acrescida de NaCl 0,5 M. Estas subfrações foram reunidas, dialisadas e liofilizadas separadamente e, posteriormente, analisadas por SDS-PAGE 12,5%.

Os perfis proteicos dos picos PII de HdLP-90, oriundos das cromatografias em pH 5,0 e em pH 8,0, não apresentaram distinção entre si, além serem similares ao perfil de HdLP-90 (Figura 10 B e D). Também não foram observadas diferenças entre os picos não retidos. Esse resultado sugere que as proteínas da fração HdLP-90 não foram separadas de modo eficiente por nenhum dos processos cromatográficos testados.

Entretanto, a cromatografia realizada em pH 5,0 foi mais eficaz na remoção de pigmentos presentes na fração proteica total do látex de *H. drasticus*, que possui uma coloração marrom bem característica. Como pode ser observado na Figura 11, o material liofilizado de PII HdLP-90 Sepharose ff pH 5,0 mostrou-se desprovido dessa cor característica. Desta forma, essa subfração foi posteriormente aplicada em matrizes cromatográficas mais refinadas em detrimento do PII em pH 8,0 para evitar danificar as colunas devido a presença de pigmentos.

Figura 11 – Amostras proteicas liofilizadas do látex de *Himatanthus drasticus*

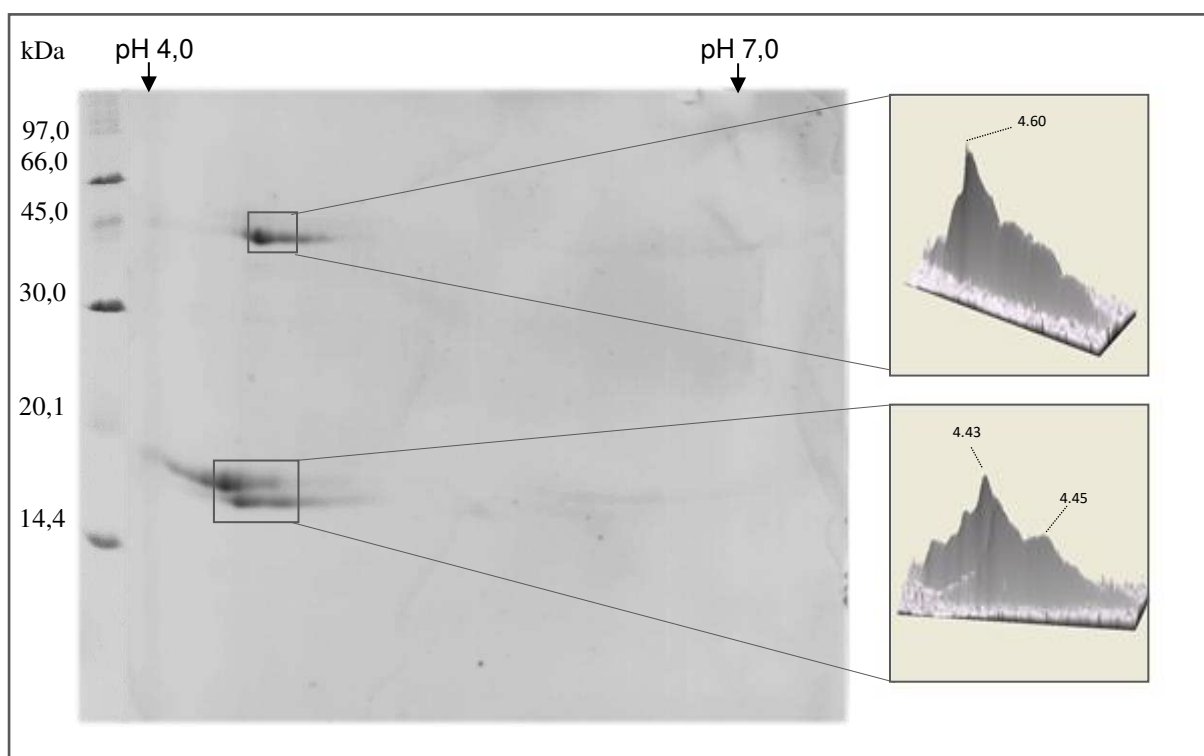


Fonte: autoria própria (2017). (a) HdLP-90; (b) PII HdLP-90 Sepharose ff pH 8,0; (c) PII HdLP-90 Sepharose ff pH 5,0.

O pico PII HdLP-90 Sepharose ff pH 5,0 teve seu perfil proteico analisado por eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamina 15% (Figura 12). Foram focalizadas proteínas principalmente na faixa de pH de 4,0 a 4,6. Portanto, o ponto isoelétrico destas macromoléculas está dentro deste intervalo de pH ácido. Logo, em pH 5,0 e em pH 8,0, a carga

líquida das proteínas é negativa, o que justifica a sua interação com os ligantes dietilaminoetil da matriz de DEAE-Sepharose *Fast Flow* nestes pHs. Com relação ao peso molecular aparente das bandas, há pelo menos três *spots* no gel: um com massa molecular de aproximadamente 45 kDa e outros dois entre 20,1 e 14,4 kDa.

Figura 12 - Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (15%) do PII HdLP-90 Sepharose ff pH 5,0



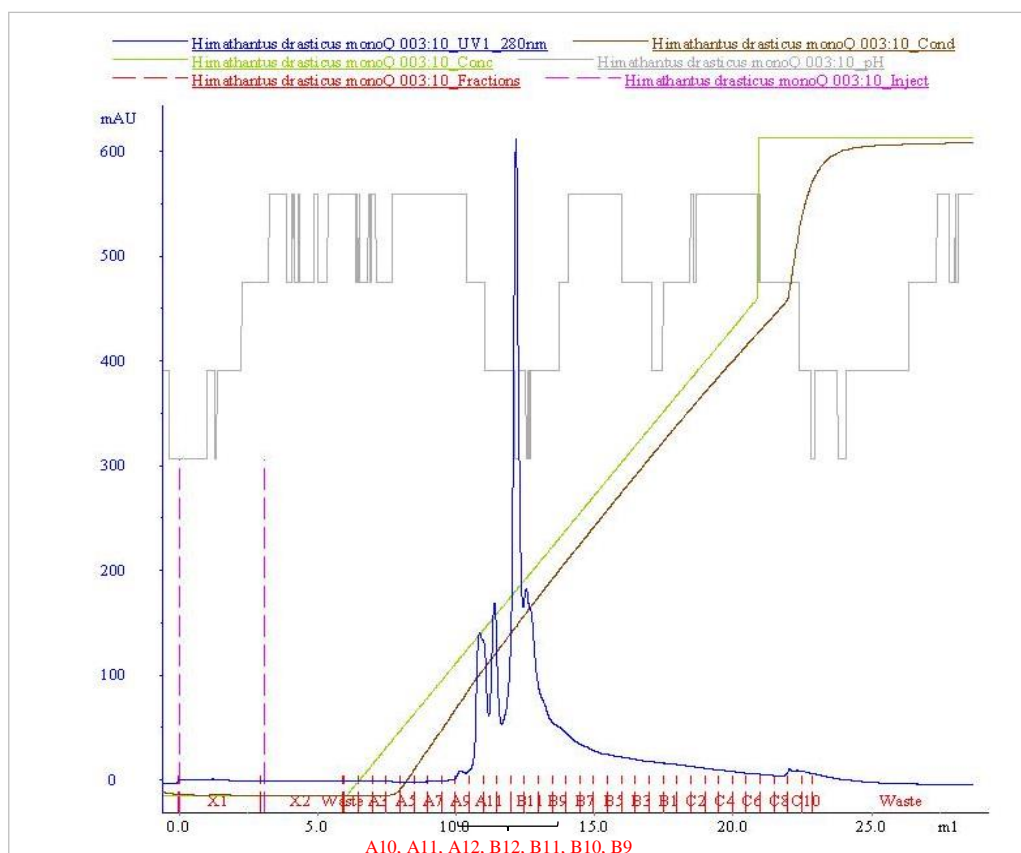
Fonte: autoria própria (2017). Foram aplicados 200,0 μg de proteínas. Fita de 11 cm com gradiente de pH imobilizado (4-7). Os valores acima das imagens tridimensionais dos *spots* referem-se ao pI das proteínas. Gel revelado com *coomassie* coloidal (G-250).

Esta mesma fração foi posteriormente submetida à cromatografia de troca iônica em coluna MonoQ acoplada ao sistema AKTA. Esta coluna foi utilizada porque se trata de uma matriz catiônica forte e, portanto, trocadora de ânions. Esta propriedade permite a interação da matriz positiva com as proteínas presentes no PII, já que possuem carga líquida negativa em pH 8,5, valor de pH no qual que a cromatografia foi realizada.

Todavia, como pode ser observado na Figura 13, PII HdLP-90 Sepharose ff pH 5,0 foi fracionado em pelo menos três picos não bem definidos. Portanto, novamente, a separação

das proteínas por cromatografia não foi eficiente. As frações coletadas, indicadas no gráfico, foram digeridas com tripsina e os produtos dessa digestão foram analisados por espectrometria de massas (ESI-QUAD-TOF). Os dados gerados foram então submetidos ao programa de busca MASCOT (Matrix Science Ltd. – www.matrixscience.com), utilizando o NCBI como banco de dados, restringido para Viridiplantae (*Green Plants*). O resultado desta análise está contido na Tabela 5, onde se observa que todas as frações analisadas foram identificadas como osmotina ou proteína do tipo taumatina. De fato, o perfil proteico, em gel de eletroforese, dessa fração cromatográfica contém uma banda proteica com peso molecular aparente em torno de 20,1 kDa (Figura 10 – c), que é próximo a massa molecular de 22 kDa da osmotina do látex de *Calotropis procera*. Todavia, as demais bandas visualizadas no gel, cujas massas moleculares não estão dentro do intervalo de 20 a 30 kDa, característico das osmotinas, não foram identificadas por esta análise.

Figura 13 – Cromatograma do PII HdLP-90 Sepharose ff pH 5,0 em coluna MonoQ acoplada ao sistema AKTA-FPLC



Fonte: autoria própria (2017). Foi aplicado 1 mg de amostra dissolvido em 1 mL de Tris HCl 0.025 M pH 8.5, tampão usado como solução de equilíbrio da coluna MonoQ. As frações foram eluídas mediante aplicação de gradiente salino de NaCl (linha verde). As frações A10, A11, A12, B12, B11, B10 e B9 foram coletadas para posterior análise por espectrometria de massas.

