



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas
(Genética e Biotecnologia)



Suzana Meira Ribeiro

**IDENTIFICAÇÃO DE UM PEPTIDEO ANTIFÚNGICO
EM SEMENTES DE *PASSIFLORA ALATA* CURTIS
COM SIMILARIDADE À ALBUMINA 2S**

Juiz de Fora, MG

2010

2010

PGCBIO

Suzana Meira Ribeiro

ICB/UFJF

Suzana Meira Ribeiro

**IDENTIFICAÇÃO DE UM PEPTIDEO ANTIFÚNGICO
EM SEMENTES DE *PASSIFLORA ALATA* CURTIS
COM SIMILARIDADE À ALBUMINA 2S**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Curso de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Genética e Biotecnologia,
como requisito para obtenção do título de
Mestre na área de Genética e
Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Octávio Luiz Franco

Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Santos

Juiz de Fora, MG

2010

Ribeiro, Suzana Meira.

Identificação de um peptídeo antifúngico em sementes de *Passiflora alata* Curtis com similaridade a albumina 2S / Suzana Meira Ribeiro. – 2010.

123 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)–Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2010.

1. Fungos. 2. Proteínas. 3. Plantas. I. Título.

CDU 582

Suzana Meira Ribeiro

**IDENTIFICAÇÃO DE UM PEPTÍDEO ANTIFÚNGICO
EM SEMENTES DE *PASSIFLORA ALATA* CURTIS
COM SIMILARIDADE À ALBUMINA 2S**

A dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas na área de Genética e Biotecnologia foi avaliada e aprovada pela banca examinadora, composta por:

Dr. Maria Lígia Rodrigues Macedo (Universidade Federal de Mato Grosso do Sul)

Dr. Marcelo de Oliveira Santos (Universidade Federal de Juiz de Fora)

Dr. Octávio Luiz Franco (Universidade Federal de Juiz de Fora)

*Ao meu pai Adão, à minha mãe Helena e aos meus irmãos Matheus e Marco
Antônio por tudo, DEDICO.*

AGRADECIMENTOS

Parafraseando Shakespeare...

Depois de certo tempo aprendemos que encontrar pessoas pode ser decisivo para mudar muito os seus planos para o futuro. Aprendemos que essas pessoas acreditam muito em você, e que elas podem te inspirar e dar forças em muitos propósitos de sua vida (Meus agradecimentos ao professor Dr. Antônio Carlos Oliveira e MSc. Charles Moreira).

Depois de certo tempo aprendemos de que chegar a uma cidade totalmente desconhecida e encontrar pessoas que você nunca viu na vida, às vezes é muito mais simples do que andar em sua própria cidade. Aprendemos que essas pessoas te receberão de forma gentil e amigável mesmo que elas não saibam nada sobre você (Meus agradecimentos ao professor Dr. Marcelo Santos, ao professor Dr. Lyderson Viccini e ao grupo de pesquisa do laboratório de Genética da UFJF pela receptividade e apoio durante minha permanência em Juiz de Fora).

Aprendemos que passar horas e horas em uma casa de vegetação ajudando a sua amiga a cultivar centenas de plantinhas é mais gratificante e divertido do que ir ao cinema sozinha. A gente aprende que amigos desse tipo são para sempre, mesmo que às vezes à distância te afaste geograficamente dessas imensuráveis pessoas... (aqui agradeço a minha parceira de mestrado e, sobretudo amiga, MSc. Aline do Vale).

Depois de certo tempo em um laboratório (com 30 pessoas) aprendemos que pipetar ou fazer uma solução não é tão difícil assim, e que mesmo que você não saiba absolutamente nada, existe sempre alguém que prontamente te ajudará. Aprendemos também onde todos os béqueres, provetas e reagentes estão guardados... Depois de certo tempo a gente aprende que muitos colegas e técnicos do laboratório, são mais do que simples pessoas. A gente aprende que essas pessoas são amigos com os quais podemos passar os mais divertidos momentos e que também podem tornar aqueles dias tristes um pouco menos pesados (Meus agradecimentos aos amigos do CAPB).

Depois de certo tempo aprendemos que os IC's são parceiros, amigos, muitas vezes conselheiros. Aprendemos que muitas vezes podemos aprender mais

com eles do que eles com a gente e que em fluxo bidirecional de aprendizagem, não apenas conhecimento é construído... mas também respeito e amizade (Agradeço muito ao Bach. Renato Goulart e à Camila Pereira por estarem comigo até o fim).

Depois de certo tempo aprendemos que contar esporos exige muita paciência e que na maioria das vezes, as coisas que são feitas com mais calma, podem te trazer mais resultados positivos. Aprendemos com amigos a olhar o mundo de forma diferente, a compreender que se as pessoas respeitassem e amassem mais as outras, com certeza o mundo seria um lugar menos difícil para viver (Aqui agradeço meu grande amigo MSc. João Moreira, John John, pela amizade e pelos ensinamentos desde Juiz de Fora).

Aprendemos que muitas pessoas vão nos ajudar e contribuir para o nosso trabalho, mesmo que às vezes elas não te conheçam, mas que com certeza merecem serem lembradas nos agradecimentos (Meus agradecimentos a professora Dra. Ilka M. Vasconcelos e ao professor Dr. José T. Oliveira e professora Dr. Laila Spindola).

Depois de certo tempo aprendemos que é preciso ter limites para estudar, trabalhar, para comer... para tudo... Aprendemos que algumas vezes, quando esses limites são ultrapassados, o nosso organismo reage contra nós mesmos... Mas aprendemos também, que mesmo quando estamos doentes, sem forças e às vezes até desanimados em prosseguir com os propósitos, existem pessoas que vão fazer mais do que simplesmente brigar com você por tudo isso, ou te levar para o hospital à força. Existem pessoas que vão te levar para jogar sinuca quando você está triste por alguma coisa ou até mesmo literalmente, “pisar em você” (santa massagem), para você sentir melhor. Aprendemos que essas pessoas realmente se importam com a gente e que elas não são simplesmente companheiras de casa. Aprendemos que essas pessoas são “amigos mais chegados que um irmão” (Meus agradecimentos a MSc. Elizabete Cândido, Bach. Bruno Pires, MSc. Michelle Pinto e MSc. Simone Neto).

Depois de certo tempo aprendemos que existem professores que realmente acreditam no sentido da palavra educação. Aprendemos que essas pessoas podem verdadeiramente ser chamadas de educadores. E que as mesmas não são plantadas aos montes como eucaliptos, eles são como madeira de lei, raras, belas em sua essência e admiradas (Meus agradecimentos as professoras Dra. Simoni Dias e Dra. Beatriz Magalhães).

Depois de certo tempo, aprendemos também ao que orientadores não são tão velhos, carecas e barrigudos e que não precisamos olhar para o chão quando falamos com eles. Aprendemos que existem orientadores nada convencionais. Orientadores que não perdem a oportunidade de entrar na roda de alunos e junto com os mesmos, compartilhar os mais divertidos fatos de seu cotidiano. Aprendemos que esses orientadores, nada formais, são profissionais, responsáveis, éticos, confiantes, educadores, humanos e, sobretudo amigos. Orientadores que acreditam mais na gente do que a gente mesmo. Pessoas que às vezes não sabem o quão importantes elas são para os nossos caminhos (o meu muito OBRIGADA ao professor Dr. Octávio Franco... ou melhor Oc).

Depois de certo tempo aprendemos com pessoas especiais que pensar positivo e que sorrir mais, faz sempre bem para alma e para um bom trabalho. Também aprendemos que é bom ouvir no final de semana “have a nice day sweetheart” (Meus agradecimentos à Vyne Sheshadri).

Depois de certo tempo aprendemos que podemos contar muito com as pessoas que estão nos bastidores, que não sabem nada sobre o seu trabalho, mas sempre estarão sorrindo e torcendo por você (Meus agradecimentos aos meus amigos, pessoas amadas, tios e tias, primos e primas e meus avós).

Por toda a vida aprendemos que sempre poderemos descansar a cabeça e despejar nossos anseios, angústias e esperanças sobre aqueles que sempre nos amarão. Aprendemos naturalmente amar com as pessoas, como Matheus e Marco Antônio, irmãos, companheiros e amigos. Também aprendemos naturalmente a sentir que somos amados, com pessoas como meus pais: Adão e Helena, aos quais carinhosamente eu chamo por “Ada” e “Hela” (Para todo sempre os meus agradecimentos a essas pessoas).

Depois de certo tempo aprendemos ouvindo e refletindo sobre uma música de Jack Johnson, que para todas essas coisas que aprendemos com pessoas que passam por nossa vida, “não existe combinação de palavras que eu poderia colocar no verso de um cartão postal” ou aqui mesmo na dissertação, para expressar toda a gratidão... E dizer que os sonhos são feitos de coisas reais (de pessoas, de lugares, de sentimentos)... E que é sempre melhor estarmos juntos, sempre.

*À Deus, por todas essas pessoas,
Obrigada*

RESUMO

Doenças causadas por patógenos, incluindo bactérias e fungos podem gerar muitos problemas à saúde humana e à agricultura. Em cultivares economicamente importantes, tais patógenos podem contribuir para perdas significativas no rendimento da produção agrícola. Um fator agravante para esses dois cenários é o uso intensivo de compostos convencionais para combater esses patógenos, levando à seleção de microrganismos extremamente resistentes. Além disso, tais compostos podem trazer severas consequências ao meio ambiente bem como à saúde humana e animal. Desta forma, a busca por novos compostos capazes de controlar efetivamente bactérias e fungos patogênicos resistentes, têm sido prioritária. Por estas razões, este trabalho reporta o isolamento de uma nova proteína heterodimérica (*Pa-AFP1*) de sementes de *Passiflora alata* com propriedades antifúngicas. *Pa-AFP1* foi purificada utilizando precipitação com sulfato de amônio 70-100%, subsequente cromatografia de troca aniônica em Q-Sepharose e cromatografia de HPLC fase reversa em coluna C₄. Análise da massa molecular por meio de gel Tricina-SDS-PAGE revelou uma massa molecular de aproximadamente 4.500 Da para a cadeia menor e cerca de 7.000 Da para cadeia maior totalizando um heterodímero com cerca de 11.500 Da. A massa da forma oligomérica também foi obtida por espectrometria de massa (11569.63 Da). Análise da seqüência N-terminal mostrou alta identidade entre *Pa-AFP1* e albuminas 2S, adicionando assim uma nova proteína à pequena lista de albuminas 2S com atividade antimicrobiana. Além disso, *Pa-AFP1* foi capaz de inibir eficientemente o fungo filamentosso *Colletotrichum gloeosporioides*, mas foi incapaz de inibir bactérias e fungos leveduriformes. Em suma, *Pa-AFP1* poderá futuramente contribuir para o desenvolvimento de produtos biotecnológicos contra fungos fitopatogênicos.

Palavras-chave: *Colletotrichum gloeosporioides*, *Passiflora alata* Curtis, proteína antifúngica, 2S albuminas

ABSTRACT

Diseases caused by pathogens, including bacteria and fungi can generate many problems to human health and agriculture. In important economically cultivars, such pathogens may contribute to significant losses in yield of agricultural production. The aggravating factor for these two scenarios is the intensive use of conventional compounds to combat these pathogens, leading to selection of highly resistant microorganisms. Furthermore, these compounds can bring severe consequences to the environment, human and animal health. Thus the search for new compounds capable of effectively controlling bacteria and fungi resistant has been a priority. In this report a heterodimeric antifungal protein named *Pa*-AFP1, showing higher identity with the 2S albumin family, was purified by using 70-100% ammonium sulfate saturation and further purification steps such as anionic exchange Q-Sepharose chromatography associated with HPLC reversed-phase C4 chromatography. Analysis by Tricine-SDS-PAGE revealed two peptide molecular masses of approximately 4,500 Da and 7,000 Da, in the presence of β -mercapthoethanol, while by removing the reducing agent, a single protein with molecular mass of about 11,500 Da was obtained. Moreover, dimeric mass was confirmed by MALDI-TOF analyses (11,569.76 Da). The antifungal protein, named *Pa*-AFP1, efficiently inhibited the growth of filamentous fungi *Colletotrichum gloeosporioides*, and was added to a short list of 2S albumins with antimicrobial properties. Otherwise, this same peptide showed no activity toward bacteria and yeasts. In summary, this compound could be used in the future to develop biotechnological products for the control of phytopathogenic fungi.

