



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

**ADELINA BRAGA BATISTA**

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DA *Mo*-CBP3, UMA ALBUMINA 2S DE  
SEMENTES DE *Moringa oleifera* LAMARCK E SEU MODO DE AÇÃO CONTRA  
FUNGOS FITOPATOGÊNICOS**

**FORTALEZA**

**2013**

ADELINA BRAGA BATISTA

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DA *Mo*-CBP3, UMA ALBUMINA 2S DE  
SEMENTES DE *Moringa oleifera* LAMARCK E SEU MODO DE AÇÃO CONTRA  
FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Bioquímica.

Orientador (a): Profa. Dra. Ilka Maria Vasconcelos

FORTALEZA

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

- 
- B336c Batista, Adelina Braga.  
Caracterização estrutural da Mo-CBP3, uma albumina 2s de sementes de moringa *Oleifera lamareck* e seu modo de ação contra fungos fitopatogênicos / Adelina Braga Batista. – 2013.  
154 f. : il., color., enc. ; 30 cm.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciência, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2013.  
Área de Concentração: Bioquímica e Química de Macromoléculas. Orientação: Profa. Dra. Ilka Maria Vasconcelos.
1. Moringa oleifera. 2. Proteína ligante à quitina. 3. Fungos fitopatogênicos. 4. Atividade antifúngica. 5. Caracterização estrutural. I. Título.

ADELINA BRAGA BATISTA

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E MODO DE AÇÃO CONTRA FUNGOS DA Mo-CBP<sub>3</sub>, UMA PROTEÍNA LIGANTE À QUITINA DE SEMENTES DE *Moringa oleifera*  
LAMARCK

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Bioquímica.

Aprovada em: 14 / 05 / 2013

BANCA EXAMINADORA



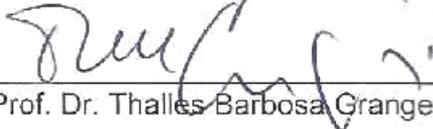
Profª. Dra. Ilka Maria Vasconcelos

Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof. Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira

Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro

Universidade Federal do Ceará (UFC)



Profª. Dra. Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira

Universidade de Fortaleza (UNIFOR)



EMBRAPA

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. **Ilka Maria Vasconcelos**, por me acolher em seu laboratório durante esses seis anos. Em especial, pela amizade e diversos conselhos dados durante esses anos.

Ao **Prof. Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira**, por todo conhecimento transmitido, assim como pela abertura do seu laboratório para o desenvolvimento de grande parte dessa dissertação.

Ao **Professor Dr. Thales Barbosa Grangeiro**, por me auxiliar na parte da tese voltada à caracterização molecular.

À **Profa. Dra. Valdirene Gomes**, que mesmo morando em outro estado, sempre correspondeu prontamente as minhas dúvidas e que auxiliou bastante para o desenvolvimento desta tese.

À **Profa. Dra. Leila Beltramini**, por ter me acolhido em seu laboratório e pela ajuda quanto aos experimentos de espectroscopias.

À **banca examinadora** que aceitou o convite para avaliação deste trabalho.

Ao Laboratório do **Prof. Dr. Hélio Costa**, que teve participação intensa para realização deste trabalho e pela tamanha prestatividade de seus componentes.

Aos colaboradores da Universidade de Fortaleza: **Profa. Dra. Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira e Pepeu Moreno** pela ajuda nos experimentos de espectrometrias de massas.

Aos meus amigos do LABTOX: **Daniele Souza, Paulo Carvalho, Vanessa Duarte, Raquel Rocha, Bella Gisele, Mariana Reis, Raquel Coelho e Juliana Gifoni**, pela convivência agradável durante esses anos e pela amizade.

À minha eterna “**comissão organizadora**”: **Marina Gabriele, Helen Paula, Mirella Pereira, Lucas Pinheiro**, que não tenho palavras para agradecer tudo que fizeram por mim. Sempre estando ali para o que desse e viesse. Eu amo vocês do fundo do meu coração... Sem falar da “**maõzona**” de cada um, que era dada para a

realização dos meus experimentos. Além do apoio nos dias de desânimo e tristeza. A vocês um muito obrigada seria pouco.

**Ao amigo Henrique Pinho**, que esteve comigo nessa jornada acadêmica desde o mestrado e a quem eu devo muito do que aprendi cientificamente e em coisas da vida.

**As minhas novas amigas, Karine Carvalho, Débora Bernardes e Jéssica Rodrigues**, que conheci no Hospital de Messejana, e que quebraram muitos galhos no último ano do meu doutorado. Obrigada pelo carinho, apoio e amizade.

**Ao casal Magnely e Hermógenes**, que sempre levantaram meu ânimo nos dias que eu estava mais tensa e triste com os diversos obstáculos encontrados. Meu muito obrigada!

**Aos amigos de outros laboratórios que foram essenciais para realização desse trabalho: Fredy Davi, Marina Duarte, Gabriela Monteiro, Davi Felipe.**

À minha família: **meus pais**, por toda a dedicação e suporte dados; ao meu irmão **Gustavo**; a minha irmã=amiga=companheira, **Amanda**, que viveu intensamente essa fase da minha vida, compartilhando absolutamente os momentos de alegria e tristeza vividos.

A **DEUS**, por tudo que conquistei e pela coragem dada. **Que soube dar cada coisa, assim como retirar cada qual no momento certo da minha vida.**

**Muito Obrigada!**

## RESUMO

*Mo*-CBP<sub>3</sub> é uma proteína ligante à quitina, purificada de sementes de *Moringa oleifera*, com amplo espectro de ação contra fungos fitopatogênicos. No presente trabalho, novas propriedades estruturais da *Mo*-CBP<sub>3</sub> são descritas, revelando correlação entre sua estabilidade estrutural e atividade antifúngica. Em adição, para melhor compreensão dos mecanismos pelos quais essa proteína exerce ação antifúngica, sua habilidade de induzir a produção endógena de espécies reativas de oxigênio e de causar alterações morfológicas e ultraestruturais foi analisada, usando *Fusarium solani* como modelo. *F. solani* é uma espécie de fácil manuseio e desenvolvimento rápido, ideal para ensaios *in vitro*, e de relevância, por se tratar de um fungo que ataca culturas economicamente importantes. Com foco na utilização segura da *Mo*-CBP<sub>3</sub> como agente químico contra fungos, seus efeitos citotóxicos sobre células eucarióticas também foram investigados. *Mo*-CBP<sub>3</sub> é uma proteína ligante à quitina de 18,0 kDa, de acordo com PAGE-SDS. Todavia, análise por espectrometria de massas revelou que essa proteína consiste de múltiplas isoformas com massas moleculares variando entre 12,2 e 12,3 kDa. *Mo*-CBP<sub>3</sub> é composta por duas cadeias polipeptídicas de 5,0 e 9,0 kDa, denominadas de cadeia A e cadeia B, respectivamente. A cadeia B contém a sequência NH<sub>2</sub>-terminal representada por CPAIQRCCQQLRNIQPPCRCCQ, enquanto que a cadeia A tem o resíduo NH<sub>2</sub>-terminal bloqueado. cDNA codificador da cadeia B foi obtido com iniciadores sintetizados a partir de sua sequência NH<sub>2</sub>-terminal. Análises *in silico* das sequências de nucleotídeos e de aminoácidos deduzida confirmaram a presença de isoformas e massa molecular da *Mo*-CBP<sub>3</sub> e identificaram sítios potenciais de O-glicosilação e fosforilação. Além disso, similaridades entre *Mo*-CBP<sub>3</sub> e outras proteínas de *M. oleifera*, bem como com albuminas 2S, foram detectadas. A estrutura secundária da *Mo*-CBP<sub>3</sub> é composta por 30,3% α-hélices, 16,3% folhas β, 22,3% voltas e 30,4% estruturas ao acaso. Na espectroscopia de fluorescência, excitações de uma solução da *Mo*-CBP<sub>3</sub> a 280 nm e 295 nm produziram emissão máxima a 303 e 309 nm, respectivamente. A estrutura da *Mo*-CBP<sub>3</sub> é altamente estável, se apresentando indiferente às mudanças de temperatura e pH. *Mo*-CBP<sub>3</sub> (0,05-0,1 mg/mL) se mostrou capaz de inibir a germinação de conídios de vários fungos fitopatogênicos, incluindo *F. solani*, *F. oxysporum*, *Colletotrichum musae* e *C. gloeosporioides*. Similarmente, *Mo*-CBP<sub>3</sub> (0,05 mg/mL) foi capaz de inibir o crescimento micelial de *F. solani* e apresentou tanto efeito fungistático como fungicida, dependendo da concentração usada. Ligação da *Mo*-CBP<sub>3</sub> à superfície de células fúngicas ocorre, pelo menos em parte, via interação eletrostática, já que NaCl 0,15 M aboliu seu efeito inibitório. *Mo*-CBP<sub>3</sub> induziu a produção de espécies reativas de oxigênio e causou perda de assimetria e deformações em células de *F. solani*. Desorganização do sistema de endomembranas, condensação do citosol e aumento de vacuolização também foram observados. *Mo*-CBP<sub>3</sub> não mostrou atividade hemolítica e nem foi capaz de alterar a viabilidade das células MCF-7 e Caco-2, sugerindo que essa proteína não é tóxica para células humanas. Com base na alta estabilidade e no amplo espectro de ação contra fungos fitopatogênicos em baixas concentrações e, também, na ausência de citotoxicidade para células humanas testadas, *Mo*-CBP<sub>3</sub> tem grande potencial para desenvolvimento de novas drogas antifúngicas ou na produção de plantas transgênicas mais resistentes a fungos.

Palavras-chave: *Moringa oleifera*; Proteína ligante à quitina; Fungos fitopatogênicos; Atividade antifúngica; Caracterização estrutural.

## ABSTRACT

*Mo*-CBP<sub>3</sub> is a chitin-binding protein purified from *Moringa oleifera* seeds that displays broad inhibitory activity against phytopathogenic fungi. In this work, we report new structural features of *Mo*-CBP<sub>3</sub> that reveal a correlation between its structural stability and antifungal activity. In addition, to gain better insights into the mechanisms by which this protein acts as an antifungal agent, its ability to induce the endogenous production of reactive oxygen species and to trigger morphologic and ultrastructural alterations were analysed using *Fusarium solani* as a model. *F. solani* is an easy-to-handle and fast-developing species, making it ideal for *in vitro* assays, and it holds relevance as a phytopathogenic fungus that attacks economically important crop plants. To fully explore the biosafety of *Mo*-CBP<sub>3</sub> as a chemical agent against fungi, its cytotoxic effects on eukaryotic cells were also investigated. *Mo*-CBP<sub>3</sub> is a chitin-binding protein of 18.0 kDa, according to SDS-PAGE. However, by mass spectrometry analysis, it was observed that this protein consists of multiple isoforms with molecular masses ranging between 12.2 and 12.3 kDa. *Mo*-CBP<sub>3</sub> is composed by two polypeptide chains of 5.0 and 9.0 kDa, named A and B chain, respectively. The B chain contains the following NH<sub>2</sub>-terminal sequence CPAIQRCCQQLRNIQPPCRCCQ while the A chain has a blocked NH<sub>2</sub>-terminal residue. cDNA encoding the B chain was obtained with primers of its NH<sub>2</sub>-terminal sequence. *In silico* analyses of nucleotide and deduced amino acid sequences confirmed the presence of isoforms and molecular mass of *Mo*-CBP<sub>3</sub> and identified potential sites of O-glycosylation and phosphorylation. Moreover, similarities between *Mo*-CBP<sub>3</sub> and other *M. oleifera* proteins as well as 2S albumins were detected. The secondary structure of *Mo*-CBP<sub>3</sub> showed 30.3%  $\alpha$ -helices, 16.3%  $\beta$ -sheets, 22.3% turns and 30.4% unordered forms. In the fluorescence spectroscopy, excitation of *Mo*-CBP<sub>3</sub> solution at 280 nm and 295 nm gave emission maxima at 303 and 309 nm, respectively. The *Mo*-CBP<sub>3</sub> structure is highly stable and retains its antifungal activity regardless of temperature and pH. *Mo*-CBP<sub>3</sub> (0.05-0.1 mg/mL) was able to inhibit the conidia germination of several phytopathogenic fungi, including *F. solani*, *F. oxysporum*, *Colletotrichum musae* and *C. gloeosporioides*. Similarly, *Mo*-CBP<sub>3</sub> was inhibitory to the mycelial mass development of *F. solani* at 0.05 mg/mL and has both fungistatic and fungicidal effects, depending on the concentration used. Binding of *Mo*-CBP<sub>3</sub> to the fungal cell surface is achieved, at least in part, via electrostatic interactions, as 150 mM NaCl abolished its inhibitory effect. *Mo*-CBP<sub>3</sub> induced the production of reactive oxygen species and caused in *F. solani* cells a marked loss of asymmetry, deformations and deep wrinkles in comparison to control cells. Disorganisation of the endomembrane system and condensation and shrinkage of cytosol with increased vacuolation and the loss of normal structure and content were also observed. *Mo*-CBP<sub>3</sub> did not show haemolytic activity and it was not capable to alter de viability of both MCF-7 and Caco-2 cells, suggesting that this protein is not toxic for human cells. Based on its high stability and broad-spectrum efficacy against important phytopathogenic fungi at low inhibitory concentrations and absence of cytotoxicity to human cells, *Mo*-CBP<sub>3</sub> has great potential in the development of new antifungal drugs or in transgenic crops with enhanced resistance to fungi.

Keywords: *Moringa oleifera*; Chitin-binding protein; Phytopathogenic fungi; Antifungal activity; Structural characterization.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b>	Esquema de obtenção do extrato total de sementes de moringa	37
<b>Figura 2 -</b>	Esquema de obtenção da fração proteica ligante em matriz de quitina e eluída com <i>N</i> -acetil-D-glucosamina 0,1 M (P <sub>NAG</sub> ), proveniente do extrato total de sementes de <i>M. oleifera</i>	38
<b>Figura 3 -</b>	Esquema de obtenção da proteína ligante à quitina de <i>M. oleifera</i> , denominada <i>Mo</i> -CBP <sub>3</sub> , a partir da fração proteica eluída com <i>N</i> -acetil-D-glucosamina 0,1 M (P <sub>NAG</sub> ), após cromatografia em matriz Resource S acoplada a sistema FPLC	39
<b>Figura 4 -</b>	Cromatografia em matriz de quitina	59
<b>Figura 5 -</b>	Cromatografia de troca iônica em matriz de Resource S, acoplada a sistema de FPLC	60
<b>Figura 6 -</b>	Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes de <i>Mo</i> -CBP <sub>3</sub>	61
<b>Figura 7 -</b>	Fotomicrografia de esporos de <i>Fusarium solani</i> cultivados no meio contendo <i>Mo</i> -CBP <sub>3</sub>	62
<b>Figura 8-</b>	Cromatografia em matriz de quitina	64
<b>Figura 9 -</b>	Eletroforese em sistema Tricina-Poliacrilamida-SDS de <i>Mo</i> -CBP <sub>3</sub>	65
<b>Figura 10 -</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa (FR-HPLC) de <i>Mo</i> -CBP <sub>3</sub>	67
<b>Figura 11 -</b>	Espectro de massas deconvoluído de <i>Mo</i> -CBP <sub>3</sub> nativa (fração 8) usando fonte de ionização por eletrospray	69
<b>Figura 12 -</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa (FR-HPLC) de <i>Mo</i> -CBP <sub>3</sub>	70
<b>Figura 13 -</b>	Espectro de massas deconvoluído de <i>Mo</i> -CBP <sub>3</sub> reduzida (DTT 0,1 M) e alquilada (IAA 0,3 M), usando fonte de ionização por eletrospray	72

<b>Figura 14</b> -	Espectro de absorção de <i>Mo</i> -CBP <sub>3</sub> . A proteína (1 mg/mL) foi solubilizada em tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,0	74
<b>Figura 15</b> -	Espectro de dicroísmo circular (UV distante) da <i>Mo</i> -CBP <sub>3</sub>	75
<b>Figura 16</b> -	Avaliação da estabilidade estrutural da <i>Mo</i> -CBP <sub>3</sub> frente a diferentes temperaturas, por monitoramento através de dicroísmo circular	76
<b>Figura 17</b> -	Avaliação da estabilidade estrutural da <i>Mo</i> -CBP <sub>3</sub> frente a diferentes valores de pH, por monitoramento através de dicroísmo circular	80
<b>Figura 18</b> -	Espectro de dicroísmo circular (UV próximo) da <i>Mo</i> -CBP <sub>3</sub>	81
<b>Figura 19</b> -	Espectro de emissão de fluorescência da <i>Mo</i> -CBP <sub>3</sub>	82
<b>Figura 20</b> -	Fotomicrografia em microscópio óptico da germinação de conídios de <i>Fusarium oxysporum</i> , incubados em diferentes condições	84
<b>Figura 21</b> -	Fotomicrografia em microscópio óptico da germinação de conídios de <i>Colletotrichum musae</i> , incubados em diferentes condições	85
<b>Figura 22</b> -	Fotomicrografia em microscópio óptico da germinação de conídios de <i>Colletotrichum gloesporioides</i> , incubados em diferentes condições	86
<b>Figura 23</b> -	Fotomicrografia em microscópio óptico da germinação de conídios de <i>Rhizoctonia solani</i> , incubados em diferentes condições	87
<b>Figura 24</b> -	Fotomicrografia em microscópio óptico da germinação de conídios de <i>Fusarium solani</i> , incubados em diferentes condições	88
<b>Figura 25</b> -	Efeito de temperatura sobre a atividade antifúngica de <i>Mo</i> -CBP <sub>3</sub>	89
<b>Figura 26</b> -	Efeito do pH sobre a atividade antifúngica de <i>Mo</i> -CBP <sub>3</sub>	90
<b>Figura 27</b> -	Efeito de <i>Mo</i> -CBP <sub>3</sub> sobre o crescimento micelial e	91

	viabilidade dos conídios de <i>Fusarium solani</i>	
<b>Figura 28</b>	– Efeito do NaCl sobre a atividade antifúngica de <i>Mo-CBP<sub>3</sub></i>	93
<b>Figura 29</b>	– Efeito de <i>Mo-CBP<sub>3</sub></i> sobre a permeabilidade da membrana de <i>Fusarium solani</i>	94
<b>Figura 30</b>	- Indução de espécies reativas de oxigênio (ERO <sub>s</sub> ) em conídios de <i>Fusarium solani</i> tratados com <i>Mo-CBP<sub>3</sub></i>	95
<b>Figura 31</b>	- Microscopia eletrônica de varredura de células de <i>Fusarium solani</i>	96
<b>Figura 32</b>	- Microscopia eletrônica de transmissão de células de <i>Fusarium solani</i>	98
<b>Figura 33</b>	- Avaliação de ação citotóxica de <i>Mo-CBP<sub>3</sub></i>	99
<b>Figura 34</b>	- Eletroforese em gel de agarose 1% do RNA extraído de sementes de <i>Moringa oleifera</i> em diferentes estádios de desenvolvimento	102
<b>Figura 35</b>	- Eletroforese em gel de agarose (1%) dos produtos de RT-PCR obtidos após amplificação com os iniciadores senso (TGYCCGGCNATHCAGCGTTGCTGCCAACAGCTGGG) e antisenso (oligo (dT) - 28 (Promega®), em diferentes temperaturas de anelamento, conforme indicadas na imagem	103
<b>Figura 36</b>	– Análise de restrição dos plasmídeos provenientes de colônias brancas transformadas com insertos de ≈ 390 pb	104
<b>Figura 37</b>	- Dendograma dos clones da cadeia B de <i>Mo-CBP<sub>3</sub></i> , analisadas utilizando o programa MEGA 5.05	107
<b>Figura 38</b>	- Alinhamento das sequências de aminoácidos deduzidas de <i>Mo-CBP<sub>3</sub></i> , usando o programa Clustal W	108
<b>Figura 39</b>	- Alinhamento de sequência putativa da cadeia B de isofo <i>Mo-CBP<sub>3</sub></i> com sequências de outras proteínas	109
<b>Figura 40</b>	- Diagrama do potencial de <i>N</i> -glicosilação na cadeia B de <i>Mo-CBP<sub>3</sub></i>	111

- Figura 41** – Diagrama do potencial de O-glicosilação na cadeia B de *Mo-CBP<sub>3</sub>* 112
- Figura 42** - Diagrama do potencial de fosforilação na cadeia B de *Mo-CBP<sub>3</sub>* 113

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> -	Teores proteicos das diferentes frações resultantes do processo de purificação de Mo-CBP3	58
<b>Tabela 2</b> -	Sumário dos dados obtidos por espectrometria de massas de <i>Mo-CBP<sub>3</sub></i> nativa	68
<b>Tabela 3</b> -	Sumário dos dados obtidos por espectrometria de massas de <i>Mo-CBP<sub>3</sub></i> reduzida (DTT 0,1 M) e alquilada (IAA 0,3 M)	71
<b>Tabela 4</b> -	Distribuição dos padrões de estrutura secundária presentes em <i>Mo-CBP<sub>3</sub></i> , calculados a partir do espectro de dicroísmo circular	78
<b>Tabela 5</b> -	Distribuição dos padrões de estrutura secundária presentes em <i>Mo-CBP<sub>3</sub></i> , calculados a partir do espectro de dicroísmo circular	79
<b>Tabela 6</b> -	Quantificação de RNA total de sementes de <i>Moringa oleifera</i> em diferentes estádios de desenvolvimento	101
<b>Tabela 7</b> -	Cálculos usando a ferramenta ponto isoelétrico/massa molecular (pI/Mw <sup>a</sup> )	106

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
2.1	<b>Fungos Fitopatogênicos</b>	19
2.2	<b>Defesa Vegetal</b>	20
2.3	<b>Proteínas Envolvidas na Defesa Vegetal</b>	21
2.4	<b>Proteínas Antifúngicas e seu Potencial Biotecnológico</b>	23
2.5	<b>Mecanismos de Ação de Proteínas Antifúngicas</b>	25
2.6	<b><i>Moringa oleifera</i> Lamarck</b>	26
2.7	<b>Hipótese do Trabalho</b>	29
3	OBJETIVOS	30
3.1	<b>Geral</b>	31
3.2	<b>Específicos</b>	31
4	MATERIAIS	32
4.1	<b>Sementes de moringa</b>	33
4.2	<b>Fungos filamentosos</b>	33
4.3	<b>Células para clonagem</b>	33
4.4	<b>Enzimas</b>	33
4.5	<b>Reagentes e outros materiais</b>	33
5	MÉTODOS	35
5.1	<b>Obtenção da proteína ligante à quitina de sementes de <i>M. oleifera</i> (<i>Mo-CBP<sub>3</sub></i>)</b>	36
5.2	<b>Determinação de proteínas</b>	40
5.3	<b>Caracterização físico-química e estrutural da <i>Mo-CBP<sub>3</sub></i></b>	40
5.3.1	<b><i>Avaliação da interação de Mo-CBP<sub>3</sub> pura com a matriz de quitina</i></b>	40
5.3.2	<b><i>Caracterização quanto à massa molecular e número de cadeias polipeptídicas</i></b>	40
5.3.2.1	<b><i>Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE-SDS)</i></b>	40

5.3.2.2	<i>Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de tricina (Tricina-PAGE-SDS)</i>	41
5.3.2.3	<i>Cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa (FR-HPLC)</i>	41
5.3.2.4	<i>Espectrometria de massas</i>	42
<b>5.3.3</b>	<b><i>Determinação da sequência NH<sub>2</sub>-terminal</i></b>	<b>43</b>
<b>5.3.4</b>	<b><i>Ensaio de inibição de <math>\alpha</math>-amilase</i></b>	<b>43</b>
<b>5.3.5</b>	<b><i>Análises espectroscópicas</i></b>	<b>44</b>
5.3.5.1	<i>Espectro de absorção</i>	44
5.3.5.2	<i>Espectro de dicroísmo circular distante e próximo</i>	44
5.3.5.3	<i>Espectro de fluorescência</i>	45
<b>5.4</b>	<b><i>Avaliação do espectro e modo de ação contra fungos de <i>Mo-CBP<sub>3</sub></i></i></b>	<b>45</b>
<b>5.4.1</b>	<b><i>Ensaio de inibição da germinação de fungos fitopatogênicos</i></b>	<b>45</b>
<b>5.4.2</b>	<b><i>Ensaio de inibição do crescimento micelial de <i>F. solani</i></i></b>	<b>46</b>
<b>5.4.3</b>	<b><i>Avaliação do efeito do pH e temperatura sobre a inibição da germinação do fungo <i>F. solani</i> causada por <i>Mo-CBP<sub>3</sub></i></i></b>	<b>47</b>
<b>5.4.4</b>	<b><i>Avaliação da interação eletrostática de <i>Mo-CBP<sub>3</sub></i> com a membrana conidial de <i>F. solani</i></i></b>	<b>47</b>
<b>5.4.5</b>	<b><i>Avaliação sobre a permeabilidade da membrana do conídio</i></b>	<b>47</b>
<b>5.4.6</b>	<b><i>Avaliação da indução da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)</i></b>	<b>48</b>
<b>5.4.7</b>	<b><i>Microscopia eletrônica de varredura</i></b>	<b>48</b>
<b>5.4.8</b>	<b><i>Microscopia eletrônica de transmissão</i></b>	<b>48</b>
<b>5.5</b>	<b><i>Avaliação da ação citotóxica de <i>Mo-CBP<sub>3</sub></i> sobre células eucarióticas</i></b>	<b>49</b>
<b>5.5.1</b>	<b><i>Teste de lise de hemácias</i></b>	<b>49</b>
<b>5.5.2</b>	<b><i>Ensaio de viabilidade celular</i></b>	<b>49</b>
<b>5.6</b>	<b><i>Isolamento, clonagem e caracterização do DNA complementar (cDNA) de <i>Mo-CBP<sub>3</sub></i></i></b>	<b>50</b>
<b>5.6.1</b>	<b><i>Coleta de sementes e extração de RNA total</i></b>	<b>50</b>
<b>5.6.2</b>	<b><i>Purificação do RNA total</i></b>	<b>51</b>
<b>5.6.3</b>	<b><i>Síntese de cDNA</i></b>	<b>52</b>
<b>5.6.4</b>	<b><i>Sequenciamento de DNA</i></b>	<b>53</b>
<b>5.7</b>	<b><i>Análise estatística</i></b>	<b>54</b>

6	RESULTADOS	55
6.1	Obtenção de <i>Mo</i> -CBP <sub>3</sub>	57
6.2	Interação de <i>Mo</i> -CBP <sub>3</sub> pura com a matriz de quitina	63
6.3	Caracterização quanto à massa molecular e número de cadeias polipeptídicas de <i>Mo</i> -CBP <sub>3</sub>	63
6.4	Sequência NH <sub>2</sub> -terminal das cadeias polipeptídicas de <i>Mo</i> -CBP <sub>3</sub>	73
6.5	Espectro de absorção da <i>Mo</i> -CBP <sub>3</sub>	73
6.6	Espectro de dicroísmo circular distante da <i>Mo</i> -CBP <sub>3</sub> e avaliação de sua estabilidade estrutural frente à diferentes temperaturas e valores de pH	73
6.7	Espectro de dicroísmo circular próximo	77
6.8	Espectro de fluorescência	77
6.9	Espectro de ação da <i>Mo</i> -CBP <sub>3</sub> frente à germinação de conídios de fungos fitopatogênicos	83
6.10	Modo de ação da <i>Mo</i> -CBP <sub>3</sub> , usando como modelo experimental o fungo <i>F. solani</i>	83
6.11	Avaliação de ação citotóxica causada pela <i>Mo</i> -CBP <sub>3</sub> , usando como modelos eritrócitos e células cancerosas	97
6.12	Obtenção do RNA Total	100
6.13	Síntese de cDNA	100
6.14	Sequenciamento do cDNA	105
7	DISCUSSÃO	114
8	CONCLUSÃO	127
9	REFERÊNCIAS	129

# ***1 INTRODUÇÃO***

Estimativas apontam uma redução da produção agrícola mundial entre 20-40%, em decorrência do ataque de fitopatógenos, dentre os quais os fungos, que são responsáveis por uma perda de 12% na produtividade de grãos (LEE *et al.*, 2003; RONALD; ADAMCHAK, 2008; NÜRNBERGER; GUST; BRUNNER, 2010; SANKARAN *et al.*, 2010; VOGT *et al.*, 2013). A aplicação de antifúngicos sintéticos tem sido uma das estratégias utilizadas na agricultura para reduzir tais prejuízos (KRUPINSKY *et al.*, 2002; SPADARO; GULLINO, 2004; FENOLL *et al.*, 2010; KUTCHER *et al.*, 2011). Entretanto, essas substâncias químicas estão associadas a uma série de desvantagens. Como exemplos, podem ser citados o perigo que causam à saúde humana e, também, o aumento do número de fungos resistentes a esses compostos mediante a aplicações prolongadas (MENG *et al.*, 2010; MAREI; RASOUL; ABDELGALEIL, 2012). Os antifúngicos sintéticos ainda são responsáveis por deixar resíduos indesejáveis no meio ambiente e nos alimentos, além de não se apresentarem tão eficientes, por reduzir em apenas 7% os prejuízos na agricultura (CARLINI; GROSSI-DE-SÁ, 2002; FIELDS, 2006; SMAGGHE *et al.*, 2006; DELIOPOULOS; KETTLEWELL; HARE, 2010).

Na tentativa de amenizar o quadro apresentado, estudos têm sido direcionados para a detecção de novas substâncias bioativas contra fitopatógenos (TEGEGNE; PRETORIUS; SWART, 2008; RIZZELLO *et al.*, 2009; BAO *et al.*, 2010; BAI *et al.*, 2013). Muitas das substâncias descritas são de natureza proteica e, a maioria dessas, de origem vegetal, dada à grande biodiversidade desse reino. Algumas dessas proteínas têm se mostrado passíveis de serem expressas em plantas transgênicas, devido ao seu potencial em proteger culturas economicamente importantes, contribuindo para a redução do uso de produtos químicos na agricultura (GAO *et al.*,

2000; VILA *et al.*, 2001; GONZALES *et al.*, 2002; MORENO *et al.*, 2003; HO; WONG; NG, 2007; CHATTOO *et al.*, 2010; SVECOVÁ *et al.*, 2013).

Dentre as proteínas possivelmente envolvidas na defesa vegetal, encontram-se as proteínas ligantes à quitina, que merecem um destaque especial, por afetarem negativamente o crescimento de fungos e insetos, uma vez que quitina está presente na constituição desses organismos (ASENSIO *et al.*, 2000; NAUMANN; WICKLOW; KENDRA, 2009; JAGANNADHAM *et al.*, 2010; NÜRNBERGER; GUST; BRUNNER, 2010; KOMBRINK; SANCHEZ-VALLET; THOMMA, 2011). A quitina é um biopolímero insolúvel, linear, composto por subunidades de *N*-acetil-D-glucosamina unidas por ligações  $\beta$ -(1,4), estando ligada covalentemente a  $\beta$ -1,3 glucanos (RAIKHEL; LEE, 1993; LATGE, 2007; MEZENDORFER, 2011). É o segundo polímero mais abundante na natureza (LENARDON; MUNRO; GOW, 2010). A presença de quitina na parede celular de fungos e sua ausência nas plantas sugerem que algumas proteínas ligantes à quitina parecem proteger os vegetais contra o ataque de fungos, através da degradação de quitina, como exemplo, as quitinases, ou mesmo por interagirem com a quitina, o que leva à perda das propriedades estruturais e funcionais desse polissacarídeo quitina (WANG; GRANADOS, 2000; ZAREIE; MELANSON; MURPHY, 2002; NAUMANN *et al.*, 2009).

Com base no conhecimento de que a espécie *Moringa oleifera* Lamarck parece apresentar um importante arsenal proteico de defesa contra predadores, uma vez que é bastante resistente às doenças, sendo afetada por poucas espécies de insetos e capaz de inibir o crescimento de bactérias e fungos (RAMACHADRAN; PETER; GOPALAKRISHNAN, 1980; NEPOLEAN; ANNITA; RENITHA, 2009), nosso grupo de pesquisa iniciou estudo com essa espécie. Gomes (2002) verificou a presença de proteínas ligantes à quitina em extratos aquosos das sementes. Posteriormente, Gifoni (2005) observou que frações contendo tais proteínas foram capazes de inibir a germinação de conídios de várias espécies de fungos fitopatogênicos, incluindo *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, *Aspergillus niger*, *Colletotrichum lindemuthianum* e *C. gloesporioides*. Esse estudo foi dado prosseguimento, tendo sido isolada uma proteína com atividade antifúngica a partir da fração contendo as proteínas ligantes à quitina, tendo sido denominada *Mo*-CBP<sub>3</sub> ("*Moringa oleifera* chitin-binding protein") (GIFONI *et al.*, 2012). Essa proteína apresenta uma massa molecular aparente de 14,3 kDa e ponto isoelétrico de 10,8. Trata-se de uma glicoproteína com 2,5% de

carboidratos, que não apresenta atividades hemaglutinante, quitinásica e  $\beta$ -1,3 glucanásica. Uma sequência NH<sub>2</sub>-terminal com 22 aminoácidos foi obtida, representada por CPAIQRCCQQLRNIQPPCRCCQ. Mo-CBP<sub>3</sub> se mostrou capaz de inibir totalmente a germinação dos conídios dos fungos acima mencionados na concentração de 0,1 mg/mL, tendo mantido sua atividade antifúngica mesmo quando aquecida a 100 °C, por 1 h e, também, quando pré-incubada com o açúcar *N*-acetil-D-glucosamina. Mo-CBP<sub>3</sub> foi inativa contra o oomiceto *Pythium oligandrum*, que apresenta celulose na parede celular, ao invés de quitina, evidenciando a especificidade dessa proteína por quitina. Mo-CBP<sub>3</sub> foi capaz de inibir em 80% a acidificação do meio, induzida por glicose, em conídios de *F. solani*, o que sugere sua influência sobre as bombas de prótons (H<sup>+</sup>ATPases) presentes na membrana celular do fungo.

Diante do exposto, Mo-CBP<sub>3</sub> mostra-se uma proteína promissora para utilização contra fungos fitopatogênicos, uma vez que mostrou atividade a uma concentração proteica baixa, quando comparada a outras proteínas de origem vegetal (COSTA *et al.*, 2002; CARUSO *et al.*, 2009; BAO *et al.*, 2010; MA; WANG; NG, 2010; MUÑOZ *et al.*, 2012; BAHNSEN *et al.*, 2013). Adicionalmente, trata-se de uma proteína termoestável. No entanto, para utilização dessa proteína como ferramenta biotecnológica no controle de doenças causadas por fungos, são necessários conhecimentos prévios acerca de sua estrutura e de seu espectro e mecanismo de ação antifúngica, bem como de sua citotoxicidade para células eucariontes. Em consonância com isso, surgiram os seguintes questionamentos:

- *Uma vez que Mo-CBP<sub>3</sub> é oriunda de uma fração proteica ligante à quitina, essa capacidade de interação com a matriz de quitina seria alterada na proteína pura?*
- *Informações referentes à caracterização estrutural de Mo-CBP<sub>3</sub> possibilitariam um melhor compreensão de seu potencial antifúngico?*
- *Qual seria o espectro de ação de Mo-CBP<sub>3</sub> frente a outros fungos fitopatogênicos de importância agrônômica?*
- *Além de inibir a germinação de conídios, Mo-CBP<sub>3</sub> teria ação sobre a fase de crescimento micelial do fungo?*
- *A ação antifúngica de Mo-CBP<sub>3</sub> seria fungicida ou fungistática?*

- *Após contato de Mo-CBP<sub>3</sub> com a célula fúngica, que alterações estruturais e metabólicas seriam decorrentes?*
- *Qual seria o provável mecanismo de ação de Mo-CBP<sub>3</sub>?*
- *O isolamento, clonagem e caracterização do gene de Mo-CBP<sub>3</sub> permitiriam um entendimento mais aprofundado sobre o seu potencial para aplicação biotecnológica?*

## ***2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA***

## 2.1 Fungos Fitopatogênicos

Estima-se que há mais de 1,5 milhões de espécies fúngicas no mundo, embora apenas cerca de 70.000 tenham sido descritas. Fungos são microrganismos eucariotos, heterotróficos, aclorofilados, absorptivos, imóveis, possuindo como principais barreiras de proteção, a membrana plasmática e a parede celular (ADAMS, 2004).

A parede celular de fungos é composta por polímeros lineares de  $\beta$ -1,4-*N*-acetil-D-glucosamina (quitina) ou celulose (oomicetos),  $\alpha$ -1,3-glucanos,  $\beta$ -1,3-glucanos e  $\beta$ -1,6-glucanos, lipídios, peptídeos e uma matriz proteica, variando a proporção, concentração e disposição desses elementos entre as espécies ou mesmo entre as fases do ciclo de vida da mesma espécie (HARDHAM; MITCHELL, 1998; CANTU *et al.*, 2009; AIRES *et al.*, 2012).

A interação planta-fungo inicia-se com a interface das paredes celulares de ambos (CANTU *et al.*, 2008; LAZNIEWSKA; MACIOSZEK; KNONOWICZ, 2012). Para o estabelecimento da infecção fúngica na planta, inicialmente, ocorre liberação de moléculas adesivas, que são responsáveis pela fixação do fungo à superfície da planta. Em seguida, ocorre secreção de enzimas hidrolíticas capazes de lisar a parede celular vegetal e outros componentes, o que possibilita a penetração e nutrição do fungo. Por último, ocorre a diferenciação de estruturas de infecção especializadas para dar continuidade à colonização (HARDHAM; MITCHELL, 1998; RIBEIRO *et al.*, 2007; POCHIECHA *et al.*, 2013).

Diversas doenças em plantas podem ser causadas por fungos filamentosos. Como exemplos de fungos fitopatogênicos, podem ser citados *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum gloeosporioides* e *C. musae*. Algumas características desses fungos foram descritas por Bergamin e colaboradores (1995), que incluem as informações a seguir: *F. solani* ataca culturas de feijão, ervilha, batata, maracujá e pimenta-do-reino. Esse fungo causa a podridão vermelha da raiz; *F. oxysporum* causa murcha em diversas plantas, facilmente observados na fase de pré-florescimento ou enchimento de grãos; *R. solani* causa podridão de raízes, podridão branca da haste, secagem e queima de folhagens em culturas de algodão, amendoim, arroz, cebola etc. e *Colletotrichum sp.* ocasiona antracnose, que ataca todas as partes da planta em qualquer fase do crescimento. O primeiro sintoma dessa doença é o aparecimento nas folhas de pequenas manchas, irregulares, de cores amarela marrom

ou preta. *C. gloeosporioides* atinge diversas culturas, abrangendo o abacate, alho, berinjela, caju, uva etc. Enquanto o *C. musae* ataca especificamente a banana.

## 2.2 Defesa Vegetal

Ao longo da evolução, as plantas desenvolveram um sofisticado e elaborado sistema de defesa, como forma de proteção diante do grande número de potenciais inimigos que as cercam, abrangendo fungos, insetos, bactérias, vírus, ácaros, nematóides e mamíferos. Esse mecanismo de defesa é mediado por reações complexas, muitas delas sendo ativadas em resposta a tais agressores (SHAO *et al.*, 1999; VERONESE *et al.*, 2003; FERREIRA *et al.*, 2007; CHANG; PURYEAR; CAIRNEY, 2008; GOSH, 2009; KOÇ *et al.*, 2011). Essas reações apresentam semelhanças com o sistema de imunidade inata dos animais, isto é, não mediado por anticorpos (GARCIA-OLMEDO *et al.*, 1998; XIE *et al.*, 2010; ROGOZHIN *et al.*, 2012).

Duas grandes classes de estratégias relacionadas à defesa de plantas contra o ataque de pragas e patógenos compreendem as defesas pré-formadas ou constitutivas e as defesas pós-formadas ou induzidas (NÜRNBERGER *et al.*, 2004; YANG *et al.*, 2010; BAI *et al.*, 2013). As defesas constitutivas são compostas de estruturas físicas e químicas, que funcionam como barreiras visando conter a invasão de microrganismos. As defesas físicas são representadas por pelos, tricomas, espinhos, ceras, parede celular, dentre outras estruturas. Já as defesas químicas consistem de reações bioquímicas que ocorrem nas células e tecidos vegetais, produzindo substâncias com ação tóxica ao patógeno ou que são capazes de criar condições adversas ao seu desenvolvimento na planta (BOWLES, 1990; OLIVEIRA *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2010). Essas substâncias são representadas por terpenoides, ácidos hidroxâmicos, glicosídeos cianogênicos, compostos fenólicos, peptídeos, dentre outras (MENEZES; JARED, 2002; LEE *et al.*, 2012).

A outra linha de defesa, compreendendo os mecanismos de resposta induzidos, corresponde qualquer mudança morfológica ou fisiológica, resultante da ação de patógenos. Quando as plantas são atacadas por fitopatógenos, é desenvolvido um mecanismo de defesa conhecido como Reação de Hipersensibilidade (HR) (LAMB; DIXON, 1997; TRIVED *et al.*, 2010). Essa resposta é caracterizada pela falência rápida do tecido vegetal ao redor do sítio de infecção, resultando em necrose, que impossibilita a propagação do patógeno para outros tecidos da planta, interrompendo,

assim, a manifestação da doença. A planta também pode desenvolver uma resposta conhecida como Resistência Sistêmica Adquirida (SAR), sendo estabelecida após a HR. Essa resposta é caracterizada pela ativação sistêmica de várias classes de genes que codificam proteínas relacionadas à patogênese, denominadas simplesmente de PR-proteínas, e pelo desenvolvimento de uma resistência prolongada a infecções causadas por uma gama de patógenos, inclusive por aqueles diferentes do patógeno que iniciou o ataque (STINTZI *et al.*, 1993; KESSMANN *et al.*, 1994; VAN LOON; VAN STRIEN, 1999; CARUSO *et al.*, 2009; SANTNER; CALDERON-VILLALOBOS; ESTELLE, 2009; PIETERSE, 2012).