Tabela 5 - Sequências de aminoácidos determinadas por ESI-Q-TOF a partir das sete subfrações do PII HdLP-90 Sepharose ff pH 5,0 submetido a cromatografia em coluna MonoQ.

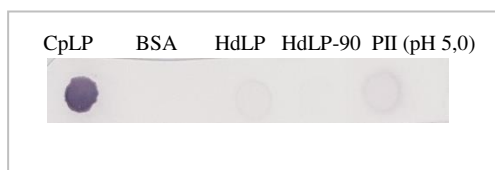
Fração	Teórico		Escore proteico	Sequência dos peptídeos identificados	ID (NCBI)	Descrição e origem das proteínas identificadas
	MM (kDa)	pI				
A10	27.2	5.35	227	DRCPDAYSYPK CPDAYSYPKDDQTSTFTCPGGTNYR	gi 590727876	Proteína do tipo taumatina [<i>Theobroma cacao</i>]
	25.2	8.15	115	TNCNFDGAGR	gi 14290151	Proteína do tipo taumatina [<i>Sambucus nigra</i>]
A11	27.2	5.35	230	DRCPDAYSYPK CPDAYSYPKDDQTSTFTCPGGTNYR	gi 590727876	Taumatina [<i>Theobroma cacao</i>]
	25.1	8.58	106	TNCNFDGAGR	gi 6470277	Osmotina [<i>Fragaria x ananassa</i>]
A12	27.2	5.35	212	DRCPDAYSYPK CPDAYSYPKDDQTSTFTCPGGTNYR	gi 590727876	Proteína do tipo taumatina [<i>Theobroma cacao</i>]
	25.1	8.58	102	TNCNFDGAGR	gi 6470277	Osmotina [<i>Fragaria x ananassa</i>]
B9	22.9	8.49	92	CPDAYSYPK DDQTSTFTCPGGTNYR	gi 88193285	Osmotina [<i>Theobroma cacao</i>]
	25.1	8.58	85	TNCNFDGAGR	gi 6470277	Osmotina [<i>Fragaria x ananassa</i>]
B10	22.9	8.49	155	CPDAYSYPKDDQTSTFTCPGGTNYR	gi 88193285	Osmotina [<i>Theobroma cacao</i>]
	25.1	8.58	107	TNCNFDGAGR	gi 6470277	Osmotina [<i>Fragaria x ananassa</i>]
B11	27.2	5.35	185	DRCPDAYSYPK CPDAYSYPKDDQTSTFTCPGGTNYR	gi 590727876	Taumatina [<i>Theobroma cacao</i>]

Fonte: autoria própria (2017).

Dot Blot utilizando anticorpos primários anti-osmotina do látex de *Calotropis procera* (anti-CpOsm) e anticorpos secundários anti-IgG produzidos em coelho foi realizado para apoiar o resultado apresentado na tabela 5. Os controles positivos e negativos consistiram respectivamente de CpLP e BSA. Como podem ser observados na Figura 14, os anticorpos anti-CpOsm reconheceram a osmotina presente no látex de *C. procera*. Houve também reconhecimento das proteínas presentes no PII HdLP-90 Sepharose ff pH 5,0 por parte do anticorpo primário utilizado. Este resultado, portanto, corrobora com o apresentado na tabela 5 e, juntos, fortemente evidenciam a presença de osmotinas no pico retido oriundo da cromatográfica de troca iônica em coluna de DEAE-Sepharose *Fast Flow* em pH 5,0. Entretanto, não houve reação cruzada entre antiCp-Osm e as proteínas presentes em HdLP-90.

O fraco reconhecimento das osmotinas de PII HdLP-90 Sepharose ff pH 5,0 pelos anticorpos anti-CpOsm pode ser devido a diferenças existentes, como o massa molecular, entre as osmotinas presentes no látices dessas duas espécies de plantas. Como pode ser visualizado na Figura 12, o perfil proteico de PII HdLP-90 Sepharose ff pH 5,0 não possui uma banda com massa molecular aparente de 22 kDa, que o valor relatado na literatura para a osmotina do látex de *C. procera*.

Figura 14 – Reconhecimento de osmotinas no látex de *Himantanthus drasticus* semelhantes a osmotina do látex de *Calotropis procera* por meio de *Dot Blot*



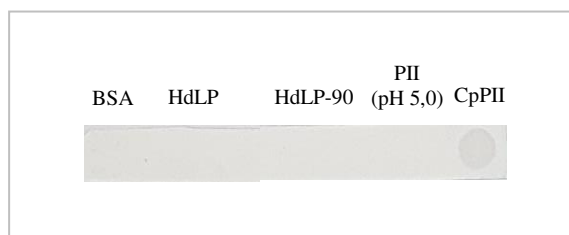
Fonte: Autoria própria (2017). Abreviou-se o nome da fração PII HdLP-90 Sepharose ff pH 5,0 para PII (pH 5,0). Controle positivo: CpLP; Controle negativo: BSA. Foram aplicados 10 μ L de cada amostra. Anticorpos anti-CpOsm policlonais foram utilizados como anticorpo primário, enquanto o anticorpo secundário consistiu de anti-IgG marcado com fosfatase alcalina.

5.1.1 Caracterização Enzimática Parcial

A presença de proteases nas frações HdLP, HdLP-90 e PII HdLP-90 Sepharose ff pH 5,0 foi investigada por meio da realização de ensaios proteolíticos colorimétricos utilizando Azocaseína como substrato inespecífico. Verificou-se que nenhuma das frações foi capaz de degradar o substrato testado.

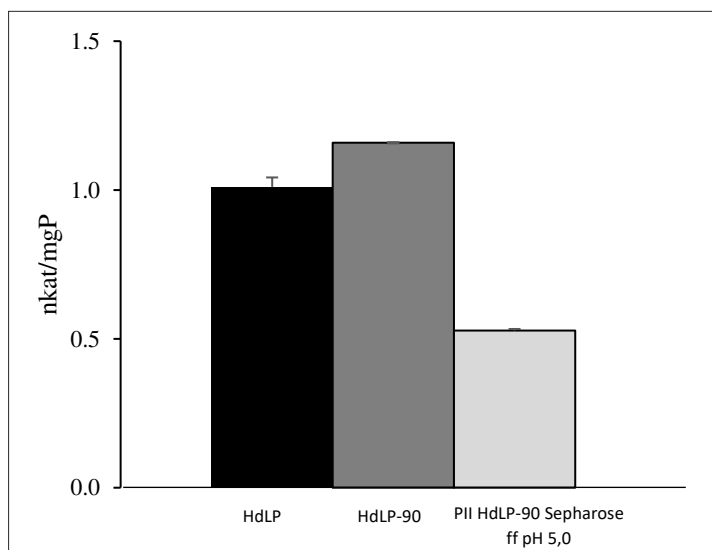
Para confirmar este resultado, foi realizado ainda um *Dot Blot* utilizando anticorpos primários anti-proteases do látex de *Calotropis procera* produzidos em coelho e anticorpos secundários anti-IgG de coelhos. Neste ensaio, CpPII (PII de *Calotropis procera* em CM-Sepharose *Fast Flow*) foi utilizado como controle positivo, enquanto BSA foi usada como controle negativo (Figura 15). Como mostra a Figura 15, nenhuma das frações proteicas do látex de *H. drasticus* reagiu com os anticorpos anti-proteases. Este resultado sugere que o látex de *H. drasticus* não possui proteases semelhantes a do látex de *C. procera*.

Figura 15 – Reconhecimento de proteases no látex de *Himantanthus drasticus* semelhantes a proteases de CpPII por meio de *Dot Blot*



Fonte: Autoria própria (2017). Abreviou-se o nome da fração PII HdLP-90 Sepharose ff pH 5,0 para PII (pH 5,0). Controle positivo: CpPII; Controle negativo: BSA. Foram aplicados 10 μ L de cada amostra. Anticorpos anti-protease de *Calotropis procera* foram utilizados como anticorpo primário, enquanto o anticorpo secundário consistiu de anti-IgG marcado com fosfatase alcalina.

Investigou-se a presença de quitinases nessas mesmas frações. Para tanto, realizou-se um ensaio fotolorimétrico para detecção de atividade quitinolítica utilizando quitina coloidal como substrato. HdLP e HdLP-90 apresentaram elevada atividade quitinásica. Entretanto, a atividade quitinásica de PII HdLP-90 Sepharose ff pH 5,0 foi mensurada como sendo aproximadamente metade do valor registrado para HdLP-90, que é sua fração de origem (Figura 16).