Keywords: *Antifungal protein*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Passiflora alata* Curtis, 2S albumins

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Antracnose causada por *Colletotrichum gloeosporioides* em *Daphniphyllum macropodum* Miquel, uma planta ornamental. A: Característica de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* crescidos por 5 dias (esquerda) e crescidos por 9 dias (direita) em BDA. B: esporo não germinado. C: esporo gerando o tubo germinativo. D e E: melanização do apressório. A barra preta corresponde a 10µm. (Adaptado de CHOI e HONG, 2009).20
- Figura 2** Sintomas de antracnose causada por *Colletotrichum gloeosporioides*. (A) fruto da amêndoa; (B) murcha das folhas distais associadas com a infecção de frutos da amêndoa; (C) abacate. A seta indica a lesão causada pelo fungo. (Adaptado de FREEMAN *et al.*, 1998).20
- Figura 3** Esquema representativo e sucinto da interação planta-patógeno e respostas de defesa mediadas pela planta. O contato de quitinas de fungos com PRRs desencadeia uma série de respostas estruturais e bioquímicas na célula vegetal. Adicionalmente, fungos podem liberar fatores de avirulência que podem ser reconhecidos pelas proteínas R da célula. Esse reconhecimento também leva a uma série de respostas estruturais e bioquímicas nas plantas.28
- Figura 4** Gráfico de atividade reportada para peptídeos vegetais compilados no banco de dados PhytAMP, Adaptado (HAMMAMI *et al.*, 2009).35
- Figura 5** Representação esquemática em fita da napina Bnlb de *Brassica napus*. A subunidade maior é representada pelas hélices em azul e a subunidade menor é representada pelas hélices em rosa. As pontes dissulfeto são representadas pela cor amarela. (Entrada no PDB:1PNB)38
- Figura 6** Flor e frutos de *Passiflora alata*. (Extraído de JUNQUEIRA *et al.*, 2001)42

- Figura 7** Fluxograma representativo das etapas desenvolvidas nesse trabalho para purificação de proteínas antimicrobianas. A partir da caixa de texto com textura seguem apenas as etapas onde ocorre o processamento das proteínas de sementes.45
- Figura 8** Avaliação da atividade antimicrobiana de proteínas de sementes de *P. alata* Curtis proveniente da fração da precipitação com sulfato de amônio de 70-100% contra a bactéria patogênica ao homem, *Salmonella typhimurium*. O C+ correspondeu a o cultivo da bactéria na presença de cloranfenicol a 60 µg.mL⁻¹. O C- correspondeu ao cultivo da bactéria na ausência de qualquer composto antibacteriano. Os ensaios foram realizados em triplicata. A barra representa desvio padrão.....55
- Figura 9** Avaliação da atividade antimicrobiana de proteínas de sementes de *Passiflora alata* Curtis das frações provenientes da precipitação com sulfato de amônio contra o fungo fitopatogênico *Colletotrichum gloeosporioides*. O C+ correspondeu a o cultivo do fungo na presença de Anfotericina B a 30 µg.mL⁻¹. O C- correspondeu ao cultivo do fungo na ausência de qualquer composto antifúngico. Os ensaios foram realizados em triplicata. A barra representa desvio padrão.....56
- Figura 10** Etapas cromatográficas de purificação. (A) Cromatografia de troca aniônica na coluna Q-Sepharose. Q1 representa a fração não adsorvida e Q2, representa a fração adsorvida e a linha diagonal representa o gradiente de NaCl (0-1M).57
- Figura 11** Avaliação antimicrobiana das frações da coluna cromatográfica Q-Sepharose. (A) e (B) representam respectivamente a atividade antimicrobiana de Q1 (fração não adsorvida) e Q2 (fração adsorvida) contra a bactéria patogênica ao homem, *S. typhimurium*. O C+ correspondeu a o cultivo da bactéria na presença de cloranfenicol a 60 µg.mL⁻¹. O C- correspondeu ao cultivo da bactéria na ausência de qualquer composto antibacteriano. Os ensaios foram realizados em triplicata. A barra representa desvio padrão.....58
- Figura 12** Avaliação antimicrobiana das frações da coluna cromatográfica Q-Sepharose. (A) e (B) representam respectivamente a atividade antimicrobiana de Q1 (fração não adsorvida) e Q2 (fração adsorvida) contra o fungo fitopatogênico *Colletotrichum gloeosporioides*. O C+ correspondeu a o cultivo do fungo na presença de Anfotericina B a 30 µg.mL⁻¹. O C- correspondeu ao cultivo do fungo na ausência de qualquer

composto antifúngico. Os ensaios foram realizados em triplicata. A barra representa desvio-padrão.....5959

Figura 13 Cromatografia líquida de fase reversa em coluna Vydac C-4TP. A) Amostra proveniente da da Q2 (Q-Sepharose). C4-1 e C4-2, correspondem as frações eluídas da cromatografia de fase reversa. B) Recromatografia da amostra C4-1, proveniente da cromatografia de fase reversa em coluna C4. A linha diagonal representa o gradiente de acetonitrila.....62

Figura 14 Avaliação da atividade antifúngica de proteínas de sementes de *Passiflora alata* Curtis da fração Q.2.4, proveniente da cromatografia de fase reversa em coluna C₄. As proteínas estavam a uma concentração de 100µg. mL⁻¹. O C+ correspondeu a o cultivo do fungo na presença de Anfotericina B a 30 µg.mL⁻¹. O C- correspondeu ao cultivo do fungo na ausência de qualquer composto antifúngico. Os ensaios foram realizados em triplicata. A barra representa desvio padrão.....63

Figure 15 Análise da massa molecular por Tricina-SDS-PAGE de diferentes passos de purificação. (1), marcador molecular; (2) fração de 70-100% proveniente da saturação com sulfato de amônio; (3), fração Q2 (obtida da Q-Sepharose); (4) e (5) fração purificada (obtida da coluna C4) em ausência e presença de β-mercapthoetanol respectivamente. Espectro de massa obtida do MALDI-Tof de *Pa*-AFP1. A massa 5.784,3 representa a forma duplamente carregada.....64

Figure 16 Alinhamento da sequência N-terminal de *Pa*-AFP1 com outros membros da família 2S albumina.....65

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Famílias de proteínas vegetais relacionadas à patogênese. Adaptado de: <http://www.bio.uu.nl/~fytopath/PR-families.htm> e (SELS et al., 2008)29
- Tabela 2** Relação de algumas famílias de peptídeos distribuídas em uma variedade de famílias e tecidos vegetais.....33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosina trifosfato
AMPs	“Antimicrobial peptides”, peptídeos antimicrobianos
PTI:	“PAMP-triggered immunity”, imunidade desencadeada por padrões moleculares associados à patógenos
BDA:	Batata-dextrose-agar
EDTA:	“Ethylenediamine tetraacetic acid”, ácido etilenodiamino tetra-acético
ETI:	“Effector-triggered imunity”, imunidade desencadeada pelo efetor
HPLC:	“High performace liquid cromatography” cromatografia líquida de alta performace
LB:	Luria-Bertani (LB)
MALDI:	“Matrix-assisted laser desorption/ionization”, Dessorção de Matriz Assistida por Laser
MS:	“Mass spectrometry”, espectrometria de massa
MOPS	ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico).
PAGE:	“Polyacrylamide gel electrophoresis”, eletroforese em gel de poliacrilamida
PAMP:	“Pathogen associated molecular patterns”, padrões moleculares associados a patógenos
PRPs:	Proteínas relacionadas à patogênese
PRRs	“Pattern recognition receptors”, receptores de reconhecimento padrão
RH	Resposta hipersensível

SAR-	“Systemic-Aquired Resistance”, resistência sistêmica adquirida
SDS	“Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis”, eletroforese em gel poloacrilamida em dodecil sulfato de sódio
TCA	“Trichloroacetic acid”, ácido tricloroacético
TEMED	“Tetramethylethylenediamine”, tetrametiletilenediamina
TFA	“Trifluoroacetic acid”, ácido trifluoracético
TOF	“Time-of-flight”, tempo de vôo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Fungos fitopatogênicos e plantas hospedeiras	17
1.2 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> e produtividade agrícola	18
1.3 Fungicidas: resistência fúngica, implicações ao meio ambiente e saúde humana	21
1.4 Mecanismos de defesa de plantas: panorama acerca da produção de compostos antimicrobianos	23
1.4.1	P
peptídeos antimicrobianos de plantas	30
1.4.2 Albuminas 2S: caracterização molecular	36
1.4.3 Papel antimicrobiano das Albuminas 2s	39
1.5 Maracujá e potencialidades biotecnológicas	40
2 OBJETIVOS	43
2.1 Objetivo Geral	43
2.2 Objetivos Específicos	43
3 MATERIAIS E MÉTODOS	44
3.1 Material Biológico	44
3.1.1 Frutos de <i>Passiflora alata</i> Curtis	44
3.1.2 Microrganismos	46
3.2 Processos de separação e higienização dos frutos e sementes	46
3.3 Extração e isolamento de proteínas antimicrobianas das sementes	47

3.4 Determinação da Concentração de Proteínas	48
3.5 Avaliação da atividade antibacteriana.....	48
3.6 Avaliação da atividade contra fungos filamentosos	49
3.7 Atividade contra fungos leveduriformes.....	50
3.8 Análise da massa molecular por Tricina-SDS-PAGE	51
3.9 Determinação da massa molecular e sequenciamento da proteína purificada por espectrometria de massa	52
3.10 Sequenciamento dos aminoácidos e análise <i>in silico</i>	52
4 RESULTADOS.....	53
4.1 Purificação e caracterização molecular de uma proteína antifúngica isolada de sementes de <i>Passiflora alata</i> Curtis.....	53
4.2 Caracterização bioquímica de <i>Pa</i> -AFP1.....	60
5 DISCUSSÃO	66
6 CONCLUSÃO	68
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
8 ANEXO A- Identification of a <i>Passiflora alata</i> Curtis dimeric peptide showing identity with 2S albumins	88

1 INTRODUÇÃO

1.1 Fungos fitopatogênicos e plantas hospedeiras

Fungos são organismos diversos, sendo considerado um grupo versátil de seres heterotróficos, e que têm ocupado a maioria dos *habitats* naturais. Estima-se que existam cerca de 1,5 milhões de espécies de fungos distribuídas no mundo (HAWKSWORTH, 1991). Esses organismos podem interagir de várias formas com uma diversidade de outros seres vivos, desde bactérias ao homem. Normalmente as interações, entre o fungo e seu hospedeiro, envolvem a necessidade de sobrevivência do mesmo, seja para obter nutrientes, abrigo ou transporte. A relação entre plantas e fungos, pode ocorrer pelo estabelecimento de simbiose, pelo aproveitamento da matéria morta vegetal e por parasitismo (GRAYER e KOKUBUN, 2001; PARRENT *et al.*, 2009).

O rompimento do equilíbrio de benefícios entre plantas e fungos, em muitos casos pode representar uma grande preocupação para toda humanidade, uma vez que representantes patogênicos podem causar devastação de importantes colheitas e incapacitar o uso de alimentos por humanos e animais através da síntese de micotoxinas (XU *et al.*, 2007).

Os fungos patogênicos foram divididos em três grupos, quanto ao modo de nutrição: biotróficos, necrotróficos e hemibiotróficos (GLAZEBROOK, 2005). Os fungos biotróficos se alimentam do tecido vivo do hospedeiro, enquanto os necrotróficos matam as células para obtenção de seu alimento (OLIVER e IPCHO, 2004). Os fungos hemibiotróficos se comportam como fungos biotróficos no início da infecção e posteriormente como fungos necrotróficos (MÜNCH *et al.*, 2008).

Os fungos biotróficos penetram a planta para ter acesso aos nutrientes, com o mínimo de dano na célula hospedeira (MENDGEN e HAHN, 2002). Esses fungos desenvolveram hifas especializadas, estruturas conhecidas como haustórios, esses órgãos, apresentam um papel importante na habilidade desses parasitas competirem com o desenvolvimento da planta por fotoassimilados bem como por outros nutrientes (SZABO e BUSHNELL, 2001). Eles podem completar todo seu

ciclo de vida e manter as células da planta viva, mas em alguns casos, plantas altamente infectadas por vezes morrem, mas somente depois que a esporulação é completada (KOCH e SLUSARENKO, 1990). Adicionalmente eles causam poucos danos na planta hospedeira e são poucos especializados na secreção de enzimas líticas (RICHARD P e SIMON V. S, 2004).

Em contraste às sofisticações dos fungos biotróficos, os fungos necrotróficos são considerados mais simples no processo de obtenção de seu alimento. É comumente conhecido que esses fungos infectam as plantas através da secreção de quantidades copiosas de enzimas que agem conjuntamente na degradação da parede celular da planta hospedeira (RICHARD P e SIMON V. S, 2004; HAMMOND-KOSACK e RUDD, 2008).

A estratégia hemibiotrófica de aquisição de nutrientes é muito difundida e estudada em espécies de *Colletotrichum*. Esses fungos infectam várias plantas que são economicamente importantes. Inicialmente hifas primárias especializadas se invaginam na membrana plasmática da célula vegetal. Nesse momento o fungo não mata a célula, assim, o mesmo se estabelece de forma biotrófica (MÜNCH *et al.*, 2008). Posteriormente, entre 48 e 72 horas, ocorre a propagação de hifas secundárias que secretam uma variedade de enzimas que degradam diversos polímeros da parede celular vegetal. Dessa forma o fungo consegue ter acesso a uma grande variedade de açúcares da célula vegetal (MÜNCH *et al.*, 2008).

1.2 *Colletotrichum gloeosporioides* e produtividade agrícola

Colletotrichum tem sido considerado um dos gêneros de fungos mais importantes para o mundo todo. Ele pode causar significantes danos à agricultura principalmente em regiões tropicais, subtropicais e temperadas (FREEMAN *et al.*, 1998), afetando diferentes espécies de plantas.