### 2.3 Proteínas Envolvidas na Defesa Vegetal

As plantas dispõem de um vasto número de peptídeos e proteínas, dentre outras substâncias, capazes de protegê-las contra o ataque de pragas e patógenos. A síntese de algumas dessas proteínas é induzida por agentes bióticos ou abióticos, outras são expressas constitutivamente (VAN DEN BERGH *et al.*, 2002, OLIVEIRA *et al.*, 2004; LÓPEZ; GÓMEZ-GÓMEZ, 2009; CARRILLO *et al.*, 2011).

Várias são as proteínas vegetais supostamente envolvidas na defesa da planta. As mais conhecidas incluem lectinas, inibidores de proteases, proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs dos tipos 1 e 2) e glico-hidrolases (BOWLES, 1990; CHRISPEELS; RAIKHEL, 1991; PEUMANS; VAN DAMME, 1995; KOIWA; BRESSAN; HASEGAWA, 1997; NASI; PICARIELLO; FERRANTI, 2009; GE; BI; GUEST, 2013). Uma família que, também, merece destaque é a das PR-proteínas, em particular as quitinases (SINGH; KIRUBAKARAN; SAKTHIVEL, 2007; GOMES *et al.*, 2010). Outras proteínas envolvidas na defesa de plantas são as arcelinas, canatoxina, toxinas da soja e formas modificadas de proteínas de estocagem (CARLINI; GROSSI-DE-SÁ, 2002; VASCONCELOS *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2010). Há, ainda, um grupo de compostos de defesa denominado de peptídeos antimicrobianos ou AMP, compreendendo tioninas, defensinas, proteínas de transferência de lipídios, peptídeos tipo heveína e tipo “knottin” (VAN DEN BERGH *et al.*, 2002; SELS *et al.*, 2008; DE CONINCK; CAMMUE; THEVISSEN, 2013). Alguns dos compostos citados defendem o vegetal do ataque de insetos fitófagos, outros de fungos, bactérias ou vírus. Há, ainda, aqueles que são potentes contra a ação de mais de um tipo de agente agressor (DATTA; MUTHUKRISHNAN, 1999; LI; CLAESON, 2003; LAM; NG, 2009).

Dentre os compostos citados, ressaltam-se aqueles ligantes à quitina nativa e/ou a oligômeros de *N*-acetil-D-glucosamina (GlcNac). Muitas proteínas ligantes à quitina, cuja sequência aminoacídica é conhecida, contêm um motivo estrutural comum de 30 a 43 resíduos de aminoácidos, com muitas cisteínas e glicinas em posições conservadas, conhecido como domínio de ligação à quitina ou domínio heveínico (ASENSIO *et al.*, 2000; TRINDADE *et al.*, 2006).

Em geral, as proteínas ligantes à quitina estão classificadas em diferentes classes: peptídeos do tipo heveína, lectinas, quitinases e peptídeos do tipo *Ac*-AMP (Peptídeos Antimicrobianos de *Amaranthus caudatus*) (HUANG; XIE; GONG, 2000). A heveína é uma merolectina monomérica de 5 kDa encontrada no látex da seringueira (*Hevea brasiliensis*), possui 43 resíduos de aminoácidos e um único domínio de ligação à quitina (VAN PARIJS *et al.*, 1991; COLOMBO *et al.*, 2005; VANDERBORRE; SNAGGHE; VAN DAMME, 2011). Outro peptídeo tipo heveína foi isolado da casca de *Euonymus europaeus*, denominado *Ee*-CBP (VAN DEN BERGH *et al.*, 2002). Li e Claeson (2003) descobriram uma pequena proteína ligante à quitina do tipo heveína presente em sementes de aveia, designada *avesina A*. Associadamente com os *Ac*-AMPs, esses peptídeos compõem a família IV de PR-proteínas (PR-4). Essa família é caracterizada por agrupar proteínas de baixa massa molecular, variando de 3,1 a 20 kDa, de *pI* básico, que são capazes de se ligar à quitina, porém, com atividades hemaglutinante ou quitinásica ausentes (THEIS; STAHL, 2004).

Lectinas têm mostrado ação contra fungos. Essa ação é verificada especialmente naquelas que se ligam à quitina, como as lectinas de batata e tomate (SCHLUMBAUM *et al.*, 1986). A lectina de *Urtica dioica* (UDA), com 8,5 kDa, é outro exemplo, tendo se mostrado capaz de inibir o crescimento de diversos fungos por atuar na síntese e/ou deposição de quitina na parede celular (BROEKAERT *et al.*, 1989). Ação antifúngica também foi verificada na heveína (500-2000 µgP/mL), que mostrou atividade inibitória sobre a germinação de esporos e crescimento de hifas de *Pyrenophora tritici-repentis* (VAN PARIJS *et al.*, 1991). Melo e colaboradores (2005) observaram potencial antifúngico da lectina cotiledonária de *Lutzelburgia auriculata* (LAA), tendo sido constatada sua liberação no meio circundante durante a germinação, além da expressiva inibição dos fitopatógenos *C. lindemuthianum*, *F. solani*, *Aspergillus niger* e *Sacharomyces cerevisiae*.

Além das lectinas, um destaque também deve ser dado para as PR-proteínas. Essas proteínas foram reunidas em diferentes grupos, de acordo com suas

características físico-químicas e imunológicas, assim como grau de similaridade (STINTZI *et al.*, 1993). Atualmente, as PR-proteínas estão classificadas em 17 grupos, todos esses apresentando atividade antifúngica e/ou antibacteriana *in vitro*. Muitas dessas proteínas estão expressas constitutivamente nas plantas, porém, em baixos níveis. Outras nem mesmo são detectadas em condições fisiológicas normais. Todavia, em ambos os casos, uma elevação significativa é observada quando o vegetal é submetido a condições de estresse (CHRISTENSEN *et al.*, 2002; VAN LOON *et al.*, 2006; LU *et al.*, 2013). Dentro do grupo das PR-proteínas, sobressaem-se como potentes proteínas de defesa as quitinases, que pertencem à família III de PR-proteínas. Quitinases são agrupadas em cinco classes, de acordo com suas características estruturais e sequências de aminoácidos (VAN LOON, 2006). Essas enzimas são capazes de hidrolisar a quitina (CHEONG *et al.*, 2000; KAO *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2013). Os principais alvos das quitinases são os fungos fitopatogênicos. Como exemplos de quitinases antifúngicas, as de milho, tabaco, ervilha, abacaxi, feijão, trigo e cevada podem ser citadas, tendo sido verificados seus efeitos inibitórios na germinação de esporos e/ou desenvolvimento de hifas (TAIRA; TOMA; ISHIHARA, 2005). A atividade antifúngica das quitinases pode, ainda, ser potencializada pela sua associação com outras proteínas de defesa, dentre elas osmotinas,  $\beta$ -1,3-glucanases e proteínas inativadoras de ribossomos (NEUHAUS, 1999).

Em relação aos Ac-AMPs, esses peptídeos compõem a família IV de PR-proteínas (PR-4). Essa família é caracterizada por agrupar proteínas com baixa massa molecular, variando de 3,1 a 20 kDa, de pl básico, que são capazes de se ligar à quitina, sendo desprovidas de atividades hemaglutinante ou quitinásica (THEIS; STAHL, 2004).

## **2.4 Proteínas Antifúngicas e seu Potencial Biotecnológico**

A cultura de grãos em todo o mundo sofre grandes perdas devido a doenças causadas por fungos. Os avanços nas tecnologias de engenharia genética e a compreensão da natureza molecular dos mecanismos de proteção vegetal têm fornecido meios para o desenvolvimento de novas estratégias de controle de doenças vegetais, em adição às técnicas tradicionais baseadas no emprego de defensivos químicos ou esquemas clássicos de produção (SHAKHBAZAU; KARTEL, 2008; GATTO *et al.*, 2011).

Desde o primeiro cultivo comercial de plantas transgênicas em 1996, a área global de plantas transgênicas cresceu para 170.3 milhões de hectares em 2012 (JAMES, 2013). Recentes pesquisas relacionadas à aplicação de técnicas de biologia molecular e biotecnologia envolvem a identificação, caracterização e clonagem de genes envolvidos na defesa de plantas. Com base nessas metodologias, os possíveis candidatos a serem (e que estão sendo) utilizados na produção de espécies resistentes são genes envolvidos na expressão de:

- Produtos de genes de resistência (R) envolvidos no reconhecimento Avr de patógenos (CHEN *et al.*, 2007; GURURANI *et al.*, 2012);
- Produtos capazes de liberar sinais que controlam as respostas de defesa (JIAN-JUN *et al.*, 2008; ROHWER; ERVIN, 2008; YU *et al.*, 2011);
- Produtos que sejam diretamente tóxicos para fungos ou que interfiram em seu crescimento, como PR-proteínas (glucanases e quitinases), proteínas antifúngicas (osmotinas e tipo taumatina), peptídeos antimicrobianos (tioninas, defensinas etc) e proteínas inativadoras de ribossomos (TEIXEIRA *et al.*, 2007; TAMBURINO *et al.*, 2012);
- Produtos que podem aumentar a defesa estrutural dos vegetais, como peroxidases (HAMID; REHMAN, 2009; ZIPOR; OREN-SHAMIR, 2013);
- Produtos que destroem ou neutralizam parte do arsenal bioquímico do patógeno, como poligalacturonases, ácido oxálico e lipases (DONOFRIO; DELANEY, 2001; HASTRUP *et al.*, 2012).

Nesse contexto, proteínas antifúngicas são identificadas e analisadas quanto à atividade *in vitro* contra patógenos. Basicamente, uma proteína é dita antifúngica quando capaz de interferir no crescimento ou reprodução de determinadas espécies de fungos. Como mecanismo geral de ação, essas proteínas compartilham a capacidade de hidrolisar os polímeros que constituem a parede celular, como quitinases e glucanases, ou de ativar respostas celulares que interferem na formação direta da parede celular (NG, 2004; SVECOVÁ *et al.*, 2013). Para tanto, esforços significativos têm sido direcionados para detecção de proteínas antifúngicas e suas expressões em plantas transgênicas (GARCIA-OMELDO *et al.*, 1998; GAO *et al.*, 2000; JAGANNADHAM *et al.*, 2010; AGUILETA *et al.*, 2012).

Quitinases são exemplos de proteínas antifúngicas que tem sido largamente usada no controle de fungos através de engenharia genética. A expressão de

quitinases na planta causa lise da hifa do fungo e da parede celular dos esporos, portanto, reduzindo o crescimento do fungo (MAUCH; STAEHELIN, 1989; JAGANNADHAM *et al.*, 2010). Plantas economicamente importantes como trigo, cana-de-açúcar, algodão e amendoim engenheiradas com genes de quitinases mostraram uma maior defesa contra alguns fungos fitopatogênicos, como *R. solani*, *Botrytis cinerea*, *Cercospora arachidicola*, *Alternaria solani* etc (GANESAN; JAYABALAN, 2006). Plantas transgênicas superexpressando PR-proteínas também tem aumentado a resistência a doenças fúngicas (CORNELISSEN; MELCHERS, 1993; SELITRENNIKOFF, 2001; SINGH; KIRUBAKARAN; SAKTHIVEL, 2007; ZHANG *et al.*, 2013). Entretanto, o pré-requisito para obtenção de promissoras plantas transgênicas resistentes a fungos é o isolamento e caracterização de genes codificadores de proteínas antifúngicas com um largo espectro de ação para diferentes espécies de plantas (SINGH; KIRUBAKARAN; SAKTHIVEL, 2007).

Alternativamente, o aumento da resistência da planta à infecção fúngica pode ser obtido com a combinação de várias proteínas antifúngicas. Como foi verificado em arroz (*Oriza sativa* L.), no qual a coprodução de quitinases e  $\beta$ -1,3 glucanases resultou na proteção aumentada contra *R. solani*, quando comparada com a espécie transfectada com apenas um dos genes (VELUTHAMBI *et al.*, 2008).

Embora os custos para obtenção de espécies transgênicas sejam mais elevados em relação ao melhoramento genético convencional ou assistido por marcadores moleculares, a produção de organismos geneticamente modificados parece ser uma estratégia viável. Adicionalmente, muitas espécies que expressam proteínas heterólogas se tornam resistentes a diferentes fungos.

## **2.5 Mecanismos de Ação de Proteínas Antifúngicas**

Os mecanismos de ação dos peptídeos e proteínas antifúngicos são diversos, sendo os mais comuns aqueles envolvendo uma atuação direta na membrana plasmática e/ou na parede celular do fungo ou, ainda, em alvos intracelulares (SELITRENNIKOFF, 2001; THEIS; STAHL, 2004; WANG; NG, 2005; HEGEDUS; MARX, 2013).

A membrana celular dos fungos é formada por uma bicamada lipídica composta de fosfolipídeos, esfingolipídeos e esteróis, sendo alvo de vários grupos de peptídeos e proteínas antifúngicos (TOSSI; SANDRI; GIANGASPERO, 2000; KATHIRAVAN *et al.*,

2012). Essa membrana, a rigor, funciona como uma barreira dotada de permeabilidade seletiva, além de participar de outras funções importantes, tais como transdução de sinais, transporte de solutos, alvo energético, replicação do DNA, secreção, dentre outras. As proteínas antifúngicas são capazes de interagir com componentes lipídicos dessa membrana, levando à formação de poros, alteração no potencial de membrana e efluxo de componentes celulares essenciais (PATTON; LESTER, 1991; THEIS; STAHL, 2004; POSTAL *et al.*, 2012). Outra forma de atuação das proteínas antifúngicas seria nas proteínas periféricas ou integrais presentes na membrana celular. Melo e colaboradores (2005) demonstraram que a lectina cotiledonária de *L. auriculata* era capaz de promover ação inibitória sobre fungos, através de sua interação com bombas H<sup>+</sup>-ATPases presentes na membrana celular. Essas bombas de prótons são responsáveis pela regulação e manutenção do gradiente de prótons necessário para a entrada de nutrientes na célula (SERRANO, 1989; MONK; PERLIN, 1994), em um processo denominado antiporte.

Outro mecanismo de ação antifúngico seria pela capacidade de proteínas interagirem, degradarem, ou inibirem a produção de qualquer um dos constituintes da parede celular do fungo, constituída por quitina,  $\beta$ -1,3- e  $\beta$ -1,6-glucanos, ácidos urônicos, mananas e proteínas (GIL *et al.*, 2010). Exemplos de proteínas antifúngicas que atuam por esse mecanismo incluem  $\beta$ -1,3-glucanases (RAIKHEL; LEE, 1993), quitinases (SINGH; KIRUBAKARAN; SAKTHIVEL, 2007; WANG *et al.*, 2012), lectinas (VAN PARIJS *et al.*, 1991; SOUZA *et al.*, 2011), proteases (MENDIETA *et al.*, 2006), dentre outras.

Proteínas antifúngicas podem, ainda, penetrar na célula fúngica e interagir com uma variedade de alvos intracelulares, prejudicando, por exemplo, a síntese de proteínas, DNA, RNA e esteróis (ODDS; BROWN; GOW, 2003; FANG *et al.*, 2010). Algumas proteínas inativadoras de ribossomos são bons exemplos, possuindo atividade antifúngica intrínseca devido à sua habilidade em depurar o rRNA, resultando no impedimento da síntese proteica. RIPs do tipo 2 podem, inclusive, se ligar às células fúngicas e formar um canal, que permite a entrada do efêmero (cadeia A), possuidor de atividade N-glicosidásica, provocando danos ao RNA (HWU *et al.*, 2000).

Embora haja uma corrida científica na busca de proteínas antifúngicas com potencial de biocontrole de fungos fitopatogênicos, muitas dessas proteínas permanecem com o seu mecanismo de ação ainda desconhecido (YE,NG; 2009)

## 2.6 *Moringa oleifera* Lamarck

A espécie *Moringa oleifera*, chamada comumente de moringa, pertence à família Moringaceae, que é constituída por apenas um gênero: *Moringa* (OLIVEIRA *et al.*, 1999; BHATTI *et al.*, 2007). Trata-se de uma espécie nativa do Noroeste da Índia (RAMACHADRAN; PETER; GOPALAKRISHNAN, 1980; BHUPTAWAT; FOLKARD; CHAUDHARI, 2007), sendo amplamente cultivada em regiões tropicais como Ásia, África e América do Sul (FAHEY, 2005; ANWAR *et al.*, 2007). No Brasil, é encontrada na região Nordeste, principalmente nos estados do Maranhão, Piauí e Ceará (AMAYA *et al.*, 1992; MATOS, 1998; CYSNE, 2006).

Essa família de plantas é bastante conhecida e estudada, particularmente pelo aproveitamento das propriedades coagulantes das sementes para a purificação de água, que se constitui um método natural, econômico e eficiente (GASSENSCHMIDT *et al.*, 1995; KATAYON *et al.*, 2006; ANTOV; SCIBAN; PRODANOVIC, 2012). Segundo Gassenschmidt e colaboradores (1995), a purificação da água é devido à presença de peptídeos catiônicos de massa molecular variando de 6,0 a 16,0 kDa e de ponto isoelétrico em torno de 10,0.

A moringa também se destaca por sua grande importância para alimentação. Seus frutos são comestíveis, assim como flores, sementes e folhas (MAKKAR; BECKER, 1997; ANWAR; BHANGER, 2003; SIDDHURAJU; BECKER, 2003; BEZERRA; MOMENTÉ; MEDEIROS FILHO, 2004). Contudo, estudos nos quais ratos em crescimento foram alimentados com uma dieta cujas proteínas (10%) provinham exclusivamente da farinha de sementes de moringa sofreram sérios distúrbios no crescimento, hiperplasia do intestino e atrofia de vários órgãos importantes (OLIVEIRA *et al.*, 1999). Diminuição expressiva do crescimento também foi observada em tilápias alimentadas com dietas artificiais contendo 20% e 30% de folhas de moringa liofilizadas (RICHTER; SIDDHURAJU; BECKER, 2003).

*M. oleifera* é afetada por poucas espécies de insetos (RAMACHADRAN; PETER; GOPALAKRISHNAN, 1980). Componentes de natureza proteica possivelmente podem estar envolvidos nessa resistência da planta. Essa suposição pode ser validada com os estudos de Cáceres e colaboradores (1991), que estudaram folhas secas, extrato de folhas frescas, raízes, casca e sementes da planta, nos quais verificaram que extratos de folhas frescas e de sementes foram capazes de inibir o crescimento de

*Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Entretanto, atividade inibitória frente às bactérias testadas não foi demonstrada quando os extratos foram realizados em temperatura superior a 56 °C.

Atividade antifúngica foi detectada para óleo essencial e extrato etanólico de sementes de moringa contra *Microsporium canis*, *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* e *Epidermophyton floccosum* (CHUANG *et al.*, 2007). Estudos de Nwosu e Okafor (1995) mostraram que extratos de moringa causaram efeito antifúngico contra os agentes patogênicos *Basidiobolus haptosporus*, *B. ranarum*, *Trichophyton rubrum* e *T. mentagrophytes*.

Adicionalmente à atividade antifúngica apresentada pela moringa, ação nematicida das raízes da planta contra *Meloidogyne incognita*, uma praga do tomate, foi detectada (HOAN; DAVIDE, 1979).

As propriedades medicinais da moringa têm sido atribuídas a todas as partes da planta. Provavelmente, pela presença de compostos bioativos que conferem atividades antitumoral, antipirético, antiepilético, anti-inflamatório, antiulcerativo, hipotensivo e hipoglicemiante (CÁCERES *et al.*, 1992; SINGH; KUMAR, 1999; MORIMITSU *et al.*, 2000; KAR; CHOUDHARY; BANDYOPADHYAY, 2003; IQBAL; BHANGER, 2006; BHATTI *et al.*, 2007; BHUPTAWAT; FOLKARD; CHAUDHARI, 2007). A moringa é também conhecida por suas propriedades farmacológicas, tendo sido utilizada nos mais diversos tratamentos, como exemplos, doenças cardíacas, reumatismos, picadas de insetos (ANWAR; BHANGER, 2003; CHUMARK *et al.*, 2008), doenças dos tratos digestório e respiratório, doenças infecciosas da pele e mucosas (DASTUR, 1977; CÁCERES *et al.*, 1991; AKHTAR *et al.*, 2007). O extrato etanólico de folhas de moringa ainda apresentou atividade antiviral contra o HSV-1 (vírus herpes simplex tipo 1) (LIPIPUN *et al.*, 2003). Cáceres e colaboradores (1992) observaram que a infusão de sementes em água quente apresentou atividades anti-inflamatória, antiespasmódica e diurética. Além disso, extratos de folhas de moringa foram sugeridos para regulação do hipertireoidismo (TAIHLIANI; KAR, 1999).

Proteínas com propriedades relevantes já foram isoladas de sementes de moringa. Santos *et al.* (2005) isolaram uma lectina (WSMoL) com massa molecular de 20 kDa e propriedades antioxidantes. Katre *et al.* (2008) purificaram outra lectina, denominada MoL, que se apresentou como banda única de massa molecular de 7,1 kDa na presença de  $\beta$ -mercaptoetanol e, na ausência desse agente redutor, como duas bandas proteicas de 13,6 e 27,1 kDa, com atividade coagulante. Mais recente, Santos

e colaboradores (2009) purificaram outra lectina de sementes de moringa, denominada cMoL, com massa molecular de 26,5 kDa, tendo também propriedade coagulante.

Além das proteínas citadas, uma proteína ligante à quitina de 14,3 kDa, denominada *Mo-CBP<sub>3</sub>* ("*Moringa oleifera chitin-binding protein*"), foi purificada das sementes (GIFONI *et al.*, 2013). Trata-se de uma glicoproteína básica, desprovida de atividades hemaglutinante, quitinásica e  $\beta$ -1,3 glucanásica, mas com potente atividade antifúngica, uma vez que se mostrou capaz de inibir totalmente a germinação dos conídios de vários fungos fitopatogênicos na concentração de 0,1 mgP/mL, não tendo essa atividade sido abolida mesmo quando a proteína foi aquecida a 100 °C por 1 h ou pré-incubada com o açúcar *N*-acetil-D-glucosamina. Por outro lado, *Mo-CBP<sub>3</sub>* não mostrou ação inibitória sobre o oomiceto *Pythium oligandrum*, que apresenta celulose na parede celular, ao invés de quitina, evidenciando a especificidade dessa proteína por quitina. *Mo-CBP<sub>3</sub>* foi capaz de inibir em 80% a acidificação do meio, induzida por glucose, em conídios de *F. solani*, o que sugere sua influência sobre as bombas de prótons (H<sup>+</sup>ATPases) presentes na membrana celular do fungo.

## 2.7 Hipótese do Trabalho

Dada a sua especificidade por quitina e atividade contra fungos em baixa concentração, *Mo-CBP<sub>3</sub>* possui potencial para ser utilizada em estratégias de controle contra fungos fitopatogênicos, atuando diretamente na membrana plasmática e/ou parede celular.

## **3 OBJETIVOS**

### 3.1 Geral

- Determinar parâmetros bioquímicos e estruturais da proteína ligante à quitina (*Mo-CBP<sub>3</sub>*) de sementes de *Moringa oleífera*, bem como investigar o espectro e modo de ação da *Mo-CBP<sub>3</sub>* frente a fungos fitopatogênicos de interesse agrônômico. Adicionalmente investigar a citotoxicidade da *Mo-CBP<sub>3</sub>* para células eucarióticas e caracterizar o cDNA que codifica para *Mo-CBP<sub>3</sub>*.

### 3.2 Específicos

- Avançar na caracterização físico-química e estrutural da *Mo-CBP<sub>3</sub>* por meio de análises envolvendo: eletroforese em gel de tricina, sequenciamento NH<sub>2</sub>-terminal, espectro de absorção, espectro de dicroísmo circular, espectro de fluorescência, avaliação da estabilidade estrutural frente a diferentes temperaturas e valores de pH e espectro de massas;
- Avaliar o espectro de ação da *Mo-CBP<sub>3</sub>* sobre fungos fitopatogênicos de relevância agrícola, incluindo *F. solani*, *F. oxysporum*, *R. solani*, *C. gloeosporioides* e *C. musae*, usando ensaios de inibição da germinação de conídios;
- Investigar o modo de ação antifúngico da *Mo-CBP<sub>3</sub>*, usando como modelo *F. solani*, considerando sua ação sobre diferentes fases de desenvolvimento do fungo, estrutura da parede celular e/ou membrana celular e indução de formação de espécies reativas de oxigênio;
- Investigar a citotoxicidade de *Mo-CBP<sub>3</sub>* para células humanas, incluindo eritrócitos, células de câncer de mama (MCF-7) e células do epitélio intestinal (Caco-2);
- Obter o cDNA da cadeia B de *Mo-CBP<sub>3</sub>*, a partir do RNA total de sementes de *M. oleífera*, procedendo com a clonagem, sequenciamento e análises *in silico*.

## ***4 MATERIAIS***

#### 4.1 Sementes de moringa

Sementes de *M. oleifera* Lamarck (Moringa) foram coletadas, durante todo o ano, de plantas localizadas no Campus do Pici, da Universidade Federal do Ceará (UFC), em Fortaleza, Ceará. O número da exsicata da espécie, depositada no Herbário Prisco Bezerra (UFC), é EAC34591.

#### 4.2 Fungos filamentosos

Os fungos filamentosos *F. solani*, *R. solani*, *F. oxysporum*, *C. gloeosporioides* e *C. musae* foram provenientes da micoteca do Laboratório de Toxinas Vegetais, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC. Os fungos foram mantidos em meio Ágar-Batata-Dextrose (BDA) estéril, em câmara de crescimento com temperatura 25-27 °C e fotoperíodo 12 h claro/12 h escuro.

#### 4.3 Células para clonagem

A estirpe de *E. coli* TOP10F' (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, USA) foi utilizada nos experimentos de clonagem.

#### 4.4 Enzimas

As enzimas de restrição *ArvI* (10 U/μL), *EcoRI* (10 U/μL), *SacI* (10 U/μL), *XhoI* (10 U/μL) e *XbaI* (10 U/μL) foram obtidas da Fermentas (Burlington, Canadá). *T<sub>4</sub>* DNA ligase (3 U/μL) foi adquirida da Promega (Madison, USA). A DNA Polimerase *Phusion Hot Start*, de alta fidelidade, juntamente com seus tampões, foi adquirida da Finzymes (Vantaa, Finlândia).

#### 4.5 Reagentes e outros materiais

Ditiotreitol (DTT), β-mercaptoetanol, dodecil sulfato de sódio (SDS) e marcadores de massa molecular de proteínas (*Bench Mark Pre-Stained Protein Ladder*) foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA) ou Invitrogen, (Carlsbad, USA).

As matrizes cromatográficas foram obtidas da GE HeathCare (Uppsala, Suécia).

Os meios de cultura ágar batata, ágar nutriente e caldo YPD (Yeast, Potato and Dextrose) foram obtidos da Himedia e Merk (Darmstadt, Germany).

Oligonucleotídeos iniciadores foram sintetizados pela *Integrated DNA Technologies* (IDT) (San Diego, USA).

Marcadores de massa molecular de ácidos nucleicos foram adquiridos da New England BioLabs Inc. (Ipswich, USA).

Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico e obtidos comercialmente.

## ***5 MÉTODOS***

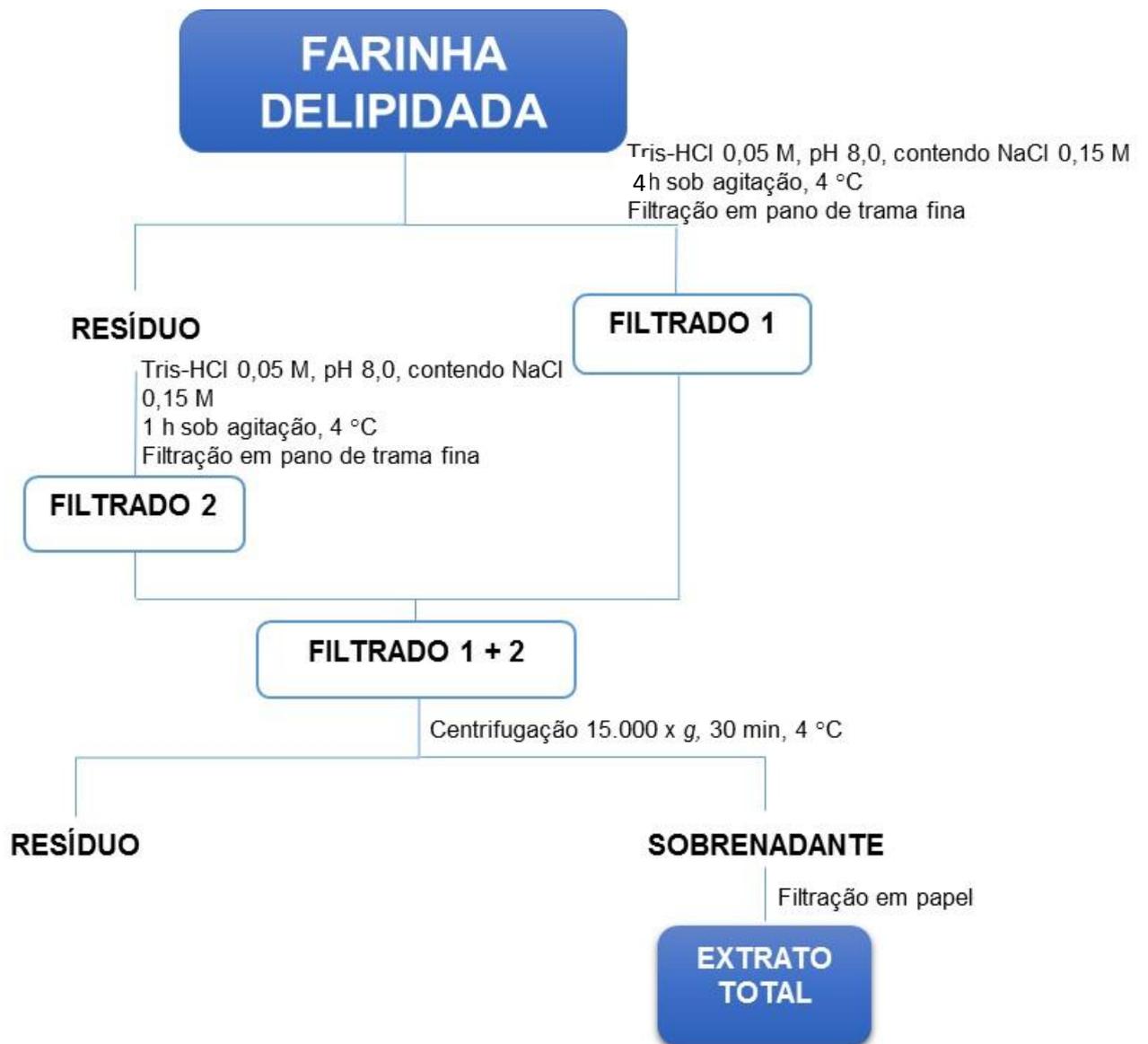
## 5.1 Obtenção da proteína ligante à quitina de sementes de *M. oleifera* (*Mo-CBP<sub>3</sub>*)

Para obtenção de *Mo-CBP<sub>3</sub>*, foi seguido o protocolo estabelecido por Gifoni *et al.* (2012), cuja descrição é feita a seguir. Sementes de moringa foram destegumentadas manualmente. As amêndoas foram, então, trituradas em liquidificador e, posteriormente, em moinho elétrico para café. A farinha resultante foi tratada com *n*-hexano, na proporção 1:10 (m/v), sob exaustão de capela à temperatura ambiente, até a completa remoção dos lipídios. Após delipidação, a farinha foi acondicionada em frascos hermeticamente fechados e conservada a 4 °C.

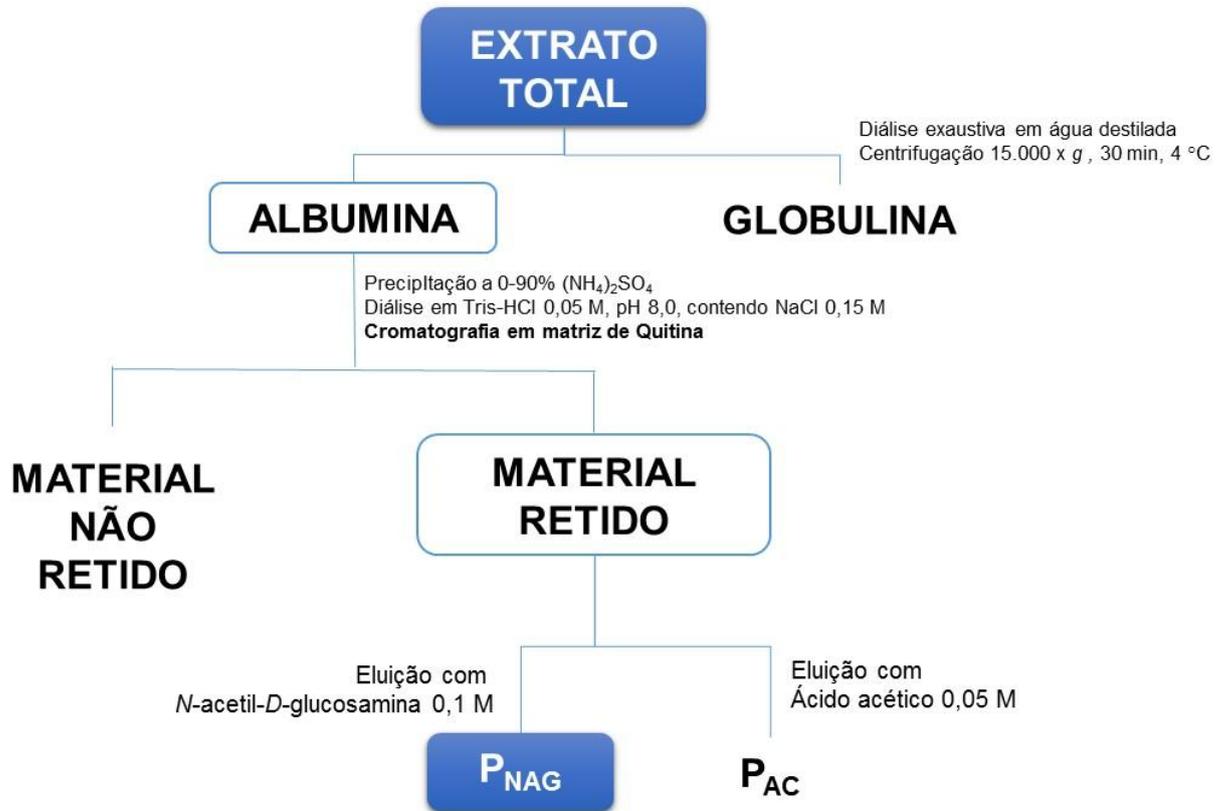
Para extração das proteínas, a farinha delipidada foi posta em contato com tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0, contendo NaCl 0,15 M, na proporção de 1:10 (m/v) e deixada sob agitação contínua por 4 h, a 4 °C (FIGURA 1). O resíduo obtido foi reextraído nas mesmas condições de extração, exceto o tempo de agitação que foi de 1 h. A suspensão foi filtrada em pano de trama fina. O filtrado foi centrifugado a 15.000 x *g*, 30 min, 4 °C; o resíduo foi descartado e o sobrenadante obtido denominado de extrato total, dialisado exaustivamente contra água destilada, 4 °C, no intuito de separar albuminas e globulinas. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 15.000 x *g*, 30 min, 4 °C. O sobrenadante, representando a fração albumina, foi submetido à precipitação com sulfato de amônio, 0-90%, deixado em repouso por 12 h, sendo centrifugado a 15.000 x *g*, 30 min, 4 °C e, após isso, dialisado contra Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0, contendo NaCl 0,15 M.

Posteriormente, amostras (835 mgP) da fração albumina foram aplicadas em matriz de quitina (24,5 x 2,1 cm), previamente equilibrada com Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0, contendo NaCl 0,15 M (FIGURA 2). Para remoção das proteínas não retidas, a coluna foi percolada com o tampão de equilíbrio. O material retido foi eluído com solução de *N*-acetil-D-glucosamina 0,1 M ( $P_{NAG}$ ), seguida da eluição com ácido acético 0,05 M ( $P_{AC}$ ). As frações coletadas foram monitoradas pela absorvância a 280 nm.

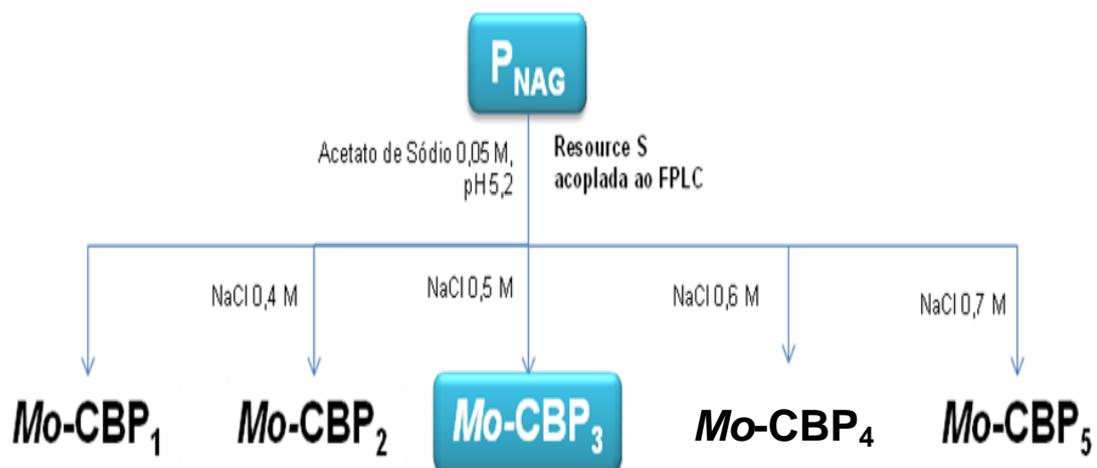
Para obtenção de *Mo-CBP<sub>3</sub>*, a fração  $P_{NAG}$  (15 mgP) foi aplicada em coluna de troca catiônica, Resource S, acoplada a sistema de FPLC, equilibrada com tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2 (FIGURA 3). Esse procedimento resultou na obtenção de uma fração não retida (*Mo-CBP<sub>1</sub>*) e de quatro frações retidas, eluídas com o tampão de equilíbrio acrescido de concentrações crescentes de NaCl, 0,4, 0,5, 0,6 e 0,7 M, denominadas respectivamente de *Mo-CBP<sub>2</sub>*, *Mo-CBP<sub>3</sub>*, *Mo-CBP<sub>4</sub>* e *Mo-CBP<sub>5</sub>*, em fluxo de 1 mL/min. Foram coletadas frações de 2,0 mL, procedidas por leituras de absorvância a 280 nm.

**Figura 1** - Esquema de obtenção do extrato total de sementes de moringa

**Figura 2** - Esquema de obtenção da fração proteica ligante em matriz de quitina e eluída com *N*-acetil-*D*-glucosamina 0,1 M ( $P_{NAG}$ ), proveniente do extrato total de sementes de *M. oleifera*



**Figura 3** - Esquema de obtenção da proteína ligante à quitina de *M. oleifera*, denominada *Mo-CBP<sub>3</sub>*, a partir da fração proteica eluída com *N*-acetil-D-glucosamina 0,1 M ( $P_{NAG}$ ), após cromatografia em matriz Resource S acoplada a sistema FPLC



## 5.2 Determinação de proteínas

A determinação de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (1976), usando albumina sérica bovina (BSA) como padrão. Alternativamente, as proteínas eluídas nos passos cromatográficos foram avaliadas pelas leituras das absorvâncias a 280 nm.

## 5.3 Caracterização físico-química e estrutural da *Mo-CBP<sub>3</sub>*

### 5.3.1 Avaliação da interação de *Mo-CBP<sub>3</sub>* pura com a matriz de quitina

A interação de *Mo-CBP<sub>3</sub>* pura com a matriz de quitina foi também avaliada. Para tanto, *Mo-CBP<sub>3</sub>* (1 mg/mL em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0) foi aplicada em matriz de quitina (2 x 1 cm), previamente equilibrada com Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0. Em seguida, a coluna foi percolada com o tampão de equilíbrio e, posteriormente, com esse mesmo tampão acrescido de NaCl 1 M. A coluna foi ainda percolada com ácido acético 0,05 M, pH 3,0, seguida da aplicação de ácido acético 1 M e, posteriormente, HCl 0,1 M. As frações foram reunidas e dialisadas contra água, sendo esse material submetido à eletroforese em condições desnaturantes e ao ensaio de inibição da germinação de conídios de *F. solani*.