Figura 16 – Atividade quitinolítica de frações proteicas do látex de *Himatanthus drasticus*

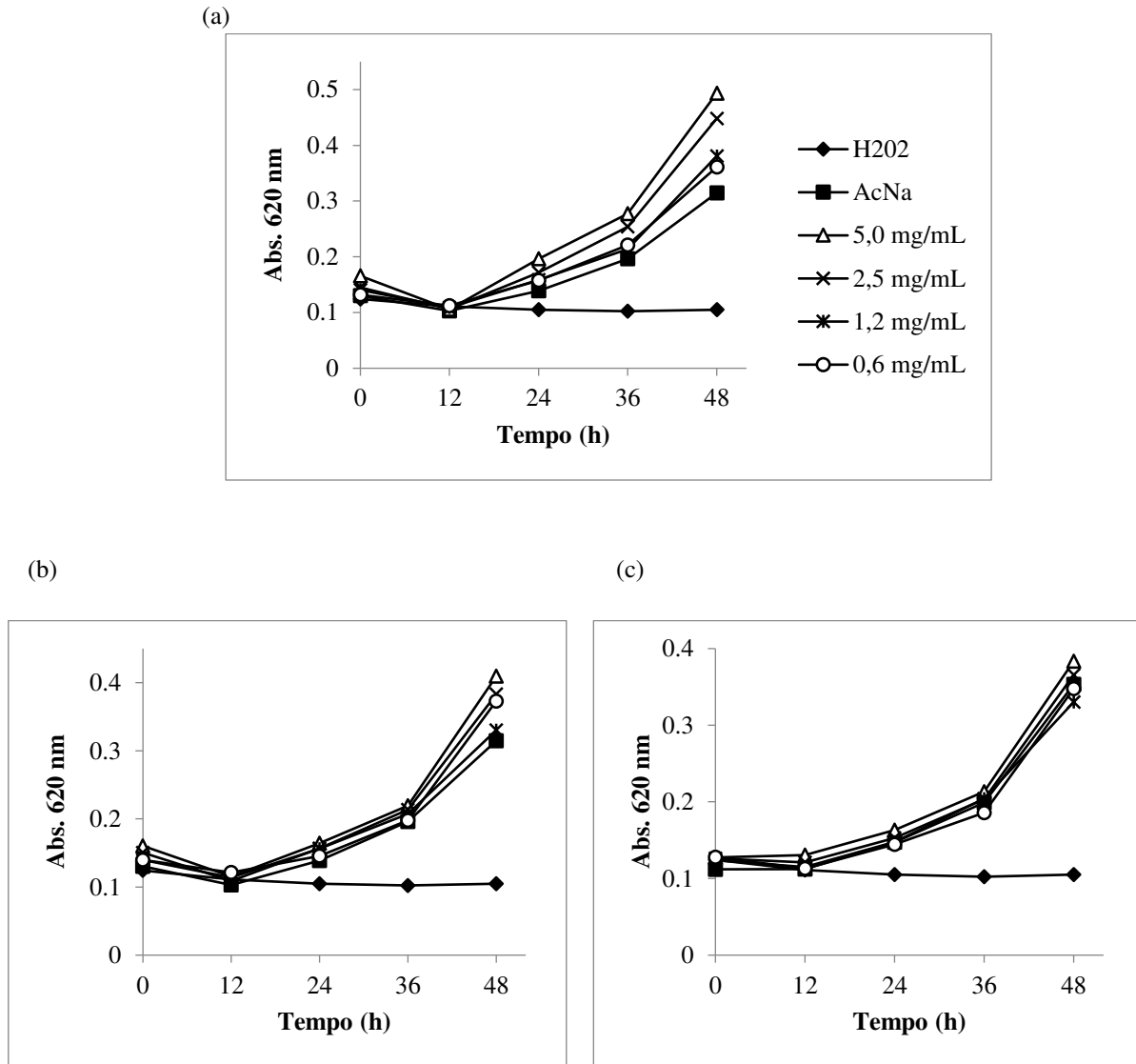
Fonte: autoria própria (2017). Uma alíquota de 250 μ L das amostras testadas a partir de uma solução de 1 mg/mL foi utilizada no ensaio. A atividade foi expressa em nanokatal (nkat) por miligrama de massa. As colunas correspondem às médias de cada triplicata.

5.2 Ensaio Biológicos

5.2.1 Atividade antifúngica

O potencial antifúngico das frações proteicas provenientes do leite de janaguba foi averiguado contra o crescimento micelial do fungo fitopatogênico *Colletotrichum gloeosporioides*. Para tanto, registrou-se a absorbância do meio de cultivo contendo os esporos do fungo acrescido ou não das amostras testadas no comprimento de onda de 620 nm. Os gráficos da Figura 17 mostram que não houve inibição do crescimento micelial. Observou-se que a maior concentração de amostra testada (5,0 mg/mL) para todas as frações proteicas foi aquela na qual houve maior crescimento do micélio. Além disto, o crescimento micelial na menor concentração de amostra testada (0,6 mg/mL) foi ainda superior ao observado para o controle positivo (tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,0). Portanto, as amostras avaliadas parecem ter exercido efeito probiótico sob o crescimento de *C. gloeosporioides*.

Figura 17 - Avaliação do efeito das frações proteicas do látex de *H. drasticus* sobre o crescimento micelial do fungo *C. gloeosporioides*



Fonte: autoria própria (2017). (a) HdLP, (b) HdLP-90, (c) PII HdLP-90 Sepharose ff pH 5,0. Ambas as amostras foram testadas em diferentes concentrações (5,0; 2,5; 1,2 e 0,6 mg/mL). O controle positivo para o crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* foi constituído do tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,0, solução na qual as amostras foram dissolvidas, enquanto peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 0,05 M foi utilizado como controle negativo.

5.2.2 Atividade inseticida

A última atividade biológica avaliada foi o possível efeito deletério das proteínas presentes na fração HdLP-90 sobre o desenvolvimento de larvas e de insetos adultos de *Callosobruchus maculatus*. Para tanto, realizou-se um ensaio inseticida utilizando um sistema de sementes artificiais enriquecidas com diferentes concentrações de HdLP-90 (0,1%, 0,5%, 1,0% e 1,5%), no qual o grupo controle consistiu de sementes contendo apenas a farinha do feijão macerada. Neste ensaio, foram avaliados o efeito das proteínas dessa fração sobre a sobrevivência e peso larval, emergência e tempo médio de desenvolvimento dos insetos adultos.

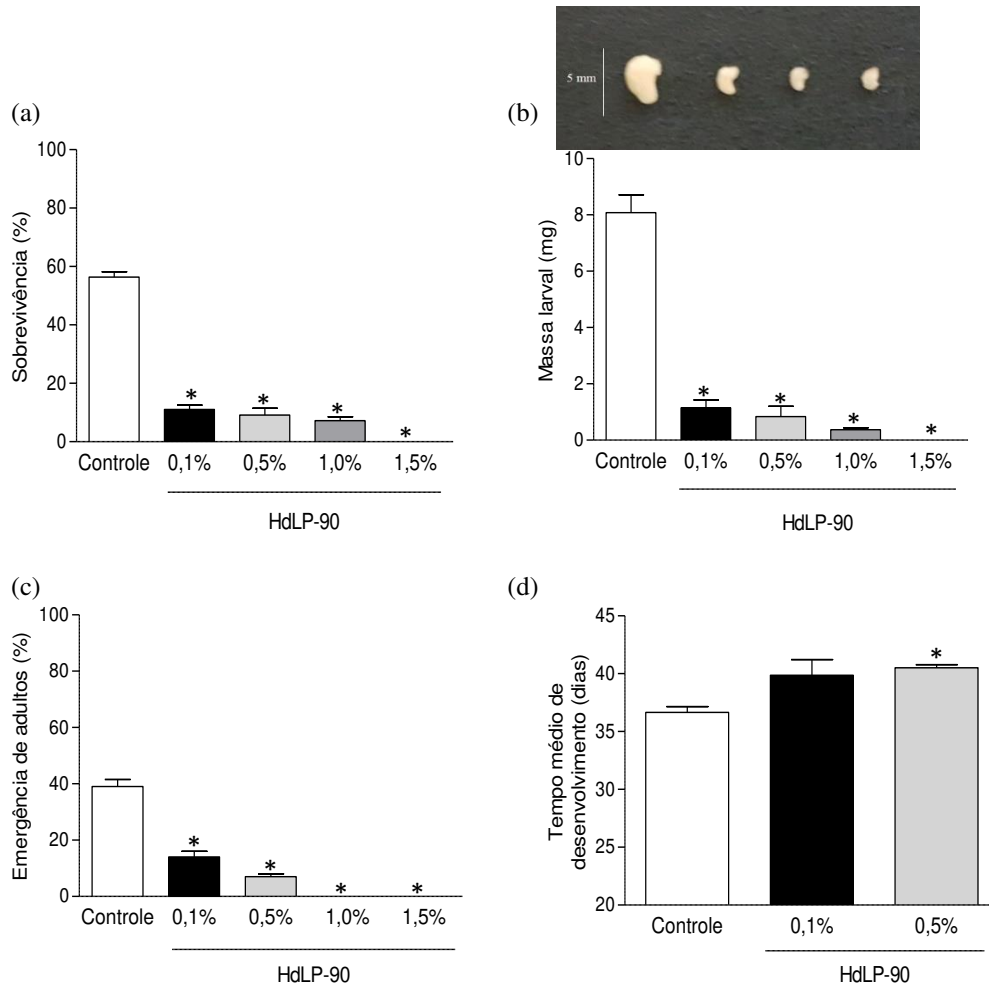
Verificou-se que mesmo a menor concentração de HdLP-90 foi capaz de causar significativo ($p < 0,05$) efeito deletério sobre o desenvolvimento larval de *C. maculatus*. O percentual de sobrevivência e a massa média das larvas crescidas no grupo controle foram respectivamente $56,38 \pm 3,15\%$ e $8,08 \pm 1,25$ mg. Esses valores para o grupo 0,1% de HdLP-90 foram reduzidos para $11,01 \pm 2,10\%$ e $1,15 \pm 0,47$ mg. Houve uma redução ainda maior na sobrevivência ($9,14 \pm 3,99\%$) e na massa das larvas ($0,83 \pm 0,63$ mg) que se alimentaram de sementes contendo 0,5% de HdLP-90. Para o grupo no qual as sementes artificiais foram enriquecidas com 1,0% HdLP-90, os valores registrados para esses dois parâmetros foram de aproximadamente $7,21 \pm 2,37\%$ e $0,36 \pm 0,11$ mg. A adição de 1,5% de HdLP-90 às sementes, por sua vez, implicou o maior efeito tóxico observado já que não houve o desenvolvimento de larvas em nenhuma das repetições do grupo (Figura 18 – A e B).

No que tange a toxicidade causada aos insetos adultos, verificou-se que todas as concentrações de HdLP-90 testadas provocaram significativa redução do percentual de emergência de adultos. O valor registrado para o grupo controle foi $41,33 \pm 2,3\%$, enquanto para os grupos 0,1% e 0,5% de HdLP-90 foram, respectivamente, $14,00 \pm 2,82\%$ e $7,00 \pm 2\%$. Portanto, os percentuais de emergência de adultos nas sementes enriquecidas com 0,1% e 0,5% da fração proteica estudada foram, respectivamente, em torno de 3 e 6 vezes menores que os valores registrados para o grupo controle. Não houve emergência de insetos adultos durante os 17 dias de condução experimento (após a emergência do primeiro inseto adulto) nos tratamentos com 1,0% e 1,5% da fração proteica (Figura 18 – C e D).