Colletotrichum gloeosporioides (Figura 1) é considerada uma das mais comuns e amplamente distribuídas espécies de fungos patogênicos (Figura 1) (HYDE, K.D *et al.*, 2009). Fungos dessa espécie podem levar a severas perdas no rendimento de muitas culturas.

C. gloeosporioides (Penz.) pertence à ordem Melaconiales e família Melanconiaceae. Esse fungo é classificado pelo nome “*Colletotrichum gloeosporioides*”, quando eles se apresentam em sua forma anamorfa (assexuada) e como *Glomerella cingulata* quando se apresentam em sua forma sexuada (MARTINS, *et al.*, 2005).

Espécies de *Colletotrichum* normalmente são responsáveis por uma típica doença em plantas conhecidas por antracnose (PELEGRINI *et al.*, 2009). A antracnose causada por *C. gloeosporioides* (Figura 2) é considerada a causa de vultosas perdas para os produtores agrícolas de todo o mundo. No Brasil, *Colletotrichum gloeosporioides* foi o responsável por prejuízos da ordem de 20 a 30 milhões dólares/ano na produção de *citrus* (laranjeiras, tangerineiras e limoeiros) entre os anos de 2005 e 2008 (CONAB, 2009). Normalmente essas perdas na produção ocorrem devido ao parasitismo desses fungos nas flores das plantas cítricas. Isso promove a queda das pétalas e dos frutos no estágio inicial de formação (CONAB, 2009).

C. gloeosporioides tem sido considerado o principal agente causal da doença pré- e pós-colheita dos frutos de todas as áreas produtoras de mangas do mundo, podendo atacar, folhas, frutos jovens, brotos e folhas (CHOWDHURY e RAHIM, 2009). Ele pode afetar outros frutos de plantas economicamente importantes, tais como: goiaba e maracujá (TEIXEIRA *et al.*, 2006) morangos, abacates (FREEMAN *et al.*, 1996), amêndoas (FREEMAN *et al.*, 1995), mamões (TEIXEIRA *et al.*, 2006; TAPIA-TUSSELL *et al.*, 2008), azeitonas (MARTIN e GARCIA-FIGUERES, 1999), pimentas (THAN *et al.*, 2008) e também pode comprometer, leguminosas forrageiras (NGUYEN *et al.*, 2009), e plantas ornamentais (ASIEGBU *et al.*, 2003; FARR *et al.*, 2006).

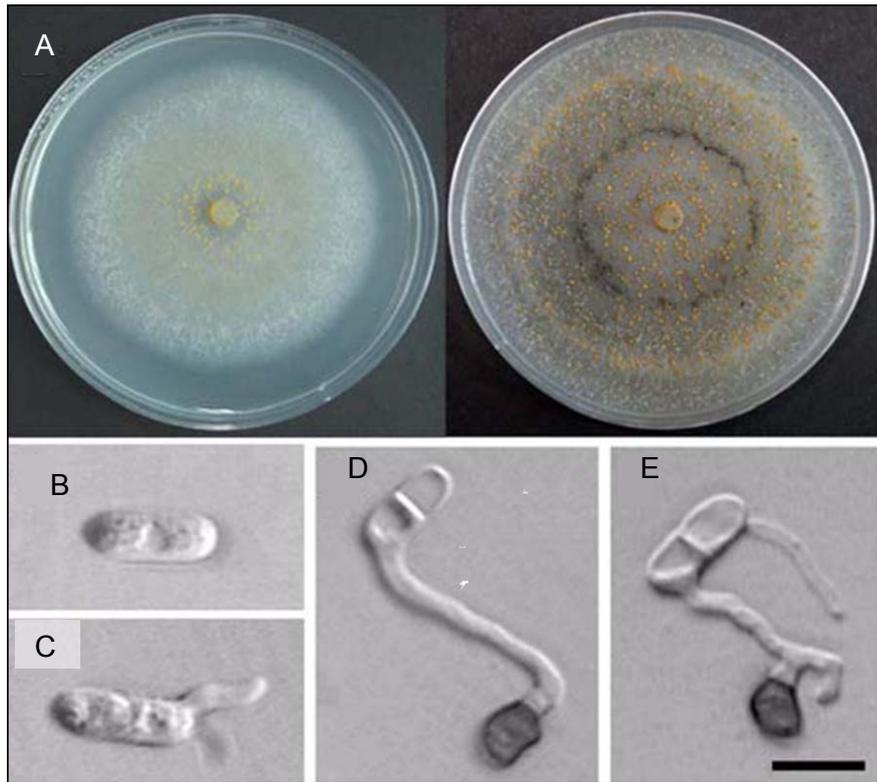


Figura 1 *Colletotrichum gloeosporioides* isolados de *Daphniphyllum macropodum* Miquel, uma planta ornamental. A: Característica de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* crescidos por 5 dias (esquerda) e crescidos por 9 dias (direita) em BDA. B: esporo não germinado. C: esporo gerando o tubo germinativo. D e E: melanização do apressório. A barra preta corresponde a 10 μ m. (Adaptado de CHOI e HONG, 2009).

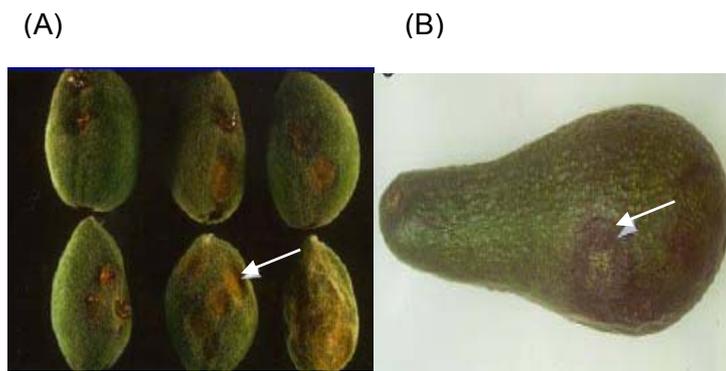


Figura 2 Sintomas de antracnose causada por *Colletotrichum gloeosporioides* em manga (A) e em abacate (B). A seta indica a lesão causada pelo fungo. (Adaptado de FREEMAN *et al.*, 1998).

1.3 Fungicidas: resistência fúngica, implicações ao meio ambiente e saúde humana

Patógenos de plantas são responsáveis por consideráveis perdas nas colheitas que representam cerca de 10-30 % da produção agrícola em todo o mundo a cada ano (STRANGE e SCOTT, 2005). Esse fator é agravado, quando os mesmos atacam variedades de plantas suscetíveis. Em relação ao controle de fungos, embora práticas como rotação de cultura, utilização de cultivares resistentes e métodos sanitários minimize esse problema, os fungicidas ainda tem sido eficientemente utilizados para aumentar o rendimento agrícola (KNIGHT *et al.*, 1997).

Historicamente o controle de doenças utilizando defensivos químicos foi empregado com sucesso em 1950, quando a “mistura” *Bordeaux*, descoberta em 1885, foi introduzida para controlar a doença da videira (*Plasmopara viticola*) em plantações de vinho na França, a qual incluía em sua composição, compostos inorgânicos (KNIGHT *et al.*, 1997). Atualmente existe uma variedade de compostos fungicidas. Um trabalho recente, publicado em 2009 pela FRAC (*Fungicide Resistance Action Committe*), apresentou a existência de 188 fungicidas formulados (www.frac.info). Esses estão agrupados de acordo com o alvo local, os quais incluem os seguintes processos celulares do patógeno: síntese do ácido nucléico, mitose e divisão celular, respiração, síntese de aminoácido e proteína, transdução de sinais, síntese de lipídeos e membranas, síntese de glucanos, síntese de melanina. Esse dado não levou em consideração os fungicidas que não foram classificados, como os óleos minerais, bicarbonato de potássio e material de origem biológica.

Apesar da considerável demanda de fungicidas e também de diversos mecanismos de ação dos mesmos, muitos desses compostos têm perdido a efetividade em controlar doenças. Muitos fungicidas, como aqueles baseados em cobre (exemplo: oxidoclorídrico cúprico e óxido cuproso, fenilamidas (exemplo: captan e folpet), e ditilcarbamatos (mamcozeb, maneb, zineb e thiran) raramente têm apresentado resistência. Entretanto, algumas classes, tais como benzimidazoles (exemplo: benomyl, carbensazim, thiabendazole), fenilamidas (exemplo: metalaxyl, oxadixyl), dicarboximidas (exemplo: iprodione, procymidone,

vinclozolin) e análogos de estrobilurina (exemplo: azoxystrobim, kresoxim-methyl e pyraclostrobim) não têm sido efetivos no controle de doenças, devido ao surgimento de resistência em muitos fungos (BRENT e HOLLOMON, 2007).

A evolução do quadro de resistência ocorreu, sobretudo devido à eficiência dos fungicidas. Isso permitiu aos agricultores, aumentar o rendimento agrícola de variedades de plantas suscetíveis a doenças. E para a contínua proteção das mesmas, repetidas aplicações de um mesmo fungicida foram efetuadas. Como consequência, houve uma forte pressão de seleção em populações resistentes de fungos fitopatogênicos (HOLLOMON e BRENT, 2009).

O risco do desenvolvimento de resistência em um patógeno alvo em particular pode aumentar, sobretudo, pelo uso de fungicidas que agem em um único alvo bioquímico da célula fúngica, como foi o caso de das fenilamidas, uma classe de fungicida sistêmica (GISI e COHEN, 1996). Os fatores que estão associados à resistência de fungos são: mutações, migrações e recombinações gênicas, fenômenos estes, que podem ocorrer de forma randômica no ambiente. Tais fatores podem contribuir para introdução de genótipos de resistência em uma população de fungos (BRENT e HOLLOMON, 2007).

Além dos problemas relacionados à dificuldade do controle de doenças devido à aquisição resistência de fungos fitopatogênicos a uma série de fungicidas, existem também severas implicações ambientais que são geradas pelo intensivo uso dos mesmos (WAARD *et al.*, 1993). A utilização de muitos fungicidas na agricultura, como por exemplo, os azoles podem afetar não somente espécies de fungos fitopatogênicos, mas também pode atacar espécies suscetíveis de fungos saprofitos, muitos dos quais podem apresentar um papel benéfico na regulação de espécies patogênicas (LIGGITT *et al.*, 1997), como *Aspergillus fumigatus*.

A. fumigatus é um fungo responsável pela aspergilose, uma doença pulmonar. Populações multi-resistentes desse fungo que têm emergido na Holanda desde 1999 foram isolados em 6,0 - 12,8% de pacientes que abrigavam o isolado (SNELDERS *et al.*, 2008). O mecanismo de resistência apresentou-se consistente com o desenvolvimento de resistência através exposição de compostos azoles no ambiente. Além disso, *A. fumigatus* de culturas provenientes de solos e adubos apresentaram resistência cruzada a fungicidas azoles e também mostraram ser geneticamente relacionados a isolados clínicos (SNELDERS *et al.*, 2009). Possivelmente a resistência de *A. fumigatus* foi ocasionada pela utilização intensiva

de fungicidas na agricultura (VERWEIJ *et al.*, 2009) . Além desses problemas, os fungicidas, devido à toxicidade de alguns compostos, também podem provocar desequilíbrio em populações de joaninhas (MICHAUD, 2001), de peixes de água doce (EKINCI e BEYDEMIR, 2010) e de outros animais.

Os efeitos tóxicos de fungicidas também podem desencadear riscos à saúde humana. Muitos trabalhos têm revelado que a exposição humana a fungicidas pode contribuir para: o risco de aborto espontâneo (ARBUCKLE *et al.*, 2001), depressão em mulheres, doença de Parkinson (BESELER *et al.*, 2006), risco de desenvolvimento de linfoma de Hodgkin, mieloma múltiplo, leucemia de células pilosas (ORSI *et al.*, 2009), risco de câncer cerebral infantil, quando os pais são expostos antes do nascimento da criança (KOYANO *et al.*, 2006), aumento da prevalência de bronquite crônica (HOPPIN *et al.*, 2007), neurotoxicidade (BJORLING-POULSEN *et al.*, 2008) entre outros.

Embora fungicidas contribuam para o aumento da produtividade agrícola, eles podem trazer severas conseqüências tanto a animais como para o homem. As intoxicações causadas por agrotóxicos em geral são um problema em todo o mundo e principalmente em países em desenvolvimento, onde, em pequenas áreas agrícolas, pesticidas são pulverizados manualmente (LEYK *et al.*, 2009).

1.4 Mecanismos de defesa de plantas: panorama acerca da produção de compostos antimicrobianos

Plantas interagem com diferentes tipos de microrganismos tanto patogênicos quanto não patogênicos. O relacionamento com microrganismos simbióticos pode trazer benefícios, tanto para a planta quanto para o microrganismo, entretanto, interações com microrganismos patogênicos em alguns casos podem resultar em doenças para a planta hospedeira (VERONESE *et al.*, 2003). Além de microrganismos, as plantas também estão sujeitas ao estresse causado por insetos e nematóides (DANGL e JONES, 2001). Embora as plantas estejam expostas a uma série de adversidades, as mesmas podem reconhecer e se defender dos potenciais inimigos. Isso tem sido fundamental para o sucesso evolutivo e o desenvolvimento das mesmas (VERONESE *et al.*, 2003).