### 5.3.2 Caracterização quanto à massa molecular e número de cadeias polipeptídicas

#### 5.3.2.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE-SDS)

No intuito de analisar a pureza de *Mo-CBP<sub>3</sub>*, o perfil eletroforético foi analisado segundo a técnica de Laemmli (1970), adaptada para o uso de placas medindo 10,0 x 8,0 cm. As amostras foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8, contendo

SDS 1,0%, na presença ou não de  $\beta$ - mercaptoetanol 1,0%. Em seguida, as amostras foram aquecidas a 100 °C, por 10 min, centrifugadas a 10.000 x g, 5 min, a 10 °C. Aos sobrenadantes, foram acrescentados cristais de sacarose e azul de bromofenol 0,1%, esse último para o acompanhamento de corrida eletroforética. A corrida eletroforética foi realizada em sistema vertical (HOEFER SE 250, Amersham Biosciences), no qual os géis foram submetidos a uma voltagem de 150 V e amperagem 20 mA. Como marcadores de massa molecular foram utilizados: albumina sérica bovina (67,0 kDa); albumina do ovo (45 kDa); anidrase carbônica bovina (29 kDa); inibidor de tripsina tipo Kunitz (20,1 kDa) e  $\alpha$ -lactalbumina (14,2 kDa). As bandas proteicas foram visualizadas por coramento com *Coomassie Brilliant Blue* R-250 0,05%, dissolvido em solução de metanol, ácido acético e água (1,0:3,5:8,0 v/v/v), por período de 2 h. Em seguida, foi procedido o descoramento do gel com solução de metanol, ácido acético e água (1,0:3,5:8,0 v/v/v).

#### 5.3.2.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de tricina (*Tricina-PAGE-SDS*)

*Mo*-CBP<sub>3</sub> foi analisada por eletroforese em sistema *Tricina-PAGE-SDS*, contendo 10% e 16% de acrilamida, em sistema vertical com dimensões de 0,07 x 14 x 14 cm. Amostras (10  $\mu$ g) foram preparadas em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 6,8, contendo 4% de SDS, na presença e ausência de  $\beta$ -mercaptoetanol 2%, sob aquecimento prévio a 70 °C, por 10 min. Como marcadores de massa molecular, foram usadas as mesmas proteínas citadas no item anterior. Para o cálculo da massa molecular aparente das proteínas em análise foi empregada a comparação das mobilidades das bandas proteicas em relação àquelas dos marcadores. As bandas proteicas foram coradas com *Coomassie Brilliant Blue* (Schagger; Von Jagow, 1987).

#### 5.3.2.3 Cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa (*FR-HPLC*)

*Mo*-CBP<sub>3</sub> nativa ou reduzida (0,01 M ditioneitol) e alquilada (0,03 M iodoacetamida) foi analisada em coluna de fase reversa C2/C18 (4,6 x 100 mm),

acoplada a HPLC (Waters), utilizando um gradiente linear (5-90%) de acetonitrila (ACN), por 50 min, a um fluxo de 0,2 mL/min. Para tanto, foram utilizados o solvente A (5% ACN, 95% H<sub>2</sub>O contendo 0,05% TFA) e o solvente B (90% ACN). A cromatografia foi monitorada pela absorvância no comprimento de onda de 214 nm.

Os fragmentos proteicos resultantes da redução e alquilação foram denominados de cadeias A e B, referentes à cadeia menor e maior, respectivamente.

#### 5.3.2.4 Espectrometria de massas

*Mo*-CBP<sub>3</sub> foi analisada por espectrometria de massas. Para tanto, *Mo*-CBP<sub>3</sub> foi diluída em água contendo 0,1% de ácido fórmico, de modo a ser obtida uma concentração final de 1mg/mL. Uma alíquota dessa solução de *Mo*-CBP<sub>3</sub> foi reduzida com 0,01 M ditioneitol, seguida de alquilação com 0,03 M iodoacetamida. Alíquotas de 5 µL da solução de *Mo*-CBP<sub>3</sub> nativa foram utilizadas. O sistema nanoACQUITY UPLC (Waters, USA) utilizou um gradiente de 5% a 80% de acetonitrila (0,1% ácido fórmico, v/v), com fluxo de 600 nL/min e coluna BEH C18 (1,7 mm, 100 mm × 100 mm). Para todas as análises, o espectrômetro de massas foi operado no modo “V”, com poder de resolução de pelo menos de 20.000 e utilizado nanoelectrspray como fonte de ionização, operando no modo de íon positivo ESI (+).

A digitalização de dados do experimento (MSE) foi realizada em espectrômetro de massas, modelo Synapt HDMS (Waters, Manchester, UK), acoplado ao sistema NanoUPLC-ESI, que foi programado para automaticamente alternar entre MS de energia baixa (3 eV) e de energia de colisão elevada MSE (12-55 eV), aplicada à armadilha CID 'onda T' (dissociação induzida por colisão celular), com gás argônio. A transferência a partir da célula de colisão foi ajustada para 1 eV, com tempo de varredura de 1,5 s, tanto em baixa quanto em alta energia. Após o analisador de aceleração do tempo-de-voo (TOF-oA), foram colhidos espectros de relação *m/z* 50-3000. O deslocamento RF (MS perfil) do quadrupolo foi ajustado para que os dados de CL/MS fossem efetivamente adquiridos de relação *m/z* de 300 a 2500, assegurando que qualquer massa menor que *m/z* 300 observada nos dados de CL/MSE surgisse a partir de dissociações na célula de colisão. Desse modo, os valores de baixa massa eram sabidamente produtos de fragmentação CID, e não de fragmentação na fonte. Na

deconvolução do espectro foi utilizado o princípio de otimização de entropia máxima (MaxEnt).

### **5.3.3 Determinação da sequência NH<sub>2</sub>-terminal**

Para obtenção da sequência de aminoácidos NH<sub>2</sub>-terminal de *Mo*-CBP<sub>3</sub>, foi utilizado um sequenciador automático de proteínas (Shimadzu PPSQ-23A), baseado no princípio de degradação de Edman. Os derivados feniltioidantoína dos aminoácidos (PTH-aminoácidos) foram detectados a 269 nm, após separação em coluna de fase reversa C18 (4,6 x 2,5 mm), conduzida sob condições isocráticas de acordo com as instruções do fabricante. A sequência de aminoácidos obtida foi submetida ao alinhamento automático através do sistema NCBI-BLAST.

### **5.3.4 Ensaio de inibição de $\alpha$ -amilase**

O ensaio de inibição de  $\alpha$ -amilase foi realizado segundo método descrito por Ali e colaboradores (2006). A  $\alpha$ -amilase pancreática suína (EC 3.2.1.1, tipo VI, Sigma) foi diluída em tampão fosfato 0,02 M, pH 6,9, contendo NaCl 0,0006 M, resultando numa concentração final de 0,1 UI/mL. Como substrato, amido de batata solúvel (EC 232-686-4-S2630, Sigma) a 1%, diluído no mesmo tampão, foi utilizado. Esse método é baseado na hidrólise desse substrato pela  $\alpha$ -amilase, que é convertido em maltose, glicose ou dextrina, açúcares redutores são quantificados por uma reação colorimétrica com o ácido 3,5,dinitrossalicílico (DNS), que ao ser reduzido, forma o ácido 3-amino-5-nitrossalicílico. A reação é avaliada no comprimento de onda de 540 nm.

Para cálculo dos açúcares redutores formados e, portanto, da atividade enzimática foi utilizada uma curva de calibração utilizando maltose como padrão (0,02-0,1 g/mL). Nas análises de inibição da  $\alpha$ -amilase foram utilizadas a absorbância (540 nm) obtida convertida em concentração de maltose formada por meio da equação da curva de calibração. A porcentagem de inibição foi calculada conforme fórmula a seguir:

% Atividade enzimática=  $\frac{\text{concentração de maltose da amostra}}{\text{Concentração maltose controle}} \times 100$

Concentração maltose controle

% Inibição= 100% atividade enzimática

### **5.3.5 Análises espectroscópicas**

#### *5.3.5.1 Espectro de absorção*

O espectro de absorção de *Mo-CBP<sub>3</sub>* foi determinado em espectrofotômetro Spectronic 7 (Pharmacia-LKB), utilizando cubeta de quartz de 1 cm de caminho óptico. A proteína (1 mg) foi dissolvida em água grau milli-Q (1 mL) e a absorção verificada na região de 220 a 350 nm. O aparelho foi zerado com água nos comprimentos de onda analisados. O coeficiente de extinção para o comprimento de onda de 280 nm foi calculado de acordo com a fórmula  $\epsilon = A_{280}/c \times L$ , onde  $\epsilon$  = coeficiente de extinção,  $A_{280}$  = absorbância no comprimento de onda de 280 nm,  $c$  = concentração da amostra e  $L$  = caminho óptico percorrido (cm).

#### *5.3.5.2 Espectro de dicroísmo circular distante e próximo*

A obtenção do espectro de dicroísmo circular de *Mo-CBP<sub>3</sub>* foi feita em espectropolarímetro JASCO J-715, em atmosfera de nitrogênio, a 25 °C, utilizando o comprimento de onda de 190-250 nm. Para tanto, foi utilizada uma cubeta de quartzo retangular com 0,1 cm de passo óptico, sendo todas as medidas realizadas com 8 scans sucessivos, com velocidade de varredura de 20 nm/min e tempo de resposta de 4 seg, cuja média foi utilizada para análise. As medidas de *Mo-CBP<sub>3</sub>* (40 µg) foram

realizadas em tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,0, sendo eliminada a interferência do tampão. No intuito de quantificar os elementos de estrutura secundária foram utilizados três diferentes métodos (CDSSTR, CONTINLL e SELCON3) disponíveis no programa CDPro.

A estabilidade térmica de *Mo*-CBP<sub>3</sub> foi analisada utilizando o espectro de dicroísmo circular. Amostras da proteína (40 µg) foram dissolvidas em tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,0, e previamente incubadas de 26 °C a 90 °C, durante 10 min em cada temperatura, seguida da determinação do espectro de dicroísmo circular. Além disso, espectros foram obtidos quando a proteína foi aquecida a 100 °C por 10, 60 e 120 min.

A estabilidade de *Mo*-CBP<sub>3</sub> também foi avaliada frente a diferentes valores de pH. Dessa forma, a proteína (40 µg) foi dissolvida e incubada por 4 h em tampão acetato-borato-fosfato 0,02 M, em valores de pH variando de 2,0 a 12,0, antes da obtenção do espectro de dicroísmo circular.

Para monitorar a estrutura terciária da proteína, determinação do espectro de dicroísmo circular foi realizada no comprimento de onda de 250- 300 nm (UV-próximo), utilizando cubeta de 0,1 cm de passo óptico.

#### *5.3.5.3 Espectro de fluorescência*

As medidas de fluorescência foram feitas em espectrofluorímetro (ISS, IL, USA, modelo ISS K2), em cubeta retangular de quartzo de 1 cm de caminho óptico. Amostras de *Mo*-CBP<sub>3</sub> (0,02 mg/mL em tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,0) foram excitadas a 280 nm e 295 nm e a emissão foi monitorada no intervalo de 300 a 440 nm.

### **5.4 Avaliação do espectro e modo de ação contra fungos de *Mo*-CBP<sub>3</sub>**

#### ***5.4.1 Ensaio de inibição da germinação de fungos fitopatogênicos***

Com o objetivo de avaliar o espectro de ação de *Mo*-CBP<sub>3</sub>, foram selecionados alguns fungos fitopatogênicos de relevância agrícola, incluindo *R. solani*, *F. oxysporum*, *C. gloeosporioides* e *C. musae*. Os fungos citados foram inicialmente repicados, por meio da transferência de um pellet, obtido a partir de uma cultura pura retirada da micoteca, para uma placa de Petri contendo 20 mL do meio sólido BDA. O preparo da suspensão de conídios foi realizado quando o crescimento dos fungos atingiu todo o diâmetro da placa, o que ocorreu, em média, 15 dias após a repicagem. Para tanto, em cada placa foram adicionados 10 mL de água destilada estéril e, em seguida, procedida a raspagem da cultura com auxílio de uma alça de Drigalski estéril. O material obtido foi, então, filtrado em malha de nylon para eliminação de fragmentos de hifas, tendo sido denominado de suspensão padrão. Posteriormente, foi feita a contagem dos conídios em câmara de Neubauer, seguida de diluição a fim de que fosse obtido um inóculo com concentração de  $2,0 \times 10^5$  conídios/mL (GIFONI, 2005).

Para avaliar o potencial antifúngico de *Mo*-CBP<sub>3</sub>, foi analisada sua ação sobre a inibição da germinação de conídios, conforme metodologia descrita por Ji e Kúc (1996), adaptada para uso de placas de polietileno reticuladas. Alíquotas de 10 µL da suspensão de conídios ( $2,0 \times 10^5$  conídios/mL) foram incubadas com 10 µL de *Mo*-CBP<sub>3</sub> a diferentes concentrações (0,05, 0,1, 0,5 mg/mL), H<sub>2</sub>O (controle negativo) ou peróxido de hidrogênio 0,1 M (controle positivo). As placas foram acondicionadas em recipientes fechados contendo papel de filtro embebido de água destilada e mantidas na ausência de luz, a 30 °C durante 24 h. Após o período de germinação, os conídios foram observados em microscópio óptico (Olympus System Microscope BX 60) e fotografados com câmera digital (Sony, modelo MCV-CD350). Aqueles que apresentaram tubo germinativo correspondente duas vezes o seu tamanho foram considerados como germinados. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Um ensaio similar foi conduzido com as cadeias polipeptídicas separadas (0,1 mg/mL) de *Mo*-CBP<sub>3</sub>, resultantes após a redução (0,01 M ditioneitol) e alquilação (0,03 M iodoacetamida) da proteína. Da mesma forma, que anteriormente, esse ensaio foi realizado em triplicata.

#### **5.4.2 Ensaio de inibição do crescimento micelial de *F. solani***

Dentre os diferentes fungos usados, *F. solani* foi selecionado como modelo experimental, para dar continuidade às análises referentes ao modo de ação de *Mo-CBP<sub>3</sub>*. Esse fungo foi selecionado, por tratar-se de uma espécie de fácil manuseio e crescimento rápido, ideal para ensaios *in vitro*, além de sua relevância agrônômica.

O ensaio quantitativo de inibição do crescimento micelial foi realizado segundo o protocolo desenvolvido por Broekaert e colaboradores (1990). Nesse ensaio, 10 µL da suspensão de conídios ( $2 \times 10^5$  conídios/mL) de *F. solani* foram incubados com 100 µL do meio batata dextrose (PD), em placas de microtitulação contendo 96 poços (Nunc™), por 12 h no escuro, a 37 °C. Em seguida, 100 µL da solução de *Mo-CBP<sub>3</sub>* (0,05, 0,1, 0,5 e 1 mg/mL) filtrada em membrana estéril (Millipore) de 0,22 µm, foram adicionados. O crescimento celular foi também avaliado na ausência da proteína teste (controle negativo). O crescimento do fungo foi monitorado por turbidimetria a 630 nm, de 0 a 49 h, usando um leitor de microplacas automático (Modelo Elx800, Bio-Tek® Instruments). O ensaio foi realizado em triplicata.

Para avaliar a viabilidade conidial de *F. solani* depois do tratamento com diferentes concentrações de *Mo-CBP<sub>3</sub>*, alíquotas de 150 µL foram tomadas dos poços, transferidas para tubos Eppendorf, centrifugadas a 3000 x *g* por 1 min a 25 °C e o sobrenadante descartado. Os conídios remanescentes foram lavados com água destilada estéril, transferidos para placas de Petri contendo meio PDA e mantidos incubados a 27 °C. Fotografias do crescimento micelial foram retiradas após cinco dias. O experimento foi realizado em triplicata.

#### **5.4.3 Avaliação do efeito do pH e temperatura sobre a inibição da germinação do fungo *F. solani* causada por *Mo-CBP<sub>3</sub>***

Para analisar a influência do pH sobre a atividade antifúngica de *Mo-CBP<sub>3</sub>*, foi conduzido o ensaio de inibição de germinação de conídios, conforme metodologia descrita no item 5.7.1. Entretanto, nesse ensaio, *Mo-CBP<sub>3</sub>* (0,1 mg/mL) antes de ser incubada com conídios de *F. solani* foi ressuspensa no tampão acetato-borato-fosfato 0,02 M, ajustado para diferentes valores de pH (2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0 e 12,0). Como controle negativo, foi utilizado o próprio tampão acetato-borato-fosfato 0,02 M, ajustado para diferentes valores de pH (2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0 e 12,0). Como controles positivos,

foram usados  $Mo-CBP_3$  na concentração fungicida (0,1 mg/mL) e peróxido de hidrogênio 0,1 M.

Em paralelo, para testar se a habilidade de  $Mo-CBP_3$  em inibir a germinação de esporos seria afetada pelo tratamento térmico, a proteína foi aquecida a 100 °C, em banho-maria, por 60 min, resfriada em gelo por 10 min e submetida ao ensaio conforme descrito no item 5.4.1. Cada experimento foi realizado em triplicata e fotografias foram obtidas em câmara digital (Sony, modelo MCV-CD350).

#### **5.4.4 Avaliação da interação eletrostática de $Mo-CBP_3$ com a membrana conidial de *F. solani***

A capacidade de  $Mo-CBP_3$  interagir eletrostaticamente com a membrana plasmática do conídio de *F. solani*, foi examinada através do ensaio de inibição de germinação de esporos, realizado conforme metodologia descrita no item 5.4.1. Na realização desse ensaio,  $Mo-CBP_3$  (0,1 mg/mL) foi ressuspensa em solução de NaCl em diferentes concentrações (0,025, 0,075, 0,15 e 0,3 M). Os controles negativos foram representados pela solução de NaCl nas concentrações citadas, enquanto o controle positivo foi  $Mo-CBP_3$  na concentração fungicida (0,1 mg/mL). O experimento foi realizado em triplicata.

#### **5.4.5 Avaliação sobre a permeabilidade da membrana do conídio**

O corante iodeto de propídio foi usado para avaliar a integridade da membrana do fungo na presença de  $Mo-CBP_3$ .  $Mo-CBP_3$  (0,1 mg/mL) foi incubada com a suspensão de conídios ( $2,0 \times 10^5$  conídios/mL) por 12 h, sendo posteriormente, acrescido 1  $\mu$ M de iodeto de propídio, que foram incubados por 30 min a 37 °C. Posteriormente, foram adicionados 10  $\mu$ L de NaCl 0,15 M e o material a ser analisado foi colocado sobre lâminas e visualizadas em microscópio ótico de fluorescência. Foram considerados conídios permeabilizados, aqueles em que os núcleos se

apresentaram fluorescentes. Como controles negativos foram utilizados água milli-Q estéril e solução de BSA 0,1 mg/mL.

#### **5.4.6 Avaliação da indução da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)**

Para avaliar a capacidade de *Mo*-CBP<sub>3</sub> de induzir a produção de EROs em conídios de *F. solani*, foi realizado um ensaio *in situ* utilizando 3,3'-diaminobenzidina (DAB), como descrito por Thordal-Christensen (1997) acrescido de modificações (MENDIETA *et al.*, 2006). Para realização do ensaio, os conídios ( $2,0 \times 10^5$  /mL) foram incubados com água, BSA 0,1 mg/mL (controles negativos) e *Mo*-CBP<sub>3</sub> (0,1 mgP/mL), na presença de DAB (0,5 mg/mL), por 1 h. Após o período de incubação, foram adicionados 10 µL de NaCl 0,15 M e o material a ser analisado foi colocado sobre lâminas e visualizadas em microscópio óptico. A presença de grânulos de coloração marrom, resultante da reação do DAB com peroxidases endógenas do fungo, foi usada como indicativo da produção de EROs.

#### **5.4.7 Microscopia eletrônica de varredura**

A morfologia de células de *F. solani* tratadas com *Mo*-CBP<sub>3</sub> foi analisada por microscopia eletrônica de varredura. Conídios ( $2,0 \times 10^5$  /mL), crescidos por 48 h na ausência e presença de *Mo*-CBP<sub>3</sub> (0,05 mg/mL em H<sub>2</sub>O), foram fixados com solução glutaraldeído 2,5% (v/v) e paraformaldeído 4% (v/v) em tampão cacodilato de sódio 0,05 M, pH 7,2, por 30 min a 25 °C. Subsequentemente, os materiais foram lavados com o tampão descrito acima (três vezes), pós-fixados com tetróxido de ósmio 1,0% (m/v) diluído no mesmo tampão, por 30 min a 25 °C e, em seguida, lavados com água destilada. Após esse procedimento, os conídios foram desidratados em concentrações crescentes de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%, v/v), secados ao ponto crítico com CO<sub>2</sub>, cobertos com ouro e observados no microscópio eletrônico de varredura DSEM 962 Zeiss através da emissão de elétrons secundários (RIBEIRO *et al.*, 2007).

#### **5.4.8 Microscopia eletrônica de transmissão**

A ocorrência ou não de alterações estruturais em conídios de *F. solani* tratados com *Mo*-CBP<sub>3</sub> foi visualizada por microscopia eletrônica de transmissão. Conídios, crescidos por 48 h na ausência e presença de *Mo*-CBP<sub>3</sub> (0,05 mg/mL em H<sub>2</sub>O), foram fixados em glutaraldeído 2,5% (v/v) e paraformaldeído 4% (v/v) em tampão cacodilato de sódio 0,05 M, pH 7,2, por 30 min a 25 °C. Após fixação, os materiais foram lavados, pós-fixados em 1% (m/v) de tetróxido de ósmio diluído no tampão acima, por 1 h a 25 °C. As amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%, v/v) e embebidas em resina Epon (Polybeded 812). Cortes ultrafinos (0,1 µm) foram feitos em ultramicrótomo, colocados sobre grades de níquel, corados com acetato de uranila 1 % (10 min) e citrato de chumbo 5 % (5 min) e, então, observados no microscópio de transmissão Zeiss 900 operando a 80 kV (REYNOLDS, 1963).

### **5.5 Avaliação da ação citotóxica de *Mo*-CBP<sub>3</sub> sobre células eucarióticas**

#### **5.5.1 Teste de lise de hemácias**

A atividade hemolítica de *Mo*-CBP<sub>3</sub> foi investigada segundo o método descrito por Castro *et al.* (2009). Sangue humano foi coletado e lavado três vezes com solução de fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,4, contendo NaCl 0,15 M (PBS). Uma suspensão de hemácias (1%) foi preparada usando o mesmo tampão de lavagem e, posteriormente, incubada com diluições seriadas de *Mo*-CBP<sub>3</sub> (280 µM a 0,137 µM), por 1 h a 37 °C. Decorrido esse tempo, a suspensão foi centrifugada a 3.000 x *g*, 10 min, 25 °C. Os sobrenadantes foram transferidos para tubos eppendorfs e leituras da absorbância a 405 nm foram realizadas, para monitorar a liberação de hemoglobina. Triton X-100 e PBS foram usados como controles positivo (100% de hemólise) e negativo, respectivamente. O percentual de hemólise foi calculado com base na seguinte equação: Hemólise (%) =  $[A_{\text{proteína}} - A_{\text{PBS}}] / [A_{\text{triton X-100}} - A_{\text{PBS}}]$ , onde A significa absorbância a 405 nm.

### **5.5.2 Ensaio de viabilidade celular**

Células MCF-7 e Caco-2 foram cultivadas em meio Dulbecco modificado por Eagle (DMEM) suplementado com soro fetal de cabra 10% e penicilina-estreptomicina 0,06% (v/v) (penicilina 10.000 units e estreptomicina 10 mg/mL). Para células Caco-2, aminoácidos essenciais 0,1 mM (100x) foram também adicionados ao meio de cultura. As células foram cultivadas a 37 °C em atmosfera úmida a 5% de CO<sub>2</sub>. Esse ensaio avalia a viabilidade celular baseado no conteúdo de ATP intracelular (ATPlite, Perkin Elmer), tendo sido conduzido seguindo as instruções do fabricante. Células MCF-7 (número de passagem 12 a 18) e Caco-2 (número de passagem de 36 a 44), ambas indiferenciadas, foram tripsinizadas, contadas e ressuspensas em seus respectivos meios de cultura para obtenção de uma concentração final de 20.000 e 4.000 células/poço, respectivamente. A uma placa de microtitulação contendo 96 poços, foram adicionados 100 µL da suspensão de células, seguida de incubação por 72 h ou 48 h, para células MCF-7 ou Caco-2, respectivamente, a 37 °C em atmosfera úmida a 5% de CO<sub>2</sub>. Soluções estoque de *Mo*-CBP<sub>3</sub> e das lectinas de *Canavalia ensiformis* (ConA) e *Phaseolus vulgaris* (PHA-E), usadas controle, encerrando 2,44 mg de proteína em 0,2 mL de PBS foram preparadas. As soluções estoque foram diluídas 14,3 vezes em DMEM e, a partir dessas, foram feitas diluições seriadas, que foram adicionadas à suspensão de células, finalizando um volume final de 117 µL em cada poço e concentrações proteicas variando de 30,6 a 244,5 µg/mL. Após 24 h de incubação, 50 µL de solução de lise de células de mamíferos (Kit ATP-lite) foram adicionados a cada poço. A placa contendo o material a ser analisado foi agitada por 1 min, seguida da adição de 50 µL de substrato (kit ATP-Lite), agitação por mais 1 min e incubação no escuro por 10 min. A luminescência foi medida em leitor de microplacas (BIO-TEK Instruments, Synergy<sup>TM</sup> HT). O experimento foi realizado em triplicata.

## **5.6 Isolamento, clonagem e caracterização do DNA complementar (cDNA) de *Mo*-CBP<sub>3</sub>**

### **5.6.1 Coleta de sementes e extração de RNA total**

Para obtenção de RNA total foram utilizadas sementes de moringa coletadas 35, 45 e 55 dias após a antese.

Para extração de RNA, as sementes (100 mg) foram coletadas e mantidas em nitrogênio líquido. Com auxílio de almofariz e pistilo, o material vegetal foi macerado e, posteriormente, adicionado o reagente “*Concert Plant Reagent*” (Invitrogen®), na proporção de 0,5 mL de reagente para cada 0,1 g de tecido. Em seguida, essa suspensão foi mantida em temperatura ambiente por 5 min e, após, centrifugada a 12.000 x g, 2 min, 4 °C. Ao sobrenadante foram adicionados 0,1 mL de NaCl 5 M e 0,3 mL de clorofórmio, seguido de centrifugação a 12.000 x g, 10 min, 4 °C. A fase aquosa foi transferida para um novo eppendorf (livre de RNase), ao qual foi adicionado álcool isopropílico (1:1). Após a manutenção dessa mistura em temperatura ambiente por 10 min (precipitação do RNA íntegro), foi realizada centrifugação a 12.000 x g, 10 min, 4 °C. O RNA precipitado foi lavado com etanol 75% e, por fim, ressuspenso em 30 µL de água grau Milli-Q tratada previamente com DEPC (dietil-pirocarbonato). A concentração de RNA foi determinada em espectrofotômetro (Biophotometer-Eppendorf®), através de medida das absorvâncias das preparações a 260 nm, utilizando como valor padrão 1 OD<sub>260</sub> = 40 µg/mL de RNA. A integridade das amostras de RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose (1%) em tampão TBE (Tris-Borato-EDTA), preparado com água grau Milli-Q estéril. Após a corrida eletroforética, as bandas foram visualizadas através do uso de brometo de etídeo (0,01 ng/µL), sob luz ultravioleta em câmara escura equipada com um transluminador (*Gel Transilluminator Bio-Rad*) e uma câmera acoplada a um microcomputador dotado de um *software* de captura e análise de imagens em tempo real (Sambrook *et al.*, 1989). Após análise, as amostras foram armazenadas a - 80 °C, até a utilização para obtenção de cDNA.

### **5.6.2 Purificação do RNA total**

Após extração, o RNA total foi tratado com a enzima RQ1 DNase (Promega®), para digestão de DNA genômico remanescente. O RNA extraído (15 µg) foi incubado com 15 µL de DNase (15 unidades/µL), no tampão da enzima diluída em água. A mistura reacional foi incubada por 30 min, a 37 °C, sendo, em seguida, adicionada solução de parada para cessar a reação, que foi incubada por 10 min, a 65 °C.

Após digestão do DNA genômico, o RNA total foi purificado usando RNasy mini Kit (Quiagen®). Inicialmente, o volume da amostra foi ajustado para 100 µL com água livre de RNase e, em seguida, foi adicionado 350 µL de tampão de lise (RLT). Essa solução recebeu 150 µL de etanol 100%, sendo transferida, imediatamente, para a coluna RNeasy *Mini Spin Column* encaixada em um microtubo de 2 mL (*Collection tube*). Posteriormente, essa solução foi centrifugada a 8.000 x g por 15 s, 25 °C, e o filtrado descartado. Para concentrar a amostra,

a coluna foi novamente encaixada no microtubo, sendo adicionado 500  $\mu\text{L}$  do tampão RPE, que seguidamente, foram submetidos a centrifugação de  $8.000 \times g$ , 15 s,  $25^\circ\text{C}$  (passo realizado 2 vezes). O sobrenadante foi descartado e a coluna acoplada em um novo tubo (Eppendorf de 1,5 mL), para eluição do RNA com adição de 30  $\mu\text{L}$  de água livre de RNase. O RNA purificado foi recuperado por centrifugação ( $8.000 \times g$ , 1 min,  $25^\circ\text{C}$ ) e estocado a  $-80^\circ\text{C}$ .

### 5.6.3 Síntese de cDNA

A reação de RT-PCR (síntese de cDNA sobre um molde de RNA catalisada pela transcriptase reversa, seguida de amplificação por meio de PCR, reação em cadeia de polimerase) foi realizada utilizando-se a amostra de RNA purificada e oligonucleotídeos iniciadores degenerados (*primers*), sendo o primer *foward* desenhado (5'-CCGTGYCCGGCNATHCAGCGTTGCTGCCAACAGCTGCGG-3') a partir da seqüência de aminoácidos  $\text{NH}_2$ -terminal de *Mo-CBP<sub>3</sub>*, obtida por Gifoni (2009), que está depositada em Uniprot. Sítio de restrição (sublinhado) de endonucleases foi incorporado ao primer *foward* para permitir a manipulação dos fragmentos.

Nesse protocolo, a síntese de cDNA foi efetuada a partir de uma alíquota contendo 2  $\mu\text{g}$  de RNA total, utilizando-se 3  $\mu\text{L}$  de 10 mM do *oligo d(T) - 28* (Promega®), 4,97  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  livre de nucleases, 2  $\mu\text{L}$  da mistura de desoxinucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), com concentração de 5 mM cada, 2,4  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  25 mM e transcriptase reversa (1 U/ $\mu\text{L}$ ) – Impron II (Promega®), totalizando um volume reacional de 20  $\mu\text{L}$ .

As amostras de RNA foram pré-desnaturadas a  $65^\circ\text{C}/5$  min em banho-maria e mantidas em banho de gelo por 2 min, até a adição de 1  $\mu\text{L}$  de Impron II. A síntese do cDNA foi realizada a  $42^\circ\text{C}/60$  min com posterior inativação da enzima a  $75^\circ\text{C}/15$  min. O produto da RT-PCR foi quantificado e empregado nas reações de PCR.

A PCR foi realizada em termociclador (*PTC-200 DNA Engine- M & J Research*®, USA), em volume total de 25  $\mu\text{L}$  contendo: 1  $\mu\text{L}$  de cDNA obtido anteriormente; 5  $\mu\text{L}$  de tampão da *Taq* DNA polimerase; 1  $\mu\text{L}$  da mistura de dNTPs (dATP, dGTP, dTTP, dCTP- 5 mM, cada); 0,75  $\mu\text{L}$  de 10 mM do *oligo d(T) 28* (Promega®); 0,75  $\mu\text{L}$  de primer *foward*, produzido a partir da extremidade  $\text{NH}_2$ -terminal de *Mo-CBP<sub>3</sub>*, 0,1  $\mu\text{L}$  *Taq* DNA polimerase (5 U/ $\mu\text{L}$ ; GIBCO BRL®) e 16,4  $\mu\text{L}$  água Milli-Q® estéril. A princípio, o programa utilizado para amplificação do cDNA de *Mo-CBP<sub>3</sub>* foi  $95^\circ\text{C}$  por 2 min (pré-desnaturação) e 27 ciclos de  $95^\circ\text{C}$  por 1 min (desnaturação),

52 °C por 40 seg (anelamento) e 72 °C por 30 seg (extensão), seguidos por uma extensão final a 72 °C por 5 min. As combinações de *primers* citadas anteriormente também foram testadas em condições de anelamento em gradiente de temperatura de 46,1 °C a 57,9 °C, sendo mantidos constantes os demais parâmetros da PCR. Amplificação do inserto esperado para *Mo-CBP<sub>3</sub>* ocorreu apenas nas temperaturas de 50,3 °C e 52,3 °C.

O(s) produto(s) de amplificação obtido(s) nas reações de PCR utilizando os *primers* para *Mo-CBP<sub>3</sub>* foi(ão) analisados através de eletroforese em gel de agarose (1%) em tampão TBE, submetido a uma voltagem de 4 V/cm, tendo como marcador de massa molecular  $\Phi$ X174 RF DNA/*Hae* III Fragments (Invitrogen®). As amostras e o marcador de massa molecular foram solubilizados em tampão de amostra, contendo azul de bromofenol 0,25%, xilenocianol - FF 0,25% e glicerol 30%, e as bandas foram visualizadas por meio do uso de brometo de etídio (0,01 ng/ $\mu$ L), sob luz ultravioleta.

Em seguida, os fragmentos de interesse foram purificados a partir do gel de agarose, utilizando o kit GFX DNA (Amersham Biosciences), de acordo com as orientações do fabricante. Após purificação, a concentração de DNA extraído foi estimada pela absorbância a 260 nm.

Para clonagem dos fragmentos amplificados e purificados do gel, o DNA foi solubilizado em água grau Milli-Q® estéril e incubado com o vetor pGEM-T Easy, em um meio contendo tampão de ligação e T4-DNA ligase (Promega®). Essa mistura foi incubada por 16 h, a 4 °C. Os produtos de ligação foram, subsequentemente, utilizados para transformar células competentes de *E. coli* TOP10 F' (Invitrogen®), através do processo de eletroporação (SAMBROOK *et al.*, 2001) em microcélulas de polipropileno (*Gene Pulser Cuvette* - Bio-Rad®). Após o processo de transformação, as células recombinantes foram cultivadas em meio ágar Luria-Bertani (LB) líquido, por 1 h, a 37 °C e, em seguida, em meio LB sólido (para seleção dos clones recombinantes) contendo 100  $\mu$ g/mL de ampicilina, 50  $\mu$ L de X-Gal 25 mg/mL (5-bromo-4-cloro-3-indolil-  $\beta$ -D-galactopiranosídeo) e 10  $\mu$ L de isopropil-tio-galactosídeo 100 mM (IPTG - para indução da expressão do gene da  $\beta$ -galactosidase), por 24 h, a 37 °C. Os plasmídeos dos clones contendo o DNA de interesse (brancos) foram isolados, utilizando o método de lise alcalina, como descrito por Sambrook e colaboradores (1989) e, posteriormente, usados para sequenciamento do inserto. Antes de serem submetidos ao sequenciamento automatizado de DNA, amostras de cerca de 30  $\mu$ g dos plasmídeos provenientes das colônias brancas foram submetidas à digestão por 3 h, a 37 °C, com EcoRI 2,5 U (Promega®) em tampão de digestão. Terminado o processo de digestão, os produtos foram analisados em gel de agarose 1%, tal como descrito anteriormente. Foram submetidos ao sequenciamento somente os clones com digestão positiva (contendo o fragmento usado na ligação).

#### 5.6.4 Sequenciamento de DNA

Sequenciamentos dos clones obtidos por PCR foram realizados com kit de DNA DYEnamic ET Dye e com kit de sequenciamento de ciclo terminador (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), seguindo o protocolo do fabricante. Reações foram realizadas com volume total de 10  $\mu$ L contendo 360 ng de plasmídeos purificados e ambos foram sequenciados usando primers universais forward M13(-40) (5'-GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA-3') e reverse M13(-46) (5'-GAGCGGATAACAATTTTCACACAGG-3'). Para eletroforese capilar, 10  $\mu$ L agarose foi adicionada (0,06% de concentração final) para sequenciar produtos ressuspensos em 10  $\mu$ L de 70% de formamida/1Mm EDTA, como inicialmente sugerido (Vatcher *et al.*, 2002, Almira *et al.*, 2003). Reações de sequenciamento foram analisadas em sequenciador automático MegaBACE 1000 (GE Healthcare). Os parâmetros utilizados para a corrida do sequenciamento foram injeção de 3 kV por 50 s e eletroforese de 6 kV por 180 min. Base de dados automáticos foram realizados usando software Cimarron 3.12 e os eletroferogramas foram visualizados com Analisador de Sequência v3.0 (Amersham Biosciences, Sunnyvale, CA, USA). As sequências de bases foram deduzidas por inspeção de cada processo traçado e leituras de alta qualidade (phred >20), que foram usados para generalizar sequências de *Mo*-CBP<sub>3</sub> usando o Phred/Phrap/Consed package (Ewing & Green, 1998; Ewing *et al.*, 1998; Gordon *et al.*, 1998).

A sequência codificada de cDNA de *Mo*-CBP<sub>3</sub> será depositada em GenBank. Pesquisas de sequências homólogas depositadas no banco de dados do NCBI foram realizadas usando o programa BLAST (Altschul *et al.*, 1990).

Sequências múltiplas de alinhamentos foram geradas e manualmente editadas usando os programas ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) e BioEdit (Hall, 1999), respectivamente. A presença de domínios conservados e outras características estruturais, como ligação e sítios catalíticos foram identificadas por buscas de similaridade em Bancos de dados de Domínios Conservados, CDD ([www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml)).

#### 5.7 Análise estatística

Os resultados, cuja análise estatística se fizeram necessários, foram expressos com média  $\pm$  erro padrão da média e a avaliação estatística dos dados foi realizada através de

ANOVA, testes paramétricos e não-paramétricos, sendo considerados como significativos os resultados que apresentarem  $p < 0,05$ .

## ***6 RESULTADOS***

Os resultados obtidos no presente trabalho foram divididos em quatro partes, de modo a possibilitar uma melhor compreensão e análise dos dados.

- A **Parte 1** corresponde à caracterização físico-química e estrutural da proteína ligante à quitina de sementes de *Moringa oleifera* (*Mo-CBP<sub>3</sub>*).
- A **Parte 2** compreende os ensaios biológicos, de modo a avaliar o espectro e modo de ação antifúngicos da *Mo-CBP<sub>3</sub>*.
- A **Parte 3** inclui os experimentos de avaliação citotóxica de *Mo-CBP<sub>3</sub>* para células humanas.
- A **Parte 4** compreende o isolamento, clonagem e caracterização do DNA complementar (cDNA) de uma das subunidades da *Mo-CBP<sub>3</sub>*.

## Parte 1 – Caracterização físico-química e estrutural da proteína ligante à quitina de sementes de *M. oleifera*, denominada *Mo-CBP<sub>3</sub>*

### 6.1 Obtenção de *Mo-CBP<sub>3</sub>*

Inicialmente, *Mo-CBP<sub>3</sub>* foi purificada e acumulada para atingir os objetivos propostos no presente estudo. Para tanto, foi utilizado o protocolo estabelecido por Gifoni *et al.* (2012), que está sumarizado nas Figuras 1, 2 e 3, mostradas em “*Métodos*”. O teor médio de proteína extraída da farinha de sementes corresponde a 216,44 mgP/gF (TABELA 1). Para obtenção das albuminas, fonte das proteínas ligantes à quitina, o extrato total foi submetido à diálise exaustiva contra água destilada e, em seguida, centrifugado. O sobrenadante, representando a fração proteica solúvel em água, portanto, as albuminas (144,71 mgP/gF), foi concentrado com sulfato de amônio a 90% de saturação, resultando na fração proteica denominada de F 0-90%, que apresentou um teor médio de proteínas de 122,33 mgP/gF, representando 56,5% das proteínas do extrato total. A F 0-90% (835 mgP) foi submetida à cromatografia de afinidade em matriz de quitina, que resultou em um material proteico não retido e em duas outras frações proteicas retidas (FIGURA 4). Das proteínas que ficaram ligadas à matriz, uma parte foi eluída com solução de *N*-acetil-D-glucosamina 0,1 M e a outra com ácido acético 0,05 M, pH 3,0, cujas siglas P<sub>NAG</sub> e P<sub>AC</sub> foram arbitrariamente adotadas para designar tais frações proteicas, respectivamente, e serão doravante empregadas neste trabalho. P<sub>NAG</sub> foi dialisado contra ácido acético 0,1 M, para remoção de carboidratos, e depois contra água destilada e liofilizado. A aplicação de P<sub>NAG</sub> (15 mgP) em matriz Resource S resultou na separação de várias frações proteicas (FIGURA 5), tendo sido *Mo-CBP<sub>3</sub>* eluída com tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2, contendo NaCl 0,5 M. *Mo-CBP<sub>3</sub>* corresponde a 1,17 mgP/gF, representando um rendimento final de 0,5% das proteínas do extrato total.

*Mo-CBP<sub>3</sub>* se mostrou homogênea, livre de contaminantes, com massa molecular de aparente de 18,0 kDa e ativa contra fungos fitopatogênicos, conforme mostram as Figuras 6 e 7, respectivamente.