O tempo médio de desenvolvimento dos adultos, por sua vez, foi de $36,54 \pm 1,00$ dias para o grupo controle. Como pode ser visualizado no gráfico D da Figura 18, as sementes artificiais

preparadas com 0,5% aumentaram significativamente ($p < 0,05$) esse tempo para $40,5 \pm 0,5$ dias. Não foi observado aumento significativo nesse parâmetro para o tratamento com 0,1% de HdLP-90.

Figura 18 - Avaliação do efeito inseticida da fração HdLP-90 sobre o desenvolvimento de *C. maculatus*



Fonte: autoria própria (2017). A sobrevivência (a), a massa das larvas (b), bem como a emergência de insetos adultos (c) e seu tempo médio de desenvolvimento (d) foram determinados para insetos criados em sementes artificiais em concentrações crescentes da amostra (0,1%, 0,5%, 1,0% e 1,5%). As sementes artificiais foram preparadas usando farinha de semente de feijão de corda disponível comercialmente. * $p < 0,05$ indica diferença significativa comparado com controle ($n=5$ ANOVA, Teste de Tukey). A figura inserida acima do gráfico (b) mostra o tamanho de uma larva representante de cada grupo (da esquerda para a direita: controle, 0,1%, 0,5%, 1,0%) 22 dias após a ovoposição.

6. DISCUSSÃO

A composição química e bioquímica de látices vegetais é complexa e varia entre as espécies de plantas laticíferas. Como descrito nos resultados, foram obtidas duas frações a partir do látex de *H. drasticus*: a fração borracha e a proteica (HdLP-90). Esta primeira fração compõe cerca de 94% do látex. Entretanto, apesar de ser denominada “fração borracha”, ela pode conter outros compostos além da própria borracha (polímero de cis-1,4-isopreno). Isto é devido ao fato de que o látex é uma mistura complexa de metabólitos secundários, podendo conter proteínas enzimáticas ou não, alcaloides, esteroides, ácidos graxos, açúcares, fenóis, taninas, flavonoides, saponinas (PICKARD, 2008, KONNO, 2011, UPADHYAY, 2011).

Há estudos bioquímicos na literatura acerca do conteúdo proteico do látex de algumas espécies de plantas laticíferas, tais como *Calotropis procera*, *Crypsotegia grandiflora*, *Plumeria rubra*, *Euphorbia tirucalli*, *Hevea brasiliensis* e *Carica papaya* (ARCHER, 1960, AZARKAN *et al.*, 2003, FREITAS *et al.*, 2007, 2010, KANOKWIROON *et al.*, 2008, PARIJS *et al.*, 1991). Entretanto, a maioria dos estudos científicos relacionados a espécie *Himatanthus drasticus*, assim como outras espécies pertencentes ao gênero *Himatanthus*, referem-se a suas características morfológicas e às propriedades farmacológicas associadas ao seu látex dentre outras partes da planta (AMARO *et al.*, 2006, BARROSO *et al.* 1999, COLARES *et al.*, 2008, MOLSINHO *et al.*, 2011).

A fração HdLP-90 representa apenas cerca de 6% da massa total do látex. Os valores referentes ao percentual da fração borracha e da fração de proteínas solúveis (HdLP) no leite de janaguba relatados por Matos *et al.* (2013) foram muito semelhantes aos obtidos no presente trabalho. Entretanto, o teor de proteínas solúveis, estimado pelo método colorimétrico de Bradford, da fração HdLP-90 foi aproximadamente 5 vezes maior que o de HdLP. Além disso, o perfil proteico de HdLP-90 em SDS-PAGE revelou a presença de bandas ausentes no de HdLP. Estes resultados demonstram que a metodologia utilizada neste trabalho permitiu a obtenção de uma fração proteica mais concentrada e diversificada.

Os métodos de precipitação são muito utilizados nas etapas iniciais de fracionamento de misturas complexas de proteínas ou ainda com o intuito de concentrar amostras. (JANSON, 2012). O sulfato de amônio, agente precipitante utilizado nesse trabalho, promove a precipitação

proteica por meio do efeito *salting-out*, no qual, em concentrações elevadas, o sal compete com as cadeias laterais polares das proteínas pelas moléculas de água. Uma vez sem a camada de solvatação formada pela água, as proteínas tendem a formar agregados, precipitando. A precipitação utilizando sulfato de amônio, que pode ser facilmente removido por diálise, proporciona um método rápido e barato para concentrar amostras a partir de grandes volumes iniciais (SHA *et al.*, 2014).

A concentração de proteínas solúveis de HdLP-90 foi estimada em 0,66 mg/mL. Este valor é superior aos relatados na literatura para os látices de *Thevetia peruviana* (0,380 mg/mL), *Cryptotegia grandiflora* (0,260 mg/mL) e *Plumeria rubra* (0,330 mg/mL) (FREITAS *et al.* 2010, 2016). Porém, é bem inferior ao registrado para a fração proteica total do látex *Calotropis procera* (8,0 mg/mL) (FREITAS *et al.*, 2007). Por outro lado, em alguns fluidos laticíferos, como o de *Euphorbia tirucalli*, proteínas não foram detectadas (FREITAS *et al.* 2010).

O ensaio proteolítico utilizando azocaseína como substrato inespecífico juntamente com o *Dot Blot* utilizando anti-corpos antiprotease revelaram a ausência de proteases nas frações HdLP-90 e PII HdLP-90 Sepharose pH 5,0. Este resultado é interessante uma vez que o látex é uma fonte comum de enzimas proteolíticas vegetais. Estima-se que mais de 110 látices de diferentes famílias de plantas laticíferas possuem pelo menos uma protease. As proteases parecem estar envolvidas em quase todos os mecanismos de crescimento e desenvolvimento da planta, incluindo germinação, senescência e morte celular programada. Além disto, estas biomoléculas participam de processos essenciais para a planta, tais como reconhecimento de patógenos e desencadeamento de respostas de defesa contra fungos e insetos. Até o momento, a maioria das proteases laticíferas foram classificadas como sendo do tipo cisteínica e serínica (DOMSALLA; MELZIG, 2011). Morcelle e colaboradores 2004 observaram que o extrato bruto do látex de *Funastrum clausum* possui principalmente proteases cisteínicas e sua atividade proteolítica sobre a caseína foi calculada como sendo 2,4 UCAS/mg. Os látices de *C. procera* e *C. papaya* também tem sido relatado na literatura como sendo uma rica fonte de proteinases cisteínas (DUBEY; JAGANNADHAM, 2003, FREITAS *et al.*, 2007, KARNJANAPRATUM; BENJAKUL, 2014).

Embora não tenham sido detectadas proteases nas frações obtidas neste trabalho, estudos anteriores mostraram que o látex de *Himatanthus drasticus* possui enzimas envolvidas no metabolismo oxidativo de plantas, tais como superóxido dismutase, peroxidase do ascorbato e

peroxidase guaiacol (MATOS, 2013). Há ocorrência de enzimas antioxidativas e outros látices, como o de *Papaver somniferum*, o de *Hevea brasiliensis* e o de *Calotropis procera* (BILKA *et al.*, 2000, WITITSUWANNAKUL *et al.*, 2002, FREITAS *et al.*, 2007). Essas enzimas fazem parte do sistema de defesa antioxidante da planta que protege as células vegetais por meio da eliminação das espécies reativas de oxigênio (EROs) em excesso. O aumento na produção de EROs pode ocorrer devido a estresses bióticos e abióticos, tais como salinidade, radiação UV, seca, presença de metais pesados no solo, deficiência de nutrientes, uso de herbicidas e ataque ao tecido vegetal por patógenos (GILL; TUTEJA 2010).

A presença de quitinases também foi detectada nas frações proteicas do látex de *H. drasticus*. Todavia, os valores das atividades quitinolíticas de HdLP ($0,00101 \pm 0,03$ nkat/ μ g de proteína) e de HdLP-90 ($0,00105 \pm 0,0021$ nkat/ μ g de proteína) foram consideravelmente menores que os observados no látex de *C. procera* ($16,310 \pm 0,71$ nkat/ μ g de proteína), *P. rubra* ($2526,90 \pm 12,34$ nkat/ μ g de proteína), *C. grandiflora* ($58,68 \pm 4,45$ nkat/ μ g de proteína) e *E. tirucalli* ($112,04 \pm 0,97$ nkat/ μ g de proteína) (FREITAS *et al.*, 2010).

Quitinases são enzimas responsáveis pela degradação biológica da quitina, um polissacarídeo presente na parede celular de fungos e em membranas peritróficas de insetos. Logo, essas enzimas desempenham um papel importante na defesa vegetal, uma vez que atacam diretamente o componente estrutural desses organismos (SARMA *et al.*, 2012). Entretanto, foi observado que nenhuma das frações proteicas obtidas a partir do leite de janaguba foi capaz de inibir o crescimento micelial do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. Provavelmente, as quitinases de HdLP-90 não estão presentes numa concentração suficiente para causar danos irreparáveis a parede celular desse fungo. Outro fator que pode explicar este resultado é a ausência de proteases no látex de *H. drasticus*.

Matos (2013) mostrou em seu trabalho o látex de *H. drasticus* que HdLP não inibiu o crescimento de *Fusarium solani* e *Cercospora kikuchii*. A ausência de potencial antifúngico em amostras proteicas obtidas de látices também já foi relatada em outros trabalhos científicos. De acordo com Souza *et al.* 2011, as proteínas laticíferas de *P. rubra* e de *E. tirucalli* não inibiram o crescimento micelial de *F. solani* e *Rhizoctonia solani*. As quitinases do látex de *C. procera*, por sua vez, não exibiram efeito deletério sobre *F. oxysporum*, mas apresentaram leve atividade antifúngica sobre *C. gloeosporioides*. Foi demonstrado que essas enzimas causaram danos a parede

celular deste fungo, o que possivelmente culminou com a alteração da permeabilidade da sua membrana plasmática e levou ao efeito deletério observado (FREITAS *et al.*, 2016).