As interações entre patógenos e plantas refletem para estes, as estratégias de aquisição de nutrientes, no caso de bactérias, fungos, nematóides, insetos; e no caso vírus, o aproveitamento da maquinaria de replicação da planta hospedeira (DANGL e JONES, 2001). Entretanto, para as plantas, essas interações representam constantes ameaças. Diante disso, elas precisam de um sistema efetivo que atue em sua defesa.

As plantas podem majoritariamente se defender de duas formas: através dos mecanismos de defesa estruturais ou bioquímicos. No primeiro caso, as plantas utilizam as barreiras físicas, que podem impedir a penetração ou colonização dos patógenos através de seus tecidos. No segundo caso, as plantas podem produzir um arsenal de substâncias que podem inibir o crescimento dos patógenos ou ainda criar condições que inviabilizem a sobrevivência desses invasores nos tecidos vegetais (BESSIRE *et al.*, 2007; HYDE *et al.*, 2009).

A defesa estrutural pode ser pré-formada ou induzida. A parede celular rígida é um exemplo de um obstáculo natural pré-formado, que torna mais difícil o acesso do patógeno aos produtos fotoassimilados das plantas. No entanto, quando microrganismos patogênicos conseguem acessar a membrana plasmática, os mesmos aumentam o seu potencial de ataque. Embora mais próximos de seu objetivo, os patógenos, encontram na membrana extracelular da planta, receptores de reconhecimento padrão (PRR's, *pattern recognition receptors*) (KROJ *et al.*, 2003) que podem reconhecer padrões moleculares associados à patógenos mais conhecido com *PAMP* (*pathogen associated molecular patterns*) (CHISHOLM *et al.*, 2006). As PRR's estimulam uma cascata de sinais envolvendo o fluxo de Ca^{2+} e proteínas quinases ativadas por mitógeno, esse fenômeno leva a uma série de reações de defesa estruturais e bioquímicas que compromete o sucesso do patógeno (ANTONIOW *et al.*, 1980) .

PAMP's são moléculas dos patógenos, que exercem um papel importante no modo de vida dos mesmos, como por exemplo, lipopolisacarídeos e flagelinas de bactérias e quitina de fungo (KROJ *et al.*, 2003). As respostas da planta a essas moléculas são conhecidas como PTI (*PAMP-triggered immunity*) (BOLLER e HE, 2009). Esse primeiro reconhecimento vegetal por moléculas específicas do patógeno leva inicialmente a uma resposta de defesa estrutural induzida. Tal defesa se manifesta através de modificações físicas na planta, como por exemplo: deposição de papilas, espessamento da parede celular da planta após o contato com o

patógeno (TSUNEDA *et al.*, 2009) e outras. Se o patógeno não consegue superar esses mecanismos de defesa, a *PTI* é desligada e a proliferação do patógeno é prevenida (GOHRE e ROBATZEK, 2008).

Existem situações que o patógeno ultrapassa essa barreira inicial e liberam uma variedade de moléculas efetoras (GREENSHIELDS e JONES, 2008). Tais moléculas podem suprimir a resposta de defesa, tornando possível a colonização desses organismos. Entretanto essas moléculas podem servir como sinais para reforçar a defesa da planta. Nesse contexto, as proteínas R (resistência), atuam respectivamente: suprimindo a ação das moléculas efetoras cognatas, mais conhecidas como fatores de avirulência (*avr*), substituindo a supressão da *PTI* e reforçando a imunidade, resultando dessa maneira, em uma imunidade desencadeada pelo efector (*ETI*, *effector-triggered immunity*) (GOHRE e ROBATZEK, 2008). As interações que ocorrem de forma específica entre fatores de avirulência e proteínas R, também ativam mecanismos de defesas estruturais, como: resposta hipersensível (RH), que resulta na morte de poucas células no local da infecção e conseqüentemente na limitação do espalhamento da doença (Figura 3) (LINTHORST *et al.*, 1991).

Semelhante à defesa estrutural, mecanismos de defesa bioquímica também podem ser constitutivos ou induzidos. Nesses dois cenários, pode haver a participação tanto de metabólitos secundários, como a participação de proteínas antimicrobianas constitutivas e induzidas (PRP's, proteínas relacionadas à patogênese). Em relação aos compostos secundários, estima-se que exista cerca de 200.000 representantes em plantas (HARTMANN e MEISEL, 2007). Eles são considerados moléculas não essenciais para o processo metabólico básico da planta (SIVASITHAMPARAM *et al.*, 2002). Um diverso grupo dessas moléculas que atuam na segurança própria da planta pode representar co-evolução entre plantas e seus inimigos naturais, como herbívoros e patógenos (SIRIKANTARAMAS *et al.*, 2009). Existem dois grupos que incluem uma diversidade de metabólitos secundários que possuem atividade antimicrobiana, atuando assim possivelmente na defesa da planta, são eles: fitoanticipinas e fitoalexinas (IRITI e FAORO, 2009). As fitoanticipinas são consideradas como moléculas que podem estar presentes na planta antes do ataque microbiano ou serem produzidas a partir de compostos pré-formados após uma infecção, enquanto as fitoalexinas são sintetizadas e acumuladas após uma infecção microbiana (MIAO *et al.*, 1991). Tanto a produção

de fitoalexinas quanto a produção de PRP's estão também associadas às interações entre produto *avr* e proteínas R e conseqüente resposta de hipersensibilidade (IRWIN *et al.*, 1990).

Quanto às proteínas antimicrobianas constitutivas, muito tem sido investigado a respeito das proteínas de armazenamento, como aquelas encontradas em caules (tubérculos) (SEGURA *et al.*, 1999) e em sementes (LIN *et al.*, 2006). Tubérculos de várias plantas têm apresentado proteínas com grande potencial antimicrobiano. Ocatinas (proteínas encontradas em tubérculos ocos) isoladas de *Oxalis tuberosa* Mol revelaram que são capazes de inibir o crescimento de várias bactérias fitopatogênicas como: *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium radiobacter*, *Serratia marcescens*, and *Pseudomonas aureofaciens* e também de fungos fitopatogênicos como: *Phytophthora cinnamomi*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* e *Nectria hematococcus* (FLORES *et al.*, 2002). Essas proteínas, assim como as *snakins* isoladas de tubérculos de batata parecem exercer um papel de defesa na barreira constitutiva da planta (SEGURA *et al.*, 1999). As albuminas 2S podem ser citadas como exemplo de proteínas antimicrobianas que são expressas constitutivamente em sementes (LIN *et al.*, 2006).

As proteínas que são produzidas sobre o processo de indução, como já discutido, têm sido conhecidas como PRP's. As PRP's estão classificadas dentro de 17 famílias atualmente reconhecidas (Tabela 1). Elas têm sido definidas como aquelas proteínas que não são detectáveis em tecidos sadios, ou quando presentes elas são encontradas em baixas concentrações. Apenas algumas dessas proteínas têm demonstrado atividade antimicrobiana. As PRP's normalmente se acumulam devido a condições patológicas que se caracterizam como: ataque de fungos, bactérias, vírus, insetos, herbivoria ou situações relacionadas. As situações relacionadas incluem os compostos químicos que mimetizam o efeito do ataque patogênico, como etileno, jasmonato e ácido salicílico (ANTONIOW *et al.*, 1980).

O aumento das PRP's em plantas caracteriza um fenômeno conhecido como: resistência sistêmica adquirida (SAR- *Systemic-Acquired Resistance*). A SAR pode ser considerada, como uma extensão da reação de resistência localizada, (DURRANT e DONG, 2004). A SAR não está restrita apenas ao local da infecção, ela pode se ampliar, acumulando assim, compostos relacionados à defesa, em tecidos sadios, além disso, ela representa proteção por um determinado período do ciclo de vida da planta (RYALS *et al.*, 1996). Pesquisas sobre os mecanismos de

defesa envolvidos na SAR têm providenciado informações úteis para um efetivo método de proteção de cultivares economicamente importantes.

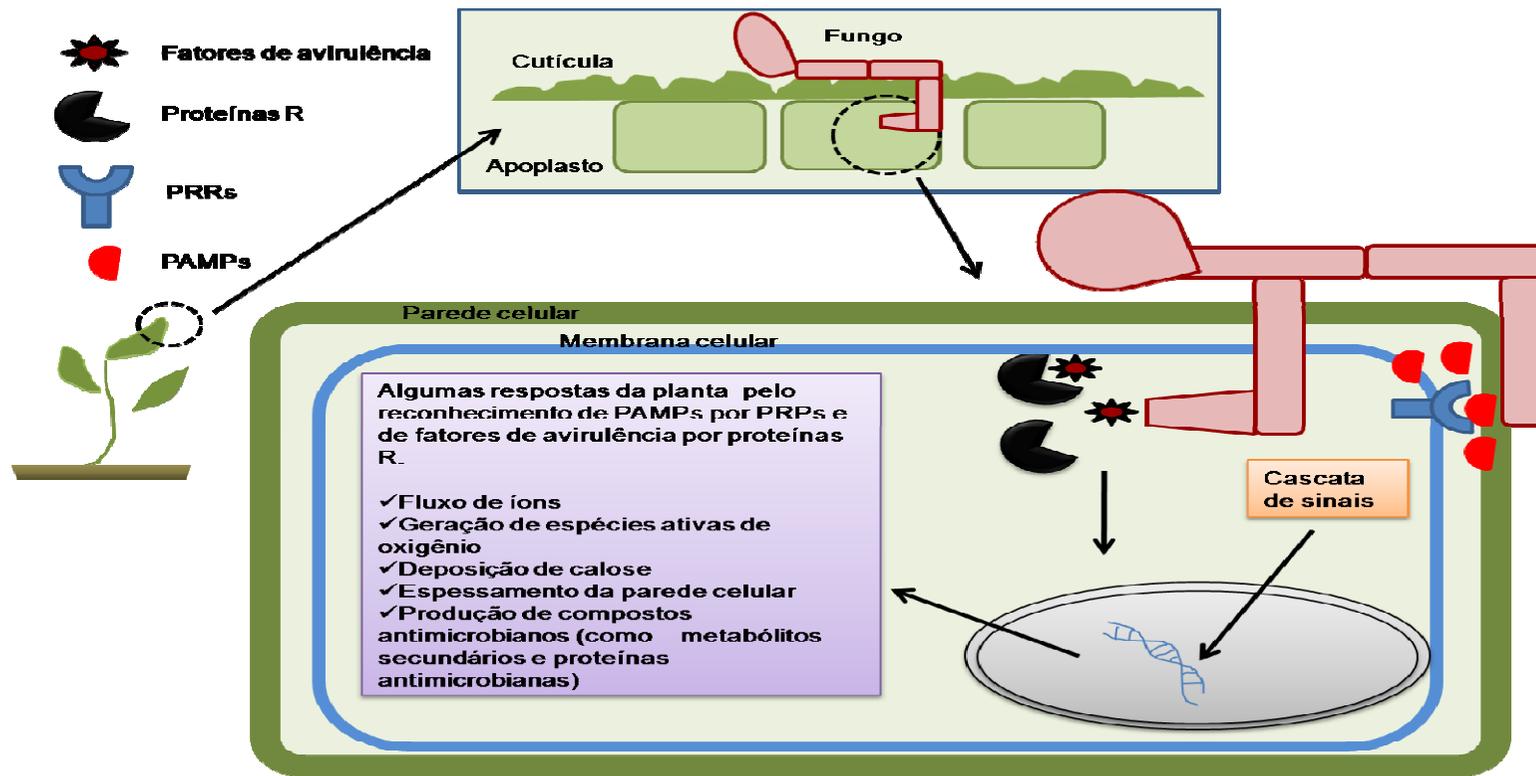


Figura 3 Esquema representativo e sucinto da interação planta-patógeno e respostas de defesa mediadas pela planta. O contato de quitinas de fungos com PRRs desencadeia uma série de respostas estruturais e bioquímicas na célula vegetal. Adicionalmente, fungos podem liberar fatores de avirulência que podem ser reconhecidos pelas proteínas R da célula. Esse reconhecimento também leva a uma série de respostas estruturais e bioquímicas nas plantas.