**Tabela 1** - Teores proteicos das diferentes frações resultantes do processo de purificação de *Mo*-CBP<sub>3</sub>

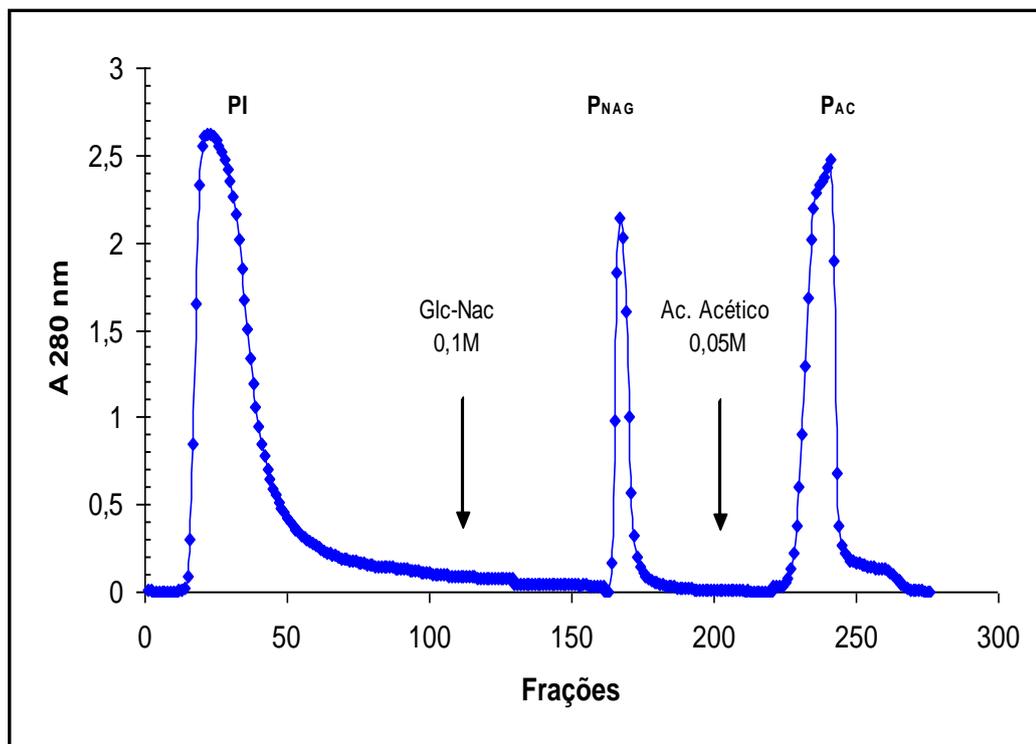
Amostras	Teor Proteico <sup>a</sup>	
	(mgP/gF) <sup>b</sup>	Rendimento (%) <sup>c</sup>
Extrato total	216,44 ± 4,72	100
Albuminas	144,71 ± 1,74	66,6
F 0-90%	122,33 ± 2,04	56,5
P <sub>NAG</sub> <sup>d</sup>	6,50 ± 0,38	3,0
<i>Mo</i> -CBP <sub>3</sub>	1,17 ± 0,07	0,5

<sup>a</sup> Os resultados representam a média e o desvio padrão de seis experimentos similares.

<sup>b</sup> Quantidade total de proteína recuperada (mg), em cada etapa de purificação, a partir de 1 g de farinha de *M. oleifera*.

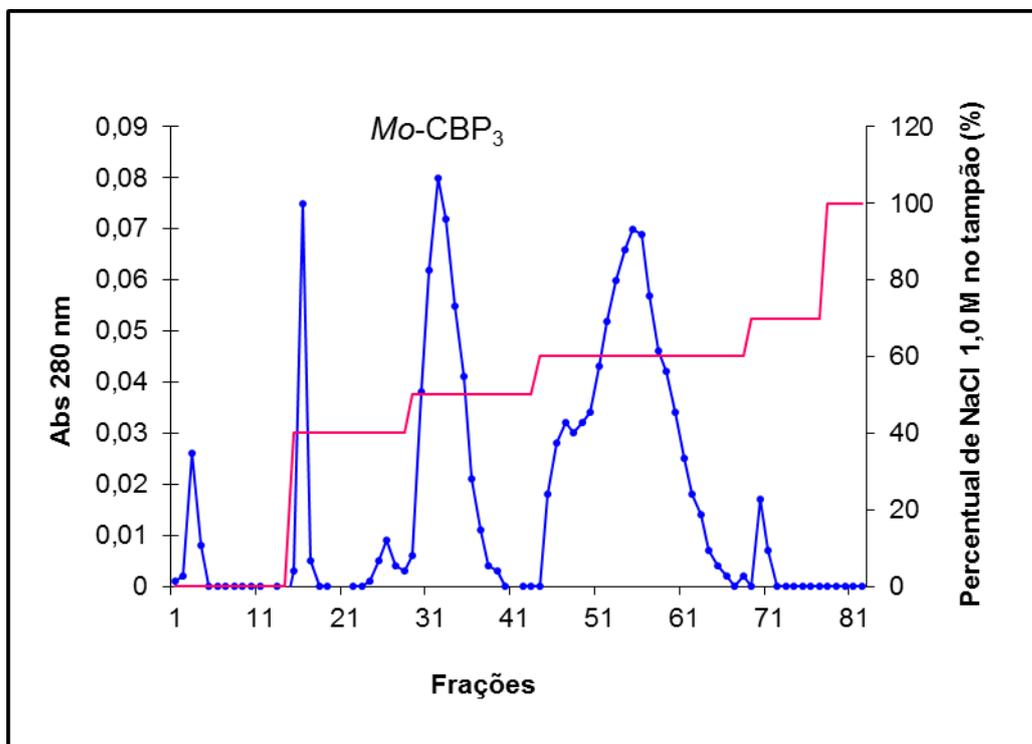
<sup>c</sup> Recuperação da proteína em cada etapa de purificação (extrato bruto igual a 100%).

<sup>d</sup> Proteína ligante à quitina eluída com *N*-acetil-D-glucosamina 0,1 M.

**Figura 4** - Cromatografia em matriz de quitina

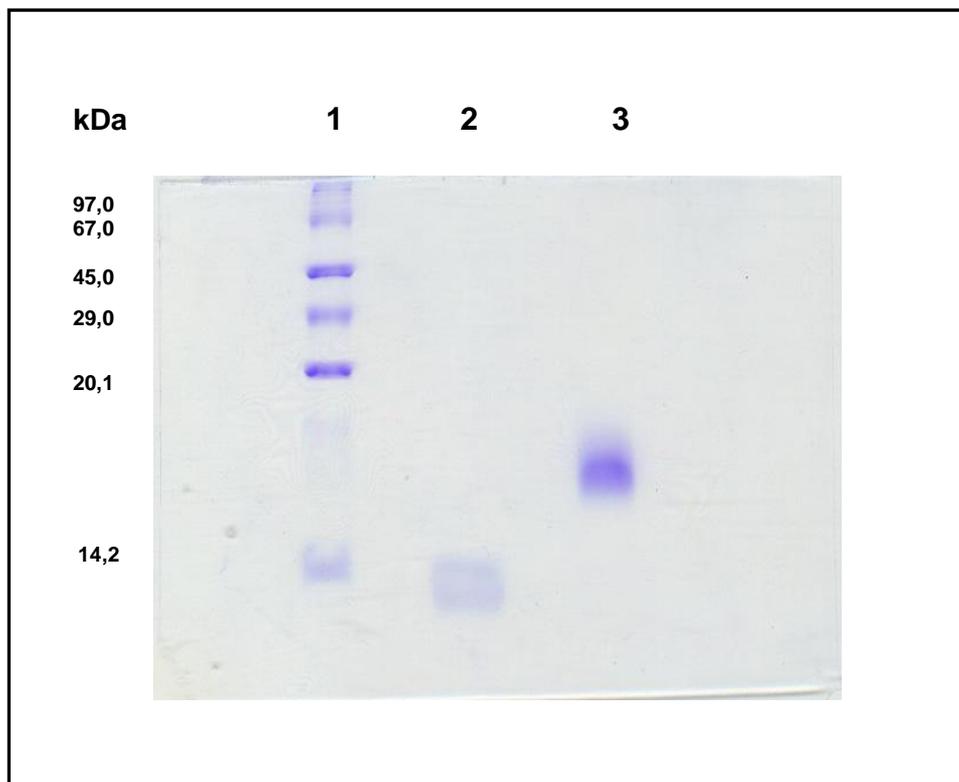
Amostra (835 mg) da fração albumina concentrada com sulfato de amônio (F0-90%), obtida a partir do extrato total de sementes de *Moringa oleifera*, foi aplicada em coluna de quitina (31,0 x 3,0 cm), equilibrada com tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0, contendo NaCl 0,15 M. Pico 1 (PI) representa o material não retido eluído com o tampão de equilíbrio; Picos 2 (P<sub>NAG</sub>) e 3 (P<sub>AC</sub>) correspondem às frações proteicas eluídas com *N*-acetil-D-glucosamina 0,1 M e ácido acético 0,05 M respectivamente. Fluxo: 60 mL/h; Frações: 3,5 mL.

**Figura 5** - Cromatografia de troca iônica em matriz de Resource S, acoplada a sistema de FPLC



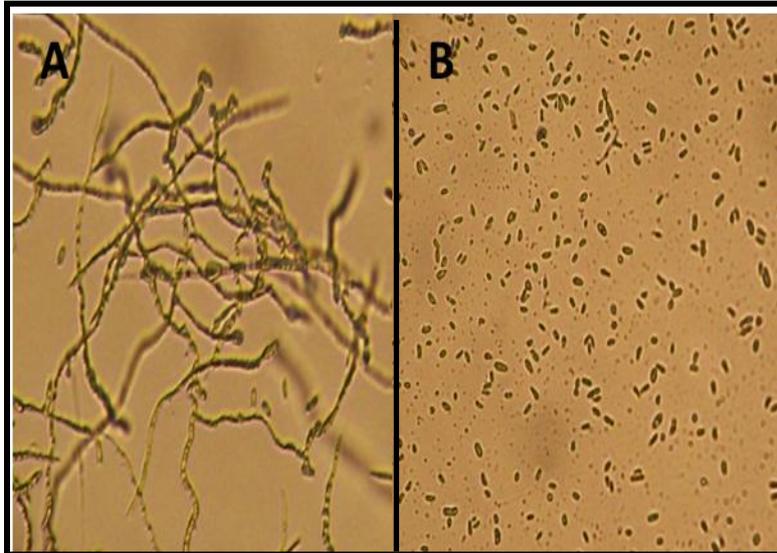
A fração (15 mg P) eluída com da matriz de quitina com *N*-acetil-D-glucosamina ( $P_{NAG}$ ) foi aplicada em matriz de Resource S (1,0 mL), equilibrada com tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2. Uma fração não retida e quatro frações retidas, eluídas após adição de 0,4, 0,5, 0,6 M e 0,7 M de NaCl ao tampão de equilíbrio, foram obtidas. Fluxo: 1 mL/min; Frações: 2,0 mL.

**Figura 6** - Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes de *Mo*-*CBP*<sub>3</sub>



Raia 1 - Marcadores de massa molecular (fosforilase B - 97,0 kDa; albumina sérica bovina - 67,0 kDa; albumina do ovo - 45,0 kDa; anidrase carbônica bovina - 29,0 kDa; inibidor de tripsina de soja tipo Kunitz - 20,1 kDa e  $\alpha$ -lactalbumina - 14,2 kDa); Raia 2 - *Mo*-*CBP*<sub>3</sub> na presença de  $\beta$ -mercaptoetanol e Raia 3 - *Mo*-*CBP*<sub>3</sub> na ausência de  $\beta$ -mercaptoetanol. As proteínas foram coradas com *Coomassie Brilliant Blue* R-250 0,05%.

**Figura 7** - Fotomicrografia de esporos de *F. solani* cultivados no meio contendo *Mo*-CBP<sub>3</sub>



A - H<sub>2</sub>O destilada (Controle) e B - *Mo*-CBP<sub>3</sub> (0,1 mg/mL).

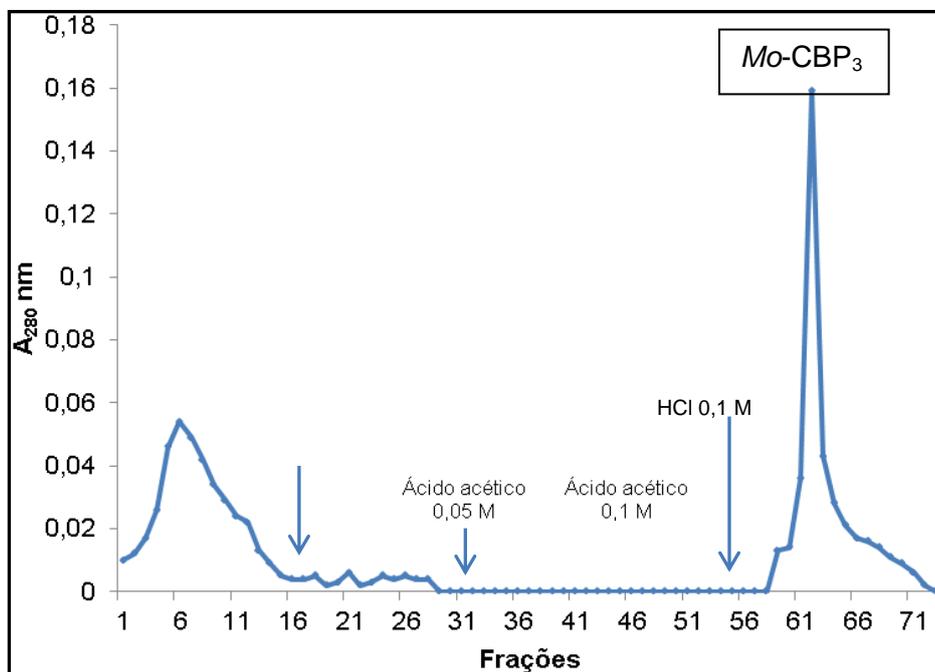
## 6.2 Interação de *Mo*-CBP<sub>3</sub> pura com a matriz de quitina

Conforme protocolo utilizado no processo de purificação, *Mo*-CBP<sub>3</sub> é oriunda de uma fração proteica que se liga à matriz de quitina. Baseado nisso, foi suposto que *Mo*-CBP<sub>3</sub> pura também seria capaz de se ligar à quitina. De fato, *Mo*-CBP<sub>3</sub> foi capaz de interagir com essa matriz, entretanto sua eluição da matriz não ocorreu com o uso de *N*-acetil-D-glucosamina ou ácido acético 0,05 M ou 0,1 M, pH 3,0, sendo verificada apenas após aplicação de HCl 0,1 M, evidenciando uma interação mais forte com a quitina (FIGURA 8). O material eluído e dialisado em membrana de 12 kDa contra água, em análise por PAGE-SDS mostrou uma banda proteica de massa molecular aparente de 18 kDa e manteve sua atividade antifúngica, confirmando os dados apresentados nas Figuras 6 e 7, ratificando, assim, a denominação de “proteína ligante à quitina” conferida a *Mo*-CBP<sub>3</sub>.

## 6.3 Caracterização quanto à massa molecular e número de cadeias polipeptídicas de *Mo*-CBP<sub>3</sub>

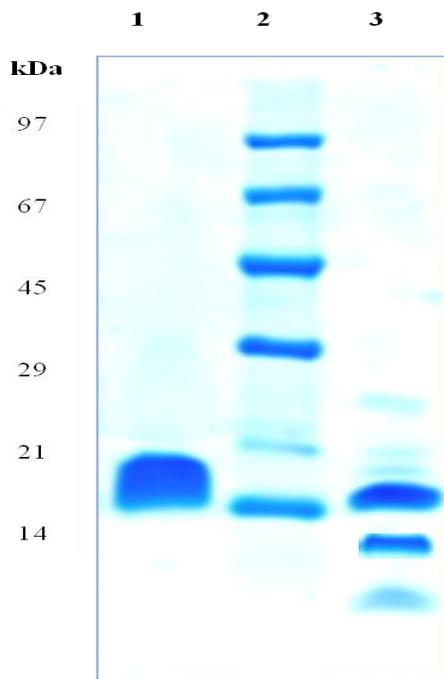
Por PAGE-SDS sob condições desnaturantes, na presença de  $\beta$ -mercaptoetanol 1%, *Mo*-CBP<sub>3</sub> apresentou uma banda difusa de massa molecular ao redor de 9,0 kDa (FIGURA 6, Raia 2). Todavia, na ausência desse agente redutor, uma banda intensa e mais definida, em torno de 18,0 kDa, foi observada (FIGURA 6, Raia 3).

Buscando uma melhor definição do perfil eletroforético de *Mo*-CBP<sub>3</sub> quando reduzida, essa proteína foi analisada por eletroforese em sistema Tricina-PAGE-SDS. *Mo*-CBP<sub>3</sub> na ausência de  $\beta$ -mercaptoetanol 2% apresentou uma banda com massa molecular de 18,0 kDa, tal como observado anteriormente por PAGE-SDS (FIGURA 9, Raia 1). Porém, na presença do agente redutor e aquecimento a 100 °C, por 15 min, foram verificadas duas bandas proteicas com massas moleculares em torno de 9,0 e 5,0 kDa (FIGURA 9, Raia 3). Ainda que essa condição tenha possibilitado a visualização de duas cadeias polipeptídicas, ela não foi suficiente para causar a redução total da *Mo*-CBP<sub>3</sub>. Portanto, *Mo*-CBP<sub>3</sub> foi tratada em várias outras

**Figura 8-** Cromatografia em matriz de quitina

$Mo-CBP_3$  (1 mg) foi aplicada em matriz de quitina (2,0 x 1,0 cm) equilibrada com tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0, contendo NaCl 0,15 M. Após eluição do material não retido, foram aplicados à coluna Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0, contendo NaCl 1 M, seguido de ácido acético 0,05 M, ácido acético 0,1 M e HCl 0,1 M. Fluxo: 0,5 mL/h; Frações: 1,0 mL.

**Figura 9** - Eletroforese em sistema Tricina-Poliacrilamida-SDS de  $Mo\text{-}CBP_3$



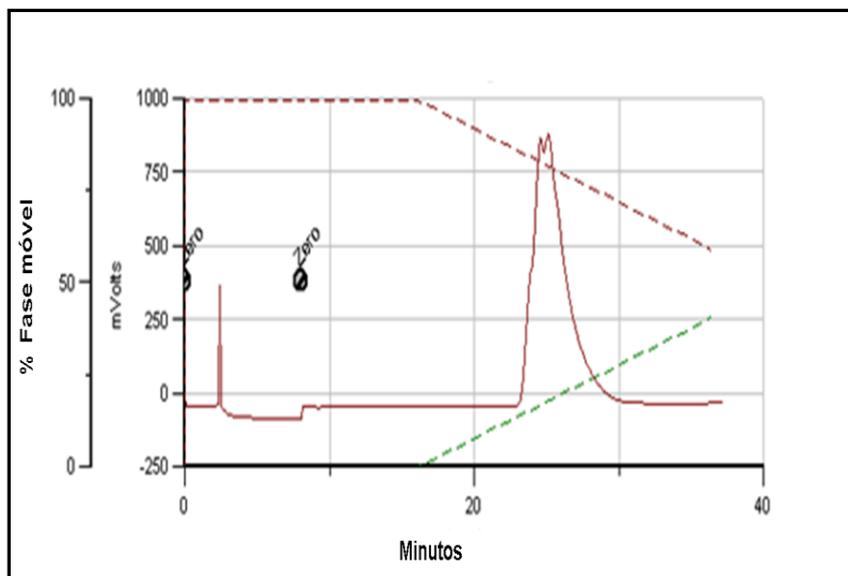
Raias 1 e 3 -  $Mo\text{-}CBP_3$  (10  $\mu\text{g}$ ) na ausência e presença de  $\beta$ -mercaptoetanol 2%; Raia 2 - Marcadores de massa molecular (fosforilase B - 97,0 kDa; albumina sérica bovina - 67,0 kDa; albumina do ovo - 45,0 kDa; anidrase carbônica bovina - 29,0 kDa; inibidor de tripsina de soja tipo Kunitz - 20,1 kDa e  $\alpha$ -lactalbumina - 14,2 kDa). As bandas foram coradas com *Coomassie Brilliant Blue R-250* 0,05%.

condições mais drásticas:  $\beta$ -mercaptoetanol 5%, seguido de aquecimento a 100 °C, por 15 e 30 min; ditioneitol (DTT) 0,02 M, ao invés de  $\beta$ -mercaptoetanol 2%, seguido de alquilação com iodoacetamida (IAA) 0,06 M durante 1 h, na ausência de luz e, por último, DTT 0,1 M, aquecimento a 100 °C por 30 min, seguido da adição de IAA 0,3 M, na ausência da luz. Porém, nenhuma dessas condições resultou na redução total de *Mo*-CBP<sub>3</sub>.

*Mo*-CBP<sub>3</sub> nativa foi submetida à análise por espectrometria de massas, que revelou a existência de muitas isoformas, interferindo na qualidade do espectro (dados não mostrados). Dessa maneira, antes da aplicação no espectrômetro de massas, *Mo*-CBP<sub>3</sub> foi submetida à cromatografia de fase reversa em coluna C2/C18, acoplada a HPLC, resultando em um material não retido e outro retido à coluna, esse último sendo majoritário (FIGURA 10). As frações (1 mL/cada) coletadas foram reunidas, dialisadas contra água grau-Milli Q e, posteriormente, analisadas por espectrometria de massas. As frações 3 a 11, compreendendo o material retido na coluna, apresentaram massas moleculares variando de 12168 a 12303 Da (TABELA 2). A Figura 11 mostra o espectro de uma dessas frações (fração 8). Nessa fração, as massas de 12227, 12170 e 12298 Da corresponderam à ionização de 100%, 72% e 67%, respectivamente.

*Mo*-CBP<sub>3</sub> tratada com agente redutor (DTT 0,1 M) e iodoacetamida (IAA 0,3 M) foi também submetida à cromatografia de fase reversa em coluna C2/C18, acoplada a HPLC. O material retido se apresentou, diante das condições empregadas, como dois picos bem definidos, conforme mostrados na Figura 12. As frações proteicas (0,5 mL/cada) coletadas no momento da cromatografia foram posteriormente reunidas, totalizando de 17 frações, dialisadas contra água grau-Milli Q e analisadas por espectrometria de massas. As frações 1 e 2 (não mostradas) compreendem o material não retido, ao passo que as frações 3 a 17 correspondem ao material retido, cujas massas moleculares variaram de 3789 a 8562 Da (TABELA 3). A Figura 13 mostra os espectros de massa de duas dessas frações representando o material retido. A fração 5 apresentou uma massa de 3949 Da, que correspondeu à ionização de 100% (FIGURA 13A). Já a fração 16 apresentou massas de 8480 e 8496 Da, correspondendo à ionização de 100% e 97%, respectivamente (FIGURA 13B). Tais frações representam o primeiro e o segundo picos retidos na coluna C2/C18 que, de

**Figura 10** - Cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa (FR-HPLC) de *Mo-CBP<sub>3</sub>*



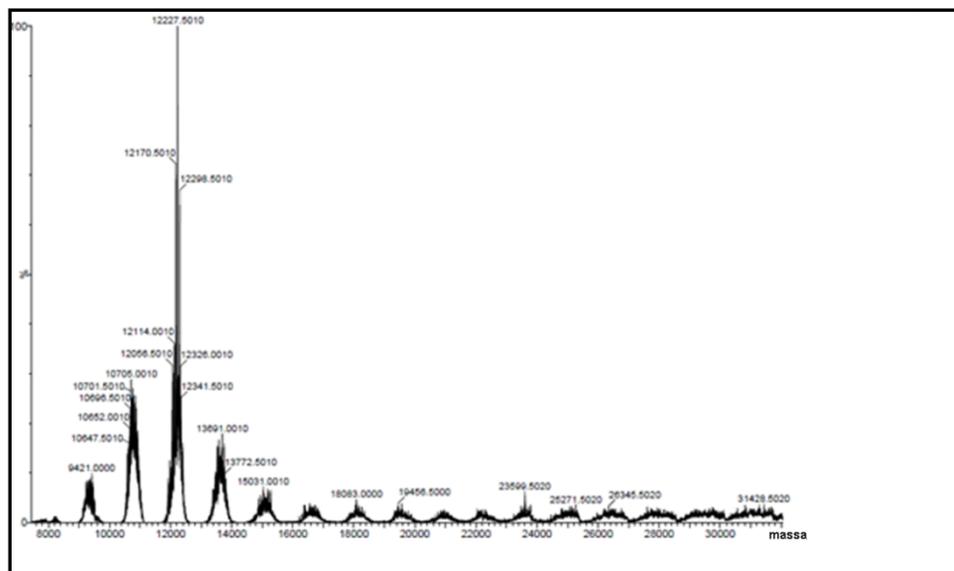
*Mo-CBP<sub>3</sub>* (1 mg/mL) nativa foi aplicada em coluna C2-C18 (4,6 mm x 100 mm), previamente equilibrada com o solvente A. Solvente A: 5% acetonitrila e 95% H<sub>2</sub>O contendo ácido trifluoroacético 0,05%; Solvente B: 90% acetonitrila. *Mo-CBP<sub>3</sub>* foi fracionada em gradiente linear durante 50 min. A linha verde representa o gradiente de acetonitrila e a vermelha o perfil de eluição da proteína a 214 nm. Fluxo: 0,2 mL/h; Frações: 1 mL/tubo.

**Tabela 2** - Sumário dos dados obtidos por espectrometria de massas de *Mo*-CBP<sub>3</sub> nativa

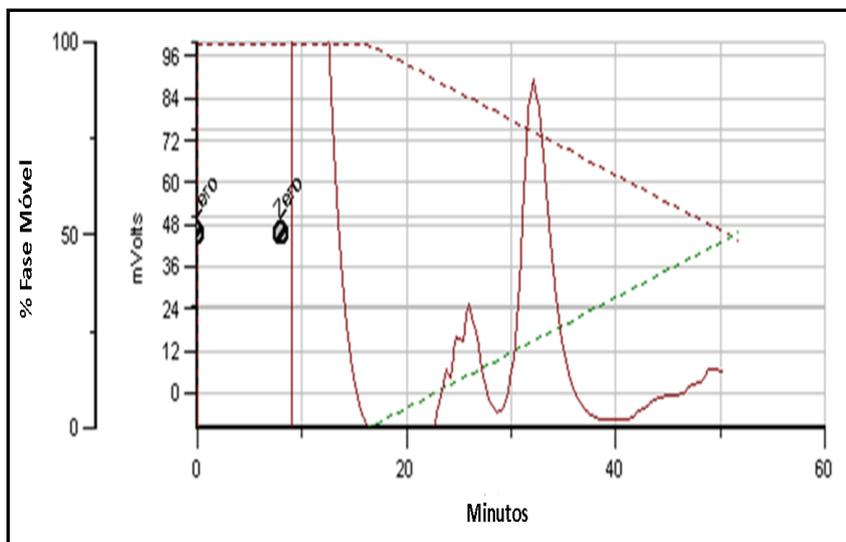
Frações <sup>a</sup>	Massas [M+H] <sup>+</sup>
3	12172; 12226; 12228; 12225; 12168; 12297;12300
4	12226; 12169; 12298; 12300; 12297
5	12225; 12170; 12227; 12169; 12228; 12297; 12229; 12172
6	1226;12168;12228;12171;12297;12298; 12229;12299
7	12226; 12228; 12171; 12296; 12169; 12300; 12167
8	12227; 12170; 12298
9	12228; 12171; 12301; 12298
10	12173; 12228; 12227; 12171; 12300; 12169; 12231; 12303
11	12229; 12171; 12301; 12229

<sup>a</sup> Essas frações foram oriundas da cromatografia de fase reversa em coluna C2/C18, acoplada a HPLC, correspondendo ao material retido, conforme mostrado na Figura 10.

**Figura 11** - Espectro de massas deconvoluído de  $Mo-CBP_3$  nativa (fração 8) usando fonte de ionização por eletrospray



**Figura 12** - Cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa (FR-HPLC) de *Mo*-CBP<sub>3</sub>



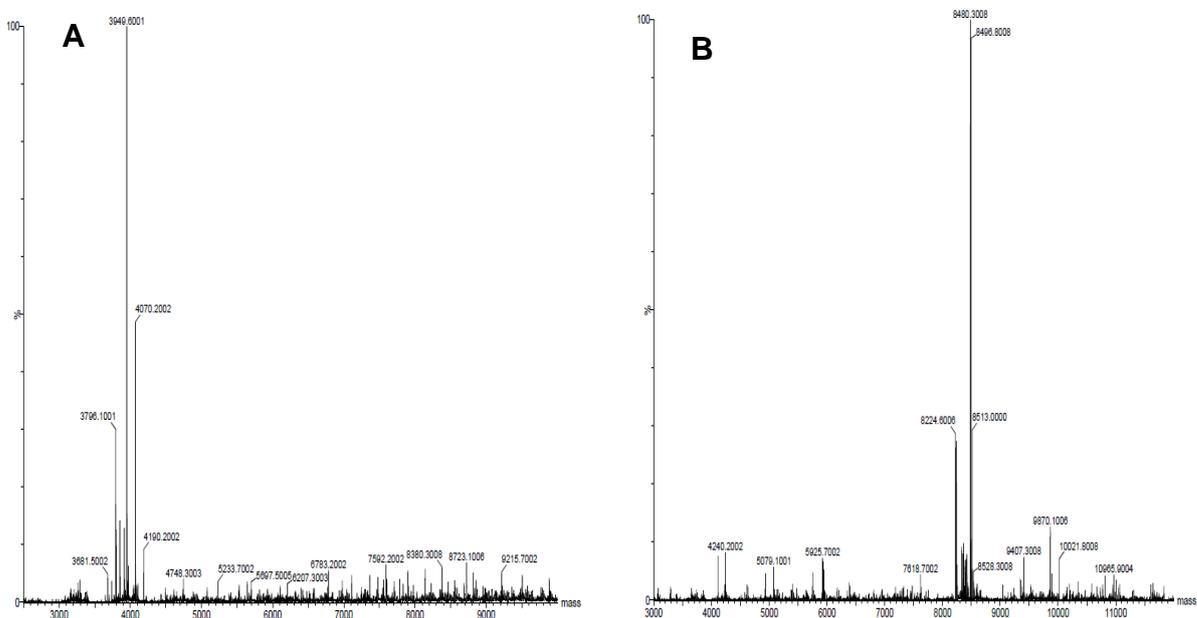
*Mo*-CBP<sub>3</sub> (2,4 mg/mL) reduzida (DTT 0,1 M) e alquilada (IAA 0,3 M) foi aplicada em coluna C2-C18 (4,6 mm x 100 mm), previamente equilibrada com o solvente A. Solvente A: 5% acetonitrila e 95% H<sub>2</sub>O contendo ácido trifluoroacético 0,05%; Solvente B: 90% acetonitrila. *Mo*-CBP<sub>3</sub> foi fracionada em gradiente linear durante 50 min. A linha verde representa o gradiente de acetonitrila e a vermelha o perfil de eluição da proteína a 214 nm. Fluxo: 0,2 mL/h; Frações: 0,5 mL/tubo.

**Tabela 3** - Sumário dos dados obtidos por espectrometria de massas de *Mo*-CBP<sub>3</sub> reduzida (DTT 0,1 M) e alquilada (IAA 0,3 M)

Frações <sup>a</sup>	Massas [M+H] <sup>+</sup>
3	3948; 3799; 4069
4	3949; 4070
5	3949
6	4193, 4136
7	4193; 4136
8	4194; 4265; 4137
9	4193; 4290; 4136
10	4290; 4136
11	4290; 4193; 4136
12	4193; 4290; 4136
13	4193; 4290; 4136; 4403
14	8547; 8492; 8562; 8289
15	8501; 8485, 8380
16	8480; 8496
17	8493; 8477

<sup>a</sup> Essas frações foram oriundas da amostra de *Mo*-CBP<sub>3</sub> reduzida e alquilada e submetida à cromatografia de fase reversa em coluna C2/C18, acoplada a HPLC, conforme mostrado na Figura 12.

**Figura 13** - Espectro de massas deconvolvido de *Mo*-CBP<sub>3</sub> reduzida (DTT 0,1 M) e alquilada (IAA 0,3 M), usando fonte de ionização por eletrospray



**A:** Fração 5, representando a cadeia polipeptídica menor ou cadeia A; **B:** Fração 17, representando a cadeia polipeptídica maior ou cadeia B. Ambas frações estão mostradas na Tabela 3. agora em diante, serão denominadas de cadeia polipeptídica menor ou cadeia A e cadeia polipeptídica maior ou cadeia B, respectivamente.

#### 6.4 Sequência NH<sub>2</sub>-terminal das cadeias polipeptídicas de *Mo-CBP<sub>3</sub>*

Diante do achado de que *Mo-CBP<sub>3</sub>* é constituída por duas cadeias polipeptídicas, as cadeias A e B foram submetidas ao sequenciamento por degradação de Edman. Sequência NH<sub>2</sub>-terminal não foi obtida para a cadeia A, mesmo após várias tentativas, indicando estar essa cadeia bloqueada. Já a cadeia B apresentou a sequência CPAIQRCCQQLRNIQPPCRCCQ, confirmando os achados prévios (GIFONI *et al.*, 2012).

#### 6.5 Espectro de absorção da *Mo-CBP<sub>3</sub>*

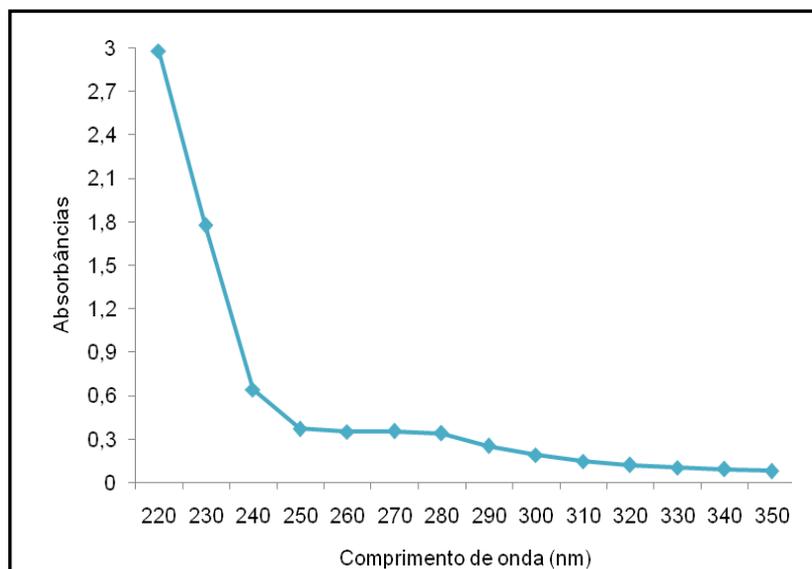
O espectro de absorção de uma solução de *Mo-CBP<sub>3</sub>* encerrando 1 mg/mL em tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,0 revelou uma absorção máxima a 280 nm, apresentando  $\epsilon^{1\%}_{1\text{ cm}} = 3,4$  (FIGURA 14).

#### 6.6 Espectro de dicroísmo circular distante da *Mo-CBP<sub>3</sub>* e avaliação de sua estabilidade estrutural frente à diferentes temperaturas e valores de pH

O espectro de dicroísmo circular (CD) UV-distante (200-250 nm) da *Mo-CBP<sub>3</sub>* caracteriza-se por apresentar formato em “w”, com bandas negativas com mínimos ao redor de 222 e 208 nm, indicando uma proteína helicoidal (FIGURA 15). O conteúdo de estrutura secundária da *Mo-CBP<sub>3</sub>* foi estimado em: 30,3% de  $\alpha$ -hélice, 16,3% de folhas- $\beta$ , 22,3% de volta- $\beta$  e 30,4% de estrutura não ordenada, caracterizando uma proteína alfa-beta.

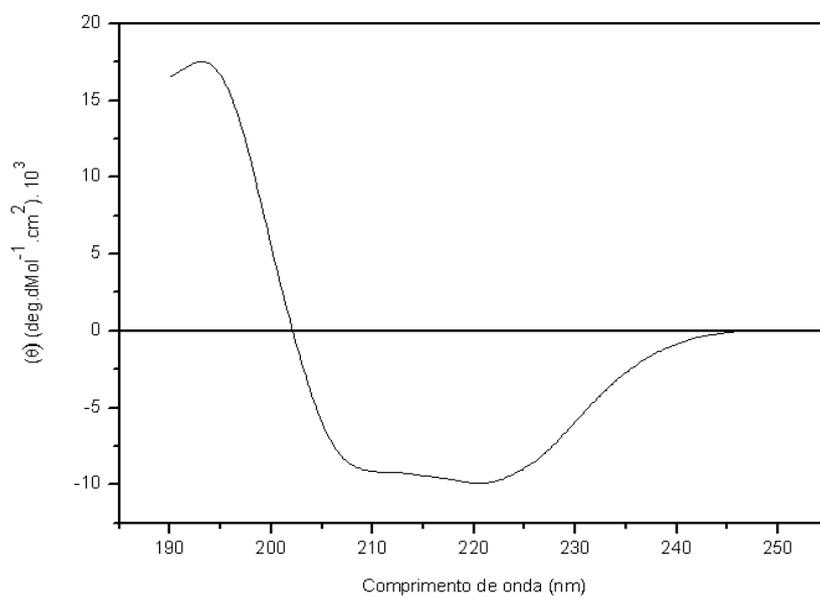
O aquecimento da *Mo-CBP<sub>3</sub>* a diferentes temperaturas (25 a 90 °C), por 10 min, não resultou na alteração do formato do espectro, evidenciando a sua estabilidade estrutural (FIGURA 16 A). Porém, com o aumento gradual de temperatura, uma pequena perda na elipticidade molar foi verificada, quando comparada à proteína nativa, o que sugere desordenamento de elementos de estrutura secundária. De fato, a mudança de temperatura de 26 °C para 90 °

**Figura 14** - Espectro de absorção de *Mo-CBP*<sub>3</sub>. A proteína (1 mg/mL) foi solubilizada em tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,0



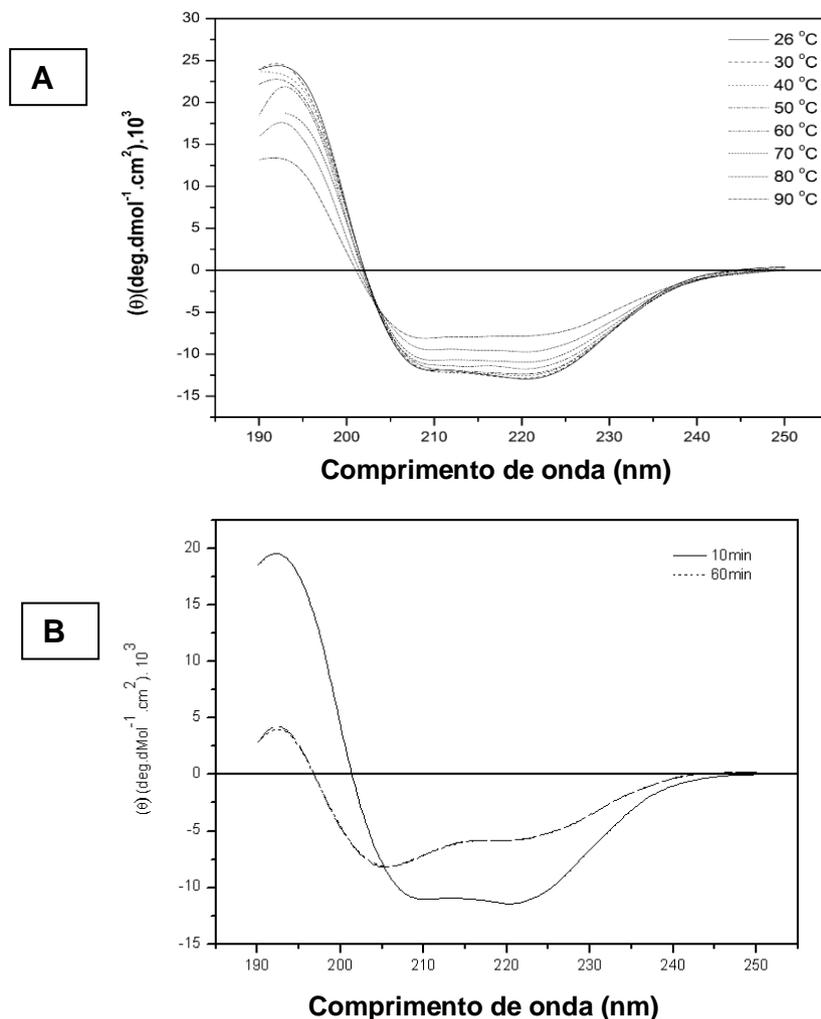
As absorbâncias foram registradas na faixa de comprimento de onda de 220 a 350 nm.

**Figura 15** - Espectro de dicroísmo circular (UV distante) da *Mo-CBP<sub>3</sub>*



A proteína (0,04 mg/mL) foi solubilizada em tampão fosfato de sódio 0,02M, pH7,0. O espectro foi registrado entre 190 e 250 nm.

**Figura 16** – Avaliação da estabilidade estrutural da *Mo-CBP<sub>3</sub>* frente a diferentes temperaturas, por monitoramento através de dicroísmo circular



(A) *Mo-CBP<sub>3</sub>* foi incubada previamente em temperaturas variando de 26 °C a 90 °C, por 10 min; (B) *Mo-CBP<sub>3</sub>* foi inicialmente aquecida a 100 °C, por 60 min. A proteína (0,04 mg/mL) foi solubilizada em tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,0 e o espectro de dicroísmo circular registrado entre 190 e 250 nm.

resultou na *Mo*-CBP<sub>3</sub> uma alteração conformacional, havendo uma diminuição (de 41,0 para 24,2%) da conformação em  $\alpha$ -hélice, contrapondo-se ao aumento (de 13,8 para 25,3%) de folhas- $\beta$  (TABELA 4). Em adição, mesmo na temperatura de 90 °C, por 60 min, *Mo*-CBP<sub>3</sub> não se mostrou desenovelada ou desnaturada, mostrando ser uma proteína termoestável (FIGURA 16B), embora também tenha sido verificado nessa condição um decréscimo de  $\alpha$ -hélice (de 30,3 para 18,6%) e um aumento (de 16,3 para 25,3%) de folhas- $\beta$ , quando comparado ao espectro de dicroísmo circular da proteína nativa (TABELA 5).