Entretanto, o outro ensaio biológico realizado neste trabalho mostrou que as larvas *Callosobruchus maculatus* desenvolvidas em sementes artificiais enriquecidas com a fração HdLP-90, mesmo em sua concentração mais baixa (0,1%), tiveram sua massa e percentual de sobrevivência significativamente reduzidos quando comparado ao grupo controle. A taxa de emergência e o tempo médio de desenvolvimento dos insetos adultos (sementes contendo 1,5% de HdLP-90) também foram significativamente reduzidas e aumentados, respectivamente. A atividade inseticida de HdLP-90 pode estar associada às suas quitinases, já que não foram detectadas proteases nesta fração. Freitas *et al.* (2016) revelou que as quitinases isoladas do látex de *C. procerus* afetaram significativamente esses mesmos parâmetros também em experimentos realizados com *C. maculatus*. Entretanto, a hipótese de que outras biomoléculas, como inibidores de proteases, e compostos químicos, como terpenoides e alcaloides, também contribuíram para esse efeito não pode ser descartada. Esses compostos, dentre outros presentes em látices, já tiveram seus potenciais contra insetos confirmados em vários trabalhos científicos (KONNO, 2011, UPADHYAY, 2011).

Osmotina é outra biomolécula pertencente à família das PR-proteínas cuja presença foi detectada na fração PII HdLP-90 Sepharose ff pH 5,0. Esse resultado foi obtido por meio de análises de espectrometria de massas e de ensaios de *Dot Blot*. No trabalho de Freitas *et al.* (2015), uma osmotina do látex de *H. drasticus* foi isolada por meio de cromatografia de afinidade com anticorpos anti-CpOsm imobilizados. No entanto, essa mesma osmotina não detectada por ensaios de *Dot Blot* e *Western Blot*. Desta forma, a fração PII HdLP-90 Sepharose ff pH 5,0 parece conter osmotina em uma concentração suficiente para a sua detecção por meio de *Dot Blot*. Isto sugere que o processo cromatográfico, em coluna de DEAE-Sepharose *Fast Flow*, que deu origem a esta fração, pode ainda assim ter sido relativamente eficiente, apesar dos resultados mostrados no tópico 5.1 (página 61).

Osmotinas são proteínas relacionadas com tolerância à seca e ao estresse vegetal em plantas. Entretanto, o mecanismo pelo qual estas funções são executadas ainda não foram completamente elucidados. Há hipóteses de que osmotinas induzem a síntese e a acumulação de determinados solutos ou estão envolvidas em mudanças metabólicas ou estruturais na célula (BARTHAKUR; BABU; BANSAO, 2001). Várias osmotinas vegetais, tais como a da uva, do

tomate e da banana, são potencialmente ativas contra algumas espécies de fungos (HO; WONG; NG, 2007, PRESSEY, 1997, TATTERSALL; HEESWIJCK; HOJ, 1997). Freitas *et al.* (2011b) mostrou que osmotina do látex *Calotropis procera* foi capaz de causar a permeabilização da membrana de esporos e hifas do fungo *F. solani*, além de induzir a extravasamento de conteúdo celular por meio de um ensaio utilizando grande vesículas unilamelares (LUVs) de 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3fosfo(1-rac-glicerol) (POPG).

Todavia, as frações proteicas do látex de *H. drasticus*, inclusive aquela na qual osmotina foi identificada por MS e detectada por *Dot Blot*, não foram ativas contra o crescimento micelial de *C. gloeosporioides*. Resultados similares foram obtidos no trabalho de Freitas *et al.* (2016), no qual a fração HdLP não causou efeitos deletérios sobre esta mesma espécie de fungo e sobre *F. solani*. Neste mesmo estudo, observou-se que a osmotina do látex de *P. rubra* também não foi capaz de causar toxicidade a estas duas espécies de fungos fitopatogênicos. Similarmente, a osmotina do látex de *C. papaya* não apresentou atividade antifúngica (LOOZE *et al.*, 2009).

Portanto, a ausência de potencial antifúngico nessas osmotinas, incluindo a do látex de *H. drasticus*, é interessante e intrigante. Estas diferenças nas atividades antifúngicas das osmotinas têm sido atribuídas a sua estrutura tridimensional. De acordo com Liu e colaboradores (2010), quando estas biomoléculas possuem atividade antifúngica, há uma fenda ácida entre os seus domínios proteicos I e II, enquanto a fenda em osmotinas sem atividade contra fungos apresenta natureza básica. Desta forma, novos estudos precisam ser realizados com o intuito de analisar as relações entre funções e estrutura tridimensional das osmotinas do látex de *H. drasticus*.

7. CONCLUSÃO

A metodologia de precipitação proteica com sulfato de amônio executada nesse trabalho aumentou a eficiência da extração de proteínas do látex de *Himatanthus drasticus* quando comparada a metodologia utilizada em trabalhos anteriores. A fração proteica resultante, a qual foi denominada HdLP-90, é rica em proteínas

A cromatografia em coluna de DEAE-Sepharose Fast Flow pH 5,0 foi eficiente na remoção de pigmentos presentes na fração HdLP-90 que danificam matrizes cromatográficas. A subfração resultante, denominada PII HdLP-90 Sepharose ff pH 5,0 pode, portanto, ser aplicada em trabalhos posteriores nos quais são utilizadas colunas cromatográficas mais refinadas. Além disto, este método também foi eficiente na obtenção de uma fração rica em osmotinas, que não apresentam atividade antifúngica sobre *C. gloeosporioides*.

As frações proteicas do leite de janaguba também possuem enzimas quitinolíticas, que podem estar relacionadas com a significativa atividade inseticida contra *C. maculatus* observada neste estudo.

Estudos bioquímicos, proteômicos e estruturais adicionais precisam ser realizados para um melhor entendimento das funções das proteínas do látex de *H. drasticus*.

REFERÊNCIAS

- ABAD, L.R.; D'URZO, M.P.; LIU, D.; NARASIMHAN, M.L.; REUVENI, M.; ZHU, J.K.; NIU, X.; SINGH, N.K.; HASEGAWA, P.M.; BRESSAN, R.A. Antifungal activity of tobacco osmotin has specificity and involves plasma membrane permeabilization. **Plant Science**, 118(1), p.11-23, 1996.
- ABDIN, M. Z., KIRAN, U.; ALAM, A. Analysis of osmotin, a PR protein as metabolic modulator in plants. **Bioinformation**, 5 (8), p. 336-340, 2011.
- ADEBAYO, R.A.; OKE, T.F. Effects of honey and glucose solutions feeding and larval competition on the development of *Callosobruchus maculatus* (F.) [Coleoptera: Chrysomelidae]. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, 5(2), p. 1270-1273, 2017.
- ADRANGI, S.; FARAMARZI, M.A. From bacteria to human: A journey into the world of chitinases. **Biotechnology Advances**, 31 (8), p. 1786-1795, 2013.
- AERTS, J.M.F.G.; BOOT, R.G.; RENKEMA, G.H.; VAN WEELY, S.; HOLLAK, C.E.M.; DONKE-KOPMAN, W.E.; VERHOEK, M. Chitotriosidase: a human macrophage chitinase that is a marker for Gaucher disease manifestation. **Chitin enzymology**, 2, 3-10, 1996.
- AGRAWAL, A.A.; KONNO, K. Latex: a model for understanding mechanisms, ecology, and evolution of plant defense against herbivory. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, 40, 311-331, 2009.
- AKTAR, W.; SENGUPTA, D.; CHOWDHURY, A. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. **Interdisciplinary toxicology**, 2(1), p. 1-12, 2009.
- AL AHMADI, K.J.; YAZDI, M.T; NAJAFI, M.F.; SHAHVERDI, A.R.; FARAMARZI, M.A.; ZARRINI, G.; BEHRAVAN, J. Optimization of medium and cultivation conditions for chitinase production by the newly isolated: *Aeromonas* sp. **Biotechnology**, 7(2), p. 266-272, 2008.
- ALBUQUERQUE, T.M.; ALENCAR, N.M.; FIGUEIREDO, J.G.; FIGUEIREDO, I.S.; TEIXEIRA, C.M.; BITENCOURT, F.S.; SECCO, D.D.; ARAÚJO, E.S.; LEÃO, C.A.M.;

RAMOS, M.V. Vascular permeability, neutrophil migration and edematogenic effects induced by the latex of *Cryptostegia grandiflora*. **Toxicon**, 53 (1), p. 15-23, 2009.

AMARO, M.A.; FILHO, S.M.; GUIMARÃES, R.M., TEÓFILO, E.M. Morfologia de frutos, sementes e de plântulas de janaguba (*Himatanthus drasticus* (mart.) Plumel. – apocynaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, 28 (1), p. 63-71, 2006.

AMIAN, A.A.; PAPENBROCK, J.; JACOBSEN, H. J.; HASSAN, F. Enhancing transgenic pea (*Pisum sativum* L.) resistance against fungal diseases through stacking of two antifungal genes (chitinase and glucanase). **GM crops**, 2(2), p. 104-109, 2011.

ARCHER, B.L. The proteins of *Hevea brasiliensis* latex. 4. Isolation and characterization of crystalline hevein. **Biochemical Journal**, 75(2), p. 236-240, 1960.

ARIMA, K.; UCHIKOBA, T.; YONEZAWA, H.; SHIMADA, M.; KANEDA, M. Cucumisinlike protease from the latex of *Euphorbia supina*. **Phytochemistry**, 53, p. 639–644, 2000.

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

AZARKAN, M.; AMRANI, A.; NIJS, M.; VANDERMEERS, A.; ZERHOUNI, S.; SMOLDERS, N.; LOOZE, Y.; *Carica papaya* latex is a rich source of a class II chitinase. **Phytochemistry**, 46(8), p. 1319-1325, 1997.

AZARKAN, M.; EL MOUSSAOUI, A.; VAN WUYTSWINKEL, D.; DEHON, G.; LOOZE, Y. Fractionation and purification of the enzymes stored in the latex of *Carica papaya*. **Journal of Chromatography B**, 790(1), p. 229-238, 2003.

AZARKAN, M.; WINTJENS, R.; LOOZE, Y.; BAEYENS-VOLANT, D. Detection of three wound-induced proteins in papaya latex. **Phytochemistry**, 65, p. 525–534, 2004.

BARROSO, G.M.; MORIN, M.P.; PEIXOTO, A.L.; ICHASO, C.L.F. Frutos e sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas. Viçosa: UFV, 443p, 1999.