Tabela 1 Famílias de proteínas vegetais relacionadas à patogênese. Adaptado de: <http://www.bio.uu.nl/~fytopath/PR-families.htm> e (SELS et al., 2008)

Família	Tamanho (KDa)	Propriedade	Fonte	Referência
PR1	15	Antifúngica	Tabaco	(ANTONIW <i>et al.</i> , 1980)
PR2	30	β -1-3-glucanase	Tabaco	(ANTONIW <i>et al.</i> , 1980)
PR3	25-30	Quitinase (I, II, IV, V, VI, VI)	Tabaco	(VAN LOON, 1982 appud VAN LOON e VAN STRIEN)
PR4	15-20	Quitinase tipo I, II	Tabaco	(VAN LOON, 1982 appud VAN LOON e VAN STRIEN)
PR5	25	Taumatinas	Tabaco S	(VAN LOON, 1982 appud VAN LOON e VAN STRIEN)
PR6	8	Inibidor de proteinase	Tomate	(MARCUS <i>et al.</i> , 1999)
PR7	75	Endoproteinase	Tomate	(VERA e CONEJERO, 1988)
PR8	28	Quitinase classe III	Pepino	(MÉTRAUX <i>et al.</i> , 1988)
PR9	35	Peroxidase	Tabaco	(LAGRIMINI <i>et al.</i> , 1987)
PR10	17	Semelhante a ribonuclease	Salsa	(SOMSSICH <i>et al.</i> , 1986)
PR11	40	Quitinase classe I	Tabaco	(MELCHERS <i>et al.</i> , 1994)
PR12	5	Defensina	Rabanete	(TERRAS <i>et al.</i> , 1995)
PR13	5	Tionina	Arabidopsis	(EPPLÉ <i>et al.</i> , 1997)
PR14	9	Proteína transferidora de lipídio	Feijão	(BERROCAL-LOBO, MARTA <i>et al.</i> , 2002)
PR15	20	Oxalato oxidase	Feijão	(ZIGUO <i>et al.</i> , 1995)
PR16	20	Similar oxalato oxidase	Feijão	(ZUO e SUN, 1996)
PR17	27	Desconhecida	Tabaco	(OKUSHIMA <i>et al.</i> , 2000)

1.4.1 Peptídeos antimicrobianos de plantas

Pequenas proteínas antimicrobianas, comumente conhecidas como peptídeos antimicrobianos (AMP's) têm sido isolados de uma ampla variedade de organismos, como bactérias, fungos, plantas, invertebrados e vertebrados. Elas são consideradas como parte da imunidade inata de organismos multicelulares e normalmente estão associados à defesa contra patógenos (LEHRER *et al.*, 1993; TERRAS *et al.*, 1995). Essas moléculas são tipicamente conhecidas: (a) por seu pequeno tamanho, geralmente < 10 kDa; (b) por sua carga, freqüentemente entre +2 e +7 a pH 7,0; e estereogeometria anfipática, que confere faces hidrofílicas ou hidrofóbicas relativamente polarizadas (YOUNT e YEAMAN, 2004). De acordo com a seqüência de aminoácidos e estrutura os peptídeos antimicrobianos podem ser divididos: peptídeos aniônicos, peptídeos α -hélice catiônicos lineares, peptídeos catiônicos enriquecidos com aminoácidos específicos, peptídeos aniônicos e catiônicos que contém cisteína e formam pontes dissulfeto e fragmentos peptídicos aniônicos e catiônicos de grandes proteínas (BROGDEN, 2005).

Nas últimas décadas algumas famílias dessas pequenas proteínas foram isoladas de uma diversidade de famílias de plantas, (Tabela 2). Atualmente existem mais de 200 peptídeos descritos em plantas (Hammami *et al.*, 2009) e distintas famílias, tais como: Ciclotídes(CRAIK *et al.*, 2010), defensinas (TERRAS *et al.*, 1995), peptídeos similar a Heveína (CAMMUE *et al.*, 1992), impatiens (BROEKAERT *et al.* 1992), knottins (CAMMUE *et al.*, 1992), peptídeos similar a proteínas transferidoras de lipídeos (CAMMUE *et al.*, 1995), MBP-1 (DUVICK *et al.*, 1992) MiAMP1(MARCUS *et al.*, 1999), shepherins (PARK, C. J. *et al.*, 2000), snakinas (SEGURA *et al.*, 1999), tioninas (FUJIMURA *et al.*, 2005) e similar a vicilina (MARCUS *et al.*, 1999). Estas moléculas são usualmente classificadas de acordo com sua estrutura primária, especialmente em relação ao número e à distância dos resíduos de cisteína (LAY e ANDERSON, 2005). Elas podem ocorrer em diferentes tecidos, tais como: raízes (ASIEGBU *et al.*, 2003), folhas (TEIXEIRA *et al.*, 2006) flores (TAVARES, L. S. *et al.*, 2008), tubérculos (BERROCAL-LOBO, MARTA *et al.*, 2002) e sementes (PELEGRINI *et al.*, 2009).

Muitas dessas pequenas moléculas apresentam atividade antimicrobiana contra uma série de bactérias e fungos importantes para a agricultura e também

para medicina. Devido à detecção de muitos peptídeos após a infecção da planta contra patógenos, algumas dessas moléculas, têm sido agrupadas às famílias das PRP's (SELS *et al.*, 2008). Mas além destes, que fazem parte barreira de defesa induzida, existem aqueles que têm sido considerados como parte defesa preexistente, atuando como barreira regulada no desenvolvimento da planta (BERROCAL-LOBO, MARTA *et al.*, 2002).

O possível papel de defesa dos peptídeos é demonstrado através de algumas observações, que não são conclusivas por si mesmas. Garcia-Olmedo *et al.*, (2002) apontam os seguintes critérios para o envolvimento desses peptídeos na defesa: (a) atividade antimicrobiana; (b) expressão gênica, distribuição do peptídeo, concentrações *in planta* (antes e depois da infecção), que são congruentes com o papel da defesa; (c) correlação da variação de níveis de expressão (natural ou geneticamente transformado com a severidade de sintomas; e (d) correlação da variação da resistência patogênica (natural ou geneticamente transformado com virulência. Esses critérios têm contribuído para entendimento e investigações acerca dessas moléculas.

A maioria dos peptídeos antifúngicos tem sido relatada em sementes, talvez porque este tecido é rico em proteínas, o que o torna bastante explorado quanto à presença de peptídeos antimicrobianos. A produção dessas moléculas em sementes pode estar associada à proteção do embrião contra potenciais inimigos presentes no solo (TERRAS *et al.*, 1992). Embora os peptídeos antimicrobianos sejam encontrados principalmente nas sementes, eles também podem ser expressos em tecidos vegetativos (TERRAS *et al.*, 1995). Evidências mostram que alguns tipos de peptídeos antimicrobianos podem ser encontradas em vários tecidos, como Cp tionina-2, isoladas de sementes, folhas e cotilédones (FRANCO *et al.*, 2006). Numerosos peptídeos com ação antifúngica têm sido isolados de plantas. Esta propriedade têm sido mais relatada do que outras atividades (Hammami *et al.*, 2009). Isso reflete a importância dos fungos enquanto patógenos.

Defensina é uma notória família de peptídeos que apresenta atividade antifúngica e antibacteriana. Moléculas dessa família podem atuar contra fungos patogênicos a plantas e também humanos. As defensinas da planta Hs-AFP1 *Heuchera sanguinea*, Rs-AFP2 de nabo forrageiro e DmAMP1 de *Dahlia merckii*, todos obtidos de sementes, são moléculas candidatas para o uso terapêutico no combate fungos oportunistas responsáveis por infecções invasivas, como *Candida*

albicans (THEVISSSEN et al., 2007). Recentemente, foi demonstrado que Rs-AFP2 não é tóxico para as células de mamíferos (TAVARES, TP et al., 2008), reforçando a idéia de que os peptídeos antimicrobianos de plantas podem contribuir para o desenvolvimento de drogas para o tratamento de infecções humanas causadas por fungos.

Além de defensinas, ciclótides também apresentam uma perspectiva de aplicação ampla. Alguns representantes deste grupo de proteínas, como circulina A e B isoladas das partes aéreas de *Parvifolia chassalia* (Rubiaceae) possuem uma potente atividade contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (GUSTAFSON et al., 1994). Cicloviolacina O2, uma outra ciclótide isolada das partes aéreas de *Viola odorata* (Violaceae) apresentou atividade relevante contra as bactérias Gram-negativas (PRANTING et al., 2010). A atividade antimicrobiana ao lado de outras atividades, como inseticida (PLAN et al. 2008), anti-helmíntica (COLGRAVE et al. 2009), anti-tumoral (Lindholm et al., 2002), a atividade uterotônica (Gran, 1973), inibidor de proteinase (HERNANDEZ et al., 2000) e além da fácil síntese *in vitro*, faz das Ciclotídes candidatas apropriadas para aplicações na indústria farmacêutica e agrícola (Craik et al., 2010).

Embora vários estudos de prospecção de peptídeos tenham sido realizados em uma diversidade de espermatófitas, ainda existe muito a se explorar no grupo das plantas superiores. Existem cerca de 257.000 espécies de Angiospermas atualmente relatadas e aproximadamente 820 espécies de Gimnospermas (JUDD et al., 2008) Dessas, já foram encontrados peptídeos antimicrobianos em uma diversidade de espécies e tecidos, e com amplo espectro de atividade antimicrobiana (Tabela 2). A atividade antifúngico tem sido a mais comumente relatada em plantas (Figura 4).

Tabela 2 Relação de algumas famílias de peptídeos distribuídas em uma variedade de famílias e tecidos vegetais.

Tecidos	Família de peptídeos	Família de plantas	Atividade	Referência
Folha	Haveina		Antifúngica	(KOO <i>et al.</i> , 1998)
	Ciclotide	Violaceae ^a , Rubiaceae ^a	Antiviral, antibacteriana, antifúngica e inseticida	(CRAIK, ; TAM <i>et al.</i> , 1999)
	Proteína transportadora de lipídeos	Poaceae ^a	Antifúngica	(SEGURA <i>et al.</i> , 1999)
	Defensina	Fabaceae ^a	Antibacteriana e antifúngica	(TEIXEIRA <i>et al.</i> , 2006)
	Defensina	Solanaceae ^a , Amaranthaceae ^a	Antifúngica, antibacteriana	(CAMMUE <i>et al.</i> , 1995)
Raízes	Seferina	Brassicaceae ^a	Antibacteriana antitífingica	(PARK, C. J. <i>et al.</i> , 2000)
Caule	Snakina	Solanaceae ^a	Antibacteriana e antifúngica	(SEGURA <i>et al.</i> , 1999)

^a Angiospermas, ^b Gimospermas

Continuação

Tecidos	Família de peptídeos	Família de plantas	Atividade	Referência
Semente	MBP-1	Poaceae ^a	Antibacterial, Antifungal	(DUVICK <i>et al.</i> , 1992)
	Proteína transportadora de lipídeo	Fabaceae ^a	Antibacteriana e antifúngica	(HUANG <i>et al.</i> , 2004; TATYANA <i>et al.</i> , 2009)
	Impatiens	Balsaminaceae ^a	Antibacteriana e antifúngica	(TAILOR <i>et al.</i> , 1997)
	Heveína	Convolvulaceae ^a , Polygonaceae ^a	Antilevedura, antibacteriana e antifúngica	(CHOON KOO <i>et al.</i> , 2002; TATYANA <i>et al.</i> , 2009)
	Beta-barrelina,	Proteaceae ^a	Antilevedura, Antibacterial, Antifungal	(HARRISON <i>et al.</i> , 1999; MARCUS <i>et al.</i> , 1999)
	Defensinas	Cycadaceae ^b	Antibacteriana e antifúngica	(FRANCO <i>et al.</i> , 2005)
	Kinotina	Phytolaccaceae ^a	Antibacteriana e antifúngica	(KANT <i>et al.</i> , 2009)
	Albuminas 2S	Passifloraceae	Antibacteriana e antifúngica	(PELEGRINI <i>et al.</i> , 2006)

^a Angiospermas, ^b Gimnospermas

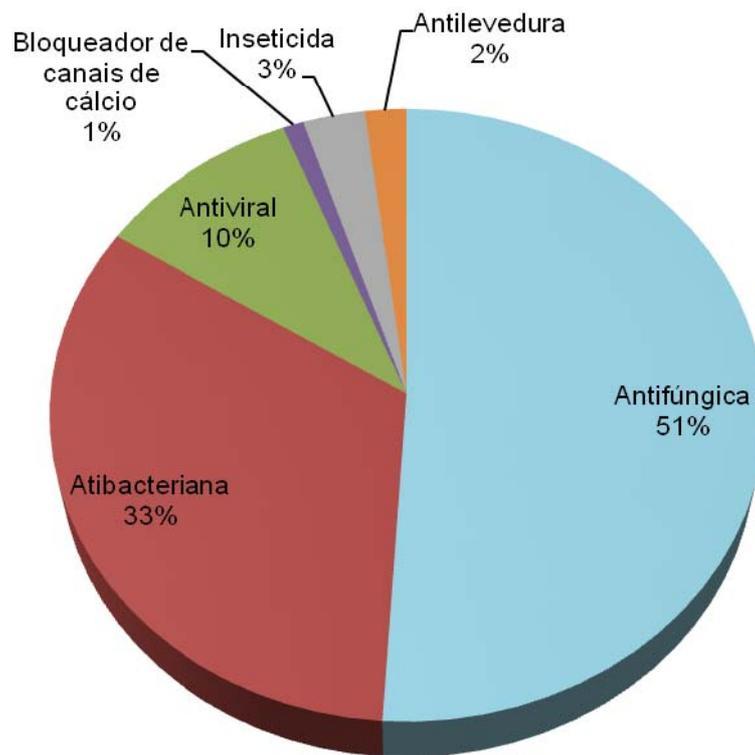


Figura 4 Gráfico de atividade reportada para peptídeos vegetais compilados no banco de dados PhytAMP, Adaptado (HAMMAMI *et al.*, 2009).