Similarmente ao verificado com a temperatura, as mudanças no pH (2 a 12) não mostraram, praticamente, alterações no padrão de distribuição de elementos da estrutura secundária da *Mo*-CBP<sub>3</sub>, reforçando a estabilidade estrutural dessa proteína (FIGURA 17).

### 6.7 Espectro de dicroísmo circular próximo

O espectro de dicroísmo circular no UV-próximo (250-300 nm) mostrou que a proteína nativa (4 mg/mL) apresenta uma estrutura terciária ordenada (FIGURA 18). Sinais nas regiões de 255-270, 275-285 e 285-305 nm são atribuídos à resíduos de fenilalanina, tirosina e triptofano, respectivamente. Outros sinais ao longo do espectro sugerem ser de ligações dissulfeto, porém esses são sinais fracos.

### 6.8 Espectro de fluorescência

O espectro de fluorescência revelou que a excitação de uma solução de *Mo*-CBP<sub>3</sub> (0,02 mg/mL) em 280 nm e 295 nm produz emissão na região de 300-440 nm, com emissões máximas,  $\lambda_{\text{max}}^{\text{emis}}$ , em 303 e 339 nm, respectivamente (FIGURAS 19 A,B).

**Tabela 4** - Distribuição dos padrões de estrutura secundária presentes em *Mo-CBP<sub>3</sub>*, calculados a partir do espectro de dicroísmo circular

<i>Mo-CBP<sub>3</sub></i> <sup>a</sup>	Elementos de Estrutura secundária (%)			
	$\alpha$ -hélice	Folhas- $\beta$	Volta- $\beta$	Estrutura não ordenada
26 °C	41,0	13,8	15,8	29,7
90 °C	24,2	25,3	22,3	29,1

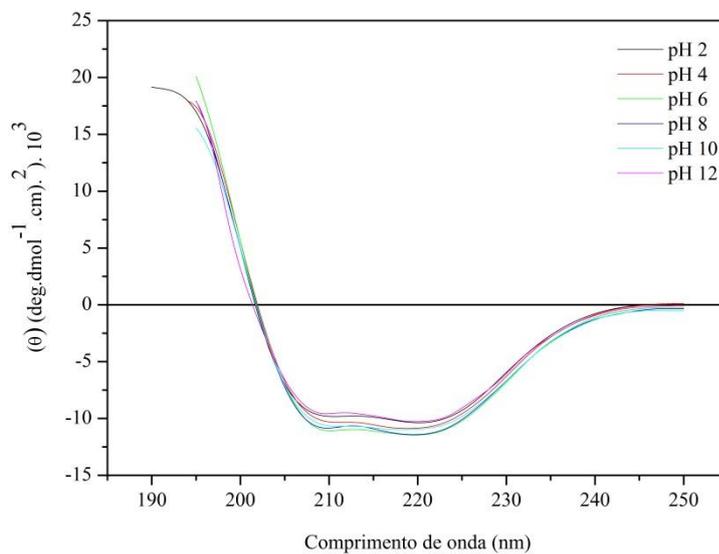
<sup>a</sup> A proteína (0,04 mg/mL) foi solubilizada em tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,0 e previamente incubada nas temperaturas citadas por 10 min. O espectro de dicroísmo circular registrado entre 190 e 250 nm.

**Tabela 5** - Distribuição dos padrões de estrutura secundária presentes em *Mo-CBP<sub>3</sub>*, calculados a partir do espectro de dicroísmo circular

<i>Mo-CBP<sub>3</sub></i>	Estruturas secundárias (%)			
	$\alpha$ -hélice	Folhas- $\beta$	Volta- $\beta$	Estrutura não ordenada
Nativa <sup>a</sup>	30,3	16,3	22,3	30,4
100 °C, 60 min <sup>b</sup>	18,6	31,9	19,6	29,3

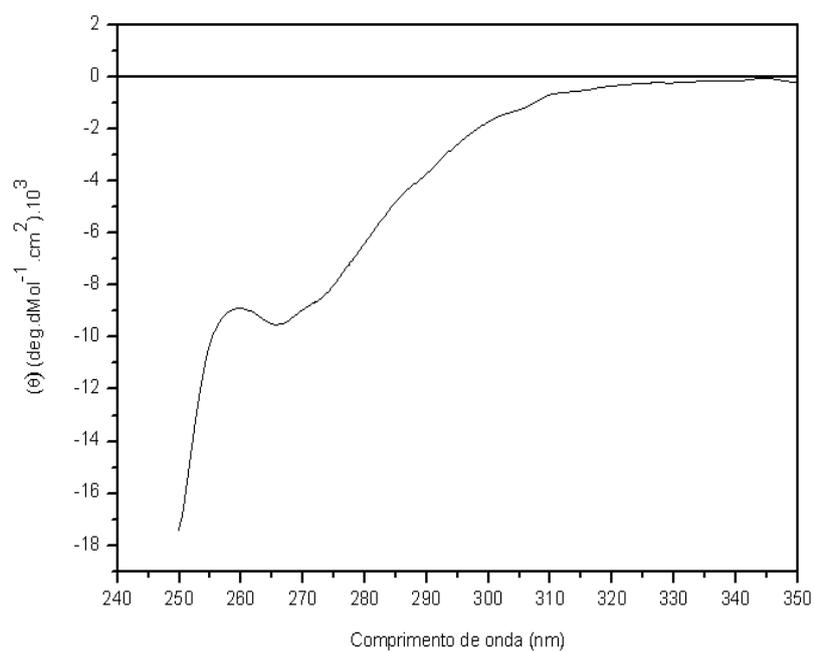
<sup>a</sup> A proteína (0,04 mg/mL) foi solubilizada em tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,0; <sup>b</sup> A solução de *Mo-CBP<sub>3</sub>* foi previamente incubada a 100 °C, por 60 min. O espectro de dicroísmo circular foi registrado entre 190 e 250 nm.

**Figura 17** - Avaliação da estabilidade estrutural da  $Mo-CBP_3$  frente a diferentes valores de pH, por monitoramento através de dicroísmo circular



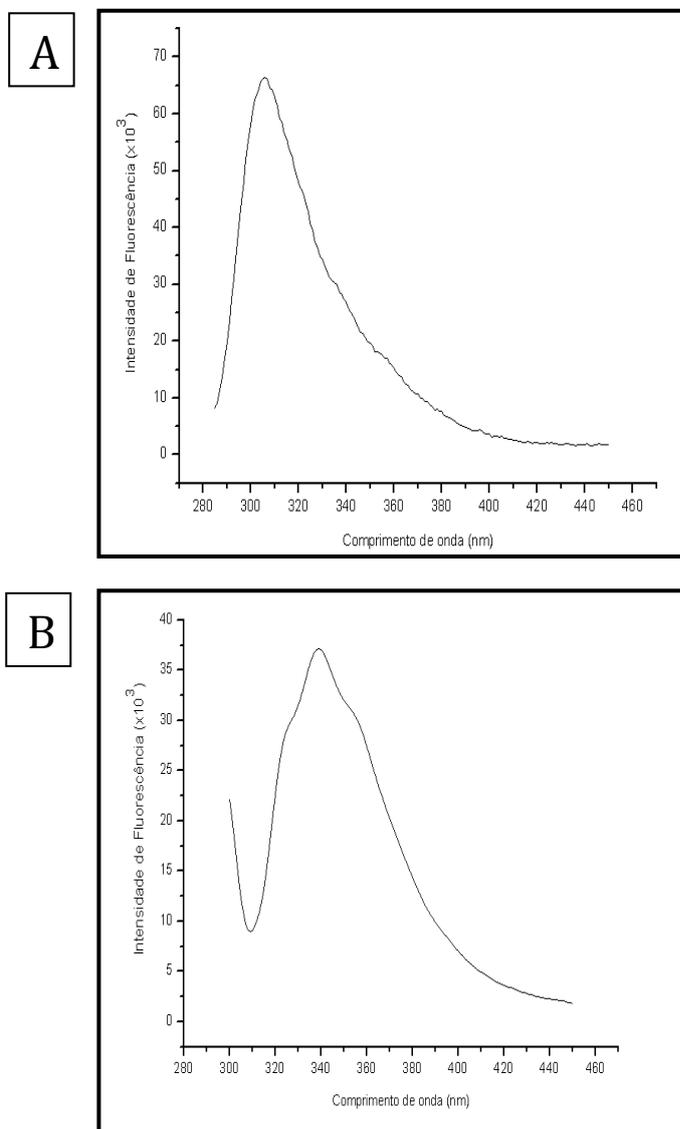
$Mo-CBP_3$  (0,04 mg/mL) foi solubilizada em tampão acetato-borato-fosfato de sódio 0,02 M nos valores de pH (2,0-12,0) e incubada por 4 h, antes do registro de cada espectro. O espectro de dicroísmo circular foi registrado entre 190 e 250 nm.

**Figura 18** - Espectro de dicroísmo circular (UV próximo) da *Mo-CBP<sub>3</sub>*



A proteína (4 mg/mL) foi solubilizada em tampão fosfato de sódio 0,02M, pH7,0. O espectro foi registrado entre 250 e 300 nm.

**Figura 19** - Espectro de emissão de fluorescência da *Mo-CBP<sub>3</sub>*



A proteína (0,1 mg/mL) foi solubilizada em tampão fosfato de sódio 0,02M, pH7,0. (A) *Mo-CBP<sub>3</sub>* excitada a 280 nm; (B) *Mo-CBP<sub>3</sub>* excitada a 295 nm – máximo de 339 nm. O espectro de emissão foi registrado na faixa de 300-440 nm.

## Parte 2 – Espectro e modo de ação antifúngicos da *Mo*-CBP<sub>3</sub>

### 6.9 Espectro de ação da *Mo*-CBP<sub>3</sub> frente à germinação de conídios de fungos fitopatogênicos

Além de inibir a germinação de conídios de *F. solani*, *Mo*-CBP<sub>3</sub> (0,05 -0,1 mg/mL) mostrou ação antifúngica para outros fungos fitopatogênicos, incluindo *F. oxysporum*, *C. musae*, *C. gloesporioides* e *R. solani*. (FIGURAS 20, 21, 22 e 23, respectivamente). Para alguns dos fungos citados, efeito inibitório foi detectado na concentração de 0,05 mg/mL; em outros casos, foi necessária uma concentração proteica mais elevada.

### 6.10 Modo de ação da *Mo*-CBP<sub>3</sub>, usando como modelo experimental o fungo *F. solani*

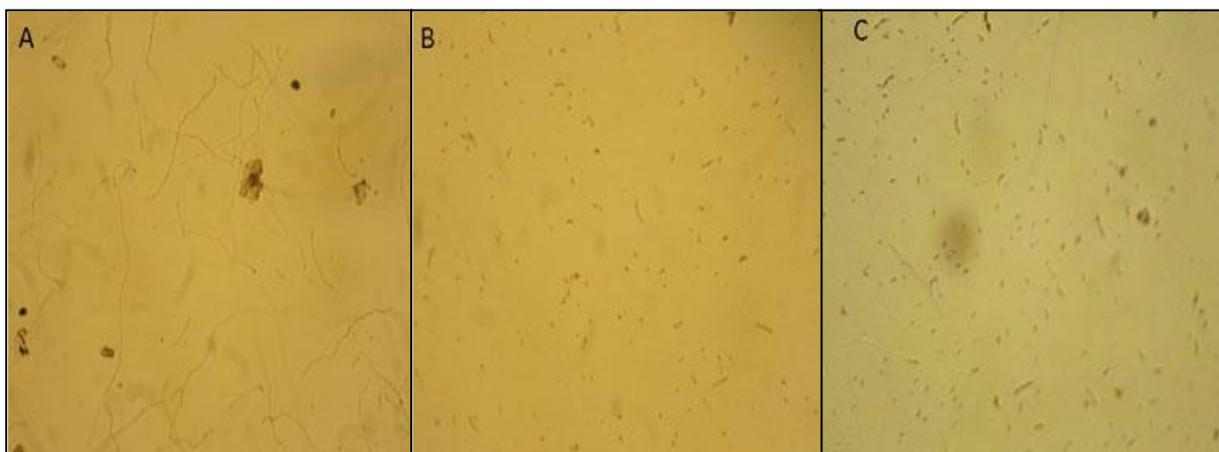
*Mo*-CBP<sub>3</sub> após redução e alquilação foi testada junto a conídios de *F. solani*. Nessas condições, a ação antifúngica antes apresentada pela *Mo*-CBP<sub>3</sub> nativa foi perdida (FIGURA 24), mostrando a importância da manutenção de sua estrutura para ação contra fungos.

A estabilidade da ação antifúngica de *Mo*-CBP<sub>3</sub> foi também avaliada quando a proteína foi tratada termicamente a 100 °C, por 60 min. Apesar da exposição prolongada ao calor, *Mo*-CBP<sub>3</sub> (0,1 mg/mL) manteve a capacidade inibitória sobre a germinação de conídios de *F. solani* (FIGURA 25).

Ainda relacionando estrutura e atividade, *Mo*-CBP<sub>3</sub> foi solubilizada em tampão acetato-borato-fosfato 0,02 M em diferentes valores de pH (2,0-12,0). *Mo*-CBP<sub>3</sub> inibiu a germinação dos conídios em praticamente todos os valores de pH testados (FIGURA 26). A pH 2,0, no entanto, não foi possível avaliar o comportamento da proteína, uma vez que, nesse pH baixo, germinação de conídios não foi detectada nem mesmo no controle (FIGURA 26).

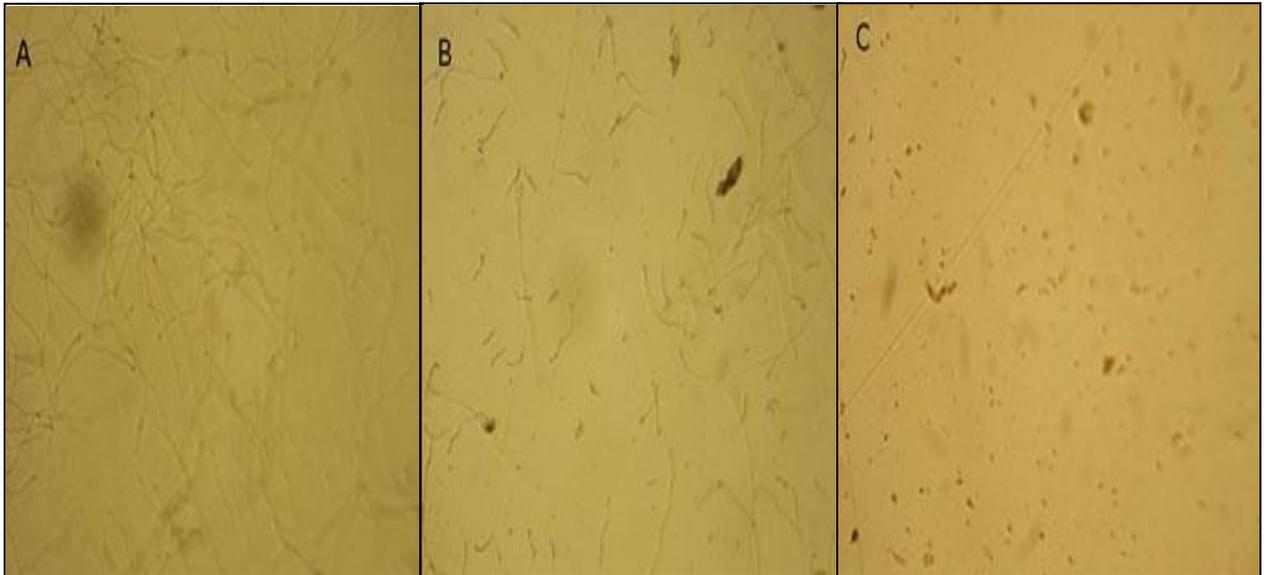
A ação de *Mo*-CBP<sub>3</sub> sobre outra fase de desenvolvimento (crescimento micelial) de *F. solani* também foi avaliada (FIGURA 27). *Mo*-CBP<sub>3</sub> foi capaz de inibir o crescimento micelial de *F. solani* já na concentração de 0,05 mg/mL. Nas concentrações de 0,1, 0,5 e 1 mg/mL,

**Figura 20** - Fotomicrografia em microscópio óptico da germinação de conídios de *Fusarium oxysporum*, incubados em diferentes condições



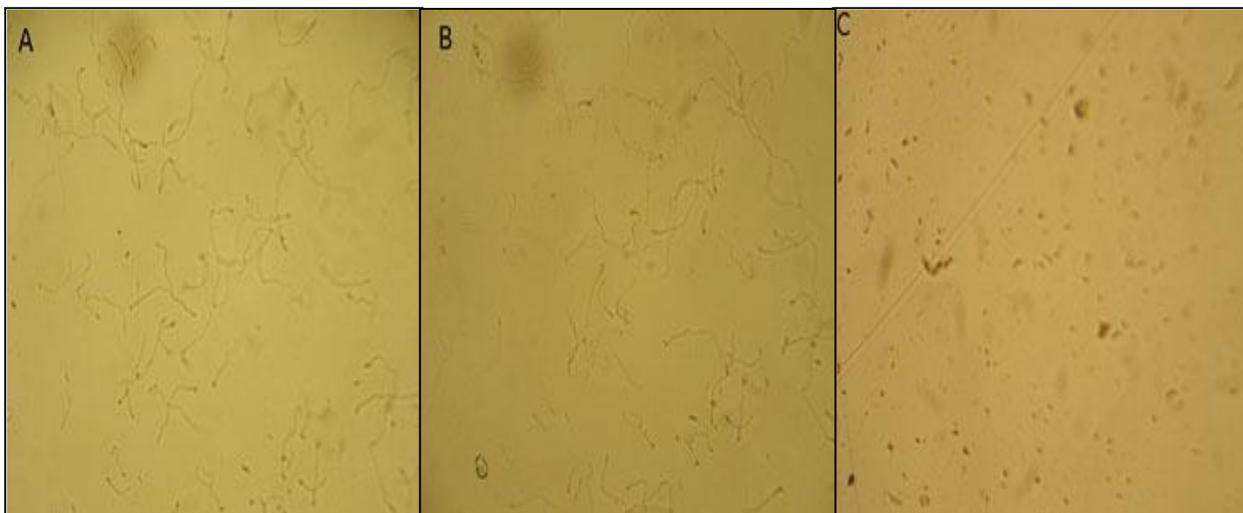
A) H<sub>2</sub>O destilada, B) Mo-CBP<sub>3</sub> 0,05 mg/mL e C) Mo-CBP<sub>3</sub> 0,1 mg/mL.

**Figura 21** - Fotomicrografia em microscópio óptico da germinação de conídios de *Colletotrichum musae*, incubados em diferentes condições



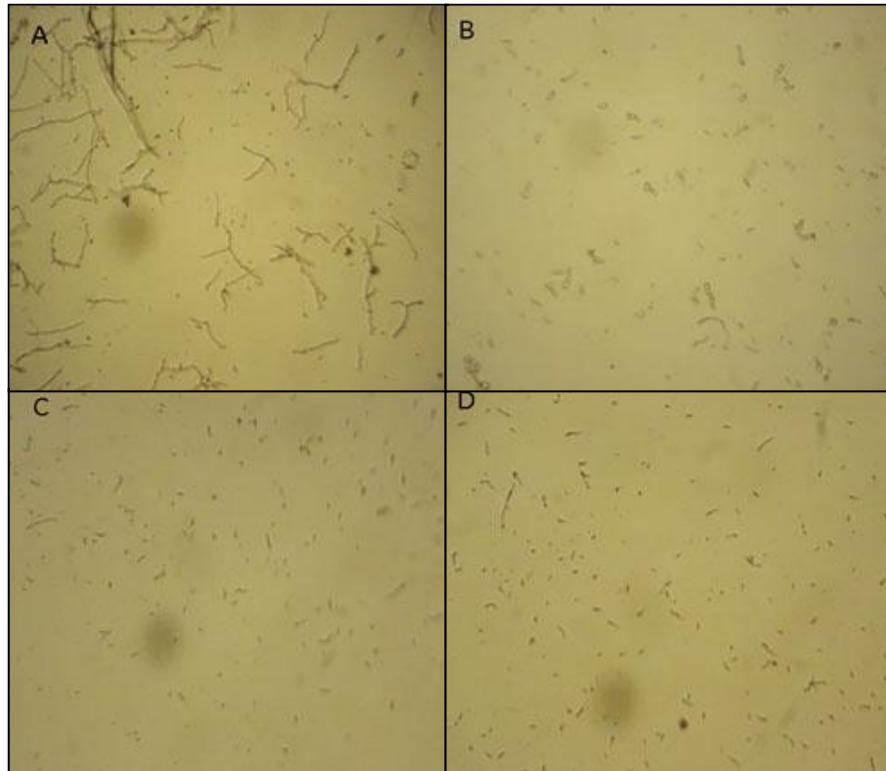
A) H<sub>2</sub>O destilada, B) Mo-CBP<sub>3</sub> 0,05 mg/mL e C) Mo-CBP<sub>3</sub> 0,1 mg/mL.

**Figura 22** - Fotomicrografia em microscópio óptico da germinação de conídios de *Colletotrichum gloesporioides*, incubados em diferentes condições



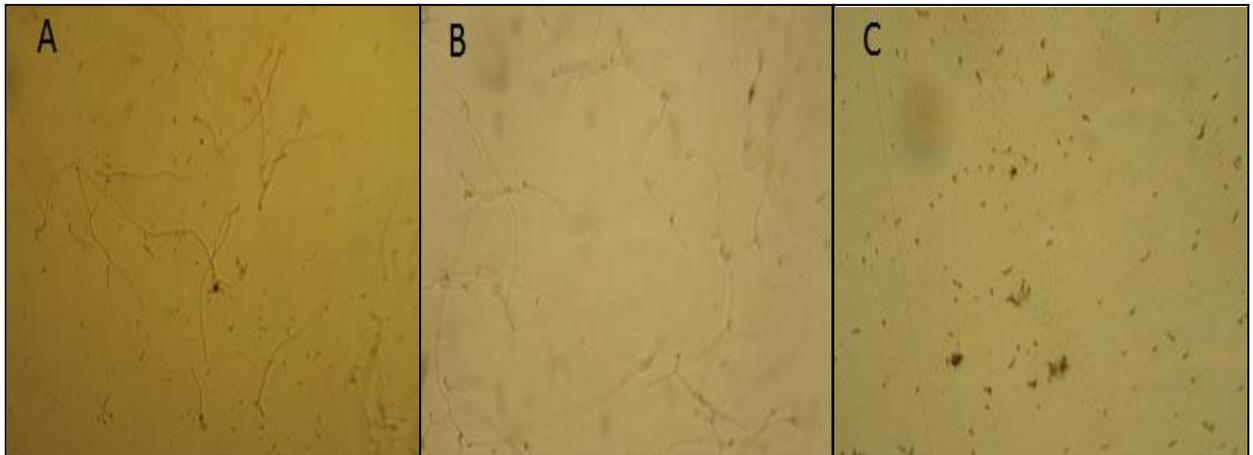
A) H<sub>2</sub>O destilada, B) Mo-CBP<sub>3</sub> 0,05 mg/mL e C) Mo-CBP<sub>3</sub> 0,1 mg/mL.

**Figura 23** - Fotomicrografia em microscópio óptico da germinação de conídios de *Rhizoctonia solani*, incubados em diferentes condições



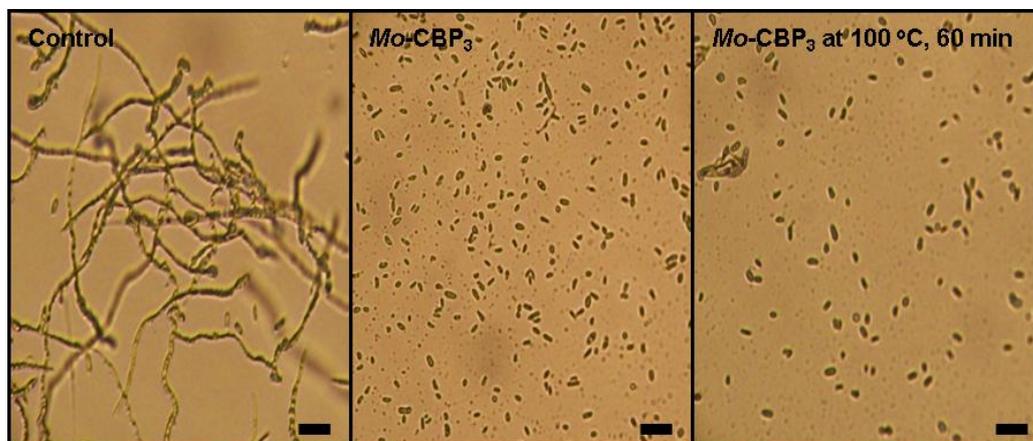
A) H<sub>2</sub>O destilada, B) Mo-CBP<sub>3</sub> 0,05 mg/mL, C) Mo-CBP<sub>3</sub> 0,1 mg/mL e D) Mo-CBP<sub>3</sub> 0,5 mg/mL.

**Figura 24** - Fotomicrografia em microscópio óptico da germinação de conídios de *Fusarium solani*, incubados em diferentes condições



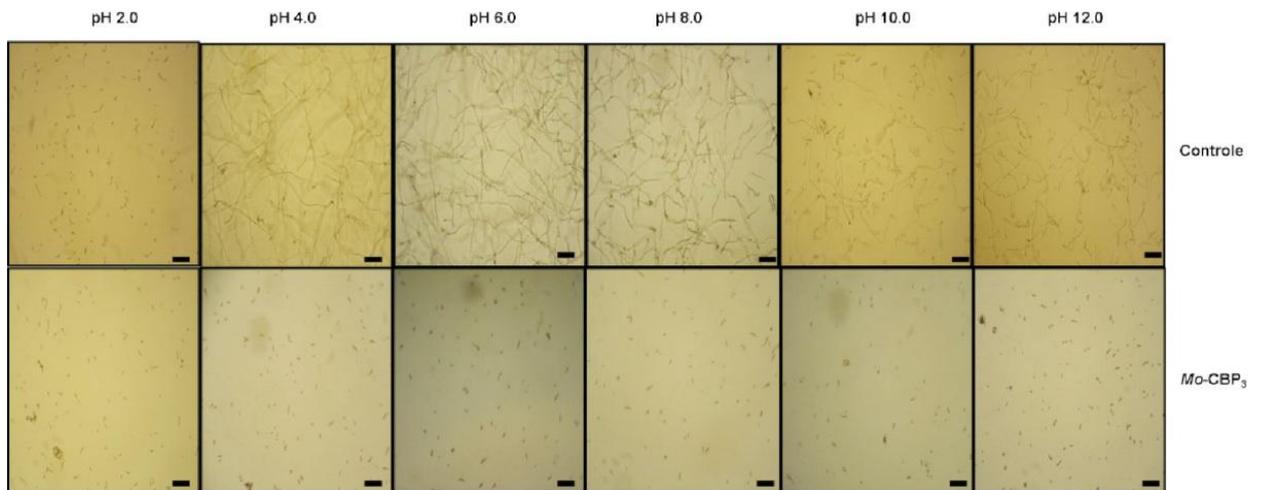
A) H<sub>2</sub>O destilada, B) Mo-CBP<sub>3</sub> (0,1 mg/mL) reduzida e alquilada e C) Mo-CBP<sub>3</sub> nativa (0,1 mg/mL).

**Figura 25** – Efeito de temperatura sobre a atividade antifúngica de *Mo-CBP<sub>3</sub>*



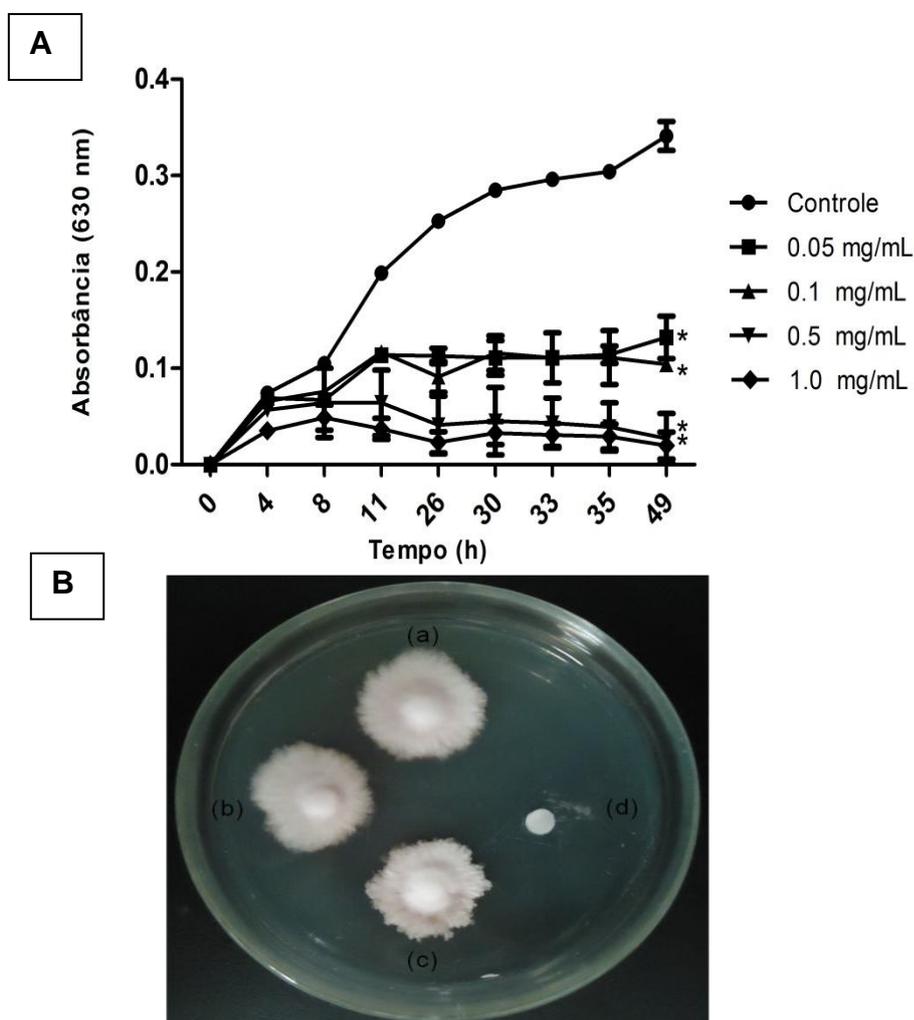
Fotomicrografia em microscópio óptico da germinação de conídios de *Fusarium solani*, incubados em diferentes condições. A) H<sub>2</sub>O destilada, B) *Mo-CBP<sub>3</sub>* (0,1 mg/mL) e C) *Mo-CBP<sub>3</sub>* (0,1 mg/mL) previamente incubada a 100 °C, por 60 min. Barra: 2,5 µm.

**Figura 26** – Efeito do pH sobre a atividade antifúngica de *Mo*-CBP<sub>3</sub>



Fotomicrografia em microscópio óptico da germinação de conídios de *Fusarium solani*, incubados em diferentes condições. Controle: A) Tampão acetato-borato-fosfato 0,02 M em diferentes valores de pH (2,0-12,0) e B) *Mo*-CBP<sub>3</sub> (0,1 mg/mL) solubilizada nesses tampões. Barra: 2,5  $\mu$ m.

**Figura 27** – Efeito de  $Mo-CBP_3$  sobre o crescimento micelial e viabilidade dos conídios de *Fusarium solani*



(A) Ensaio da inibição do crescimento de *F. solani* na presença de  $Mo-CBP_3$ . O crescimento foi observado até 49 h. Os valores representam a média de experimentos em triplicata. Asteriscos indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos e o controle. (B) Efeitos de  $Mo-CBP_3$  sobre a viabilidade de conídios de *F. solani* após o ensaio da inibição do crescimento. (a)  $H_2O$  (Controle), (b)  $Mo-CBP_3$  (0,1 mg/mL), (c)  $Mo-CBP_3$  (0,5 mg/mL) e (d)  $Mo-CBP_3$  (1 mg/mL).

a inibição causada por *Mo*-CBP<sub>3</sub> foi de 56,4%, 59,7% e 71,8%, respectivamente (FIGURA 27A).

Posterior ao ensaio da inibição do crescimento, a viabilidade dos conídios de *F. solani* foi avaliada. *Mo*-CBP<sub>3</sub> comportou-se como agente fungistático nas concentrações de 0,1 e 0,5 mg/mL e fungicida na concentração de 1 mg/mL.

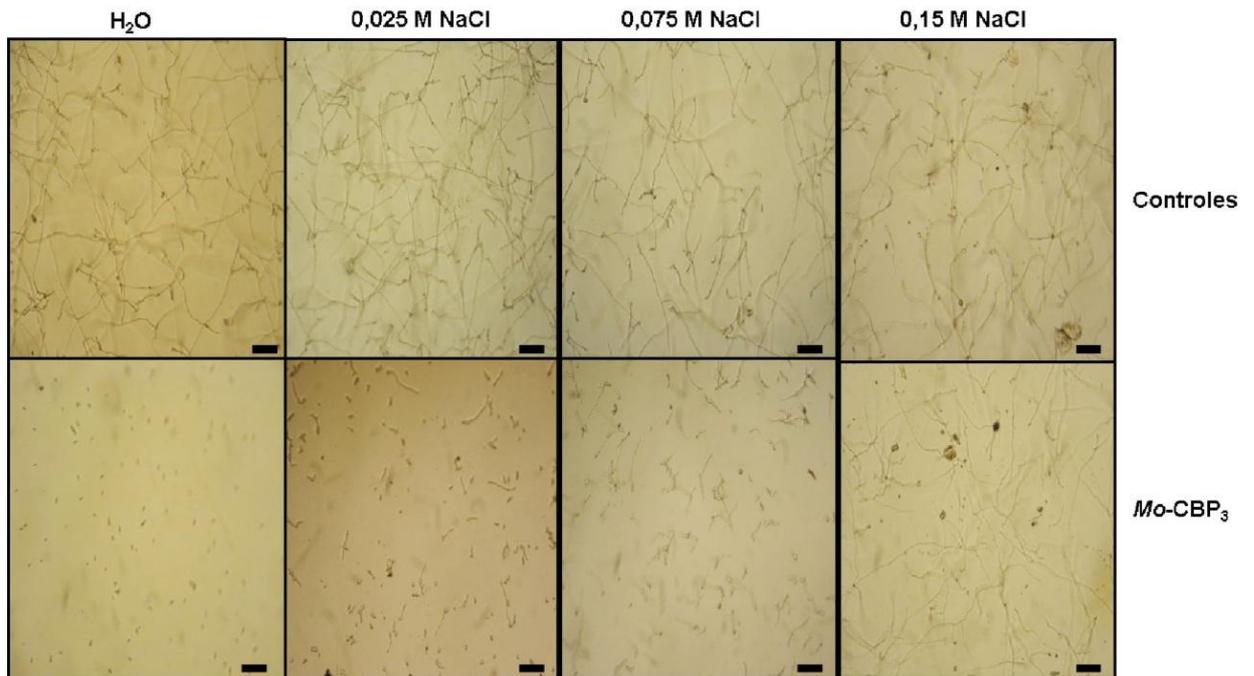
O efeito do NaCl sobre a atividade antifúngica da *Mo*-CBP<sub>3</sub> foi investigado (FIGURA 28). Germinação dos conídios de *F. solani* foi observada na presença de água e concentrações crescentes de NaCl (0,025-0,15 M) (controles negativos). Por outro lado, inibição total da germinação ocorreu quando na presença de *Mo*-CBP<sub>3</sub> (0,1 mg/mL) (controle positivo). No entanto, quando *Mo*-CBP<sub>3</sub> foi incubada na presença de NaCl 0,025 e 0,075 M, apenas uma diminuição da germinação foi verificada. Inibição essa que não foi mais observada quando a proteína foi posta na presença de NaCl 0,15 M. Tais resultados sugerem que a interação eletrostática da *Mo*-CBP<sub>3</sub> com a membrana do fungo é essencial para manifestação da ação inibitória decorrente da proteína.

Além da possível interação eletrostática com a membrana do fungo, *Mo*-CBP<sub>3</sub> (0,1 mg/mL) mostrou-se capaz de promover um aumento na sua permeabilidade, permitindo a entrada do composto iodeto de propídio e sua posterior reação com moléculas de ácidos nucleicos, havendo emissão de fluorescência (FIGURA 29C). Contrariamente, os conídios de *F. solani* incubados com H<sub>2</sub>O ou BSA (0,1 mgP/mL) não mostraram fluorescência no seu interior (FIGURA 29A,B).

Em adição, *Mo*-CBP<sub>3</sub> (0,1 mgP/mL) foi capaz de induzir a produção endógena de espécies reativas de oxigênio (EROs) nos conídios de *F. solani* (FIGURA 30C), fato este não ocorrido no tratamento com água e BSA (0,1 mgP/mL) (FIGURA 30A,B).

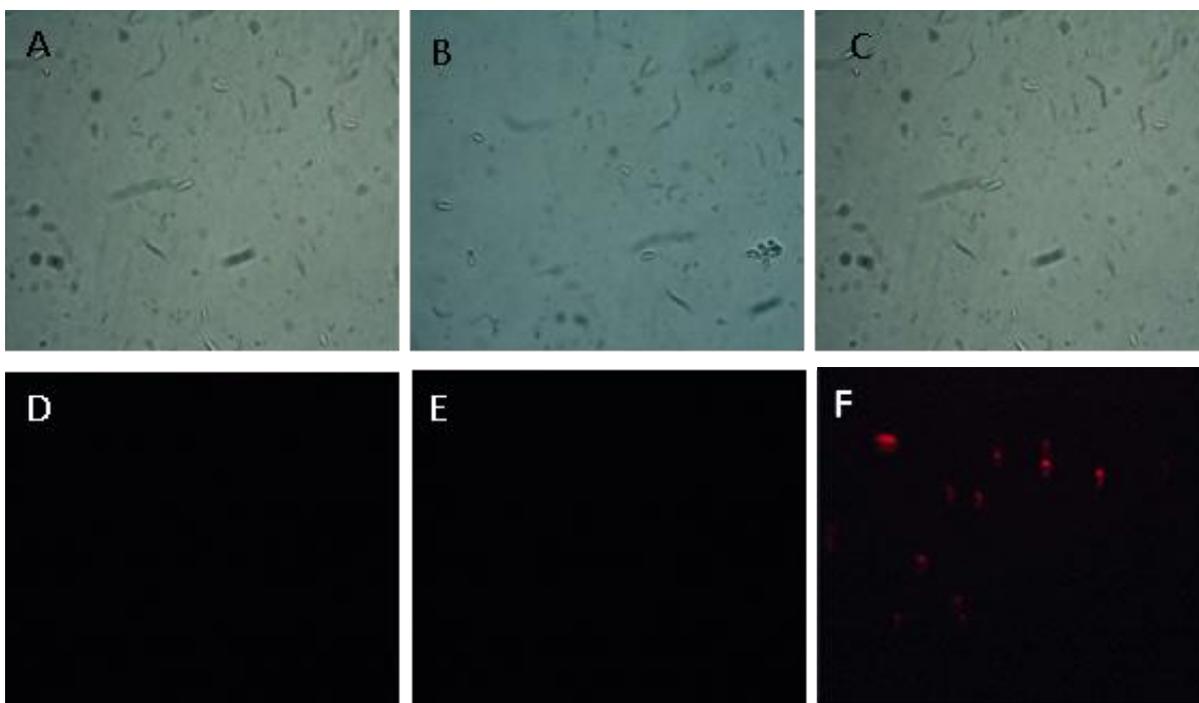
Por microscopia eletrônica de varredura, foi verificado que na presença de *Mo*-CBP<sub>3</sub> (0,05 mg/mL em H<sub>2</sub>O), 48 h após da incubação, não ocorre crescimento de hifas, a despeito da presença de vários conídios (FIGURA 31B), contrastando com o desenvolvimento normal verificado no controle (FIGURA 31A). Os conídios apresentaram-se completamente deformados, com alterações morfológicas acentuadas na superfície (FIGURA 31C).

**Figura 28** – Efeito do NaCl sobre a atividade antifúngica de *Mo*-CBP<sub>3</sub>



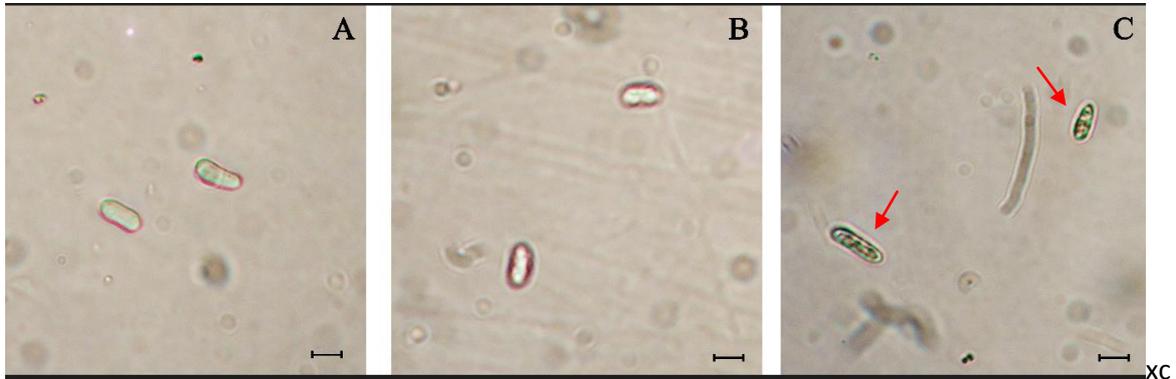
Fotomicrografia em microscópio óptico de conídios de *Fusarium solani* em água ou em diferentes concentrações de NaCl (0,025 a 0,15 M), na presença ou não de *Mo*-CBP<sub>3</sub> (0,1 mg/mL), preparada nessas soluções. Barra: 2,5  $\mu$ m.