- BARTHAKUR, S.B.V.B.; BABU, V.; BANSA, K.C. Over-expression of osmotin induces proline accumulation and confers tolerance to osmotic stress in transgenic tobacco. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, 10(1), p. 31-37, 2001.
- BECKER-RITT, A.B.; CARLINI, C.R. Fungitoxic and insecticidal plant polypeptides. **Peptide Science**, 98(4), p.367-384, 2012.
- BILKA, F.; BALAZOVA, A.; BILKOVA, A.; PSENAK, M. Purification of polyphenol oxidase from opium poppy latex. **Pharmazie**, 55(2), p. 155-156, 2000.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, 72(1-2), p.248-254, 1976.
- BROEKAERT, W.F.; CAMMUE, B.P.A.; VANDERLEYDEN, J. An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. **FEMS Microbiology Letters**; 69, p. 61-66, 1990.
- BUSHMAN, B.S.; SCHOLTE, A.A.; CORNISH, K.; SCOTT, D.J.; BRICHTA, J.L.; VEDERAS, J.C.; OCHOA, O.; MICHELMORE, R.W.; SHINTANI, D.K.; KNAPP, S.J. Identification and comparison of natural rubber from two *Lactuca* species. **Phytochemistry**, 67, p.2590–2596, 2006.
- COHEN-KUPIEC, R.; CHET, I. The molecular biology of chitin digestion. **Current Opinion in Biotechnology**, 9, p. 270-277, 1998.
- COLARES, A.; CORDEIRO, L.; COSTA, J. G. M.; SILVEIRA, E.; CAMPOS, A.; CARDOSO, A. Phytochemical and biological preliminary study of *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel (Janaguba). **Pharmacognosy Magazine**, 4(14), p. 73-77, 2008.
- COLLINGE, D.B.; KRAGH, K.M.; MIKKELSEN, J.D.; NIELSEN, K.K.; RASMUSSEN, U.; VAD, K. Plant chitinases. **The Plant Journal**, 3(1), p. 31-40, 1993.
- DAWSON, C.R., 1954. The toxic principle of poison ivy and related plants. **Record of Chemical Progress**, 15, p. 39–53, 1954.
- DEAN, R.; VAN KAN, J.A.; PRETORIUS, Z.A.; HAMMOND-KOSACK, K.E.; DI PIETRO, A.; SPANU, P.D.; RUDD, J.J.; DICKMAN, M.; KAHMANN, R.; ELLIS, J.; FOSTER, G.D.,

The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular plant pathology**, 13(4), p.414-430, 2012.

DEMARCO, D. Micromorfología y histoquímica de los Laticíferos de órganos vegetativos de especies de Asclepiadoideae (apocynaceae). **Acta biológica colombiana**, São Paulo, 20(1), p. 57-65, 2014.

DEMARCO, D.; CASTRO, M. M; ASCENSÃO, L. Two laticifer systems in *Sapium haemospermum* - new records for Euphorbiaceae. **Botany**, 91, p. 545–554, 2013.

DOMSALLA, A.; SYTWALA, S.; MELZIG, M.F. Proteolytic activity in latices of Asteraceae and Campanulaceae. *Planta Medica*, 77(12), p.38, 2011

DUBEY, V.K., JAGANNADHAM, M.V. Procerain, a stable cysteine protease from the latex of *Calotropis procera*. **Phytochemistry**, 62(7), p. 1057-1071, 2003.

DUSSOURD, D.E. Chemical stimulants of leaf-trenching by cabbage loopers: natural products, neurotransmitters, insecticides, and drugs. **Journal of Chemical Ecology**, 29, p.2023–2047, 2003.

DUSSOURD, D.E.; HOYLE, A.M. Poisoned plusiines: toxicity of milkweed latex and cardenolides to some generalist caterpillars. **Chemoecology**, 10, p. 11–16, 2000.

ERSSON, B.; RYDÉN, L.; JANSON, J. Introduction to Protein Purification. In: JANSON, J. (Ed.). **Protein purification: principles, high resolution methods, and applications**, John Wiley & Sons, 54 (3) p. 3-22, 2012.

ESCOTT, G. M.; WALTERS, C. E.; INGHAM, E.; ADAMS, D. J. Expression of chitinase activity during monocyte differentiation. **Chitin Enzymology**, 2, p. 11-20, 1996.

ESTRUCH, J.J.; CAROZZI, N.B.; DESAI, N.; DUCK, N.B.; WARREN, G.W.; KOZIEL, M.G. Transgenic plants: an emerging approach to pest control. **Nature biotechnology**, 15(2), p.137-141, 1997.

FARRELL, B. D., DUSSOURD, D. E., MITTER, C. Escalation of plant defense: do latex and resin canals spur plant diversification. **The American Naturalist**, 138 (4), p. 881–900,1991.

FERREIRA, R.B.; MONTEIRO, S.; FREITAS, R.; SANTOS, C. N.; CHEN, Z.; BATISTA, L. M.; DUARTE, J.; BORGES, A.; TEIXEIRA, A.R. The role of plant defense proteins in fungal pathogenesis. **Molecular Plant Pathology**, 8, p. 677-700, 2007.

FRANÇA, W.C.D.S.C.; SOUZA, A.C.R.L.A.; CORDEIRO, J.A.; CURY, P.M., Analysis of the action of *Himatanthus drasticus* in progression of urethane-induced lung cancer in mice. **Einstein**, 9(3), p.350-353. 2011.

FREITAS, C.D.; NOGUEIRA, F.C.; VASCONCELOS, I.M.; OLIVEIRA, J.T.; DOMONT, G. B.; RAMOS, M.V. Osmotin purified from the latex of *Calotropis procera*: biochemical characterization, biological activity and role in plant defense. **Plant Physiology and Biochemistry**, 49(7), p. 738-743, 2011a.

FREITAS, C.D.; SOUZA, D.P.D.; ARAÚJO, E.S.; CAVALHEIRO, M.G., OLIVEIRA, L.S.; RAMOS, M.V. Anti-oxidative and proteolytic activities and protein profile of laticifer cells of *Cryptostegia grandiflora*, *Plumeria rubra* and *Euphorbia tirucalli*. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, 22(1), p. 11-22, 2010.

FREITAS, C.D.; VIANA, C.A.; VASCONCELOS, I.M.; MORENO, F.B.; LIMA-FILHO, J.V.; OLIVEIRA, H.; D., MOREIRA, R.A; MONTEIRO-MOREIRA, A.C.; RAMOS, M.V. First insights into the diversity and functional properties of chitinases of the latex of *Calotropis procera*. **Plant Physiology and Biochemistry**, 108, p. 361-371, 2016.

FREITAS, C.D.; CRUZ, W.T.; SILVA, M.Z.; VASCONCELOS, I.M.; MORENO, F.B.; MOREIRA, R.A.; MONTEIRO-MOREIRA, A.C.; ALENCAR, L.M.; SOUSA, J.S.; ROCHA, B.A; RAMOS, M.V. Proteomic analysis and purification of an unusual germin-like protein with proteolytic activity in the latex of *Thevetia peruviana*. **Planta**, 243(5), p.1115-1128, 2016.

FREITAS, C.D.T.; OLIVEIRA, J.S.; MIRANDA, M.R.A.; MACEDO, N.M.R.; SALES, M.P.; VILLAS-BOAS, L.A.; RAMOS, M.V. Enzymatic activities and protein profile of latex from *Calotropis procera*. **Plant Physiology and Biochemistry**, 45(10), p. 781-789, 2007.

FREITAS, C.D.T.; SILVA, M.Z.R.; BRUNO-MORENO, F.B.; MONTEIRO-MOREIRA, A.C.O.; MOREIRA, A.R.; RAMOS, M.V. New constitutive latex osmotin-like proteins lacking antifungal activity. **Plant Physiology and Biochemistry**, 96, p. 45-52, 2015.

- FREITAS, C.D.T.; SOUZA LOPES, J.L.; BELTRAMINI, L.M.; OLIVEIRA, R.S.B.; OLIVEIRA, J.T.A.; RAMOS, M.V. Osmotin from *Calotropis procera* latex: New insights into structure and antifungal properties. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Biomembranes**, 1808(10), p. 2501-2507, 2011b.
- GAGLIARDI, B. K.; CORDEIRO, I.; DEMARCO, D. Protection and attraction: bracts and secretory structures in reduced inflorescences of Malpighiales. **Flora**, 2016.
- GAUTAM, A. K. *Colletotrichum gloeosporioides*: Biology, pathogenicity and management in India. **Plant Physiology & Pathology**, 2, p. 2-11, 2014.
- GHINI, R.; BETTIOL, W. Proteção de plantas na agricultura sustentável. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, 17(1), p.61-70, 2000.
- GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant physiology and biochemistry**, 48(12), p. 909-930, 2010.
- GODFRAY, H.C.J., BEDDINGTON, J.R., CRUTE, I.R., HADDAD, L., LAWRENCE, D., MUIR, J.F., PRETTY, J., ROBINSON, S., THOMAS, S.M.; TOULMIN, C. Food security: the challenge of feeding 9 billion people. **Science**, 327(5967), p.812-818, 2010.
- GOODAY, G.W. Diversity of roles for chitinases in nature. **Chitin and Chitosan**, 3, p. 191-202, 1995.
- GÖRG, A.; OBERMAIER, C.; BOGUTH, G.; HARDER, A.; SCHEIBE, B.; WILDGRUBER, R.; WEISS, W. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. **Electrophoresis**, 21, p. 1037–1053, 2000.
- HAGEL, J. M.; YEUNG, E. C.; FACCHINI, P. J. Got milk? The secret life of laticifers. **Trends in Plant Science**, 13, p. 631-639, 2008.
- HO, V.S.M.; WONG, J.H.; NG, T.B. A thaumatin-like antifungal protein from the emperor banana. **Peptides**, 28, p. 760-766, 2007.
- ITENOV, K.; MOLGAARD, P.; NYMAN, U. Diurnal fluctuations of the alkaloids concentration in latex of poppy *Papaver somniferum* is due to day-night fluctuation of water content. **Phytochemistry**, 52, p. 1229–1234, 1999.