1.4.2 Albuminas 2S: caracterização molecular

As albuminas 2S são consideradas o maior grupo de proteínas presentes em sementes tanto de plantas monocotiledôneas, como dicotiledôneas (BERROCAL-LOBO, M. *et al.*, 2002). Elas estão presentes em importantes fontes de alimento, como por exemplo, soja (LIN *et al.*, 2006) e feijão (GENOVESE e LAJOLO, 1996). Tais proteínas foram conhecidas por esse nome, devido ao seu coeficiente de sedimentação (S_{20w}) de aproximadamente 2 (YOULE e HUANG, 1981). As albuminas 2S são depositadas em vacúolos de armazenamento e requisitadas como fonte de nutrientes durante a germinação da semente e desenvolvimento da plântula (VITALE e HINZ, 2005). Essas proteínas despertam um elevado interesse nutricional e clínico, por esse motivo elas têm sido amplamente estudadas. Atualmente, essas proteínas são agrupadas na família 2S com base em características como, presença de resíduos conservados na estrutura primária, estrutura tridimensional típica, entre outras, como discutido subsequente.

De acordo com Moreno e Clemente (2008), embora possam existir isoformas de albumina 2S isoladas de uma mesma espécie de planta, ainda é possível caracterizar a “típica” albumina 2S. Essas proteínas são codificadas por famílias multigênicas (BERROCAL-LOBO, M. *et al.*, 2002) . A caracterização molecular de genes que codificam napinas, albuminas 2S isoladas de nabo (*Brassica napus*), por exemplo, revelou que essas proteínas podem ser expressas no mínimo por 16 genes (JOSEFSSON *et al.*, 1987). Em *Arabidopsis* foi relatada a presença de 5 genes que codificam albuminas 2S (VAN DER KLEI *et al.*, 1993). Isoformas de albumina 2S também têm sido preditas em gergelim (*Sesamum indicum* L.) e em avelã (*Corylus avellana* L.) (GARINO *et al.*, 2010) . Múltiplas formas têm sido descritas tanto para subunidade maior quanto para a menor. Em *Bertholletia excelsa*, por exemplo, foi descrita pelo menos seis isoformas para subunidade maior (8,5 kDa), entretanto a menor (3,6 kDa) consistiu de apenas uma forma (CHRISTOPHE *et al.*, 1986). Caracterização de albuminas 2S *Bertholletia excelsa* feitas por abordagens proteômicas revelou a existência de pelo menos 10 isoformas com massa molecular de aproximadamente 12 kDa (BERROCAL-LOBO, M. *et al.*, 2002).

As albuminas 2S estão agrupadas na superfamília prolamina, juntamente com outras proteínas, como as proteínas transportadoras de lipídeos e inibidores de α -amilase e tripsina (BATEMAN *et al.*, 2002). Os membros dessa superfamília normalmente compartilham um típico esqueleto bem conservado de 8 resíduos de cisteínas (...C...C.../...CC...CXC...C...C...). As albuminas 2S que têm sido isoladas de sementes de várias espécies de plantas, possuem uma massa entre 12 e 15 kDa. Essas moléculas são compostas em sua maioria por duas cadeias polipeptídicas, uma menor, que varia de 3-5 kDa e uma maior, cuja massa molecular varia de 8-10 kDa, as quais são ligadas por duas pontes dissulfeto intra-cadeia (PANTOJA-UCEDA *et al.*, 2002). Entretanto a albumina 2S SFA-8 de girassol (*Heliantus annuus*), apresenta apenas uma subunidade, com massa de 12,1 kDa (KORTT e CALDWELL, 1990).

Os resíduos de cisteínas presentes nas subunidades pequena e grande são responsáveis pela formação de duas pontes inter-cadeias, quando a proteína está em sua forma madura, e também pela formação de duas pontes intra-cadeia na subunidade grande. Os resíduos 1 e 2 de cisteínas da subunidade pequena são respectivamente ligados aos resíduos 5 e 6 da subunidade grande. As pontes intra-cadeias, são formadas entre os resíduos de cisteínas 4-7 e 6-8 (BERROCAL-LOBO, M. *et al.*, 2002).

Estudos por ressonância magnética nuclear em solução aquosa têm revelado que essas proteínas globulares apresentam um comum arranjo tridimensional, que compreende a presença de 5 α -hélices anfipáticas dispostas em espiral (RICO *et al.*, 1996; PANDYA *et al.*, 2000; PANTOJA-UCEDA *et al.*, 2002) (Figura 5). Ainda, vários estudos demonstram que albuminas de muitas espécies de plantas, como mostarda amarela (MENÉNDEZ-ARIAS *et al.*, 1987), girassol (PANDYA *et al.*, 2000), castanha do Pará (BERROCAL-LOBO, M. *et al.*, 2002), amendoim (LEHMANN *et al.*, 2006), soja (SEGURA *et al.*, 1999), gergelim (BERROCAL-LOBO, M. *et al.*, 2002), mamona (PANTOJA-UCEDA *et al.*, 2002) e nabo (RICO *et al.*, 1996) são ricas em α -hélices.

A maioria das albuminas 2S que têm sido relatadas na literatura é sintetizada como proteína precursora a qual é submetida a uma ou mais processos proteolíticos após a tradução. Em albuminas 2S de mamona (*Ricinus communis* L.), durante o desenvolvimento da semente, o gene de albumina 2S, expressa a mesma como um simples precursor pro-proteína. Esse precursor contém um peptídeo sinal no N-terminal (IRWIN *et al.*, 1990), que é clivado no lúmen do retículo endoplasmático.

Esse processo resulta em uma pro-albumina 2S que é encaminhada para o vacúolo de estoque de proteína. Nessa organela, a pro-albumina 2S é clivada em duas proteínas maduras hetero-diméricas, sendo uma maior e outra menor, ambas ligadas por pontes dissulfeto (HARA-NISHIMURA *et al.*, 1998; BROWN *et al.*, 2003).

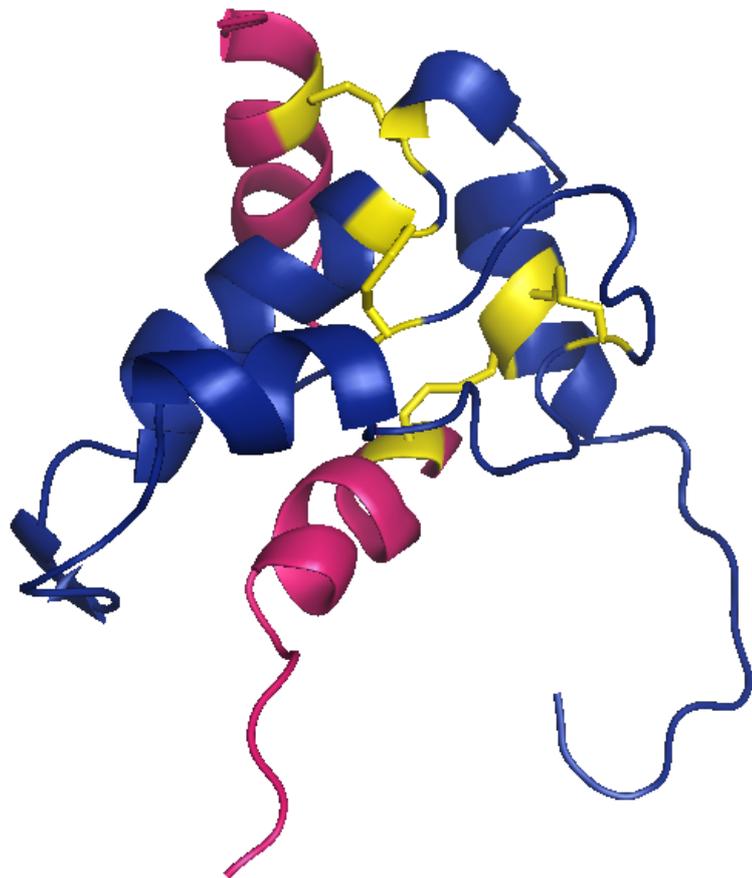


Figura 5 Representação esquemática em fita da napina Bn1b de *Brassica napus*. A subunidade maior é representada pelas hélices em azul e a subunidade menor é representada pelas hélices em rosa. As pontes dissulfeto são representadas pela cor amarela. (Entrada no PDB:1PNB)

1.4.3 Papel antimicrobiano das Albuminas 2s

Investigações recentes *in vitro*, têm revelado que albuminas 2S, além do papel nutritivo durante a germinação, podem desempenhar um papel adicional na defesa de plantas. Terras *et al.* (1992), foi o primeiro a descrever o papel antimicrobiano de albuminas 2S, estas isoladas de sementes de rabanete (*Raphanus sativus* L.). Após essa primeira descoberta, o mesmo buscou por Albuminas 2S com atividade antimicrobiana em outras quatro espécies da família Brassicaceae, entretanto atividade antimicrobiana foi descrita apenas para albuminas 2S de cevada (*Hordeum vulgare*) (CAMMUE *et al.*, 1992). Trabalhos posteriores também têm confirmado atividade antimicrobiana em sementes de uma diversidade de espécies de plantas, como: *Malva paviflora* (WANG e BUNKERS, 2000), *Helianthus annuus* (REGENTE e DE LA CANAL, 2001), *Passiflora edulis* (AGIZZIO *et al.*, 2003; PELEGRINI *et al.*, 2009), *Sesamum indicum* L. (MANDAL *et al.*, 2009) e *Taraxacum officinale* Wigg (ODINTSOVA *et al.*, 2010) e outras.

Outra possibilidade é que as albuminas 2S atuem na inibição de células fúngicas mediante a inativação da enzima H⁺-ATPase. Isso foi proposto diante de ensaios onde albumina 2S isolada de sementes *Passiflora edulis* revelou-se capaz de inibir em 40% a acidificação do meio quando estimulada por glicose pelo fungo *Fusarium oxysporum*. Esses resultados estavam correlacionados à inibição do crescimento fúngico (AGIZZIO *et al.*, 2003). A inibição da acidificação, reflete possivelmente alguma interferência causada por albumina 2S na enzima H⁺-ATPase na membrana plasmática fúngica. Em geral, a H⁺-ATPase, uma enzima transmembrana, presente na membrana plasmática de todos os organismos, é uma bomba de próton de alta capacidade. A mesma desempenha um papel essencial na fisiologia da célula, ajudando a manter o pH intracelular e também o gradiente eletroquímico de prótons que é necessário para a absorção de nutrientes (SERRANO, 1988). A H⁺-ATPase de fungos, têm sido considerada alvo para o desenvolvimento de drogas uma vez que ela apresenta diferenças entre H⁺-ATPases de outros organismos (MONK e PERLIN, 1994).

A ação de albuminas 2S, na defesa de planta possivelmente ocorre de modo sinérgico com outras proteínas, como tem demonstrado investigações *in vitro* (CAMMUE *et al.*, 1992). A concentração requerida de defensina para inibição de

50% do crescimento fúngico quando combinadas com albuminas 2S de (*R.sativus* L.), diminui em até 73 vezes (CAMMUE *et al.*, 1992). Esses dados têm indicado que albuminas 2S podem agir conjuntamente com outras proteínas em defesa da planta. Adicionalmente, estudos de microscopia de varredura e de saída de K^+ de hifas fúngicas têm revelado que albuminas 2S de rabanete (*R.sativus* L.) agem permeabilizando a membrana da hifa (CAMMUE *et al.*, 1992). Todos esses dados apresentam consideráveis evidências que albuminas 2S atuem na defesa de plantas.

1.5 Maracujá e potencialidades biotecnológicas

As plantas do “maracujá” ou “maracujazeiro” ou ainda “flor da paixão” são designações dadas às espécies de planta que pertencem ao gênero *Passiflora* L (Passifloraceae) (SALOMÃO e ANDRADE, 1987). O gênero *Passiflora* L., abriga cerca de 400 espécies, e desse total, já foram descritas aproximadamente 150 espécies no Brasil, sendo que desse número, cerca de 60 são frutos comestíveis (JUNQUEIRA, 2005). Na história, o maracujá se tornou conhecido pelos sentidos de divindade atribuídos as partes florais da espécie primeiramente conhecida por cristãos católicos, *Passiflora incarnata*. Nessa espécie, era possível reconhecer na flor os instrumentos do sofrimento de Jesus, por isso a designação “Flor da paixão”. Assim se originou a denominação do nome científico do gênero (Passi= paixão, flora=flor) (CERVI, 1997). As passifloras possuem uma grande importância comercial. Elas podem ser utilizadas em sua forma *in natura*, como suco concentrado, de forma ornamental (devido à beleza de suas flores) e ainda por suas propriedades medicinais (BRAGA *et al.*, 2006)

A plantação de maracujá no Brasil é bastante difundida, uma vez que o clima brasileiro, com destaque para região nordeste, favorece grandemente o cultivo dessa fruteira (RUGGIERO e MARTINS, 1987). Esse é uma dos aspectos que tem colocado o Brasil entre os principais produtores de maracujá do mundo. De acordo com Braga *et al.* (2006) as espécies mais conhecidas para alimentação são: *Passiflora edulis* e *Passiflora incarnata* e em menor escala *Passiflora alata*. Entretanto essa última fruteira, mais conhecida como maracujá-doce (Figura 6) tem

ganhado representatividade no mercado de frutas para consumo *in natura* (BRAGA et al., 2006). O maracujá doce apresenta boa adaptabilidade a diferentes solos e climas. Ela é amplamente distribuída pelo Brasil, podendo ser encontrada de forma nativa no Norte (Amazônia, Pará, Rondônia e Tocantins), no Nordeste (Bahia, Maranhão e Piauí), Sul (Rio Grande do Sul e Paraná), Sudeste (Minas Gerais, São Paulo, Espírito Santo e Rio de Janeiro) e Centro-Oeste (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (JUNQUEIRA et al., 2001).