**Figura 29** – Efeito de *Mo*-CBP<sub>3</sub> sobre a permeabilidade da membrana de *Fusarium solani*



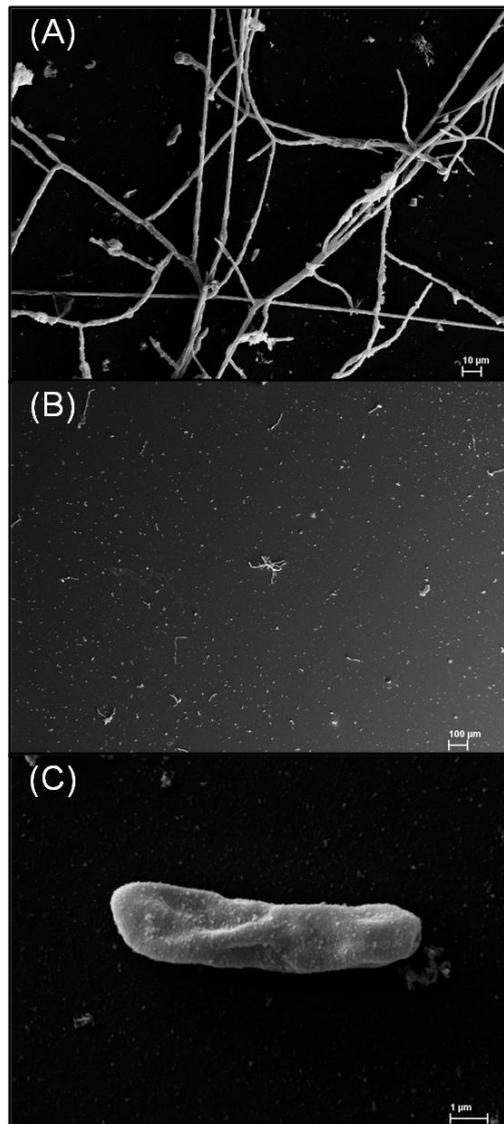
Fotomicrografia em microscópio óptico dos conídios de *F. solani* na presença de iodeto de propídio 1  $\mu$ M, incubados previamente em diferentes condições. (A) H<sub>2</sub>O, (B) BSA (0,1 mg/mL) e (C) *Mo*-CBP<sub>3</sub> (0,1 mg/mL). (D), (E), e (F) representam respectivamente, H<sub>2</sub>O, BSA (0,1 mg/mL) e *Mo*-CBP<sub>3</sub> (0,1 mg/mL) visualizados sob fluorescência. A coloração avermelhada indica fluorescência oriunda da entrada do iodeto de propídio decorrente do aumento da permeabilidade da membrana.

**Figura 30** - Indução de espécies reativas de oxigênio (ERO<sub>s</sub>) em conídios de *F. solani* tratados com *Mo*-CBP<sub>3</sub>



Fotomicrografia em microscópio óptico dos conídios de *F. solani* na presença de diaminobenzidina (DAB), incubados previamente em diferentes condições. (A) H<sub>2</sub>O, (B) BSA (0,1 mg/mL) e (C) *Mo*-CBP<sub>3</sub> (0,1 mg/mL). Setas indicam a produção de ERO<sub>s</sub>, confirmada pela presença de grânulos no interior do conídio, resultante da reação do DAB com peroxidases endógenas do fungo. Barra: 2,5 μm.

**Figura 31** - Microscopia eletrônica de varredura de células de *F. solani*



As células foram cultivadas na ausência (A) ou presença (B, C) de  $Mo-CBP_3$  (0,05 mg/mL em  $H_2O$ ). A imagem C representa um aumento da imagem de B. Barras: (A) 10 μm, (B) 100 μm e (C) 1 μm.

Observações através da microscopia eletrônica de transmissão revelaram que células de *F. solani* quando tratadas com *Mo*-CBP<sub>3</sub> (0,05 mg/mL em H<sub>2</sub>O) apresentaram alterações proeminentes, diferindo do controle (FIGURA 32). Dentre as alterações detectadas, podem ser destacados o desaparecimento do citosol, aumento de vacuolização, interrupção na membrana plasmática e deformação da parede celular. A presença de material eletrodense foi ainda verificada no citoplasma das células (FIGURA 32 D).

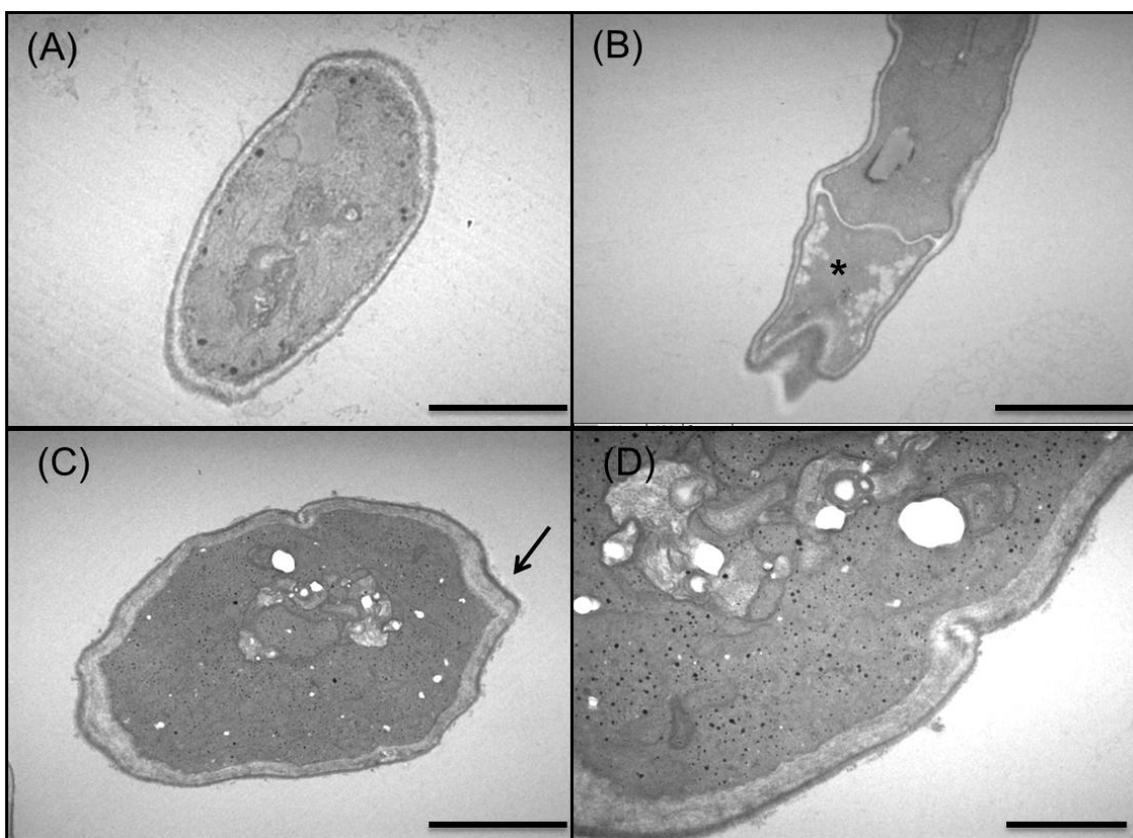
### **Parte 3 – Citotoxicidade de *Mo*-CBP<sub>3</sub> para células humanas**

#### **6.11 Avaliação de ação citotóxica causada pela *Mo*-CBP<sub>3</sub>, usando como modelos eritrócitos e células cancerosas**

Para avaliar se *Mo*-CBP<sub>3</sub> possui ação citotóxica, foram realizados os ensaios hemolítico e de viabilidade celular. *Mo*-CBP<sub>3</sub>, na concentração de 0,137 a 280 µM, não causou hemólise de eritrócitos humanos, diferindo dos resultados observados com Triton X-100 1% (FIGURA 33A).

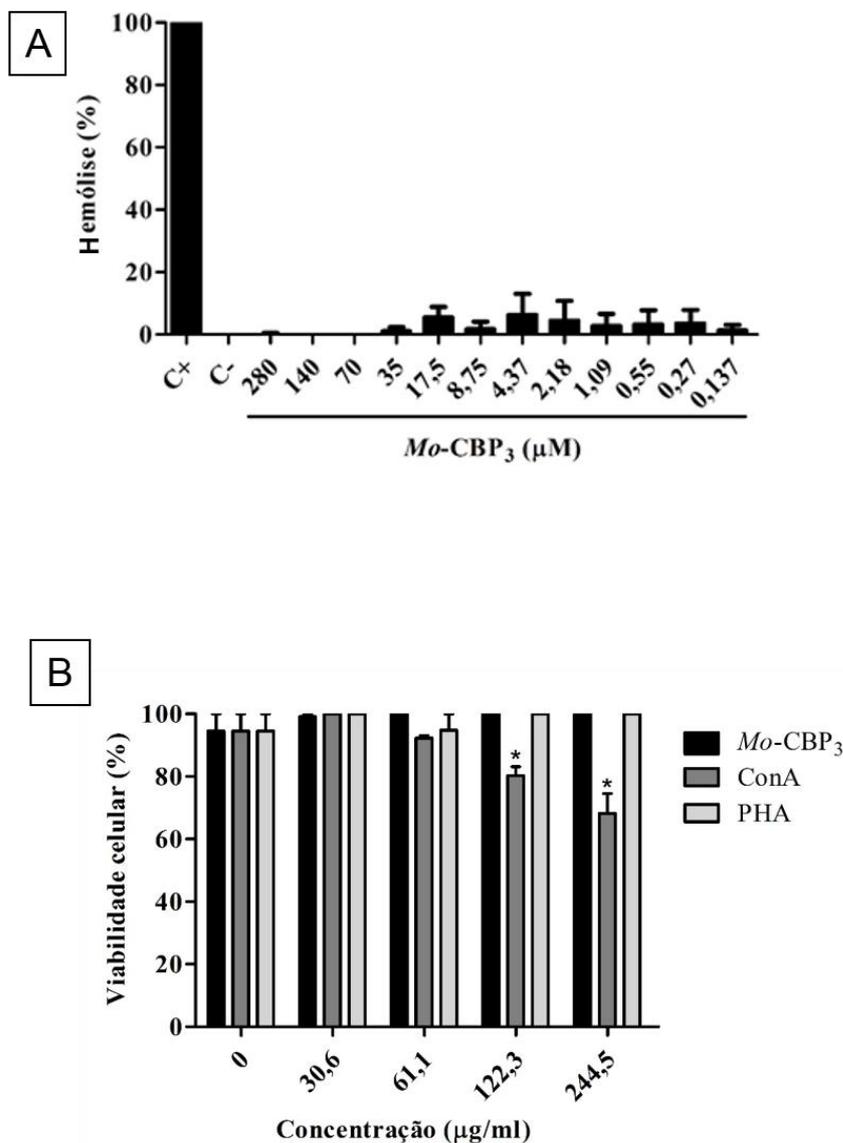
Em relação à ação tóxica para células cancerosas, *Mo*-CBP<sub>3</sub> não se mostrou citotóxica, pelo menos nas concentrações testadas (30,6 a 244,5 µg/mL), preservando a viabilidade dos dois tipos de células usadas, Caco-2 e MCF-7 (FIGURA 33B). Esses resultados diferiram quando consideradas as lectinas ConA e PHA, usadas como controles positivos. ConA, a partir das concentrações de 61,7 e 244,5 µg/mL, causou perda de viabilidade das células MCF-7 e Caco-2, respectivamente. Ação citotóxica frente a células MCF-7 foi também verificada com PHA, na concentração a partir de 122,3 µg/mL, mas não para células Caco-2. Tais resultados sugerem que as células Caco-2 são mais resistentes à ação das lectinas utilizadas do que as células MCF-7 (FIGURA 33B).

**Figura 32** - Microscopia eletrônica de transmissão de células de *F. solani*



As células foram cultivadas na ausência (A) ou presença (B, C e D) de *Mo*-CBP<sub>3</sub> (0,05 mg/mL em H<sub>2</sub>O). (D) representa um aumento da imagem (C). Asterisco indica condensação do citosol, com aumento da vacuolização e diminuição de estruturas; seta indica malformação da parede celular. Barras: (A–D): 0,5  $\mu$ m.

**Figura 33** - Avaliação de ação citotóxica de  $Mo\text{-}CBP_3$



(A) Atividade hemolítica *in vitro* de  $Mo\text{-}CBP_3$  sobre eritrócitos humanos. 1-12: Concentrações de  $Mo\text{-}CBP_3$  variando de 0,137 a 280  $\mu\text{M}$ . Controle positivo (C+): Triton X-100 1%. Controle negativo (C-): tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0, contendo NaCl 0,15 M. (B) Atividade citotóxica contra células cancerosas, avaliada por meio do kit *ATP-Lite*.

## **Parte 4 - Isolamento, clonagem e caracterização do DNA complementar (cDNA) de uma das subunidades da *Mo-CBP<sub>3</sub>*.**

### **6.12 Obtenção do RNA Total**

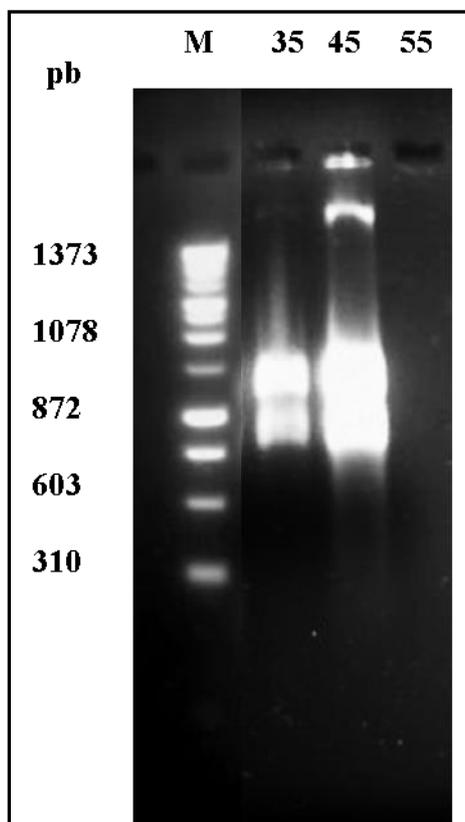
As concentrações de RNA total obtida de sementes coletadas 35, 45 e 55 dias após a antese. Os estádios de 35, 45 e 55 dias apresentaram 1,568, 3,048 e 0,116 ng/ $\mu$ L, respectivamente. Nos estádios de 35 e 45 dias após a antese, foram obtidas as mais elevadas concentrações de RNA total que, quando analisadas por eletroforese em gel de agarose (1%), apresentaram as bandas 18 S e 28 S do RNA ribossômico, confirmando a integridade do material extraído (FIGURA 34). Assim, as amostras de RNA extraídas de sementes coletadas 35 e 45 dias após a antese foram usadas na obtenção do cDNA.

Nesse momento, foi priorizada a obtenção do cDNA codificante para a cadeia B (cadeia maior) de *Mo-CBP<sub>3</sub>*, pelo fato de sua sequência NH<sub>2</sub>-terminal já ter sido determinada por nosso grupo de pesquisa.

### **6.13 Síntese de cDNA**

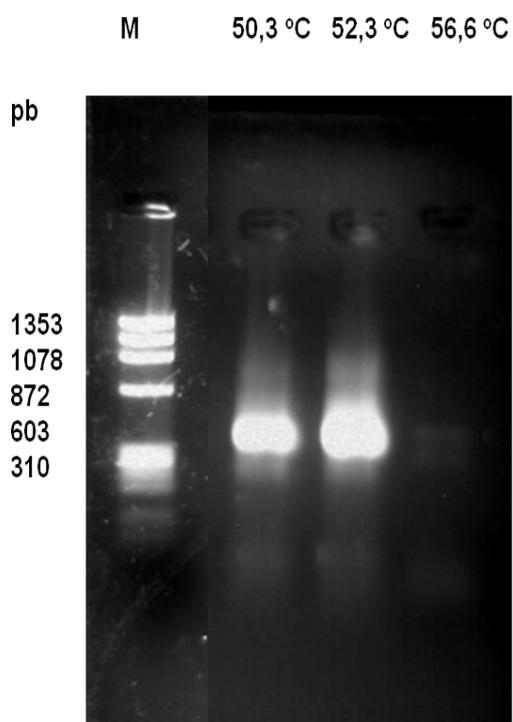
A reação de RT-PCR (síntese de cDNA sobre um molde de RNA catalisada pela transcriptase reversa, seguida de amplificação por meio de PCR, reação em cadeia da polimerase) foi realizada utilizando-se a amostra de RNA purificada e oligonucleotídeos iniciadores degenerados (*primers*), tendo sido o iniciador senso (*primer forward*) desenhado a partir da sequência de aminoácidos NH<sub>2</sub>-terminal da cadeia B de *Mo-CBP<sub>3</sub>*, obtida por Gifoni *et al.* (2012). Os produtos das reações de PCR foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 1%, tendo sido verificada a amplificação do inserto nas temperaturas de anelamento de 50,3 °C e 52,3 °C (FIGURA 35). Posteriormente, esses fragmentos amplificados foram reunidos e inseridos no vetor *pGEM-T Easy*, com auxílio da T4-DNA ligase. Para confirmação da transformação, 24 amostras dos plasmídeos extraídos de colônias brancas foram submetidas à digestão com EcoRI, por 3 h, a 37 °C. Os produtos da digestão foram analisados em gel de agarose a 1%, tendo sido verificada a presença do inserto nos clones obtidos (FIGURA 36).

**Figura 34** - Eletroforese em gel de agarose 1% do RNA extraído de sementes de *Moringa oleifera* em diferentes estádios de desenvolvimento



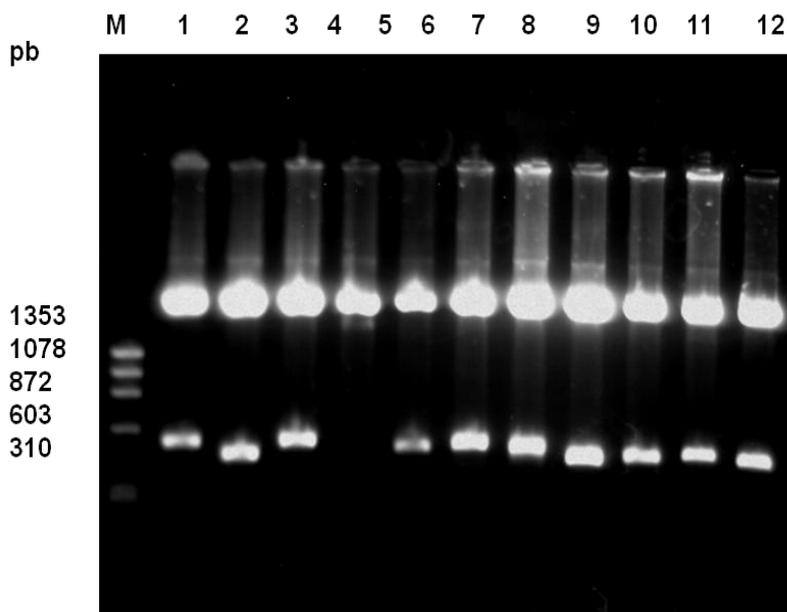
As bandas foram visualizadas através de brometo de etídeo, sob luz ultravioleta. Raia M: marcador de peso molecular  $\Phi X174$  RF DNA/Hae III Fragments. Raias 35, 45 e 55 indicam amostras de RNA nos respectivos dias de coleta após a antese.

**Figura 35** - Eletroforese em gel de agarose (1%) dos produtos de RT-PCR obtidos após amplificação com os iniciadores senso (TGYCCGGCNATHCAGCGTTGCTGCCAACAGCTGCGG) e antisenso (oligo (dT) - 28 (Promega®), em diferentes temperaturas de anelamento, conforme indicadas na imagem



M: marcador  $\Phi X174$  RF DNA/Hae III Fragments.

**Figura 36** – Análise de restrição dos plasmídeos provenientes de colônias brancas transformadas com insertos de  $\approx 390$  pb



Trinta microgramas de DNA plasmidial foram digeridos com a enzima de restrição EcoRI (2,5 U), por 3 h.

#### 6.14 Sequenciamento do cDNA

Os plasmídeos recombinantes quando sequenciados produziram 18 seqüências de qualidade, nas quais foram verificadas seqüências do cDNA da cadeia B encerrando 204-219 bp, o que corresponde 68-73 resíduos de aminoácidos (TABELA 7). O alinhamento das seqüências, usando o programa Clustal (THOMPSON *et al.*, 1994), mostrou a presença de 5 isoformas, denominadas A, B, C, D e E, cujas massas moleculares preditas variaram de 7747,07 a 8384,74 Da e os pI teóricos de 9,63 a 11,10 (TABELA 7).

De posse das seqüências da cadeia B de *Mo*-CBP<sub>3</sub>, foi observada a presença de 7 resíduos de cisteína, que devem participar da formação de pontes dissulfeto intra- e intermoleculares (FIGURA 37). Em adição, os aminoácidos Arg<sup>121</sup>, Asn<sup>125</sup> e Asn<sup>131</sup>

apresentaram-se conservados. Apenas a metionina Met<sup>128</sup> foi substituída pelo aminoácido de mesma classe funcional Ile<sup>128</sup> (FIGURA 38).

A comparação da sequência NH<sub>2</sub>-terminal (22 resíduos), determinada por degradação de Edman (GIFONI *et al.*, 2012), com a sequência deduzida a partir do cDNA, revelou alta similaridade, diferindo em apenas cinco resíduos de aminoácidos (FIGURA 39). Similaridade foi detectada entre a cadeia B de *Mo*-CBP<sub>3</sub> e outras proteínas, cujas sequências estão depositadas em banco de dados, incluindo a proteína floculante MO2.1 (81%) de *M. oleifera*, cadeia B da mabilin (55%) e precursor da albumina 2S (45%) de *Bertholletia excelsa* (FIGURA 38).

Tendo em vista a similaridade detectada entre a cadeia B de *Mo*-CBP<sub>3</sub> e albuminas 2S e dado ao fato de que algumas dessas proteínas são capazes de inibir  $\alpha$ -amilase, essa atividade foi investigada. *Mo*-CBP<sub>3</sub>, mesmo em concentração elevada (1 mg/mL), não apresentou atividade de inibição diante de  $\alpha$ -amilase pancreática suína (dados não mostrados).

Adicionalmente, foi tentado o alinhamento de *Mo*-CBP<sub>3</sub> com proteínas ligantes à quitina que possuem o domínio heveínico, já que a proteína aqui em estudo é capaz de se ligar à matriz de quitina. Contudo, a sequência da cadeia B de *Mo*-CBP<sub>3</sub> não apresentou similaridade com esse tipo de proteína.

**Tabela 7** - Cálculos usando a ferramenta ponto isoelétrico/massa molecular (pI/Mw<sup>a</sup>)

<b>Sequências</b>	<b>Resíduos de aminoácidos (Nº)</b>	<b>Ponto isoelétrico (pI)</b>	<b>Massa molecular (Da)</b>
A (clone 1)	68	10,03	7747,07
B (clone 23)	68	11,10	7835,24
C (clone 13)	73	10,03	8384,74
D (clone 3)	73	9,63	8369,72
E (clone 2)	71	10,03	8028,30

<sup>a</sup>Ferramenta disponível em [www.expasy.ch/tools/pi\\_tool.html](http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html).

**Figura 37** - Alinhamento das sequências de aminoácidos deduzidas de *Mo-CBP<sub>3</sub>*, usando o programa Clustal W

```

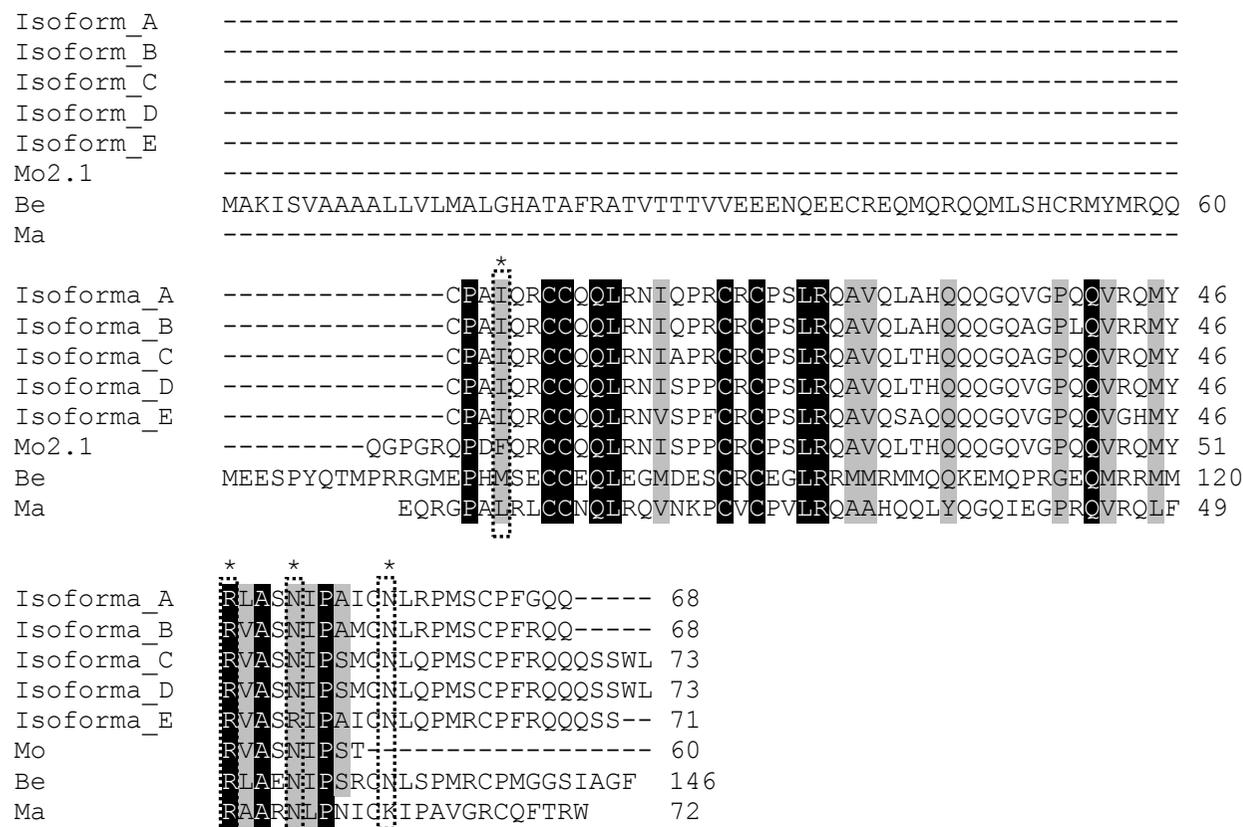
Clone1      CPAIQRCCQQLRNIQPRCPCPSLRQAVQLAHQQQGQVGPQQVVRQMYRLASNIPaicnlRP 60
Clone10     CPAIQRCCQQLRNIQPRCPCPSLRQAVQLAHQQQGQVGPQQVVRQMYRLASNIPaicnlRP 60
Clone14     CPAIQRCCQQLRNIQPRCPCPSLRQAVQLAHQQQGQVGPQQVVRQMYRLASNIPaicnlRP 60
Clone17     CPAIQRCCQQLRNIQPRCPCPSLRQAVQLAHQQQGQVGPQQVVRQMYRLASNIPaicnlRP 60
Clone23     CPAIQRCCQQLRNIQPRCPCPSLRQAVQLAHQQQGQAGPLQVRRMYRVASNIPAMCNLRP 60
Clone13     CPAIQRCCQQLRNIAPRCPCPSLRQAVQLTHQQQGQAGPQQVVRQMYRVASNIPSMCNLQP 60
Clone3      CPAIQRCCQQLRNISPPCPCPSLRQAVQLTHQQQGQVGPQQVVRQMYRVASNIPSMCNLQP 60
Clone6      CPAIQRCCQQLRNISPPCPCPSLRQAVQLTHQQQGQVGPQQVVRQMYRVASNIPSMCNLQP 60
Clone8      CPAIQRCCQQLRNISPPCPCPSLRQAVQLTHQQQGQVGPQQVVRQMYRVASNIPSMCNLQP 60
Clone9      CPAIQRCCQQLRNISPPCPCPSLRQAVQLTHQQQGQVGPQQVVRQMYRVASNIPSMCNLQP 60
Clone12     CPAIQRCCQQLRNISPPCPCPSLRQAVQLTHQQQGQVGPQQVVRQMYRVASNIPSMCNLQP 60
Clone2      CPAIQRCCQQLRNVSFFCPCPSLRQAVQSAQQQQGQVGPQQVGHMYRVASRIPaicnlQP 60
Clone7      CPAIQRCCQQLRNVSFFCPCPSLRQAVQSAQQQQGQVGPQQVGHMYRVASRIPaicnlQP 60
Clone15     CPAIQRCCQQLRNVSFFCPCPSLRQAVQSAQQQQGQVGPQQVGHMYRVASRIPaicnlQP 60
Clone18     CPAIQRCCQQLRNVSFFCPCPSLRQAVQSAQQQQGQVGPQQVGHMYRVASRIPaicnlQP 60
Clone19     CPAIQRCCQQLRNVSFFCPCPSLRQAVQSAQQQQGQVGPQQVGHMYRVASRIPaicnlQP 60
Clone20     CPAIQRCCQQLRNVSFFCPCPSLRQAVQSAQQQQGQVGPQQVGHMYRVASRIPaicnlQP 60
Clone22     CPAIQRCCQQLRNVSFFCPCPSLRQAVQSAQQQQGQVGPQQVGHMYRVASRIPaicnlQP 60
Clone24     CPAIQRYCQQLRNVSFFCPCPSLRQAVQSAQQQQGQVGPQQVGHMYRVASRIPaicnlQP 60
              * : ** ***** : * ***** : : ***** . ** ** : *** : ** . *** :

Clone1      MSCPFGQQ----- 68
Clone10     MSCPFGQQ----- 68
Clone14     MSCPFGQQ----- 68
Clone17     MSCPFGQQ----- 68
Clone23     MSCPFRQQ----- 68
Clone13     MSCPFRQQQSSWL 73
Clone3      MSCPFRQQQSSWL 73
Clone6      MSCPFRQQQSSWL 73
Clone8      MSCPFRQQQSSWI 73
Clone9      MSCPFRQQQSSWL 73
Clone12     MSCPFRQQQSSWL 73
Clone2      MRCPFRQQQSS-- 71
Clone7      MRCPFRQQQSS-- 71
Clone15     MRCPFRQQQSS-- 71
Clone18     MRCPFRQQQSS-- 71
Clone19     MRCPFRQQQSS-- 71
Clone20     MRCPFRQQQSS-- 71
Clone22     MRCPFRQQQSS-- 71
Clone24     MRCPFRQQQSS-- 71

```

Os asteriscos indicam aminoácidos idênticos nas sequências.

**Figura 38** - Alinhamento de sequência putativa da cadeia B de isoformas de *Mo*-CBP<sub>3</sub> com sequências de outras proteínas. Proteína floculante de *M. oleifera* (Mo2.1; CAC69951.1), precursor da albumina 2S de *Bertholletia excelsa* (Be; ACI70207) e cadeia B da mabilin de *Capparis masaikai* (Ma; AAB31597.1)



O alinhamento foi realizado usando o programa ClustalW. Sombreamentos em preto e cinza representam resíduos ou classe de aminoácidos conservados, respectivamente. Os resíduos conservados da interface do dímero de albumina 2S estão marcados com uma linha tracejada.

Outras análises *in silico* foram realizadas, incluindo a verificação de sítios de *N*-glicosilação, *O*-glicosilação e fosforilação. Na sequência deduzida de *Mo-CBP*<sub>3</sub>, não foi observado sítio para *N*-glicosilação. Entretanto, vários sítios potenciais para *O*-glicosilação foram detectados nas posições 15, 22, 50, 62, 70 e 72. Com relação aos sítios de fosforilação, há possibilidade de ocorrência nas posições 15, 22, 50 e 72 (dados não mostrados).

## ***7 DISCUSSÃO***

A caracterização estrutural e funcional de uma proteína é fundamental para a compreensão de seu papel fisiológico e proposição de aplicação biotecnológica. Nesse contexto, esse trabalho teve como objetivos a determinação de parâmetros bioquímicos e estruturais da *Mo*-CBP<sub>3</sub>, uma proteína ligante à quitina de sementes de *M. oleifera*, purificada anteriormente por nosso grupo de pesquisa (GIFONI *et al.*, 2012), e a investigação do seu espectro e modo de ação frente a fungos fitopatogênicos de interesse agrônomo, bem como a avaliação da citotoxicidade para células humanas.

Tão logo obtida *Mo*-CBP<sub>3</sub> pura, a capacidade de interação dessa proteína com a matriz de quitina foi avaliada, tendo sido confirmada a sua ligação a esse polímero, até mesmo de forma mais intensa do que verificada em etapa prévia do procedimento de purificação, quando a fração albumina foi aplicada na matriz de quitina, uma vez que sua eluição não ocorreu com o uso de *N*-acetil-D-glucosamina ou ácido acético 0,05 M ou 0,1 M, pH 3,0, como antes, e sim após aplicação de HCl 0,1 M (FIGURA 8). De posse do conhecimento de que *Mo*-CBP<sub>3</sub> é formada por inúmeras isoformas, é possível que, o material retido seria representado pela isoforma que apresentou maior interação com a matriz. Enquanto no material não retido, estariam presentes as outras isoformas. Esse dado ratifica a denominação de “proteína ligante à quitina” dada à *Mo*-CBP<sub>3</sub>, conforme proposto em Gifoni *et al.*, (2012).

*Mo*-CBP<sub>3</sub>, quando analisada por eletroforese em sistema Tricina-PAGE-SDS sob condições redutoras, mostrou ser uma proteína monomérica, com a presença de duas cadeias polipeptídicas com massas moleculares aparentes de 5,0 e 9,0 kDa, denominadas cadeia A e cadeia B, respectivamente (FIGURA 9). A estrutura da *Mo*-CBP<sub>3</sub> sendo composta por duas cadeias polipeptídicas não foi ressaltada por Gifoni *et al.* (2012), na análise feita da proteína por PAGE-SDS, na qual *Mo*-CBP<sub>3</sub> se apresentou como banda única bem difusa. Tal fato não se trata de contradição, mas de análise por técnicas diferentes, evidenciando a melhor resolução que o sistema Tricina-PAGE-SDS proporciona na separação de componentes de baixa massa molecular, como são as cadeias polipeptídicas de *Mo*-CBP<sub>3</sub>, em relação ao método tradicional, que consiste na observação por PAGE-SDS (SHAGGER; VON JAGOW, 1987). Em condições não redutoras, independentemente de ter sido analisada por PAGE-SDS ou Tricina-PAGE-SDS, *Mo*-CBP<sub>3</sub> se apresentou com uma banda espessa

(FIGURA 9, Raia 1), o que pode estar relacionado ao fato de haver várias isoformas de *Mo-CBP<sub>3</sub>*, com características físico-químicas similares (TABELA 2). Muitas proteínas são comumente encontradas com várias isoformas (DUMAS-GAUDOT *et al.*, 1994; SYRIOS *et al.*, 2004; PUUMALAINEN *et al.*, 2005; SEHGAL *et al.*, 2010). Um bom exemplo é o das albuminas 2S, que são proteínas solúveis em água, se constituindo, na maioria, em proteínas de reserva de sementes (MORENO *et al.*, 2004). Como *Mo-CBP<sub>3</sub>*, essas albuminas, na forma nativa, se apresentam com massa molecular em torno de 12,0 kDa, compostas por duas cadeias polipeptídicas distintas, unidas por pontes dissulfeto (GEHRIG *et al.*, 1996).

Diante da observação de que *Mo-CBP<sub>3</sub>* é constituída por duas cadeias polipeptídicas, as cadeias A e B foram submetidas ao sequenciamento por degradação de Edman. Sequência NH<sub>2</sub>-terminal não foi obtida para a cadeia A, sugerindo que essa cadeia estava bloqueada. Já a cadeia B apresentou a sequência CPAIQRCCQQLRNIQPPCRCCQ, confirmando achados prévios (GIFONI *et al.*, 2012). Comumente, proteínas de eucariontes são protegidas por bloqueio NH<sub>2</sub>-terminal (WELLNER; PANNEERSELVAM; HORECKER, 1990). São conhecidos, pelo menos, 10 tipos de grupos de bloqueio da sequência NH<sub>2</sub>-terminal, destacando-se o acetil, formil e piroglutamato (BROWN; ROBERTS, 1976; COUSSOT *et al.*, 2007). Para remover tais grupos, reagentes químicos específicos têm sido usados, muitos deles de custo elevado, envolvendo procedimentos de utilização complexos e demorados (HUANG; WANG, 2004). No caso da cadeia A da *Mo-CBP<sub>3</sub>*, é possível que o resíduo NH<sub>2</sub>-terminal esteja bloqueado na forma de piroglutamato, considerando como referência o NH<sub>2</sub>-terminal da cadeia B, que contém muitos resíduos de glutamina, sugerindo também sua presença na sequência total da proteína, possibilitando, assim, a formação do piroglutamato. Tentativas de desbloqueio foram feitas, porém sem sucesso.

No intuito de obter dados estruturais adicionais da *Mo-CBP<sub>3</sub>*, análises espectroscópicas foram realizadas. O espectro de absorção da *Mo-CBP<sub>3</sub>* mostrou absorção em 280 nm (FIGURA 14), indicando a presença de aminoácidos aromáticos em sua composição (PACE *et al.*, 1995). Estudos conformacionais da *Mo-CBP<sub>3</sub>*, por espectroscopia de dicroísmo circular, mostrou um espectro em formato de “W”, com bandas em torno de 222 e 208

nm, perfil característico de proteína rica em  $\alpha$ -hélice (RANJBAR; GILL, 2009) (FIGURA 15). Predominância de  $\alpha$ -hélice foi confirmada por meio da quantificação de elementos de estrutura secundária obtidos pelo método SELCON3 que, na verdade, mostrou ser *Mo*-CBP<sub>3</sub> uma proteína alfa-beta, contendo 30,3% de  $\alpha$ -hélice, 16,3% de folha- $\beta$ , 22,3% de volta- $\beta$  e 30,4% de estrutura não ordenada.

O espectro de dicroísmo circular na região do ultravioleta de 260 a 320 nm é utilizado para análises de cadeias laterais de aminoácidos aromáticos e, portanto, fornece informações sobre a estrutura terciária da proteína (KELLY; PRICE, 2000). Essa técnica possibilita o estudo da estrutura da molécula na condição em que ela exerce sua atividade biológica (KELLY; JESS; PRICE, 2005). *Mo*-CBP<sub>3</sub> apresenta uma estrutura ordenada, com sinais entre 255-270, 275-285 e 285-305 nm, atribuídos aos resíduos de fenilalanina, tirosina e triptofano, respectivamente (FIGURA 18). Outros sinais, ainda que fracos, foram verificados ao longo do espectro, sugerindo ser de pontes dissulfeto (ZENG, 1997; LAKOWICZ, 1999).

O estudo da estrutura terciária pode ainda ser aprofundado através do espectro de fluorescência, determinado pela presença de fenilalanina, tirosina e triptofano, fornecendo informações acerca da localização desses aminoácidos aromáticos na estrutura da proteína (HELL *et al.*, 1996). Quanto aos comprimentos de onda utilizados, a maioria das proteínas é excitada a 280 nm e/ou 295 nm, típicos da presença de tirosina/triptofano e triptofano, respectivamente. Ambos os comprimentos de onda excluem a fenilalanina, que tem emissão tão baixa, muitas vezes, não sendo observada. A rigor, basicamente a emissão da proteína é dominada pelos resíduos de triptofano. Uma provável razão para a menor contribuição dos outros dois aminoácidos é que as energias absorvidas pela fenilalanina e tirosina podem ser transferidas para resíduos de triptofano (LAKOWICZ, 2006; FUKUMA *et al.*, 2006). Contudo, em geral, os picos de emissão da fenilalanina, tirosina e triptofano ocorrem ao redor de 280, 305 e 348 nm, respectivamente (LAKOWICZ; GRZYCZYNSKI, 1999; BIRCH, 2001). Nas análises com *Mo*-CBP<sub>3</sub>, excitações foram realizadas em 280 e 295 nm, tendo sido a emissão de fluorescência mais intensa em 280 nm, sugerindo a exposição não apenas de resíduos de triptofano, mas, também, de tirosina na estrutura da proteína (LAKOWICZ,

2006; KRONMAN; HOLMES, 2008). *Mo*-CBP<sub>3</sub> quando excitada a 295 nm apresentou emissão máxima em 339 nm, estando esse comprimento de onda compreendido no intervalo de 331-343 nm, observado para outras proteínas; o que mostra que o resíduo de triptofano encontra-se exposto (DE RIENZO *et al.*, 2000; ESTRADA; URIARTE, 2005; KWAAMBWA; MAIKOKERA, 2007).