- KANOKWIROON, K.; TEANPAISAN, R.; WITITSUWANNAKUL, D.; HOOPER, A. B.; WITITSUWANNAKUL, R. Antimicrobial activity of a protein purified from the latex of *Hevea brasiliensis* on oral microorganisms. *Mycoses*, 51(4), p. 301-307, 2008.
- KARNJANAPRATUM, S.; BENJAKUL, S. Glycyl endopeptidase from papaya latex: Partial purification and use for production of fish gelatin hydrolysate. **Food chemistry**, 165, 403-411, 2014.
- KASPRZEWSKA, A. Plant chitinases – regulation and function. **Cellular & molecular biology letters**, 8, p. 809–824, 2003.
- KEHR, J. Phloem sap proteins: their identities and potential roles in the interaction between plants and phloem-feeding insects. **Journal of Experimental Botany**, 57, p. 767–774, 2006.
- KIM, J.S.; KIM, Y.O.; RYU, H.J.; KWAK, Y.S.; LEE, J.Y.; KANG, K. Isolation of stress-related genes of rubber particles and latex in fig tree (*Ficus carica*) and their expression by abiotic stress or plant hormone treatments. **Plant Cell Physiology**, 44, p. 412–414, 2003.
- KIMMEL, J.R.; SMITH, E.L. Crystalline papain. I. Preparation, specificity, and activation. **Journal of Biological Chemistry**, 207, p. 515–531, 1954.
- KONNO, K. Plant latex and other exudates as plant defense systems: Roles of various defense chemicals and proteins contained therein. **Phytochemistry**, Ohwashi, 72, p. 1510–1530, 2011.
- KONNO, K.; HIRAYAMA, C.; NAKAMURA, M.; TATEISHI, K.; TAMURA, Y.; HATTORI, M.; KOHNO, K. Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex. **Plant Journal**, 37, p. 370–378, 2004.
- KUNDU, S.; SUNDD, M.; JAGANNADHAM, M.V. Purification and Characterization of a Stable Cysteine Protease Ervatamin B, with Two Disulfide Bridges, from the Latex of *Ervatamia coronaria*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(2), p.171-179, 2000.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T 4. **Nature**, 227, p. 680-685, 1970.

LEITE, G.D.; PENHA, A.S.; DA SILVA, G.Q.; COLARES, A.V.; RODRIGUES, F.G.; COSTA, J.G.; CARDOSO, A.L.; CAMPOS, A.R. Gastroprotective effect of medicinal plants from Chapada do Araripe, Brazil. **Journal of Young Pharmacists**, 1, p. 54–56, 2009.

LEWINSOHN, T. M. The geographical distribution of plant latex. **Chemoecology**, 2, p. 64-68, 1991.

LIU, J.J.; STURROCK, R; EKRAMODDOULLAH, A.K. The superfamily of thaumatin-like proteins: its origin, evolution, and expression towards biological function. **Plant cell reports**, 29(5), p.419-436, 2010.

LIU, Z.; GAO, J.; YANG, G.; ZHANG, H.; AHE, Y., Localization and Classification of Paddy Field Pests using a Saliency Map and Deep Convolutional Neural Network. **Scientific reports**, 6, p. 1-12, 2016.

LOOZE, Y.; BOUSSARD, P.; HUET, J.; VANDENBUSSCHE, G.; RAUSSENS, V.; WINTJENS, R. Purification and characterization of a wound-inducible thaumatin-like protein from the latex of *Carica papaya*. **Phytochemistry**, 70, p. 970-978, 2009.

LUCETTI, D.L.; LUCETTI, E.C.; BANDEIRA, M.A.M.; VERAS, H.N.; SILVA, A.H.; LEAL, L.K.A.; LOPES, A.A.; ALVES, V.C.; SILVA, G.S.; BRITO, G.A; VIANA, G.B. Anti-inflammatory effects and possible mechanism of action of lupeol acetate isolated from *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel. **Journal of Inflammation**, 7(1), p. 1-11, 2010.

LYNN, K.R.; CLEVETTE-RADFORD, N.A.; Ficin E, a serine-centred protease from *Ficus elastica*. **Phytochemistry**, 25, p.1559–1561, 1986a.

LYNN, K.R.; CLEVETTE-RADFORD, N.A., Hevains: serine-centred proteases from the latex of *Hevea brasiliensis*. **Phytochemistry**, 25, p. 2279–2282, 1986b.

MACEDO, M.L.R.; FERNANDES, K.V.S.; SALES, M.P.; XAVIER-FILHO, J. Vicilins variants and the resistance of cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds to the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, 105, p. 89-94, 1993.

- MALCOLM, S.B.; Cardenolide-mediated interactions between plants and herbivores. In: ROSENTHAL, G.A.; BERENBAUM, M.R. (Eds.), **Herbivores: Their Interaction with Secondary Plant Metabolites**, vol. 1, second ed. Academic Press, San Diego, p. 251–296, 1991.
- MARQUES, L. M. Proteínas isoladas do látex de *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel (Apocynaceae) protegem a mucosa gástrica de camundongos contra lesões gástricas induzidas por etanol: envolvimento da via NO/ GMPc/ KATP e da glutatona, 2012, 116 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.
- MARTIN, M.N. The latex of *Hevea brasiliensis* contains high levels of both chitinases and chitinases/lysozymes. **Plant Physiology**, 95, p. 469-476, 1991.
- MATOS, F.J.A. Plantas medicinais: guia de seleção e aproveitamento de plantas usadas em fitoterapia no nordeste do brasil. Fortaleza: ioce, 1989.
- MATOS, M. P. V. Caracterização bioquímica parcial e investigação de atividades biológicas contra pragas agrícolas na fração proteica do látex de *Himatanthus drasticus* Mart. (Plumel). Monografia – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 90 p., 2010.
- MATOS, M. P. V.; OLIVEIRA, R. S. B.; ALENCAR, N. M. N.; FIGUEIREDO, I. S. T.; OLIVEIRA, J. S.; AMARAL, B. J. S.; NISHI, B. C.; RAMOS, M. V. Ethnopharmacological use and pharmacological activity of latex from *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel. **International Journal of Indigenous Medicinal Plants**, 29, p.1122-1131, 2013.
- MAXMEN, A. Crop pests: under attack. **Nature**, 501(7468), p. S15-S17, 2013.
- MEDEIROS, R. B.; FERREIRA, M. A. S. V.; DIANESE, J. C. Mecanismos de agressão e defesa nas interações planta-patógeno. **Editora Universidade de Brasília**, p. 290, 2003.
- MELO, V.M.M.; MEDEIROS, D.A.; RIOS, F.J.B.; CASTELAR, L.I.M.; CARVALHO, F.F.U. Antifungal properties of proteins (agglutinins) from the red alga *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux. **Botanica Marina**, 40, p. 281–284, 1997.
- MODESTO, M. M. L. S. Aspectos ecológicos e sócio-econômicos de *Himatanthus drasticus* (Wahl.) Woodson. “janaguba” da Chapada do Araripe. Monografia (Especialização em Botânica) – Universidade Regional do Cariri, 1997.

- MONTEIRO, S.; BARAKAT, M.; PIÇARRA-PEREIRA, M.A.; TEIXEIRA, A.R.; FERREIRA, R.B., Osmotin and thaumatin from grape: a putative general defense mechanism against pathogenic fungi. **Phytopathology**, 93(12), p.1505-1512, 2003.
- MOOIBROEK, H.; CORNISH, K. Alternative sources of natural rubber. **Applied Microbiology. Biotechnology**, 53, p. 355–365, 2000.
- MORCELLE, S. R.; CAFFINI, N. O.; PRIOLO, N. Proteolytic properties of *Funastrum clausum* latex. **Fitoterapia**, 75(5), pp.480-493, 2004.
- MOUSINHO, K. C.; OLIVEIRA, C. C; FERREIRA, J. R. O.; CARVALHO, A. A.; MAGALHÃES, H. I. F.; BEZERRA, D. P.; ALVES, A. P. N. N; COSTA-LOTUFO, L.V.; PESSOA, C; MATOS, M. P. V.; RAMOS, M. V.; MORAES, M. O. Antitumor effect of laticifer proteins of *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel – Apocynaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, 137, p. 421–426, 2011.
- NOORI, S.A.S; SOKHANSANJ, A. Wheat plants containing an osmotin gene show enhanced ability to produce roots at high NaCl concentration. **Russian Journal of Plant Physiology**, 55, p. 256-258, 2008.
- OERKE, E.C. Crop losses to pests. **The Journal of Agricultural Science**, 144(1), p.31-43, 2006.
- OLIVEIRA, J.T.A.; GONDIM, D.M.F.; VASCONCELOS, I.M. Ensaio enzimáticos de proteínas e inibidores de proteases envolvidos com a defesa de plantas a patógenos. In: Biotecnologia aplicada à agricultura: textos de apoio e protocolos experimentais. FIGUEIREDO, M.V.B.; BURITY, H.A.; OLIVEIRA, J.O.; SANTOS, C.E.R.S.; STAMFORD, N.P. (Eds.). EMBRAPA Informação Tecnológica, Brasília, DF, Brasil; 1, p. 62-92, 2010.
- PANIS, C.; PIZZATTI, L.; HERRERA, A.C.; CECCHINI, R.; ABDELHAY, E. Putative circulating markers of the early and advanced stages of breast cancer identified by high-resolution label-free proteomics. **Cancer Letters**, 330(1), p. 57–66, 2013.
- PATIL, C.D.; Patil, S.V.; Borase, H.P.; Salunke, B.K.; Salunkhe, R.B. Larvicidal activity of silver nanoparticles synthesized using *Plumeria rubra* plant latex against *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. **Parasitology Research**, 110 (5), p. 1815-1822, 2012.