Historicamente o maracujá é utilizado na medicina tradicional em muitos países para o tratamento da ansiedade e insônia. Muitos estudos já têm comprovado o papel de espécies de maracujá para o tratamento desses quadros clínicos além evidenciar outras potencialidades dessa planta. Investigações têm demonstrado que passifloras possuem compostos bioativos em diversas partes da planta. Entre as atividades de Passifloras, podem ser destacadas: atividade ansiolítica (DHAWAN et al., 2001), potencial anticonvulsivo (NASSIRI-ASL et al., 2007), propriedades afrodisíacas (KAMALDEEP et al., 2003), propriedades antiasmática (KAMALDEEP et al., 2003), potencial antiinflamatório (MONTANHER et al., 2007).

Além dessas propriedades terapêuticas, outros estudos que avaliam o potencial antimicrobiano têm revelado que sementes de maracujá possuem compostos protéicos ativos contra fungos e bactérias. Agizzio e colaboradores (2003) demonstraram a presença de dois peptídeos antifúngicos nomeados de PF1-RP e PF2-RP, em *Passiflora edulis*. Esses peptídeos apresentaram uma inibição de 24% contra *Fusarium oxysporum*, 78% de *Colletotrichum lindemuthianum* e ainda 32% *Saccharomyces cerevisiae* e *Colletotrichum musae*. Ainda de acordo com o mesmo autor, o peptídeo Pf2-RP (subunidade maior) mostrou alto grau de homologia com proteínas 2S albuminas. Adicionalmente estudos realizados por Pelegrini e colaboradores (2006) revelaram também a presença de um novo peptídeo, Pe-AFP1 de sementes de *Passiflora edulis* com similaridades a outros membros da família 2S albumina. Esse peptídeo, em ensaios conduzidos por difusão em placa, apresentou inibição de 80% contra *Trichoderma harzianum*, 70% contra *Fusarium oxysporum*, and 60% contra *Aspergillus fumigatus*. Entretanto não foi detectada alguma inibição contra *Rhizoctonia solani*, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Candida albicans*.

Recentemente foi isolada de *Passiflora edulis*, uma proteína de 67 kDa com propriedade antimicrobiana e anticâncer. Essa proteína, chamada de Passiflin foi

capaz de inibir o crescimento micelial de *Rhizotonia solani* e de células de câncer de mama (GARCIA-OLMEDO *et al.*, 1998). Os estudos realizados com proteínas e peptídeos antimicrobianos de *Passiflora edulis* podem servir como indicativo da presença de novos peptídeos com ação antimicrobiana em outras espécies de *Passiflora*, possibilitando assim a perspectiva de desenvolvimento de novos fármacos alternativos a partir de proteína e peptídeos de espécies desse gênero.



Figura 6 Flor e frutos de *Passiflora alata*. (Extraído de JUNQUEIRA *et al.*, 2001).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Prospectar, isolar e caracterizar as proteínas ou peptídeos a partir de mesocarpo, exocarpo e sementes de maracujá-doce (*Passiflora alata* Curtis) capazes de combater bactérias responsáveis por infecções humanas, fungos patogênicos ao homem e a plantas, e dessa forma contribuir para geração futura de novos produtos antimicrobianos.

2.2 Objetivos específicos

- Obter extratos protéicos tanto do exocarpo e mesocarpo bem como da semente de maracujá-doce (*Passiflora alata* Curtis) a partir da precipitação com sulfato de amônio;
- Purificar e isolar através de técnicas cromatográficas pelo menos uma proteína ou peptídeo do mesocarpo e exocarpo ou semente de maracujá-doce (*Passiflora alata* Curtis);
- Avaliar a atividade antimicrobiana nas diferentes etapas de purificação através de ensaios em microplacas;
- Descrever a massa molecular da proteína antimicrobiana isolada por *Tricine-SDS-PAGE* e por espectrometria de massa;
- Obter a seqüência N-terminal da proteína isolada por degradação de Edman.

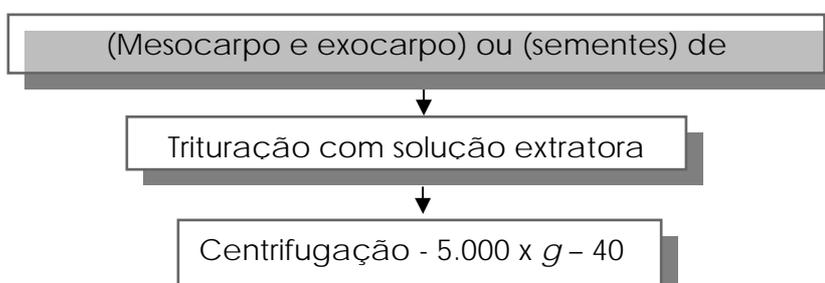
3 MATERIAL E MÉTODOS

Um fluxograma foi elaborado para um melhor acompanhamento de todo o processo de purificação, isolamento, determinação das massas moleculares de proteínas e avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de amostras de tecidos do fruto de *Passiflora alata* Curtis.(Figura 7).

3.1 Material Biológico

3.1.1 Frutos de *Passiflora alata* Curtis

Frutos verdes e maduros de *Passiflora alata* Curtis foram fornecidos pelo Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, na cidade de Vitória da Conquista- Bahia/Brasil. Apenas o mesocarpo e exocarpo de frutos verdes foram utilizados. Essa pode ser justificada por alguns trabalhos que têm demonstrado que a expressão de proteínas antimicrobianas é mais alta em fruto verde. Por outro lado a escolha por sementes de frutos maduros pode ser justificada pela ampla descrição de proteínas de sementes de uma diversidade de plantas (CAMMUE *et al.*, 1992; TAILOR *et al.*, 1997; KOO *et al.*, 1998; SILVA-SANCHEZ *et al.*, 2008).



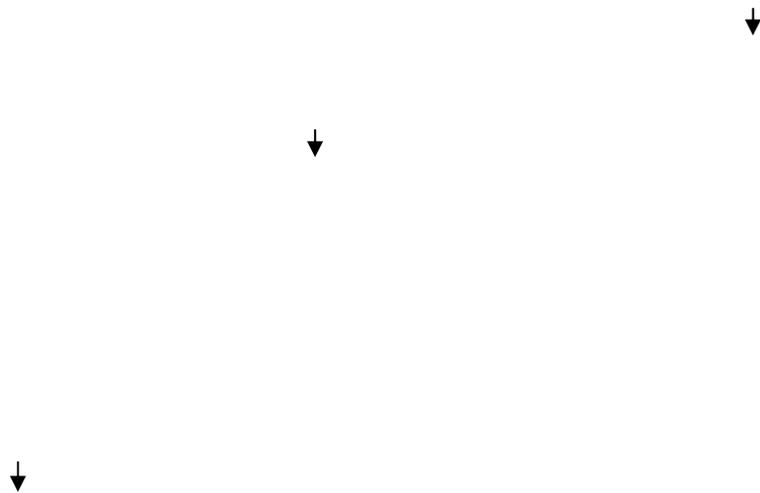


Figura 7 Fluxograma representativo das etapas desenvolvidas nesse trabalho para purificação de proteínas antimicrobianas. A partir da caixa de texto com textura seguem apenas as etapas onde ocorre o processamento das proteínas de sementes.

3.1.2 Microrganismos

A cepa *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), foi obtida da coleção Americana de Tipos de Cultura e a cepa de *Staphylococcus aureus* foi obtida do Hospital Universitário de Brasília (HUB). As culturas estoques das bactérias citadas foram mantidas meio Luria-Bertani (LB) (10 g de tripton, 5 g de extrato de levedura e 10g de NaCl para 1 L de água destilada) e armazenadas a 40% de glicerol a -80°C até a utilização das mesmas. Os fungos filamentosos *Colletotrichum gloeosporioides* e *Fusarium* sp. foram obtidos da coleção pertencente a Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB). O fungo *Botrytis cinerea* foi obtido da coleção pertencente Universidade Católica de Brasília (UCB). Os mesmos foram mantidos em meio sólido, batata-dextrose (200 g de batata inglesa, 20 g de dextrose 20 g de Agar para 1 L de água destilada), estocados a temperatura de 10 °C, e repicados mensalmente. Os fungos leveduriformes, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida neoformans* e *Candida parapsilosis* (todas patogênicas ao homem) foram obtidos da coleção pertencente à Universidade de Brasília (UNB). Os ensaios referentes a estes fungos foram realizados na UNB no Laboratório de Farmacognosia.

3.2 Processos de separação e higienização dos frutos e sementes

Com a finalidade de eliminar possíveis microrganismos e outros contaminantes, os frutos de *P. alata* foram previamente higienizados com hipoclorito de sódio comercial a 0,0025% de acordo com as recomendações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2008). Os frutos permaneceram nessa solução por 30 minutos. Posteriormente os mesmos foram lavados abundantemente em água corrente e em água destilada. As sementes foram removidas do fruto, foram extensivamente lavadas em água corrente e em seguida, mantidas sobre papel jornal para remoção da umidade. Após a secagem, as sementes foram peneiradas e também separadas manualmente de restos de tecidos vegetais que ainda as envolviam. As mesmas foram lavadas abundantemente com água corrente.

3.3 Extração e isolamento de proteínas antimicrobianas das sementes

Para extração de proteínas, as sementes foram trituradas em um liquidificador com solução de extração (10 mM Na₂HPO₄, 15 mM NaH₂PO₄, 100 mM KCl, 1.5% EDTA) na proporção 1:3 m/v. O extrato bruto foi centrifugado à 8000 x g à 4 °C por 30 min, com a finalidade de retirar restos celulares. O sobrenadante foi submetido a duas etapas de precipitação com sulfato de amônio: de 0-70% e depois 70-100%. Cada etapa foi mantida sobre agitação constante, overnight a temperatura de 10 °C em câmara fria. Em seguida, a amostra de cada etapa de precipitação foi centrifugada a 8.000 x g por 30 min a 4 °C. Cada precipitado foi extensamente dialisado contra água destilada em membranas de diálise (*cut off* 3, 5 kDa) em temperatura de 4 °C. A fração rica em proteínas, proveniente da saturação com sulfato de amônio foi submetida à *FPLC* (*fast protein liquid chromatography*) em coluna de troca aniônica Q-Sepharose em sistema Akta *purifier*. O tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, contendo 1,0 M de NaCl foi utilizado para eluição das proteínas adsorvidas. Essa cromatografia foi desenvolvida em um fluxo de 1mL.min⁻¹. A fração ativa foi liofilizada, ressuspensa em 0,1% de TFA (ácido trifluoracético em água Milli-Q) e subsequentemente aplicada em *HPLC* (*high performace liquid chromatography*) em coluna C₄ (Vydac) analítica e a eluição das proteínas foi acompanhada pela leitura em densidade ótica de 215 nm.

3.4 Determinação da Concentração de Proteínas

A quantificação protéica foi realizada através do Quant-iT™ *Protein Assay Kit*, segundo as orientações do fabricante (Invitrogen, 2007). Um volume de 199 µl da solução Tampão Quant-IT™ foi homogeneizado por 3 segundos juntamente com 1 µL do reagente Quant-iT™. Em seguida retirou uma alíquota de 5 µL dessa solução e adicionou-se 5 µl da amostra. A mesma foi homogeneizada por 3 segundos e incubada a uma temperatura de 20°C por 15 minutos. Após esse tempo, essa solução foi analisada no Qubit™ fluorómetro e os valores da concentração foram calculados para 5 µl da amostra pelo equipamento.

3.5 Avaliação da atividade antibacteriana

A atividade antimicrobiana foi determinada usando o método de microdiluição em caldo de acordo M7-A6 do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2006). Previamente, uma curva de crescimento da cultura original foi estabelecida obtida, com a finalidade de determinar a relação entre unidades formadoras de colônias (UFC) e densidade ótica, de acordo com a técnica de microgotas para contagem de células bacterianas viáveis em uma suspensão (TEIXEIRA *et al.*, 2006). Para os ensaios de atividade antimicrobiana, 0,1 mL do inóculo foi cultivado em 4 mL de meio LB (10 g de tripton, 5 g de extrato de levedura e 10g de NaCl para 1 L de água destilada, pH 7,0) por aproximadamente 3 horas, até que a densidade ótica alcançasse a metade da fase logarítmica. Após esse tempo, uma alíquota correspondente a 5×10^5 UFC.mL⁻¹ e 100 µg. mL⁻¹ da amostra protéica foi adicionada em uma solução contendo meio LB para obtenção de um volume final de 0,1 mL e que posteriormente foi aplicada no poço da microplaca de 96 poços. O controle positivo foi representado pela presença das bactérias em meio suplementado com cloranfenicol a uma concentração de 60 µg. mL⁻¹; o controle negativo, consistiu na presença das bactérias em meio líquido LB e e água. Também foi realizado um controle do meio (ausência das bactérias na presença de qualquer composto antibacteriano), para assegurar a confiabilidade dos ensaios. Os poços foram preenchidos 0,1 mL tanto da amostra quanto dos controles. Os ensaios foram

realizados em triplicata. O crescimento bacteriano foi monitorado a 595 nm, a cada 30 minutos até o crescimento bacteriano atingir a fase estacionária. A leitura da microplaca foi realizada no equipamento BIOTEK, Power Wave HT.