Na perspectiva de serem obtidas informações adicionais sobre parâmetros bioquímicos, estruturais e funcionais da *Mo*-CBP<sub>3</sub>, a sequência NH<sub>2</sub>-terminal da cadeia B foi utilizada na busca do gene codificante dessa proteína e posterior caracterização. De fato, análises *in silico* têm sido bastante utilizadas com foco na obtenção de informações teóricas das proteínas (ABD-ELSALAM, 2003; PALAGI *et al.*, 2006). Para tanto, sementes nos estágios iniciais e finais de desenvolvimento foram coletadas, uma vez que não se conhecia o perfil de expressão do gene da *Mo*-CBP<sub>3</sub>, apostando, no entanto, que transcritos para essa proteína seriam mais facilmente detectados nos estágios finais de enchimento dos grãos. Com base na maior concentração e integridade do RNA, amostras obtidas de sementes com 35 e 45 dias de idade após a antese foram selecionadas para dar continuidade ao processo de obtenção do cDNA (TABELA 6; FIGURA 34). Após sequenciamento, cinco isoformas de cDNA codificadoras para a cadeia B da *Mo*-CBP<sub>3</sub>, nomeadas A, B, C, D e E, foram identificadas (TABELA 7). A ocorrência de várias isoformas condiz com os resultados obtidos por espectrometria de massas (TABELA 3). Dentre as cinco isoformas encontradas, a isoforma C apresentou massa molecular deduzida de 8,38 kDa, coincidindo com uma das massas determinadas por espectrometria de massas. As massas moleculares deduzidas para as outras isoformas apenas se aproximaram das massas determinadas experimentalmente. É provável que isso esteja relacionada à presença de glicosilações, alquilações, dentre outras modificações pós-traducionais, que podem interferir na massa da proteína (BIERMANN, 1988). Outra possibilidade seria a não ionização de algumas isoformas ou mesmo a ausência de expressão de algumas dessas isoformas nas sementes quiescentes utilizadas para obtenção da *Mo*-CBP<sub>3</sub> (SECOND *et al.*, 2009). Já em relação aos valores teóricos de pI (TABELA 7), os dados corroboram com o pI determinado para *Mo*-CBP<sub>3</sub>, que foi de 10,8 (GIFONI *et al.* 2012), revelando se tratar de uma proteína básica.

Na sequência deduzida da *Mo*-CBP<sub>3</sub> vários resíduos de cisteína foram detectados, o que poderia justificar a alta estabilidade dessa proteína quando exposta a agentes redutores, temperaturas elevadas e extremos de pH (FIGURAS 9, 16 e 17). A presença de alguns desses resíduos de cisteína foi verificada na sequência NH<sub>2</sub>-terminal da *Mo*-CBP<sub>3</sub>, obtida por degradação de Edman. A sequência deduzida apresentou similaridade com proteínas coagulantes presentes em sementes de *M. oleifera*, confirmando achados prévios, quando a busca foi realizada usando apenas a sequência NH<sub>2</sub>-terminal (GIFONI *et al.*, 2012). Similaridades com albuminas 2S de diferentes espécies também foram detectadas, em particular com a cadeia B de isoformas da mabilin, uma albumina de sementes de *C. masaikai*. Quando comparadas as propriedades dessas albuminas 2S com as encontradas para *Mo*-CBP<sub>3</sub>, uma alta semelhança é verificada no que se refere à massa molecular, presença de duas cadeias polipeptídicas distintas, estrutura secundária predominantemente alfa-beta e termoestabilidade elevada (LIU *et al.*, 1993; NIRASAWA *et al.*, 1994). Para algumas dessas albuminas 2S, um papel protetor contra fitopatógenos foi atribuído (TERRAS *et al.*, 1992). Por exemplo, albuminas 2S de *B. excelsa* apresentaram atividade antifúngica contra vários fungos (ALTENBACH; PEARSON; SUN, 1992). Atividade contra fungos e bactérias também foi verificada para albuminas 2S de sementes de rabanete que, atuando em sinergismo com tioninas de trigo ou cevada, alteraram a permeabilização da membrana plasmática dos fitopatógenos (TERRAS *et al.*, 1996). Porém, para as isoformas de mabilin, relatos com essa ênfase não foram encontrados.

Conexão entre *Mo*-CBP<sub>3</sub> e defesa vegetal foi também observada quando considerados os resíduos de aminoácidos conservados nas isoformas da cadeia B da proteína em estudo. Tais resíduos de aminoácidos estão presentes na região de interface das cadeias 1HSS\_A e 1HSS\_B do inibidor de alfa-amilase de *Triticum aestivum* (ODA *et al.*, 1997). Esse tipo de proteína desempenha uma função importante na defesa natural de plantas contra patógenos e herbívoros (CHRISPEELS; MORENO, 1989; SCHORUDER *et al.*, 1993). Todavia, apesar das evidências relatadas, *Mo*-CBP<sub>3</sub> não se mostrou capaz de inibir a  $\alpha$ -amilase pancreática suína. Porém, antes de fazer qualquer

afirmativa de que *Mo*-CBP<sub>3</sub> é desprovida dessa atividade, ensaios adicionais são necessários utilizando  $\alpha$ -amilases de outras espécies.

Utilizando ferramentas de bioinformática, na sequência deduzida da *Mo*-CBP<sub>3</sub>, não foram encontrados sítios potenciais de fosforilação e O-glicosilação com oligossacarídeos tipo mucina (GalNAc). No entanto, achados experimentais anteriores, mostraram que *Mo*-CBP<sub>3</sub> é uma glicoproteína, contendo 2,5% de carboidratos (GIFONI *et al.*, 2012). Com relação à fosforilação, nenhum experimento foi realizado, o que não se pode excluir a possibilidade dessa proteína ser fosforilada. Dentre as modificações pós-traducionais, a fosforilação é uma das mais importantes e bem estudadas, já que exerce papel crucial em diversos processos celulares, incluindo a ativação ou desativação de muitos receptores e enzimas. A atividade enzimática regulada por fosforilação é encontrada em diversas vias de transdução de sinal, no controle do ciclo celular e em muitos outros eventos celulares (PAWSON, 2002). Em eucariontes, a fosforilação ocorre apenas nos resíduos de serina, treonina e tirosina, sendo a taxa de probabilidade de fosforilação de cada um desses aminoácidos de, aproximadamente, 1000/100/1, respectivamente (SEO; LEE, 2004). De fato, *Mo*-CBP<sub>3</sub> se enquadra nessa probabilidade, uma vez que fosforilação está predita apenas em resíduos de serina. Quanto à glicosilação, essa consiste num processo primordial para a formação das proteínas de membrana e secretórias. Existem dois tipos de glicosilação, a nitrogênio-glicosilação e a oxigênio-glicosilação, que ocorrem no nitrogênio da amida de cadeias laterais de asparagina e na hidroxila da serina e treonina, respectivamente (WELLS *et al.*, 2003; WHELAN; HART, 2003). Essas cadeias de polissacarídeos adicionadas às proteínas têm diversas funções, sendo essencial para o enovelamento correto e manutenção da meia-vida da proteína, bem como na adesão célula-célula (DANIELS; HOGQUIST; JAMESON, 2002).

Estudos prévios realizados por nosso grupo de pesquisa já sugeriam ser *Mo*-CBP<sub>3</sub> uma proteína termoestável, já que sua atividade contra fungos fitopatogênicos era mantida mesmo após aquecimento a 100 °C, por 1 h (FIGURA 25). Na tentativa de melhor compreender essa aparente termoestabilidade da *Mo*-CBP<sub>3</sub>, análises por dicroísmo circular foram realizadas com a proteína submetida ao aquecimento gradual na faixa de 26 a

90 °C e, também, quando aquecida a 90 °C, por 1 h, mostrando ausência de desnaturação, já que a estrutura secundária foi preservada e, provavelmente, sua estrutura terciária (FIGURA 16). É provável que esse comportamento esteja relacionado ao fato de ocorrer um reordenamento dos elementos de estrutura secundária na proteína, evitando a desnaturação e, conseqüentemente, a manutenção da atividade biológica. Esse achado difere do encontrado para a maioria das proteínas quando submetidas ao tratamento térmico nas condições citadas, dado que as proteínas, em geral, mantêm sua estrutura intacta até certa temperatura, em torno de 35-45 °C, ocorrendo a partir daí uma alteração abrupta na conformação nativa (NELSON, 2008).

Proteínas podem desnaturar não somente com o aquecimento, mas também em extremos de pH. Nesse estudo, *Mo-CBP<sub>3</sub>* também mostrou estabilidade frente a diferentes valores de pH, sugerindo que tais condições não foram suficientes para alterar a carga líquida da proteína, de modo a causar repulsão eletrostática, por exemplo, com posterior ruptura das pontes de hidrogênio (FIGURA 17) (KWAAMBWA; MAIKOKERA, 2008). Esse comportamento condiz com a manutenção da atividade antifúngica da *Mo-CBP<sub>3</sub>* quando utilizada em diferentes valores de pH (4,0; 6,0; 8,0; 10,0 e 12,0) (FIGURA 26). Entretanto, em pH 2,0, nas condições em que o ensaio foi realizado, não é possível afirmar se a proteína apresentou ação antifúngica, pois nem mesmo nas condições controle foi observada a germinação dos conídios. Sendo a concentração de prótons muito elevada nesse pH, é possível que se trate de um meio adverso à germinação do fungo (FIGURA 26).

Estabilidade similar a apresentada por *Mo-CBP<sub>3</sub>* foi verificada para uma proteína de 14 kDa, denominada MoL, também purificada de sementes de *M. oleifera* (KATRE *et al.*, 2008). A proposição de apoiar a estabilidade da *Mo-CBP<sub>3</sub>* na presença de resíduos de cisteína mostra-se pertinente, visto que dos 22 resíduos identificados de sua extremidade NH<sub>2</sub>-terminal, 27,3% são representados por cisteína (GIFONI *et al.*, 2012). A presença dos resíduos de cisteína pode levar à formação de pontes dissulfeto, tornando as proteínas mais resistentes à desnaturação (VELAZHAHAN *et al.*, 1999; ASENSIO *et al.*, 2000; TRINDADE *et al.*, 2006).

Com foco no outro do objetivo do presente trabalho, voltado para investigação do espectro e modo de ação da *Mo-CBP<sub>3</sub>*, atividade foi detectada

frente vários fungos fitopatogênicos de interesse agrônomo. Esse resultado propõe ser *Mo*-CBP<sub>3</sub> uma proteína promissora para obtenção de plantas transgênicas resistentes a fungos, uma vez que um dos pré-requisitos para essa finalidade é a presença de um amplo espectro de ação contra fitopatógenos alvo (PELEGRINI; FRANCO, 2005; SINGH *et al.*, 2007).

Para dar prosseguimento ao estudo do modo de ação da *Mo*-CBP<sub>3</sub>, o fungo *F. solani* foi escolhido como modelo, por ser de fácil manuseio e rápido desenvolvimento, sendo, portanto, ideal para ensaios “*in vitro*” (ZHANG *et al.*, 2006). Além desses fatos, *F. solani* trata-se de uma espécie de extrema importância, visto que é um fungo responsável por perdas severas na agricultura mundial em diversas espécies vegetais, principalmente soja e feijão (CHATERJEE, 1958; BAYWATER, 1959; SYNDER *et al.*, 1975; ALBRECHT *et al.*, 1998).

Um dos testes realizados teve como proposta avaliar a necessidade ou não das cadeias polipeptídicas da *Mo*-CBP<sub>3</sub> estarem unidas para a proteína se mostrar antifúngica. Foi verificado que *Mo*-CBP<sub>3</sub> para ser ativa contra *F. solani* precisa das cadeias A e B unidas por pontes dissulfeto, já que essa proteína perdeu a capacidade de inibir a germinação dos conídios de *F. solani* quando reduzida e alquilada, com 0,01 M ditiotreitol e 0,03 M iodoacetamida, respectivamente (FIGURA 24). Similarmente ao observado com *Mo*-CBP<sub>3</sub>, uma osmotina purificada do látex de *Calotropis procera* perdeu sua atividade contra fungos fitopatogênicos, quando tratada com agente redutor (FREITAS *et al.*, 2011).

*Mo*-CBP<sub>3</sub> é uma proteína capaz de causar efeitos negativos não apenas na fase de germinação de conídios, mas, também, durante o crescimento micelial (FIGURA 27). Contudo, é importante salientar que a capacidade de *Mo*-CBP<sub>3</sub> em interferir negativamente no crescimento de *F. solani* apenas foi verificada na ausência do extrato de levedura no meio de cultura. Isso pode ser explicado pela possibilidade de *Mo*-CBP<sub>3</sub> interagir com a levedura, no lugar do fungo filamentosos, resultando na ausência de atividade antifúngica. Esse efeito inibitório da *Mo*-CBP<sub>3</sub> sobre o crescimento micelial de *F. solani* é bastante expressivo, tendo sido observado já a 0,05 mg/mL, uma concentração cerca de 15,1 vezes menor quando comparada a outra proteína com afinidade à quitina, denominada SPL (YAO *et al.*, 2010). Adicionalmente, muitos trabalhos

reportam sobre diferentes proteínas ligantes à quitina capazes de inibir o crescimento de fungos fitopatogênicos (MIRELMAN *et al.*, 1975; BROEKAERT *et al.*, 1989; CIOPRAGA *et al.*, 1999; HUANG; XIE; GONG, 2000; YANG; GONG, 2002; NG, 2004, TRINDADE *et al.*, 2006).

A atividade antifúngica de *Mo*-CBP<sub>3</sub> parece envolver interações eletrostáticas. De fato, *Mo*-CBP<sub>3</sub> perdeu a atividade antifúngica na presença de NaCl na concentração de 0,15 M (FIGURA 28). Sensibilidade da atividade microbiana à força iônica já foi reportada para outras proteínas e peptídeos antifúngicos, mesmo em concentrações fisiológicas (BRUHN *et al.*, 2003; THEIS *et al.*, 2003; MENDIETA *et al.*, 2006). Em consonância ao aqui exposto, defensinas vegetais quando usadas em testes antimicrobianos, expostas a meios suplementados com cátions, mostraram atividade antifúngica menos intensa (CARVALHO; GOMES, 2011). Outras proteínas antifúngicas também foram antagonizadas por cátions mono- e divalentes (BROEKAERT *et al.*, 1978; NIELSEN *et al.*, 1997; THEIS *et al.*, 2003).

É provável que a interação da *Mo*-CBP<sub>3</sub> com a membrana celular do fungo favoreça a morte da célula, uma vez que a utilização do iodeto de propídio resultou na emissão de fluorescência (FIGURA 29). Essa presunção advém do fato de que a célula é impermeável a esse corante e, em princípio, ele não atravessa a membrana da célula viva. Assim, quando esse composto se liga a ácidos nucleicos é porque a célula perdeu a integridade de sua membrana celular, ou seja, está morta (PINA-VAZ; SANSONETTY; RODRIGUES, 2001). Essa capacidade de permeabilização da membrana também foi verificada para outros peptídeos e proteínas antifúngicos (MENDIETA *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2012; MUÑOZ *et al.*, 2012). A membrana celular fúngica pode estar comprometida pela interação da proteína antifúngica com lipídios ou mesmo com proteínas periféricas ou integrais da membrana (PATTON; LESTER, 1991; THEIS; STAHL, 2004; MELO *et al.*, 2005). Gifoni *et al.* (2012) mostraram que *Mo*-CBP<sub>3</sub> é capaz de interferir na bomba H<sup>+</sup>-ATPase, uma proteína integral de membrana.

*Mo*-CBP<sub>3</sub> foi ainda capaz de induzir a produção endógena de espécies reativas de oxigênio (EROs) nos conídios de *F. solani* (FIGURA 30). Aerts *et al.* (2007) demonstraram que o peptídeo catiônico *R*sAFP<sub>2</sub> induz a produção endógena de EROs em células de *Candida albicans* e que tanto a formação de

EROs quanto a atividade antifúngica desaparecem na presença do antioxidante ácido ascórbico, o que sugere ligação entre a atividade antifúngica de *Rs-AFP<sub>2</sub>* e produção de EROs. Acúmulo de EROs já foi detectado em outro fungo do gênero *Fusarium*, por uma proteína também catiônica, denominada *PvD<sub>1</sub>* (MELLO *et al.*, 2011). Em células fúngicas, EROs estão relacionadas ao processo de desenvolvimento do fungo e à sinalização fisiológica interna (GESSLER *et al.*, 2007). Entretanto, o excesso desses compostos gera efeitos oxidativos sobre lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, enquadrando a célula em um evento denominado de estresse oxidativo que, geralmente, culmina em apoptose (HANSBERG; AGUIRRE, 1990; NORDBERG; ARNER, 2001). Apoptose ou morte celular programada é um processo no qual as células ativam um programa intrínseco suicida, resultando em mudanças sequenciais que levam à morte celular, com empacotamento dos constituintes celulares em pedaços ligados à membrana (YUN *et al.*, 1998). Proteínas PR-5 tem predominância de conformações folhas- $\beta$  antiparalelas estabilizadas por pontes dissulfeto que causam ruptura das membranas dos organismos alvos e, também, de membranas artificiais (ANZLOVAR *et al.*, 1998). Já foi demonstrado que osmotinas, a exemplo de PR-5, também apresentam relação entre atividade antifúngica e desorganização na membrana plasmática das células alvo (ABAD *et al.*, 1996; YUN *et al.*, 1998; ANZLOVAR *et al.*, 1998; NARASIMHAN *et al.*, 2001).

Posteriormente, foram evidenciadas alterações causadas por *Mo-CBP<sub>3</sub>* na morfologia e ultraestrutura de células de *F. solani* (FIGURAS 31 e 32). Dentre essas alterações, deformação da parede celular, desorganização do sistema de endomembranas e interrupções na membrana plasmática podem ser destacadas. Outras proteínas ligantes à quitina também podem prejudicar a síntese da parede celular, causando distúrbios na estrutura e/ou função (BORMANN *et al.*, 1999; THEIS; STAHL, 2004). Koo e colaboradores (2004) mostraram que *Pn-AMP1*, uma proteína de defesa de planta, induz várias alterações morfogênicas, como interrupção de membranas e enrugamento das células, em *Saccharomyces cerevisiae* e *C. albicans*. Aumento de vacúolo foi também observado, podendo estar associado a um mecanismo de defesa da célula fúngica, visto que é uma organela envolvida em importantes funções celulares, como exemplos, degradação proteica, homeostase celular,

transporte de membrana, sinalização, nutrição, crescimento, diferenciação e patogênese (RICHARDS; VESES; GOW, 2008). Acúmulo de material eletrodense em todo citoplasma foi também observado (FIGURA 32). Como *Mo-CBP<sub>3</sub>* é uma proteína floculante, é possível que esse material agregado seja proveniente de sua interação com metabólitos primários ou secundários presentes no interior da célula. Acredita-se que a propriedade de floculação apresentada por algumas proteínas da moringa consista da adsorção e neutralização de cargas coloidais (NDABIGENGESERE *et al.*, 1995). Nesse sentido, proteínas carregadas positivamente se ligam a superfícies de partículas carregadas negativamente por meio de interações eletrostáticas, ocasionando à formação de partículas maiores, com cargas positivas e negativas em sua superfície, as quais colidem entre si e se neutralizam, formando flocos maiores que decantam (BROIN *et al.*, 2002). Enfim, as alterações observadas nos conídios de *F. solani*, após incubação com *Mo-CBP<sub>3</sub>*, são típicas de células em apoptose (NARASIMHAN *et al.*, 2001), estando em conformidade com os resultados anteriormente relatados, em particular a emissão de fluorescência detectada no teste com iodeto de propídio e a indução de formação de espécies reativas de oxigênio.

O presente trabalho, além de buscar compreender a ação antifúngica de *Mo-CBP<sub>3</sub>*, teve como objetivo avaliar o efeito citotóxico dessa proteína para células humanas. *Mo-CBP<sub>3</sub>*, mesmo na concentração de 280  $\mu$ M, não foi capaz de causar lise de eritrócitos humanos, sugerindo que sua ação antifúngica decorre de uma interação seletiva com a membrana do fungo (FIGURA 33A). Resultado semelhante foi encontrado para o AFP-J, um potente peptídeo antifúngico (LEE *et al.*, 2012). A ausência de efeito citotóxico de *Mo-CBP<sub>3</sub>* foi reforçada pela preservação da viabilidade celular das células MCF-7 e Caco-2, diferindo dos resultados apresentados por ConA e PHA, lectinas citotóxicas usadas como controles positivo (FIGURA 33 B). Avaliação do efeito citotóxico geralmente é feita para peptídeos e proteínas antifúngicos, visando sua aplicação segura, requerendo uma atividade citotóxica baixa ou ausente (KLUVER *et al.*, 2005; QI *et al.*, 2010; VORONTSOVA *et al.*, 2011). Embora *Mo-CBP<sub>3</sub>* tenha apresentado indícios de caráter inócuo às células humanas, se faz necessário o aprofundamento de estudos que comprovem a utilização segura dessa proteína.

## ***11 CONCLUSÕES***

A proteína ligante à quitina presente nas sementes de *Moringa oleifera*, denominada *Mo-CBP<sub>3</sub>*, trata-se de uma albumina 2S, que mostrou alta estabilidade, amplo espectro de ação contra fungos fitopatogênicos em baixas concentrações. Associadamente, apresentou indícios de ser inócua à células humanas; o que reforça que *Mo-CBP<sub>3</sub>* tem grande potencial para produção de plantas transgênicas mais resistentes a fungos.

## REFERÊNCIAS

ABAD, L. R.; D'URZO, M. P.; LIU, D.; NARASIMHAM, 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**, v. 118, p. 11-23, 1996.

ABD-ELSALAM, K. A. Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design. **African Journal of Biotechnology**, v. 2 (5), p. 91-95, 2003.

ADAMS, D. J. Fungal cell wall chitinases and glucanases. **Microbiology**, v. 150, p. 2029-2035, 2004.

AERTS, A. M.; FRANCOIS, I. E. J. A.; MEERT, E. M. K.; LI, Q. T.; CAMMUE, B. P. A.; THEVISSSEN, K. The antifungal activity of Rs-AFP2, a plant defensin from *Raphanus sativus*, involves the induction of reactive oxygen species in *Candida albicans*. **Journal of Molecular Microbiology Biotechnology**, v. 13, p. 13243-13247, 2007.

AGERBERTH, B.; GUNNE, H.; ODEBERG, J.; KOGNER, P.; BOMAN, H. G.; GUDMUNDSSON, G. H. FALL-39, a putative human peptide antibiotic, is cysteine-free and expressed in bone marrow and testis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America**, v. 92, p. 195-199, 1995.

AGUILETA, G.; LENGELLE, J.; CHIAPELLO, H.; GIRAUD, T.; VIAUD, M.; FOURNIER, E.; RODOLPHE, F.; MARTHEY, S.; DUCASSE, A.; GENDRAULT, A.; POULAIN, J.; WINCKER, P.; GOUT, L. Genes under positive selection in a model plant pathogenic Fungus *Botrytis*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, p. 987-996, 2012.

AIRES, R. S.; STEINDORFF, A. S.; RAMADA, H. S.; SIQUEIRA, S. J.; ULHOA, C. J. Biochemical characterization of 27 kDa 1,3- $\beta$ -D-glucanase from *Trichoderma asperellum* induced by cell wall of *Rhizoctonia solani*. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 1219-1223, 2012.

AKHTAR, M.; HASANY, S. M.; BHANGER, M. I.; IQBAL, S. Sorption potential of *Moringa oleifera* pods for the removal of organic pollutants from aqueous solutions. **Journal of Hazardous Materials**, v. 141, p. 546-556, 2007.

ALI, H.; HOUGHTON, P. J.; SOUMYANATH, A.  $\alpha$ -amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, p. 449-455, 2006.

ALBRECHT, A.; HEISSER, I.; BACKER, R.; NEMEC, S.; ELSTNER, E. F.; OSSWALD, W. Effects of the *Fusarium solani* toxin dihydrofusarubin on tobacco leaves and spinach chloroplasts. **Journal of the Plant Physiology**, v. 153, p. 462-468, 1998.

ALTENBACH, S. B.; PEARSON, K. W.; SUN, S. S. M. Nucleotide sequences of cDNAs encoding two members of the Brazil nut methionine-rich 2S albumin gene family. **Plant Physiology**, v. 98, p. 1520–1522, 1992.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, n. 215, p. 403-410, 1990.

AMAYA, D. R.; KERR, W. E.; GODOI, H. T.; OLIVEIRA, A. L.; SILVA, F. R. Moringa: hortaliça arbórea rica em beta-caroteno. **Horticultura Brasileira**, v. 10, p. 126, 1992.

ANTOV, M. G.; SCIBAN, M. B.; PRODANOVIC, J. M. Evaluation of the efficiency of natural coagulant obtained by ultrafiltration of common bean seed extract in the water turbidity removal. **Ecological Engineering**, v. 49, p. 48-52, 2012.

ANWAR, F.; BHANGER, M. I. Analytical characterization of *Moringa oleifera* seed oil grown in temperature regions of Pakistan. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 51, p. 6558-6563, 2003.

ANWAR, F.; LATIF, S.; ASHRAF, M.; GILANI, A. H. *Moringa oleifera*, a food plant with multiple medicinal uses. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 17–25, 2007.

ANZLOVAR, S.; SERRA, M. D.; DERMASTIA, M.; MENESTRINA, G. Membrane permeabilizing activity of pathogenesis-related protein linusitin from flax seed. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 11, p. 610–617, 1998.

ASENSIO, J. L.; CAÑADA, F. J.; SIEBERT, H. C.; LAYNEZ, J.; POVEDA, A.; NIETO, P. M.; SOEDJANAAMADJA, U. M.; GABIUS, H. J.; BARBERO, J. J. Structural basis for chitin recognition by defense proteins: GlcNAc residues are bound in a multivalent fashion by extended binding sites in hevein domains. **Chemistry & Biology**, v. 7, p. 529-543, 2000.

BAHNSEN, J. S.; FRANZYK, H.; SANDBERG-SCHAAL, A.; NIELSEN, H. M. Antimicrobial and cell-penetrating properties of penetratin analogs: Effect of sequence and secondary structure. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1828, p. 223-232, 2013.

BAI, S.; DONG, C.; LI, B.; DAI, H. A PR-4 gene identified from *Malus domestica* is involved in the defense responses against *Botryosphaeria dothidea*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 62, p. 23-32, 2013.

BAO, J.; YAO, Q.; WU, C.; LUO, P.; XIANG, X.; LIU, J.; MOU, L. A new chitin-binding lectin from rhizome of *Setcreasea purpurea* with antifungal, antiviral and apoptosis-inducing activities. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1477-1485, 2010.

BAYWATER, J. Infection of peas by *Fusarium solani*- r. martii forma 2 and the spread of the pathogen. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 42, p. 201-212, 1959.

BEINTEMA, J. J. Structural features of plant chitinases and chitin-binding proteins. **FEBS Letters**, v. 350, p.159-163, 1994.

BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. Fisiologia do parasitismo. **Manual de Fitopatologia**, 3<sup>a</sup> edição, p. 334-414, 1995.

BEZERRA, A. M. E.; MOMENTÉ, V. G.; MEDEIROS FILHO, S. Germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas de moringa (*Moringa oleifera* Lam.) em função do peso da semente e do tipo de substrato. **Horticultura Brasileira**, v. 22, p. 295-299, 2004.

BHATTI, H. N.; MUMTAZ, B.; HANIF, M. A.; NADEEM, R. Removal of Zn(II) ions from aqueous solution using *Moringa oleifera* Lam. (horseradish tree) biomass. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 547-553, 2007.

BHUPTAWAT, H.; FOLKARD, G. K.; CHAUDHARI, S. Innovative physico-chemical treatment of wastewater incorporating *Moringa oleifera* seed coagulant. **Journal of Hazardous Materials**, v. 142, p. 477-482, 2007.

BIERMANN, C. J. Hydrolysis and other cleavages of glycosidic linkages in polysaccharides. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v. 46, p. 251-271, 1988.

BIRCH, D. J. S. Multiphoton excited fluorescence spectroscopy of biomolecular systems. **Spectrochimica Acta**, v. 57, p. 2313-2336, 2001.

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

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

BROEKAERT, W. F.; VAN PARIJS, J.; LEYNS, F.; JOOS, H.; PEUMANS, W. J. A chitin-binding lectin from stinging nettle rhizomes with antifungal properties. **Science**, v. 245, p. 1100-1102, 1989.

BROEKAERT, W. F.; MARIEN, W.; TERRAS, F. R. G.; DE BOLLE, M. F. C.; PROOST, P.; VAN DAMME, J.; DILLEN, L.; CLAEYS, M.; REES, S. B.; VANDERLEYDEN, J.; CAMMUE, B. P. A. Antimicrobial peptides from *Amaranthus caudatus* seeds with sequence homology to the cysteine/glycine-rich domain of chitin-binding proteins. **Biochemistry**, v. 31, p. 4308-4314, 1992.

BROEKAERT, W. F.; TERRAS, F. R. G.; CAMMUE, B. P. A.; VANDERLEYDEN, J. An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. **FEMS Microbiology Letters**, v. 69,, p. 55-59, 1990.

BROIN, M.; SANTAELLA, C.; CUINE, S.; KOKOU, K.; PELTIER, G.; JOËT, T.; Flocculent activity of a recombinant protein from *Moringa oleifera* Lam. seeds. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, p. 114-119, 2002.

BROWN, J. L.; ROBERTS, W. K. Evidence that approximately eighty percent of the soluble Proteins from Ehrlich ascites cells are N-acetylated. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 251, p. 1009-1014, 1976.

BRUHN, H.; RIEKENS, B.; BERNINGHAUSEN, O.; LEIPPE, M. Amoebapores and NK, members of a class of structurally distinct antimicrobial and cytolytic peptides from protozoa and mammals: a comparative functional analysis. **Biochemical Journal**, v. 375, p. 737-744, 2003.

BORMANN, C; BAIER, D.; HÖRR, I.; RAPS, C.; BERGER, G.; JUNG, J; SCHWARZ; H. Characterization of a novel, antifungal, chitin-binding protein from *Streptomyces tendae* Tü901 that interferes with growth polarity. **Journal of Bacteriology**, v. 181, p. 7421-7429, 1999.

CÁCERES, A.; CABRERA, O.; MORALES, O.; MOLLINEDO, P.; MENDIA, P. Pharmacological properties of *Moringa oleifera*. 1: Preliminary screening for antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 33, p. 213-216, 1991.

CÁCERES, A.; SARAIVA, A.; RIZZO, S.; ZABALA, L.; LEON, E. D.; NAVE, F. Pharmacological properties of *Moringa oleifera*. 2: Screening for antispasmodic, anti-inflammatory and diuretic activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 36, p. 233-237, 1992.

CANTU, D.; VICENTE, A. R.; LABAVITCH, J. M.; BENNETT, A. B.; POWELL, A. L. T. Strangers in the matrix: plant cell walls and pathogen susceptibility. **Trends in Plant Science**, v. 13, p. 610–617, 2008.

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

- CARLINI, C. R.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon**, v. 40, p. 1515-1539, 2002.
- CARRILLO, L.; HERRERO, I.; CAMBRA, I.; SÁNCHEZ-MONGE, R.; DIAZ, I.; MARTINEZ, M. Differential in vitro and in vivo effect of barley cysteine and serine protease inhibitors on phytopathogenic microorganisms. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 49, p. 1191-1200, 2011.
- CARUSO, C.; BERTINI, L.; CAPORALE, C.; TESTA, M.; PROIETTI, S. Structural basis of the antifungal activity of wheat PR4 proteins. **FEBS Letter**, v. 583, p. 2865-2871, 2009.
- CARVALHO, A. O.; GOMES, V. M. Plant defensins and defensin-like peptides-biological activities and current pharmaceutical design. **Peptides**, v. 17, p. 4270-4293, 2011.
- CASTRO, M. S.; FERREIRA, T. C.; CILLI, E. M.; CRUSCA, E. Jr.; MENDES-GIANNINI, M. J.; SEBBEN, A.; RICART, C. A. O.; SOUSA, M. V.; FONTES, W. Hylin a1, the first cytolytic peptide isolated from the arboreal South American frog *Hypsiboas albopunctatus* ("spotted treefrog"). **Peptides**, v. 30, p. 291-296, 2009.
- CHANG, S.; PURYEAR, J.; CAIRNEY, J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. **Plant Molecular Biology**, v. 11, p. 113-116, 1993.
- CHATERJEE, P. The bean rot complex in Idaho. **Journal of Phytopatology**, v. 48, p. 197-200, 1958.
- CHATOO, B. B.; PRASAD, B. D.; CREISSEN, G.; LAMB, C. Heterologous expression and characterization of recombinant OsCDR1, a rice aspartic proteinase involved in disease resistance. **Protein Expression and Purification**, v. 72, p. 169-174, 2010.
- CHEN, G. S.; PAN, D. R.; ZHOU, Y. F.; LIN, S.; KE, X. D. Diversity and evolutionary relationship of nucleotide binding site encoding disease-resistance gene analogues in sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.). **Journal of Bioscience**, v. 32, p. 713-721, 2007.
- CHEONG, Y. H.; KIM, C. Y.; CHUN, H. J.; MOON, B. C.; PARK, H. C.; KIM, J. K.; LEE, S-H.; HAN, C-D.; LEE, S. Y.; CHO, M. J. Molecular cloning of a soybean

class III  $\beta$ -1,3-glucanase gene that is regulated both developmentally and in response to pathogen infection. **Plant Science**, v. 154, p. 71-81, 2000.

CHISPEELS, M. J.; RAIKHEL, N. V. Lectins, lectin genes and their role in plant defense. **Plant Cell**, v. 3, p. 1-9, 1991.

MORENO, J.; CHRISPEELS, M. J. A lectin gene encodes the  $\alpha$ -amylase inhibitor of the common bean. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, p. 7885-7889, 1989.

CHRISTENSEN, A. B.; CHO, B. H.; NAESBY, M.; GREGERSEN, P. L.; BRANDT, J.; MADRIZ-ORDEÑA, K.; COLLINGE, D. B.; THORDAL-CRISTENSEN, H. The molecular characterization of two barley proteins establishes the novel PR-17 family of pathogenesis-related proteins. **Molecular Plant Pathology**, v. 3, p. 135-144, 2002.

CHUANG, P-H.; LEE, C-W.; CHOU, J-Y.; MURUGAN, M.; SHIEH, B-J.; CHEN, H. M. Antifungal activity of crude extracts and essential oil of *Moringa oleifera* Lam. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 232-236, 2007.

CHUMARK, P.; KHUNAWAT, P.; SANVARINDA, Y.; PHORNCHIRASILP, S.; MORALES, N. P.; PHIVTHONG-NGAM, L.; RATANACHAMNONG, P.; SRISAWAT, S.; PONGRAPEEPORN, K. S. The *in vitro* and *ex vivo* antioxidant properties, hypolipidaemic and antiatherosclerotic activities of water extract of *Moringa oleifera* Lam. leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, p. 439-446, 2008.

CIOPRAGA, J.; GOZIA, O.; TUDOR, R.; BREZUICA, L.; DOYLE, R. *Fusarium* sp. growth inhibition by wheat germ agglutinin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1428, p. 424-432, 1999.

COLOMBO, G.; MELI, M.; CAÑADA, J.; ASENSIO, J. L.; BARBERO, J. J. A dynamic perspective on the molecular recognition of chito oligosaccharide ligands by hevein domains. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 1039-1049, 2005.

CORNELISSEN, B.; MELCHERS, L. Strategies for control of fungal diseases with transgenic plants. **Plant Physiology**, v. 101, p. 709-712, 1993.

COSTA, S. A.; BELTRAMINI, L. M.; THIEMANN, O. H.; SILVA, F. H. A sugarcane cystain: recombinant expression, purification, and antifungal activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 296, p. 1194-1199, 2002.

COUSSOT, G.; HAWKE, D. H.; MULARZ, A.; KOOMEN, J. M.; KOBAYASHI, R. A method for the Isolation of blocked N-terminal peptides. **Analytical Biochemistry**, v. 361, p. 302-304, 2007.

CYSNE, J. R. B. **Propagação *in vitro* de *Moringa oleifera* L.** Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Universidade Federal do Ceará, 2006.

DANIELS M. A; HOGQUIST, K. A; JAMESON, S. C. Sweet 'n' sour: the impact of differential glycosylation on T cell responses. **Nature Immunology**, v. 3(10), p. 903-910, 2002.

DASTUR, J. F. **Medicinal Plants of Indian and Pakistan.** D. B. Taraporevala and Co. Delhi, p. 113-114, 1977.

DATTA, S. K.; MUTHUKRISHNAN, S. **Pathogenesis-Related Proteins in Plants.** Ed. CRC Press. Boca Raton, Florida: Ed. CRC Press, 1999.

DE CONINCK, B.; CAMMUE, B. P. A.; THEVISSSEN, K. Modes of antifungal action and in planta functions of plant defensins and defensin-like peptides. **Fungal Biology Reviews**, v. 26, p. 109-120, 2013.

DELIOPOULOS, T.; KETTLEWELL, P. S.; HARE, M. C. Fungal disease suppression by inorganic salts: A review. **Crop Protection**, v. 29, p. 1059-1075, 2010.

DE RIENZO, F.; GABDOULLIVE, R. R.; MENZINE, M. C.; WADE, R. C. Blue copper proteins a comparative analysis of their molecular interaction properties. **Protein Science**, v. 9, p. 1439-1459, 2000.

DONOFRIO, N. M.; DELANEY, T. P. Abnormal callose response phenotype and hypersusceptibility to *Peronospora parasitica* in defense-compromised *Arabidopsis nim 1-1* and salicylate hydroxylase-expressing plants. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 14, p. 439-450, 2001.

DUMAS-GAUDOT, E.; ASSELIN, A.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; GOLLOTE, A.; GIANINAZZI, S. Chitinase isoforms in roots of various pea genotypes infected with arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Science*, v. 99, p. 27-37, 1994.

ESTRADA, E.; URIARTE, E. Folding degrees of azurins and pseudoazurins: Implications for Structure and function. **Computational Biology and Chemistry**, v. 29, p. 345-353, 2005.

EWING, B.; GREEN, P. Basecalling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, v. 8, p. 186-194, 1998.

FAHEY, J. D. *Moringa oleifera*: a review of the medical evidence for its nutritional, therapeutic, and prophylactic properties. Part 1. **Trees for Life Journal**, 2005.

FANG, E. F.; WONG, J. H.; LIN, P.; NG, T. B. Biochemical characterization of the RNA-hydrolytic activity of a pumpkin 2S albumin. **FEBS Letters**, v. 584, p. 4089-4096, 2010.

FENOLL, J.; RUIZ, E.; HELLÍN, P.; NAVARRO, S.; FLORES, P., Solarization and biosolarization enhance fungicide dissipation in the soil. **Chemosphere**, v. 79, p. 216-220, 2010.

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 defence proteins in fungal pathogenesis. **Molecular Plant Pathology**, v. 8, p. 677-700, 2007

FIELDS, P. G. Effect of *Pisum sativum* fractions on the mortality and progeny production of nine stored-grain beetles. **Journal of Stored Products Research**, v. 42, p. 86–96, 2006.

FREITAS, C. D. T.; LOPES, J. L. S.; 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**, v. 1808, p. 2501–2507, 2011.

FUKUMA, H.; NAKASHIMA, K.; OZAKI, Y.; NODA, I. Two-dimensional fluorescence correlation spectroscopy IV: Resolution of fluorescence of tryptophan residues in alcohol dehydrogenase and lysozyme. **Spectromechimica Acta**, v. 65, p. 517-522, 2006.

GANESAN, M.; JAYABALAN, N. Role and importance of chitinase gene expression in plants for fungal disease tolerance. In: JAYABALAN, N. (Org.). **Plant Biotechnology**, New Delhi: APH Publishing Corporation, 2006. p. 1-28.

GAO, A. G.; HAKIM, S. M.; MITTANCK, C. A.; WU, Y.; WOERNER, B. M.; STARK, D. M.; SHAH, D. M.; LIANG, J.; ROMMENS, C. M. Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide. **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 1307-1310, 2000.

GARCIA-OLMEDO, F.; MOLINA, A.; ALAMILLO, J. M.; RODRIGUEZ-PALENZUELA, P. Plant defense peptides. **Biopolymers**, v. 47, p. 479–491, 1998.

GASSENSCHMIDT, U.; JANY, K. D.; TAUSCHER, B.; NIEBERGALL, H. Isolation and characterization of a flocculating protein from *Moringa oleifera* Lam. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1243, p. 477-481, 1995.

GATTO, M. A.; IPPOLITO, A.; LINSALATA, V.; CASCARANO, N. A.; NIGRO, F.; VANADIA, S.; VENERE, D. D. Activity of extracts from wild edible herbs

against postharvest fungal diseases of fruit and vegetables. **Postharvest Biology and Technology**, v. 61, p. 72-82, 2011.

GE, Y.; BI, Y.; GUEST, D. I. Defense responses in leaves of resistant and susceptible melon (*Cucumis melo* L.) cultivars infected with *Colletotrichum lagenarium*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 81, p. 13-21. 2013.

GESSLER, N. N.; AVER'YANOV, A. A.; BELOZERSKAYA, T. A. Reactive oxygen species in regulation of fungal development. **Biochemistry**, v. 72, p. 1091-1109, 2007.

GEHRING, P. M.; KRZYZANIAK, A.; BAECISZEWSKI, J.; BIEMANN, K. Mass spectrometric amino acid sequencing of a mixture of seed storage proteins (napin) from, products of a multigene family. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93 (8), p. 3647-3652, 1996.

GIFONI, J. M. **Propriedades bioquímicas e funcionais de uma proteína ligantes à quitina purificada de sementes de *Moringa oleifera***. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Ceará, 2009.