- PATIL, R.S.; GHORMADE, V.; DESHPANDE, M.V. Chitinolytic enzymes: an exploration. **Enzyme and Microbial Technology**, 26, p. 473–483, 2000.
- PICKARD, W. F. Laticifers and secretory ducts: two other tube systems in plants. **New phytologist**, 177, p. 877–888, 2008.
- PLUMEL, M.M. Le genre *Himatanthus* (Apocinaceae). Revisión taxonomique: bradea. **Boletim do Herbarium Bradeanu**, 5, p. 1-20, 1991.
- PRESSEY, R. Two isoforms of NP24: a thaumatin-like protein in tomato fruit. **Phytochemistry**, 44 p. 1241-1245, 1997.
- RAMOS, M. V.; FREITAS, C. D. T.; STANISÇUASKI, F.; MACEDO, L. L. P.; SALES, M. P.; SOUSA, D. P.; CARLINI, C. R. Performance of distinct crop pests reared on diets enriched with latex proteins from *Calotropis procera*: role of laticifer proteins in plant defense. **Plant Science**, 173, p. 349–357, 2007.
- RAMOS, M.V.; GRANGEIRO, T.B.; FREIRE, E.A.; SALES, M.P.; SOUZA, D.P.; ARAÚJO, E.S.; FREITAS, C.D.T. The defensive role of latex in plants: detrimental effects on insects. **Anthropod-Plant interactions**, 4, p. 57-67, 2010.
- RAO, M.V.R.; PARAMESWARI, C.; SRIPRIYA, R.; VELUTHAMBI, K. Transgene stacking and marker elimination in transgenic rice by sequential *Agrobacterium*-mediated co-transformation with the same selectable marker gene. **Plant cell reports**, 30(7), p. 1241-1252, 2011.
- RASMANN, S.; JOHNSON, M.D.; AGRAWAL, A.A. Induced responses to herbivory and jasmonate in three milkweed species. **Journal of Chemical Ecology**, 35, p. 1326–1334, 2009.
- REBOUÇAS, S. O.; Grivicich, I.; SANTOS, M. S.; RODRIGUEZ, P., GOMES, M. D.; OLIVEIRA, S. Q.; SILVA, J.; FERRAZA, A. B. F. Antiproliferative effect of a traditional remedy, *Himatanthus articulatus* bark, on human cancer cell lines. **Journal of Ethnopharmacology**, 137, p. 926–929, 2011.
- REES, S.B.; HARBORNE, J.B. The role of sesquiterpene lactones and phenolics in the chemical defense of the chicory plant. **Phytochemistry** 24, p. 2225–2231. 1985

SAHAI, A.S.; MANOCHA, M.S. Chitinases of fungi and plants: their in morphogenesis and host-parasite involvement interaction. **FEMS Microbiology Reviews**, 11, p. 317-338, 1993.

SARMA, K.; DEHURY, B.; SAHU, J.; SARMAH, R.; SAHOO, S.; SAHU, M.; BAROOAH, M. A comparative proteomic approach to analyse structure, function and evolution of rice chitinases: a step towards increasing plant fungal resistance. **Journal of molecular modeling**, 18(11), p. 4761-4780, 2012.

SEIBER, J.N.; NELSON, C.J.; LEE, S.M. Cardenolides in the latex and leaves of seven *Asclepias* species and *Calotropis procera*. **Phytochemistry**, 21, p. 2343–2348, 1982.

SESSA, R.A.; BENNETT, M.H; LEWIS, M.J.; MANSFIELD, J.W., BEALE, M.H., Metabolite profiling of sesquiterpene lactones from *Lactuca* species. **Journal of Biological Chemistry**, 275, p. 26877–26884, 2000.

SGARBIERI, V.C.; GUPTA, S.M.; KRAMER, D.E.; WHITAKER, J.R.; Ficus enzymes. I. Separation of proteolytic enzymes of *Ficus carica* and *Ficus glabrata* lattices. **Journal of Biological Chemistry**, 239, p. 2170–2177, 1964.

SHA, X.M.; TU, Z.C., LIU, W.; WANG, H.; SHI, Y.; HUANG, T.; MAN, Z.Z. Effect of ammonium sulfate fractional precipitation on gel strength and characteristics of gelatin from bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) scale. **Food Hydrocolloids**, 36, p. 173-180, 2014.

SHEWRY, P. R.; LUCAS, J. A. Plant proteins that confer resistance to pests and pathogens. **Advances in botanical research**, 26, p.135-192, 1997.

SINGH, N.K.; BRACKER, C.A.; HASEGAWA, P.M.; HANDA, A.K.; BUCKEL, S.; HERMODSON, M.A.; PFANKOCH, E.; REGNIER, F.E.; BRESSAN, R.A. Characterization of osmotin: a thaumatin-like protein associated with osmotic adaptation in plant cells. **Plant Physiology**, 85, p. 529-536, 1987.

SNOOK, M.E.; DATA, E.S.; KAYS, S.J., Characterization and quantification of hexadecyl, octadecyl and eicosyl esters of p-coumaric acid in the vine and root latex of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.]. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. 42, p. 2589–2595, 1994.

- SOUZA, D.P.; FREITAS, C.D.; PEREIRA, D.A.; NOGUEIRA, F.C.; SILVA, F.D.; SALAS, C.E.; RAMOS, M.V. Laticifer proteins play a defensive role against hemibiotrophic and necrotrophic phytopathogens. **Planta**, 234(1), p. 183-193, 2011.
- SPANÒ, D.; POSPISKOVA, K.; SAFARIK, I.; PISANO, M.B.; PINTUS, F.; FLORIS, G.; MEDDA, R. Chitinase iii in *Euphorbia characias* latex: purification and characterization. **Protein expression and purification**, 116, p. 152-158, 2015.
- SUBROTO, T.; VRIES, H.; SCHURINGA, J.J.; SOEDJANAATMADJA, U.M.S.; HOFSTEENGED, J.; JEKEL, P.A.; BEINTEMA, J.J. Enzymatic and structural studies on processed proteins from the vacuolar (luteoid-body) fraction of latex of *Hevea brasiliensis*. **Plant Physiology Biochemistry**, 39, p. 1047 – 1055, 2001.
- SYTWALA, S.; GÜNTHER, F.; MELZIG, M. F. Lysozyme- and chitinase activity in latex bearing plants of genus Euphorbia: a contribution to plant defense mechanism. **Plant Physiology Biochemistry**, 95, p. 35-40, 2015.
- TATTERSALL, D.B.; HEESWIJCK, R.V.; HOJ, P.B. Identification and characterization of a fruit-specific, thaumatin-like protein that accumulates at very high level in conjunction with the onset of sugar accumulation and berry softening in grapes. *Plant Physiology*, 114, p. 759-769, 1997.
- TIROESELE, B.; THOMAS, K.; SEKETEME, S. Control of cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus* (F.)(Coleoptera: Bruchidae), using natural plant products. **Insects**, 6(1), p. 77-84, 2014
- TOMAR, R.; KUMAR, R.; JAGANNADHAM, M.V., A stable serine protease, wrightin, from the latex of the plant *Wrightia tinctoria* (Roxb.) R. Br.: purification and biochemical properties. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 56, p. 1479–1487, 2008.
- TOMÈ, F.; COLOMBO, M.L. Distribution of alkaloids in *Chelidonium majus* and factors affecting their accumulation. **Phytochemistry**, 40, p. 37–39, 1995.
- TORRES, E.B.; NÓBREGA, R.S.; FERNANDES-JÚNIOR, P.I.; SILVA, L.B.; CARVALHO, G.S.; MARINHO, R.D.C.N.; PAVAN, B.E. The damage caused by *Callosobruchus maculatus* on cowpea grains is dependent on the plant genotype. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 96(12), p. 4276-4280, 2016.

TZOU, Y.M.; HUANG, T.S.; HUGGINS, K.W.; CHIN, B.A.; SIMONNE, A.H.; SINGH, N. K. Expression of truncated tobacco osmotin in *Escherichia coli*: purification and antifungal activity. **Biotechnology letters**, 33(3), p. 539-543, 2011.

UPADHYAY, R. Plant latex: A natural source of pharmaceuticals and pesticides. **International Journal of Green Pharmacy**, 5(3), p. 169 -180, 2011.

PARIJS, J. V.; BROEKAERT, W.F.; GOLDSTEIN, I.J.; PEUMANS, W.J. Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. **Planta**, 183(2), p. 258-264, 1991.

VERBURG, J.G.; HUYNH, Q.K. Purification and characterization of an antifungal chitinase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 95, p. 450-455, 1991.

VIGERS, A.J.; ROBERTS, W.K.; SELITRENNIKOFF, C.P. A new family of plant antifungal proteins. **Molecular Plant Microbe Interaction**, 4, p. 315-323, 1991.

VIGERS, A.J.; WIEDEMANN, S.; ROBERTS, W.K.; LEGRAND, M.; SELITRENNIKOFF, C.P.; FRITIG, B. Thaumatin-like pathogenesis-related proteins are antifungal. **Plant Science**, 83(2), p.155-161, 1992.

VIKTOROVA, J.; KRASNY, L., KAMLAR, M.; NOVAKOVA, M; MACKOVA1, M; MACEK, T. Osmotin, a Pathogenesis-Related Protein. **Current Protein and Peptide Science**, 13, p. 672-681, 2012.

WEI, Y.; PU, J.; ZHANG, H.; LIU, Y.; ZHOU, F.; ZHANG, K.; LIU, X.. The laccase gene (LAC1) is essential for *Colletotrichum gloeosporioides* development and virulence on mango leaves and fruits. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. (2017)

WITITSUWANNAKUL, D.; CHAREONTHIPHAKORN, N.; PACE, M.; WITITSUWANNAKUL, R. Polyphenol oxidases from latex of *Hevea brasiliensis*: purification and characterization. **Phytochemistry**, 61(2), p. 115-121, 2002.

WOLOSHUK, C.P.; MEULENHOF, J.S.; SELA-BUURLAGE, M.; VAN DEN ELZEN, P.J.; CORNELISSEN, B.J., Pathogen-induced proteins with inhibitory activity toward *Phytophthora infestans*. **The Plant Cell**, 3(6), p.619-628, 1991.

XAVIER-FILHO, J.; CAMPOS, F.A.P.; ARY, M.B.; SILVA, C.P.; CARVALHO, M.M.; MACEDO, M.L.R.; LEMOS, F.J.A.; GRANT, G. Poor correlation between the levels of proteinase inhibitors found in seeds of different cultivars of cowpea (*Vigna unguiculata*) and the resistance/susceptibility to predation by *Callosobruchus maculatus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 37, p. 1139-1143, 1989.

TONG, Z.; SUN, Y.; WANG, D.; WANG, L.; LI, L.; MENG, X.; FENG, W.; WURTELE, E. S.; WANG, X. Identification and functional characterization of HbOsmotin from *Hevea brasiliensis*. **Plant Physiology Biochemistry**, 109, p. 171-180, 2016.