GIFONI, J. M. **Proteínas ligantes à quitina de sementes de *Moringa oleifera* Lamarck e seu papel na defesa da planta**. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Ceará, 2005.

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

GIL, C.; INSENSER, M. R.; HERNÁEZ, M. L.; NOMBELA, MOLINA, M.; MOLERO, G. Gel and gel-free proteomics to identify *Saccharomyces cerevisiae* cell surface proteins. **Journal of Proteomics**, v. 7 3, p. 1183-1195, 2010.

GOMES, A. S. **Purificação, caracterização físico-química e biológica de proteínas ligantes à quitina presentes nas sementes de *Moringa oleifera* Lamarck**. Monografia, Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará, 2002.

GONZALES, C. F.; PROVIN, E. M.; ZHU, L.; EBBOLE, D. J. Independent and synergistic activity of synthetic peptides against thiabendazole-resistant *Fusarium sambucinum*. **Phytopathology**, v. 92, p. 917-924, 2002.

GORDON, D., ABAJIAN, C., GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, v. 8, p. 195-202, 1998.

GOSH, M. Purification of a lectin-like antifungal protein from the medicinal herb, *Withania somnifera*. **Fitoterapia**, v. 80, p. 91-95, 2009.

GURURANI, M. A.; VENKATESH, J.; UPADHYAYA, C. P.; NOOKARAJU A., A.; PANDEY S. K.; PARK, S. W. Plant disease resistance genes: Current status and future directions. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 78, p. 51-65, 2012.

HALL, T. A. BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acid Symposium Series**, v. 41, p. 95-98.

HAMID, M., REHMAN, K-U. Potential applications of peroxidases. **Food Chemistry**, v. 115, p. 1177-1186, 2009.

HANSBERG, W.; AGUIRRE, J. Hyperoxidant states cause microbial cell differentiation by cell isolation from dioxygen. **Journal of Theoretical Biology**, v. 142, p. 201-221, 1990.

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

HASTRUP, A. C. S.; GREEN, F.; LEBOW, P. K.; JENSEN, B. Enzymatic oxalic acid regulation correlated with wood degradation in four brown-rot fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 75, p. 109-114, 2012.

HEGEDUS, N.; MARX, F., Antifungal proteins: More than antimicrobials? **Fungal Biology Reviews**, v. 26, p. 132-145, 2013.

HELL, S. W.; BAHLMANN, K.; SCHRADER, M.; SOINI, A.; MALAK, H.; GRYEZYNSKI, I.; LAKOWICZ. Three-photon Excitation in fluorescence microscopy. **Journal of Biochemical Optics**, v. 1, p. 71-74, 1996.

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

HOAN, L. T.; DAVIDE, R. G. Nematicidal properties of root extracts of seventeen plant species on *Meloidogyne incognita*. **Philippine Agriculturist**, v. 62, p. 285-295, 1979.

HUANG, R. H.; WANG, D. C. Mass spectrometry strategy for primary structure determination of N-terminally blocked peptides. **Journal of Chromatography**, v. 803, p. 167-172, 2004.

HUANG, X.; XIE, W.; GONG, Z. Characteristics and antifungal activity of a chitin binding protein from *Ginkgo biloba*. **FEBS Letters**, v. 478, p. 123-126, 2000.

HWU, L.; HUANG, C. C.; CHEN, D. T.; LIN, A. The action mode of ribosome inactivating protein  $\alpha$ -sacarin. **Journal of Biomedical Science**, v. 7, p. 420-428, 2000.

IQBAL, M. J.; YAEGASHI, S.; AHSAN, R.; SHOPINSKI, K. L.; LIGHTFOOT, D. A. Root response to *Fusarium solani* f. sp. *glycines*: temporal accumulation of transcripts in partially resistant and susceptible soybean. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 110, p. 1429, 2005.

JAGANNADHAM, V.; PATEL, A. K.; SINGH, V. K.; YADAV, R. P.; MOIR, A. J. G.; JAMES, C. **Global status of commercialized biotech/GM crops**. ISAAA Brief: Executive Summary, p. 41, 2009.

JAMES, C. **Global status of commercialized biotech/GM crops: 2012**. Disponível em: <http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/44/highlights/default.asp>. Acesso em: 01 mar. 2013.

JI, C.; KÚC, J. Antifungal activity of cucumber  $\beta$ -1,3-glucanase and chitinase. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 49, p. 257-265, 1996.

JIAN-JUN, M., DE-WEN, Q., XIU-FENG, Y., HONG-MEI, Z., JING-JING, Y. Expression of protein elicitor-encoding gene *pemG1* in tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. samsun NN) plants and enhancement of resistance to TMV. **Acta Agronomica Sinica**, v. 34, p. 2070-2076, 2008.

KAO, M. P.; CHEN, C. I.; HUANG, S. C.; LIN, K. M.; CHANG, Y. C.; LIU, Y. C. Preparation of fermentation-processed chitin and its application in chitinase affinity adsorption. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 343-348, 2009.

KWAAMBWA, H. M.; MAIKOKERA, R. Infrared and circular dichroism spectroscopic characterisation of secondary structure components of a water treatment coagulant protein extracted from *Moringa oleifera* seeds. **Colloids Surfaces B: Biointerfaces**, v. 64, p. 118–125, 2008.

KAR, A.; CHOUDHARY, B. K.; BANDYOPADHYAY, N. G. Comparative evaluation of hypoglycaemic activity of some Indian medicinal plants in alloxan diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 4, p. 105-108, 2003.

KATAYON, S.; NOOR, M. J. M. M.; ASMA, M.; GHANI, L. A. A.; THAMER, A. M.; AZNI, I.; AHMAD, J.; KHOR, B. C.; SULEYMAN, A. M. Effects of storage

conditions of *Moringa oleifera* seeds on its performance in coagulation. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1455-1460, 2006.

KATHIRAVAN, M. K.; SALAKE, A. B.; CHOTHE A. S.; DUDHE, P. B.; WATODE, R, P.; MUKTA, M. S.; GADHWE, S. The biology and chemistry of antifungal agents: A review. **Bioorganic & Medical Chemistry**, v. 20, p. 5678-5698, 2012.

KATRE, U. V.; SURESH, C. G.; KHAN, M. I.; GAIKWAD, S. M. Structure-activity relationship of a hemagglutinin from *Moringa oleifera* seeds. **Biological Macromolecules**, v. 42, p. 203-207, 2008.

KELLY, S. M.; JESS, T. J.; PRICE, N. C. How to study proteins by circular dichroism. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1751, p. 119-139, 2005.

KESSMANN, H.; STAUB, T.; HOFMANN, C.; MAETZKE, T.; HERZOG, J.; WARD, E.; UKNES, S.; RYALS, J. Induction of systemic acquired resistance in plants by chemicals. **Annual Reviews of Phytopathology**, v. 32, p. 439-459, 1994.

KLÜVER, E.; SCHULZ-MARONDE, S.; SCHEID, S.; MEYER, B.; FORSSMANN, W-G.; ADERMANN, K. Structure-activity relation of human  $\alpha$ -Defensin 3: influence of disulfide bonds and cysteine substitution on antimicrobial activity and cytotoxicity. **Biochemistry**, v. 44, p. 9804-9816, 2005.

KOÇ, E.; ÜSTÜN, A. S.; ISLEK, C.; ARICI, Y. K. Defense responses in leaves of resistant and susceptible pepper (*Capsicum annum* L.) cultivars infected with different inoculum concentrations of *Phytophthora capsici* Leon. **Scientia Horticulturae**, v. 128, p. 434-442, 2011.

KOIWA, H.; BRESSAN, R. A.; HASEGAWA, P. M. Regulation of proteinase inhibitors and plant defense. **Trends in Plant Science**, v. 2, p. 379-384, 1997.

KOMBRINK, A.; SÁNCHEZ-VALLET, A.; THOMMA, B. P. H. J. The role of chitin detection in plant-pathogen interactions. **Microbes and Infection**, v. 13, p. 1168-1176, 2011.

KOO, J. C.; LEE, B.; YOUNG, M. E.; KOO, S. C.; COOPER, J. A.; BAEK, D.; LIM, C. O.; LEE, S. Y.; YUN, D. J.; CHO, M. J. Pn-AMP1, a plant defense protein, induces actin depolarization in yeasts. **Plant and Cell Physiology**, v. 45, p. 1669-1680, 2004.

KRONMAN, M. J.; HOLMES, L. G. The Fluorescence of native, denatured and reduced-denatured proteins. **Photochemistry and Photobiology**, v. 14, p. 113-134, 2008.

KRUPINSKI, E.; NYPAVER, M.; POROPATICH, R.; ELLIS, D.; SAFWAT, R.; SAPCI, H. Telemedicine/telehealth: an international perspective. Clinical applications in telemedicine/telehealth. **Telemedicine Journal and E-Health**, v. 8, p. 13-34, 2002.

KUTCHER, H. R.; JOHNSTON, A. M.; BAILEY, K. L.; MALHI, S. S. Managing crop losses from plant diseases with foliar fungicides, rotation and tillage on a Black Chernozem in Saskatchewan, Canada. **Field Crops Research**, v. 124, p. 205-212, 2012.

KWAAMBWA, H. M.; MAIKOKERA, R. Infrared and circular dichroism spectroscopic characterisation of secondary structure components of a water treatment coagulant protein extracted from *Moringa oleifera* seeds. **Colloids Surfaces B: Biointerfaces**, v. 64, p. 118–125, 2008.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 679-685, 1970.

LAKOWICZ, J. **Princípios de Espectroscopia de Fluorescência**, 3<sup>a</sup> ed., p. 530-573, 2006.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**, 1999.

LAKOWICZ, J. R.; GRZYCZYNSKI, I. Three-photon excitation of fluorescence. **Applied Fluorescence in Chemistry Biology and Medicine**, v. 7, p. 137, 1999.

LAM S. K.; NG, T. B. Passiflin, a novel dimeric antifungal protein from seeds of the passion fruit. **Phytomedicine**, v. 16, p.172-180, 2009.

LAMB, C.; DIXON R. A. A. The oxidative burst in plant disease resistance. **Current Opinions in Biotechnology**, v. 9, p. 679-685, 1970.

LATGÉ, J. P. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. **Molecular Microbiology**, v. 66, p. 279-290, 2007.

LAZNIEWSKA, J.; MACIOSZEC, V. K.; KONONOWICZ, A. K. Plant-fungus interface: The role of surface structures in plant resistance and susceptibility to pathogenic fungi. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 78, p. 24-30, 2012.

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

LEE, J-K.; GOPAL, R.; SEO, C. H.; CHEONG, H.; PARK, Y. Isolation and purification of a novel deca-antifungal peptide from potato (*Solanum tuberosum* L cv. Jopung) against *Candida albicans*, **International Journal of Molecular Sciences**, v. 3, p. 4021-4032, 2012.

LEE, Y.; YANG, S. T.; LEE, S. K.; JUNG, H. H.; SHIN, S. Y.; HAHM, K-S; KIM, J. I. Salt-resistant homodimeric bactenecin, a cathelicidin-derived antimicrobial peptide. **FEBS Journal**, v. 275, p. 3911–3920, 2008.

NELSON, D. L.; A. L. LEHNINGER, A. L.; COX, M. M. LEHNINGER: **Principios de Bioquímica**, 5a ed., 1158 p, 2008.

LENARDON, M. D, MUNRO, C. A., GOW, N. A. Chitin synthesis and fungal pathogenesis. **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, p. 1-8, 2010.

LI, S.; CLAESON, P. Cys/Gly-rich proteins with a putative single chitin-binding domain from oat (*Avena sativa*) seeds. **Phytochemistry**, v. 63, p. 249-255, 2003.

LIPIPUN, V.; KUROKAWA, M.; SUTTISRI, R.; TAWEECHOTIPATR, P.; PRAMYOTHIN, P.; HATTORI, M.; SHIRAKI, K. Efficacy of Thai medicinal plant extracts against herpes simplex virus type 1 infection *in vitro* and *in vivo*. **Antiviral Research**, v. 60, p. 175-180, 2003.

LIU, X.; MAEDA, S.; HU, Z.; AIUCHI, T.; NAKAYA, K.; KURIHARA, Y. Purification, complete amino acid sequence and structural characterization of the heat-stable sweet protein mabinlin II. **European Journal of Biochemistry**, v. 211, p. 281-287, 1993.

LÓPEZ, R. C.; GÓMEZ-GÓMEZ, L. Isolation of a new fungi and wound-induced chitinase class in corms of *Crocus sativus*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 47, p. 426-434, 2009.

LU, S.; FARIS, J. D.; SHERWOOD, R.; EDWARDS, M. C. Dimerization and protease resistance: New insight into the function of PR-1. **Journal of Plant Physiology**, v. 170, p. 105-110, 2013.

MA, D. Z.; WANG, H. X.; NG, T. B. A peptide with potent antifungal and antiproliferative activities from Nepalese large red beans. **Peptides**, v. 30, p. 2089-2094, 2009.

MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Nutrients and quality factors in different morphocological parts of the *Moringa oleifera* tree. **Journal of Agricultural Science**, v. 128, p. 331-342, 1997.

MAREI, G. I. KH; RASOUL , M. A. A.; ABDELGALEIL, S. A. M. Comparative antifungal activities and biochemical effects of monoterpenes on plant pathogenic fungi. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 103, p. 56-61, 2012.

MATOS, F. J. A. **Farmácias vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetados para pequenas comunidades**. 3. ed. Fortaleza: EUFC, 1998. 220 p.

MAUCH F.; STAEHELIN L. A. Functional implications of the subcellular localization of ethylene-induced chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase in bean leaves. **Plant Cell**, v. 1, p. 447-457, 1989.

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

MELLO, E. O.; RIBEIRO, S. F. F.; CARVALHO, A. O.; SANTOS, I. S.; DA CUNHA, M.; SANTA-CATARINA, C.; GOMES, V. M. Antifungal activity of PvD1 defensin involves plasma membrane permeabilization, inhibition of medium acidification, and induction of ROS in fungi cells. **Current Microbiology**, v. 62, p. 1209–1217, 2011.

MENDIETA, J. R.; PAGANO, M. R.; MUÑOZ, F. F.; DALEO, G. R.; GUEVARA, M. G. Antimicrobial activity of potato aspartic proteases (StAPs) involves membrane permeabilization. **Microbiology**, v. 152, p. 2039-2047, 2006.

MENEZES, H.; JARED, C. Immunity in plants and animals: common ends through different means using similar tools. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 132, p. 1-7, 2002.

MENG, X.; YANG, L.; KENNEDY, J. F.; TIAN, S. Effects of chitosan and oligochitosan on growth of two fungal pathogens and physiological properties in pear fruit. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, p. 70-75, 2010.

- MEZENDORFER, H. The cellular basis of chitin synthesis in fungi and insects: Common principles and differences. **European Journal of Cell Biology**, v. 90, p. 759-769, 2011.
- MIRELMAN, D.; GALUN, E.; SHARON, N.; LOTAN, R. Inhibition of fungal growth by wheat germ agglutinin. **Nature**, v. 256, p. 414-416, 1975.
- MONK, B. C.; PERLIN, D. S. Fungal plasma-membrane proton pumps as promising new antifungal targets. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 20, p. 209-223, 1994.
- MORENO, F. J.; JENKINS, J. A.; MELLON, F. A.; RIGBY, N. M.; ROBERTSON, J. A.; WELLNER, N.; MILLS, E. N. C. Mass spectrometry and structural characterization of 2S albumin isoforms from Brazil nuts (*Bertholletia excelsa*). **Biochemica et Biophysica Acta**, v. 1698, p. 175-186, 2004.
- MORENO, A. B.; DEL POZO, A. M.; BORJA, M.; SAN SEGUNDO, B. Activity of the antifungal protein from *Aspergillus giganteus* against *Botrytis cinerea*. **Phytopathology**, v. 93, p. 1344-1353, 2003.
- MORENO, J., CHRISPEELS, M. J. A lectin gene encodes the  $\alpha$ -amylase inhibitor of the common bean. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, p. 7885-7889, 1989.
- MORIMITSU, Y.; HAYASHI, K.; NAKAGAMA, Y.; HORIO, F.; UCHIDA, K.; OSAWA, T. Antiplatelet and anticancer isothiocyanates in Japanese horseradish, wasabi. **BioFactors**, v. 13, p. 271-276, 2000.
- MUÑOZ, A.; GANDÍA, M.; HARRIES, E.; CARMONA, L.; READ, N. D.; MARCOS, J. F. Understanding the mechanism of action of cell-penetrating antifungal peptides using the rationally designed hexapeptide PAF26 as a model. **Fungal Biology Reviews**, v. 26, p. 146-155, 2013.
- MUÑOZ, A.; GANDÍA, M.; HARRIES, E.; CARMONA, L.; READ, N. D.; MARCOS, J. F. Understanding the mechanism of action of cell-penetrating antifungal peptides using the rationally designed hexapeptide PAF26 as a model. **British Mycological Society**, v. xxx, p. 1-10, 2012.
- NDABIGENGESERE, A.; NARASIAH, K. S.; TALBOT, B. G. Active agents and mechanism of coagulation of turbid waters using *Moringa oleifera*. **Water Research**, v. 29, p. 703-710, 1995.
- NARASIMHAN, M. L.; DAMSZ, B.; COCA, M. A.; IBEAS, J. I.; YUN, D. J.; PARDO, J. M.; HASEGAWA, P. M.; BRESSAN, R. A. A plant defense response effector induces microbial apoptosis. **Molecular Cell**, v. 8, p. 921-930, 2001.

NASI, A.; PICARIELLO, G.; FERRANTI, P. Proteomic approaches to study structure, functions and toxicity of legume seeds lectins. Perspectives for the assessment of food quality and safety. **Journal of Proteomics**, v. 72, p. 527-538, 2009.

NAUMANN, T. A.; WICKLOW, D. T.; KENDRA, D. F. Maize seed chitinase is modified by a protein secreted by *Bipolaris zeicola*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 74, p. 134-141, 2009.

NELSON, D. L.; LEHNINGER, A. L.; COX, M. M. **Lehninger: Principles of Biochemistry**, 5<sup>a</sup> ed., p. 1158, 2008.

NEPOLEAN, P.; RENNITA, R. E.; ANITHA, J. Isolation, analysis and identification of phytochemicals of antimicrobial activity of *Moringa oleifera* Lam. **Current Biotica**, v. 3, p. 33-39, 2009.

NEUHAUS, J. M. Plant chitinases (PR-3, PR-4, PR-8, PR-11). In: Datta, S. K. and Muthukrishnan, S. **Pathogenesis-Related Proteins in Plants**, CRC Press, p. 77–105, 1999.

NG, T. B. Antifungal proteins and peptides of leguminous and non-leguminous origins. **Peptides**, v. 25, p.1215-1222, 2004.

NIELSEN, H.; ENGELBRECHT, J.; BRUNAK, S.; VON HEIJENE, G. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. **Protein Engineering**, v. 10 (1), p. 1-6, 1997.

NIRASAWA, S.; NISHINO, T.; KATAHIRA, M.; UESUGI, S.; HU, Z.; KURIHARA, Y. Structures of heat-stable and unstable homologues of the sweet protein mabinlin. **European Journal of Biochemistry**, v. 223, p. 989-995, 1994.

NORDBERG, J.; ARNER, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicini**, v. 31, p. 1287–1312, 2001.

NÜRNBERGER, T.; GUST, A. A.; BRUNNER, F. Biotechnological concepts for improving plant innate immunity. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, p. 204-210, 2010.

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

NWOSU, M. O.; OKAFOR, J. I. Preliminary studies of the antifungal activities of some medicinal plants against *Basidiobolus* and some other pathogenic fungi. **Mycoses**, v. 38, p. 191-195, 1995.

ODA, T.; ELKAHLOUN, A. G.; RIKE, B. L.; OKAJIMA, K.; KRANTZ, I. D.; GENIN, A.; PICCOLI, D. A.; MELTZER, P. S.; SPINNER, N. B.; COLLINS, F. S.; CHANDRASEKHARAPPA, S. C. Mutations in the human *Jagged1* gene are responsibility for Alagille syndrome. **Nature Genetics**, v. 16, p. 235-242, 1997.

ODDS, F. C.; BROWN, A. J. P.; GOW, N. A. R. Antifungal agents: mechanisms of action. **Trends in Microbiology**, v. 11, p. 272-279, 2003.

OLIVEIRA, C. F. R.; LUZ, L. A.; PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B.; MARANGONI, S.; MACEDO, M. L. R. Evaluation of seed coagulant *Moringa oleifera* lectin (cMoL) as a bioinsecticidal tool with potential for the control of insects. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 498–504, 2011.

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

OLIVEIRA, J. T. A.; SILVEIRA, S. B.; VASCONCELOS, I. M.; CAVADA, B. S.; MOREIRA, R. A. Compositional and nutritional attributes of seeds from the multipurpose tree *Moringa oleifera* Lamarck. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, p. 815-820, 1999.

OLIVEIRA, J. T. A.; RIOS, F. J. B.; VASCONCELOS, I. M.; FERREIRA, F. V. A.; NOJOSA, G. B. A.; MEDEIROS, D. A. *Cratylia argentea* seed lectin, a possible defensive protein against plant-eating organisms: effects on rat metabolism and gut histology. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 1737-1747, 2004.

PACE, C. N.; VAJDOS, F.; FEE, L.; GRIMSLEY, G.; GRAY, T. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. **Protein Science**, v. 4, p. 2411-2423, 1995.

PATTON, J.; LESTER, R. L. The phosphoinositol sphingolipids of *Saccharomyces cerevisiae* are highly localized in the plasma membrane. **Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 3101-3108, 1991.

PAWSON, T. Regulation and targets of receptor tyrosine kinases. **European Journal of Cancer-Supplements**, v. 5, p. S3-10, 2002.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Lectin as plant defense proteins. **Plant Physiology**, v. 109, p. 347-352, 1995.

PIETERSE, A. H. Is flowering in Lemnaceae stress-induced? A review. **Aquatic Botany**, v. 104, p. 1-4, 2012.

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

POSTAL M.; MARTINELLI, A. H. S.; BECKER-RITT, A. B.; LIGABUE-BRAUN, R.; DEMARTINI, D. R.; RIBEIRO, S. F. F.; PASQUALI, G.; GOMES, V. M.; CARLINI, C. R. Antifungal properties of *Canavalia ensiformis* urease and derived peptides. **Peptides**, v. 38, p. 22-32, 2012.

PALAGI, P. M; HERNANDEZ, P.; WALTHER, D.; APPEL, R. D. Proteome informatics I: bioinformatics tools for processing experimental data. **Proteomics**, v. 6, p. 5435–5444, 2006.

PELEGRINI, P. B.; FRANCO, O. L. Plant  $\gamma$ -thionins novel insights on the mechanism of action of a multi-functional class of defense proteins. **Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 37, p. 2239-2252, 2005.

PINA-VAZ, C.; SANSONETTY, F.; RODRIGUES, A. G. Cytometric approach for a rapid evaluation of susceptibility of *Candida* strains to antifungals. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 7, p. 609-618, 2001.

PUUMALAINEN, T. J.; POIKONEN, S.; KOTOVUORI, A.; VAALI, K.; KALKKINEN, N.; REUNALA, T.; TURJANMAA, K.; PALOSUO, T. Napins, 2S albumins, are major allergens in oilseed rape and turnip rape. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 117, p. 426-432, 2006.

QI, X.; ZHOU, C.; LI, P.; XU, W.; CAO, Y.; LING, H.; CHEN, W. N.; LI, C. M.; XU, R.; LAMRANI, M.; MU, Y.; LEONG, S. S. J.; CHANG, M. W.; CHAN-PARK, M. B. Novel short antibacterial and antifungal peptides with low cytotoxicity: Efficacy and action mechanisms. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 398, p. 594–600, 2010.

RAIKHEL, N. V.; LEE, H. I. Structure and function of chitin-binding proteins. Annual Reviews of Plant Physiology. **Plant Molecular Biology**, v. 44, p. 591-615, 1993.

RAMACHANDRAN, D.; PETER, K. V.; GOPALAKRISHNAN, P. K. Drumstick (*Moringa oleifera*): A multipurpose Indian vegetable. **Economic Botany**, v. 34, p. 276-283, 1980.

RANJBAR, B.; GILL, P. Circular dichroism techniques: biomolecular and nanostructural analyses. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 74, p. 101-120, 2009.

REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron- opaque staining in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v. 17, p. 208–212, 1963.

RIBEIRO, S. F. F.; CARVALHO, A. O.; CUNHA, M.; RODRIGUES, R.; MELO, V. M. M.; MELO, E. J. T.; VASCONCELOS, I. M.; CRUZ, L. P.; GOMES, V. M. Isolation and characterization of novel peptides from chilli pepper seeds: antimicrobial activities against pathogenic yeasts. **Toxicon**, v. 50, p. 600-611, 2007.

RICHARDS, A.; VESES, V.; GOW, N. A. R. Vacuole dynamics in fungi. **Fungal Biology Reviews**, v. 24, p. 93–105, 2008.

RICHTER, N.; SIDDHURAJU, P.; BECKER, K. Evaluation of nutritional quality of moringa (*Moringa oleifera* Lam.) leaves as an alternative protein source for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). **Aquaculture**, v. 217, p. 599-611, 2003.

RIZZELLO, C. G.; CODA, R.; ANGELIS, M.; Di CAGNO, R.; CARNEVALI, P.; GOBBETTI, M. Long-term fungi inhibitory activity of water-soluble extract from *Amaranthus* spp. seeds during storage of gluten-free and wheat flour breads. **International Journal of Food Microbiology**, v. 131, p. 189-196, 2009.

ROGOZHIN, E. A.; RYAZANTSEV, D. Y.; GRISHIN, E. V.; EGOROV, T. A.; ZAVRIEV, S. K. Defense peptides from barnyard grass (*Echinochloa crusgalli* L.) seeds. **Peptides**, v. 38, p. 33-40, 2012.

ROHWER, C. L.; ERWIN, J. E. Horticultural application of jasmonates: A review. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 83, p. 283-304, 2008.

RONALD, P.; ADAMCHAK, R. E. **Tomorrow's table: organic farming, genetics, and the future of food USA**. Oxford University Press, 2008.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: A laboratory manual**. 2<sup>a</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3<sup>a</sup> ed. Cold Spring Harbor, N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANKARAN, S.; MISHRA, A.; EHSANI, R.; DAVIS, C. A review of advanced techniques for detecting plant diseases. **Computers and Eletronics in Agriculture**, v. 72, p. 1-13, 2010.

SANTNER, A.; CALDERON-VILLALOBOS, L. I. A.; ESTELLE, M. Plant hormones as versatile regulators of plant growth. **Nature Chemical Biology**, v. 5, p. 301–307, 2009.

SANTOS, A. F. S.; ARGOLO, A. C. C.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G. Detection of water soluble lectin and antioxidant component from *Moringa oleifera* seeds. **Water Research**, v. 39, p. 975-980, 2005.

SANTOS, A. F. S.; LUZ, L. A.; ARGOLO, A. C. C.; TEIXEIRA, J. A.; PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B. Isolation of a seed coagulant *Moringa oleifera* lectin. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 504-508, 2009.

SCHAGGER, H.; VON JAGOW, G. Tricine-sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Analytical Biochemistry**, v. 166, p. 368–379, 1987.

SCHLUMBAUM, A.; MAUCH, F.; VÖGELI, U.; BOLLER, T. Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. **Nature**, v. 324, p. 365-367, 1986.

SCHROEDER, H.E; SCHOTZ, A. H; WARDLEY-RICHARDSON, T.; SPENCER D.; HIGGINS, T. J. V. Transformation and regeneration of two cultivars of pea (*Pisum sativum* L.). **Plant Physiology**, v. 101, p. 751-757, 1993.

SEHGAL, P.; KHAN, M.; KUMAR, O.; VIJAYARAGHAVAN. Purification characterization and toxicity profile of ricin from castor beans. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 3171-3376, 2010.

SELITRENNIKOFF, C. P. Antifungal proteins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 2883-2894, 2001.

SELS, J.; MATHYS, J.; DE CONINCK, B. M. A.; CAMMUE, B. P.A.; DE BOLLE, M. F. C. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 46, p. 941-950, 2008.

SEO, J.; LEE, K-J. Post-translation modifications and their biological functions: proteomic analysis and systematic approaches. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37 (1), p. 35-44, 2004.

SERRANO, R. Structure and function of plasma membrane ATPase. **Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 40, p. 61-94, 1989.

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

SHAO, F.; HU, Z.; XIONG, Y. M.; HUANG, Q. Z.; WANG, C. G.; ZHU, R. H.; WANG, D. C. A new antifungal peptide from the seeds of *Phytolacca americana*: characterization, amino acid sequence and cDNA cloning. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1.430, p. 262-268, 1999.

SIDDHURAJU, P.; BECKER, K. Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 15, p. 2144-2155, 2003.

SINGH A.; KIRUBAKARAN, S. I.; SAKTHIVEL, N. Heterologous expression of new antifungal chitinase from wheat. **Protein Expression and Purification**, v. 56, p. 100-109, 2007.

SINGH, K. K.; KUMAR, K. Ethnotherapeutics of some medicinal plants used as antipyretic agents among the tribals of India. **Journal of Economic and Taxonomic Botany**, v. 23, p. 135-141, 1999.

SMAGGHE, G.; SADEGHI, A.; VAN DAMME, E. J. M.; PEUMANS, W. J. Deterrent activity of plant lectins on cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (F.) oviposition. **Phytochemistry**, v. 67, p. 2078–2084, 2006.

SOUZA, J. D.; SILVA, M. B. R.; ARGOLO, A. C. C.; NAPOLEÃO, T. H.; SÁ, R. A.; CORREIA, M. T. S.; PAIVA, P. M. G.; SILVA, M. D. C.; COELHO, L. C. B. B. A new *Bauhinia monandra* galactose-specific lectin purified in milligram quantities from secondary roots with antifungal and termiticidal activities. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 65, p. 696-702, 2011.

SPADARO, D.; GULLINO, M. L. State of the art and future prospects of the biological control of postharvest fruit diseases. **International Journal of Food Microbiology**, v. 91, p. 185-194, 2004.

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

SVECOVÁ, E.; PROIETTI, S.; CARUSO, C.; COLLA, G.; CRINÒ, P. Antifungal activity of *Vitex agnus-castus* extract against *Pythium ultimum* in tomato. **Crop Protection**, v. 43, p. 223-230, 2013.

SYNDER, W. C.; GEORGOPOULOS, S. G.; WEBSTER, R. K.; SMITH, S. N. Sexuality and genetic behavior in the fungus *Hypomyces (Fusarium) solani* f. sp. Curcubitae. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 43, p. 161-185, 1975.

SYRIOUS, T.; YUPSANIS, T.; ZAFIRIADIS, H.; ECONOMOU, A. Activity and isoforms of peroxidases, lignin and anatomy, during adventitious rooting in cuttings of *Ebenus cretica* L. *Journal of Plant Physiology*, v. 161, p. 69-77, 2004.

T.A. HALL. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium**, v. 41, p. 95–98, 1999.

TAIHLIANI, P.; KAR, A. Role of *Moringa oleifera* leaf extract in the regulation of thyroid hormone status in adult male and female rats. **Pharmacological Research**, v. 41, p. 319-323, 1999.

TAIRA, T.; TOMA, N.; ISHIHARA, M. Purification, characterization, and antifungal activity of pineapple (*Ananas comosus*) leaf chitinases. **Biosciences, Biotechnology and Biochemistry**, v. 69, p. 189-196, 2005.

TAMBURINO, R.; PIZZO, E.; SARCINELLI, C.; POERIO, E.; TEDESCHI, F.; FICCA, A. G.; PARENTE, A., DI MARO, A. Enhanced cytotoxic activity of a bifunctional chimeric protein containing a Type 1 ribosome-inactivating protein and serine protease inhibitor. **Biochimie**, v. 94, p. 1990-1996, 2012.

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

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

TERRAS, F. R. G.; SCHOOF, H. M. E.; DE BOLLE, M. F. C.; LEUVEN, F. VAN; RESS, S. B.; VANDERLEYDEN, J.; CAMMUE, B. P. A.; BROEKAERT, W. F. Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, p. 15301–15309, 1992.

TERRAS, F. R. G.; TORREKENS, S.; LEUVEN, F. VAN; BROEKAERT, W. A six-cysteine type thionin from the radish storage organ displays weak in vitro antifungal activity against *Fusarium culmorum*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 34, 599–603, 1996.

THEIS, T.; STAHL, U. Antifungal proteins: targets, mechanisms and prospective applications. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, p. 437-455, 2004.

- THEIS, T.; WEDDE, M.; MEYER, V.; STAHL, U. The antifungal protein from *Aspergillus giganteus* causes membrane permeabilization. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47 (2), p. 588–593, 2003.
- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 4673–4680, 1994.
- THORDAL-CHRISTENSEN, H.; ZHANG, Z.; WEI, Y.; COLLINGE, D. B. Subcellular localization of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in plants: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. **Plant Journal**, v. 11, p. 1187-1194, 1997.
- TOSSI, A.; SANDRI, L.; GIANGASPERO, A. Amphipathic,  $\alpha$ -helical antimicrobial peptides. **Biopolymers**, v. 55, p. 4-30, 2000.
- TOSSI, A.; SCOCCHI, M.; SKERLAVAJ, B.; GENNARO, R. Identification and characterization of a primary antibacterial domain in CAP18, a lipopolysaccharide binding protein from rabbit leukocytes. **FEBS Letters**, v. 339, p. 108–112, 1994.
- TRINDADE, M. B.; LOPES, J. L. S.; SOARES-COSTA, A.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C.; MOREIRA, R. A.; OLIVA, M. L. V.; BELTRAMINI, L. M. Structural characterization of novel chitin-binding lectins from the genus *Artocarpus* and their antifungal activity. **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 1764, p. 146-152, 2006.
- TRIVEDI, P.; DUAN, Y.; WANG, N. Huanglongbing, a systemic disease, restructures the bacterial community associated with citrus roots. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 3427-3436, v. 76, 2010.
- VAN DEN BERGH, K. P. B.; PROOST, P.; VAN DAMME, J.; COOSEMANS, J.; VAN DAMME, E. J. M.; PEUMANS, W. J. Five disulfide bridges stabilize a hevein-type antimicrobial peptide from the bark of spindle tree (*Euonymus europaeus* L.). **FEBS Letters**, v. 530, p. 181-185, 2002.
- VAN LOON, L. C.; VAN STRIEN, E. A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 55, p. 85-97, 1999.
- VAN LOON, L. C.; REP, M.; PIETERSE, C. M. J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, v. 44, p. 135-162, 2006.
- VAN PARIJS, J.; BROEKAERT, W. F.; GOLDSTEIN, I. J.; PEUMANS, W. J. Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. **Planta**, v. 183, p. 258-264, 1991.

VANDENBORRE, G.; SMAGGE, G.; VAN DAMME, E. J. M. Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects. **Phytochemistry**, v. 72, p. 1538-1550, 2011.

VASCONCELOS, I. M.; MORAIS, J. K. S.; SIEBRA, E. A.; CARLINI, C. R.; SOUSA, D. O. B.; BELTRAMINI, L. M.; MELO, V. M. M.; OLIVEIRA, J. T. A. SBTX, a new toxic protein distinct from soyatoxin and other soybean [*Glycine max*] proteins, and its inhibitory effect on *Cercospora sojina* growth. **Toxicon**, v. 51, p. 952-963, 2008.

VELAZHAHAN, R.; DATTA S. K.; MUTHUKRISHNAN, S. The PR-5 family: thaumatin-like proteins in plants. In: Datta SK, Muthukrishan S, editors. Pathogenesis-related proteins. **CRC Press**, p. 107-129, 1999.

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

VERONESE, P.; RUIZ, M. T.; COCA, M. A.; HERNANDEZ-LOPEZ, A.; LEE, H.; IBE, J. I.; DAMSZ, B.; PARDO, J. M.; HASEGAWA, P. M.; BRESSAN, M.; NARASIMHAN, M. In defense against pathogens. Both plant sentinels and foot soldiers need to know the enemy. **Plant Physiology**, v.131, p. 1.580-1.590, 2003.

VILA, L.; LACADENA, V.; DEL POZO, A. M.; SAN SEGUNDO, B. A protein from the mold *Aspergillus giganteus* is a potent inhibitor of fungal plant pathogens. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 14, p. 1331-11327, 2001.

VOGT, V.; CIFUENTE, D.; TONN, C.; SABINI, L.; ROSAS, S. Antifungal activity *in vitro* and *in vivo* of extracts and lignans isolated from *Larrea divaricata* Cav. against phytopathogenic fungus. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 583-586, 2013.

VORONTSOVA, O. V.; EGOROVA, N. S.; ARSENIEV, V. A.; FEOFANOV, V. Haemolytic and cytotoxic action of laticin Ltc2a. **Biochimie**, v. 93 p. 227-241, 2011.

WANG, H. X.; NG, T. B. An antifungal peptide from the coconut. **Peptides**, v. 26, p. 2392-2369, 2005.

WANG, J.; XIA, X-M.; WANG, H-Y.; LI, P-P.; WANG, K-Y. Inhibitory effect of lactoferrin against grey mould on tomato plants caused by *Botrytis cinerea* and

possible mechanisms of action. **International Journal of Food Microbiology**, v. 161, p.151-157, 2012.

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

WANG, P.; GRANADOS, R. R. Calcofluor disrupts the midgut defense system in insects. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 30, p. 135-143, 2000.

WELLS, L.; WHALEN, S. A.; HART, G. W. O-GlcNAc: a regulatory post-translational modification. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 302, p. 435-441, 2003.

WELLNER, D.; PANNEERSELVAM, C.; HORECKER, B. L. Sequencing of peptides and proteins with blocked N-terminal amino acids: N-acetylserine or N-acetylthreonine. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, p. 1947, 1990.

XIE, Y.R.; CHEN, Z. Y.; BROWN, R. L.; BHATNAGAR, D. Expression and functional characterization of two pathogenesis-related protein10 genes from *Zea mays*. **Journal of Plant Physiology**, v. 167, p. 121-130, 2010.

YANG, D.; PULLA, R. M.; LEE, O. R.; IN, J. KIM, Y., SENTHIL, K. Expression and functional characterization of pathogenesis-related protein family 10 gene, *PgPR10-2*, from *Panax ginseng* C. A. Meyer. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 74, p. 323-329, 2010.

YANG, Q.; GONG, Z-Z. Purification and characterization of an ethylene-induced antifungal protein from leaves of guelder rose (*Hydrangea macrophylla*). **Protein Expression and Purification**, v. 24, p. 76-82, 2002.

YAO, Q.; WU, C.; LUO, P.; XIANG, X.; LIU, J.; MOU, L.; BAO, J. A New chitin-binding lectin from thizome of *Setcreasea purpurea* with antifungal, antiviral and apoptosis-inducing activities. **Process Biochemistry**, v. 45, p.1477-1485, 2010.

YE, X. Y.; NG, T. B. Isolation and characterization of juncin, an antifungal protein from seeds of japanese takana (*Brassica juncea* Var. integrifolia). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 4366–4371, 2009.

YU, M.; SHEN, L.; ZHANG, A.; SHENG, J. Methyl jasmonate-induced defense responses are associated with elevation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase in *Lycopersicon esculentum* fruit. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, p. 1820-1827, 2011.

YUN, D.-J.; IBEAS, J. I.; LEE, H.; COCA, M. A.; NARASIMHAN, M. L.; UESONO, Y.; HASEGAWA, P. M.; PARDO, J. M.; VERSAN, R. A. Osmotin, a Plant Antifungal Protein, Subverts Signal Transduction to Enhance Fungal Cell Susceptibility, **Molecular Cell**, v. 1, p. 807–817, 1998.

ZANETTI, M.; STORICI, P.; TOSSI, A.; SCOCCHI, M.; GENNARO, R. Molecular cloning and chemical synthesis of a novel antibacterial peptide derived from pig myeloid cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 7855–7858, 1994.

ZAREIE, R.; MELANSON, D. L.; MURPHY, P. J. Isolation of fungal cell wall degrading proteins from barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves infected with *Rhynchosporium secalis*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 15, p. 1031-1039, 2002.

ZENG, D. L. Investigation of protein-surfactant interactions in aqueous solutions. **The University of Connecticut**, 1997.

ZHANG J., KOPPARAPU, N. K., YAN, Q., YANG, S., JIANG, Z. Purification and characterisation of a novel chitinase from persimmon (*Diospyros kaki*) with antifungal activity. **Food Chemistry**, v. 138, p.1225-1232, 2013.

ZHANG, X.; MUNIS, M. F. H.; TU, L.; DENG, F.; TAN, J.; XU, L.; XU, S.; LONG, L. A thaumatin-like protein gene involved in cotton fiber secondary cell wall development enhances resistance against *Verticillium dahliae* and other stresses in transgenic tobacco. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 393, p. 38-44, 2010.

ZHANG, N.; O'DONNELL, K.; SUTTON, D. A.; AMEENA NALIM, F.; SUMMERBELL, R. C.; PADHYE, A. A.; GEISER, D. M. Members of the *Fusarium solani* species complex that cause infections in both humans and plants are common in the Environment. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44 (6), p. 2186, 2006.

ZIPOR, G.; OREN-SHAMIR, M. Do vacuolar peroxidases act as plant caretakers? **Plant Science**, v. 199, p. 41-47, 2013.

A sensibilidade antimicrobiana ao sal parece estar relacionada à presença de pontes dissulfeto (TOSSI *et al.*, 1994; ZANETTI *et al.*, 1994; AGERBERTH *et al.*, 1995; LEE *et al.*, 2008).