Para avaliação da atividade antibacteriana, as médias de todos os tempos foram subtraídas pela média do primeiro tempo de leitura. A porcentagem inibição do crescimento fúngico foi calculada de acordo com a fórmula abaixo:

$$100 - \frac{(A \times 100)}{C}$$

A = Média da absorbância da triplicata da amostra teste, referente a cada tempo

C = Média da absorbância da triplicata do controle negativo, referente a cada tempo

3.6 Avaliação da atividade contra fungos filamentosos

A atividade antifúngica foi conduzida de acordo com Broekaert (1992) com modificações. *Colletotrichum gloeosporioides* foi cultivado em meio sólido BDA (batata dextrose, 200g de batata inglesa, 20g de dextrose em 1L de água destilada) em placa Petri por 7 dias na ausência de luminosidade, à temperatura ambiente, antes da utilização para o ensaio. Após esse período, foi realizada a coleta dos esporos, mediante a inundação da cultura na placa com 2mL de água estéril e posterior esfregaço da cultura com auxílio da alça de Drigalski estéril. As suspensões dos esporos foram filtradas através de camadas de gaze e os esporos foram contados em câmara de Neubauer. Os ensaios foram realizados em meio líquido, em microplaca de 96 poços. A atividade antifúngica foi determinada em leitor de microplaca à 595 nm, mediante a realização de leituras a cada 12 horas e até um tempo final de 48 horas, tempo em que o fungo parou de crescer. Cada poço da microplaca continha 3000 esporos do fungo em um volume final de 150 µl. O controle positivo foi representado pela presença dos esporos em meio líquido BDA (batata-dextrose-agar) suplementado com Anfotericina B a concentração de 30µg. mL⁻¹; o controle negativo, consistiu na presença dos esporos em meio líquido BDA na ausência de qualquer composto antifúngico. Também foi realizado um controle do

meio (ausência de esporos e qualquer composto antifúngico), para assegurar a confiabilidade dos ensaios. A microplaca foi agitada por 5 segundos e em seguida, mantida 30 minutos sem agitação, para sedimentação dos esporos. Após esse tempo a leitura da placa foi conduzida em leitor de no equipamento Biotek Power Wave HT, à 595 nm. A cada 12 horas, novas leituras foram realizadas até 48 horas incubação a 25°C e em baixa agitação contínua. Os ensaios foram conduzidos em triplicata. Para avaliação da atividade antifúngica, as médias de todos os tempos foram subtraídas pela média do primeiro tempo de leitura. A porcentagem inibição do crescimento fúngico foi calculada de acordo com a fórmula abaixo:

$$100 - \frac{(A \times 100)}{C}$$

C-

A = Média da absorbância da triplicata da amostra teste, referente a cada tempo

C = Média da absorbância da triplicata do controle negativo, referente a cada tempo

3.7 Atividade contra fungos leveduriformes

A atividade contra fungos leveduriformes foi realizada através do método de microdiluição em caldo (NCCLS, 2002). Os fungos testados foram *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* e *Criptococcus neoformans var neoformans*. Esses ensaios foram conduzidos no Laboratório de Farmacognosia da Universidade de Brasília. Resumidamente, nos ensaios foram utilizados uma concentração de 1×10^6 UFC.mL⁻¹ (UFC, unidades formadoras de colônias dos fungos filamentosos), diluições seriadas ($0,5-256\mu\text{g. mL}^{-1}$) da fração rica de amostras de 0-70% e de 70-100% de *P. alata* Curtis. Os ensaios foram conduzidos em microplacas de 96 poços e o volume final dos poços foi de 100 µl. Para o controle negativo foi utilizado tanto fluconazol quanto itraconazol ambos diluídos serialmente ($0,5-4 \mu\text{g. mL}^{-1}$). O meio de cultura utilizado nos ensaios foi o RPMI-1640 (10,4g de meio RPMI-1640 em pó (com glutamina e vermelho fenol, sem bicarbonato, 34,53g de tampão MOPS). Nos ensaios foi realizado o controle da esterilidade (meio isento de drogas). As placas de microdiluição foram incubadas a 35° C, observando presença ou ausência de

crescimento visível. Para determinação da atividade antilevedura as placas de microdiluição receberam uma pontuação (escore). O crescimento em cada poço foi comparado com o do poço controle do crescimento (isento de droga) com auxílio de um espelho de leitura, sendo a escala 0 = opticamente claro; 1 = crescimento indefinido; 2 = redução proeminente de crescimento; 3 = ligeira redução do crescimento; e 4 = nenhuma redução do crescimento. Os resultados da microdiluição com leitura da concentração inibitória mínima foi realizada em 48 horas para *C. albicans*, *Candida glabrata* e *Candida parapsilosis* enquanto para, *Candida neoformans* foi de 72 horas.

3.8 Análises da massa molecular por Tricina-SDS-PAGE

A análise da massa molecular foi avaliada por Tricina-SDS-PAGE (*Tricine-sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis*) e acordo com Schagger e Von Jagow (1987) com adaptações. O gel foi composto por três malhas sobrepostas, sendo a mais inferior correspondente a malha fracionadora (3,3 mL de solução de acrilamida/N'N'metileno bis acrilamida; 3,3 mL solução de gel; 1,1 mL de glicerol; 2,3 mL de água bidestilada; 75 µL de persulfato de amônio 10%; e 7,5 µL de TEMED; a intermediária referente à malha espaçadora (1,5 mL de solução de acrilamida/N'N'metileno bis acrilamida; 2,5 mL solução de gel; 3,5 mL de água bidestilada; 75 µL de persulfato de amônio 10%; e 7,5 µL de TEMED) e superior correspondente a malha de empilhamento (0,5 mL de solução de acrilamida/N'N'metileno bis-acrilamida; 0,8 mL solução de gel e 2,1 mL de água bidestilada, 50 µL de persulfato de amônio 10% e 5 µL de TEMED). A eletroforese foi desenvolvida inicialmente a 30 V até as amostras atingirem a segunda malha. Em seguida a voltagem foi aumentada em 15 V a cada 15 minutos, totalizando 105 V, a qual permaneceu até o final do processo. Previamente a preparação das malhas do gel, as amostras foram precipitadas com ácido tricloroacético (TCA) a 75 % (p/v) na proporção de 1000 µL da amostra para 133 µl de TCA, as mesmas foram mantidas na geladeira por 50 minutos e centrifugadas a 13.400 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado três vezes com acetona gelada em intervalos de 15 minutos. As proteínas precipitadas foram submetidas ao

processo de redução das pontes dissulfeto através do tratamento das mesmas com 50% de tampão de amostra 5X (0,5mM Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 10% β -mercaptoetanol, 0,4% azul de bromofenol e 20% de glicerol) e 50% de água Milli-Q. Semelhantemente as amostras que não foram reduzidas, foram preparadas com o mesmo tampão, mas sem a presença de β -mercaptoetanol. Subseqüentemente, as amostras foram fervidas por 10 minutos e depois aplicadas nos poços do gel ao lado de um marcador de baixa massa molecular, *Ultra Low Range Molecular Weight Marker* (1,6-26,6 kDa) da Sigma.

3.9 Determinação da massa molecular por espectrometria de massa

Um volume de 1 μ L da amostra purificada foi misturado com 3 μ L de uma solução saturada de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (200 μ l de água Milli-Q, 250 μ l de acetonitrila 100%, 50 μ l de ácido trifluoracético e 5mg da matriz alfa-ciano-4-hidroxicinâmico), tal solução foi usada como matriz doadora de prótons. Posteriormente 1 μ L dessa mistura foi depositada sobre uma placa de MALDI. As análises por espectrometria de massa foram realizadas na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia em um espectrômetro de massa do tipo MALDI-ToF Ultraflex III (Bruker Daltonics) o qual foi operado em modo linear.

3.10 Sequenciamento dos aminoácidos e análise *in silico*

A sequência N-terminal da proteína purificada foi determinada usando degradação automática padrão de Edman (EDMAN, 1949) em um seqüenciador Shimadzu PPSQ-23. A sequência de *Pa*-AFP1 foi submetida ao BLAST e contrastada contra um banco de dados de sequências de proteínas não redundantes, usando o algoritmo BlastP (ALTSCHUL *et al.*, 1997). O alinhamento das sequências foi realizado, utilizando o ClustalW (THOMPSON *et al.*, 1994) e o software BioEdit, um editor de alinhamento de sequências biológicas (HALL, 1999).

4 RESULTADOS

4.1 Purificação e caracterização molecular de uma proteína antifúngica isolada de sementes de *Passiflora alata* Curtis

Objetivando a obtenção de proteínas antimicrobianas a partir de diferentes tecidos vegetais de *Passiflora alata* Curtis, os seguintes tecidos foram avaliados: tecido verde de mesocarpo e exocarpo (em um único extrato) e sementes. Inicialmente, o extrato enriquecido com sulfato de amônio do mesocarpo e exocarpo, após diálise contra água destilada, foram avaliados contra *Salmonella typhimurium*. Amostra dessa etapa de purificação apresentou uma inibição de aproximadamente de 5% contra *S. typhimurium*. Após ser submetida à cromatografia de troca aniônica em DEAE-Sepharose, a fração adsorvida dessa coluna cromatográfica, apresentou uma atividade de aproximadamente 20%. Entretanto, observações revelaram que não houve uma separação clara na purificação com DEAE-Sepharose, sendo esta estratégia abandonada. Desta forma, objetivando uma melhor separação, as amostras da fração rica foram submetidas à cromatografia de exclusão molecular em Superdex G-75. Todavia, as frações provenientes dessa coluna cromatográfica não apresentaram inibição contra *S. typhimurium* (dados não mostrados). Diante desses resultados, não foi dada seqüência a prospecção de proteínas antimicrobianas em mesocarpo e exocarpo. Seguiu-se então com estudos exploratórios, para investigação de proteínas antimicrobianas em sementes da mesma espécie.

As proteínas do extrato bruto das sementes de *Passiflora alata* Curtis foram obtidas a partir da precipitação com sulfato de amônio a saturação de 0-70% e em seguida de 70-100%. Amostras provenientes do fracionamento com sulfato de amônio foram então dialisadas, liofilizadas e ressuspensas em água destilada estéril. A avaliação da atividade antimicrobiana foi testada com proteínas a concentração de 100 $\mu\text{g. ml}^{-1}$ e todos os ensaios foram realizados em triplicata. Paralelamente aos ensaios das frações protéicas foram apresentados dois controles de crescimento. Um controle positivo, que correspondeu o cultivo do microrganismo na presença de um agente antimicrobiano e um controle negativo, na ausência de qualquer agente antimicrobiano. Para cada ensaio, também foi realizado um controle

do meio para assegurar a confiabilidade do mesmo, esses dados não são representados graficamente.

A amostra proveniente da saturação de 70-100 % com sulfato de amônio apresentou uma inibição do crescimento de *S. tiphymurium* de 22,5% no tempo final do ensaio (Figura 8). Entretanto, a amostra com saturação com sulfato amônio de 0-70 % foi incapaz de inibir o crescimento dessa bactéria (Figura 8 A). As amostras das duas saturações com sulfato de amônio, não foram capazes de inibir o crescimento de *S. aureus* (esses resultados não foram representados graficamente). A fração de 70-100 % também foi avaliada contra o fungo fitopatogênico *C. gloeosporiodes*. Os resultados desse ensaio revelaram uma inibição de 53,2% do crescimento fúngico no tempo final do ensaio (Figura 9). As amostras das duas saturações com sulfato de amônio não apresentaram atividade inibitória contra os fungos filamentosos *Fusarium* sp. e *B. cinerea* e contra os fungos filamentosos, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. neoformans* e *C. parapsilosis* (esses resultados não foram representados graficamente).

A saturação de 70-100% foi submetida à cromatografia de troca aniônica em Q-Sepharose. Essa etapa de purificação apresentou duas frações, que foram nomeadas de Q1 (fração não adsorvida da Q-Sepharose), que correspondeu o grupo catiônico e fração Q2 (fração adsorvida da Q-Sepharose), que correspondeu ao grupo aniônico (Figura 10). Essas frações foram avaliadas contra *S. tiphymurium* e contra *C. gloeosporiodes*. As frações da Q-Sepharose não apresentaram atividade antibacteriana (Figura 11). Em relação à avaliação antifúngica, a fração Q2 apresentou uma atividade de 36,7% contra *C. gloeosporiodes* no tempo final do ensaio (Figura 12). Nem uma atividade da fração Q1 foi detectada contra esse mesmo fungo.

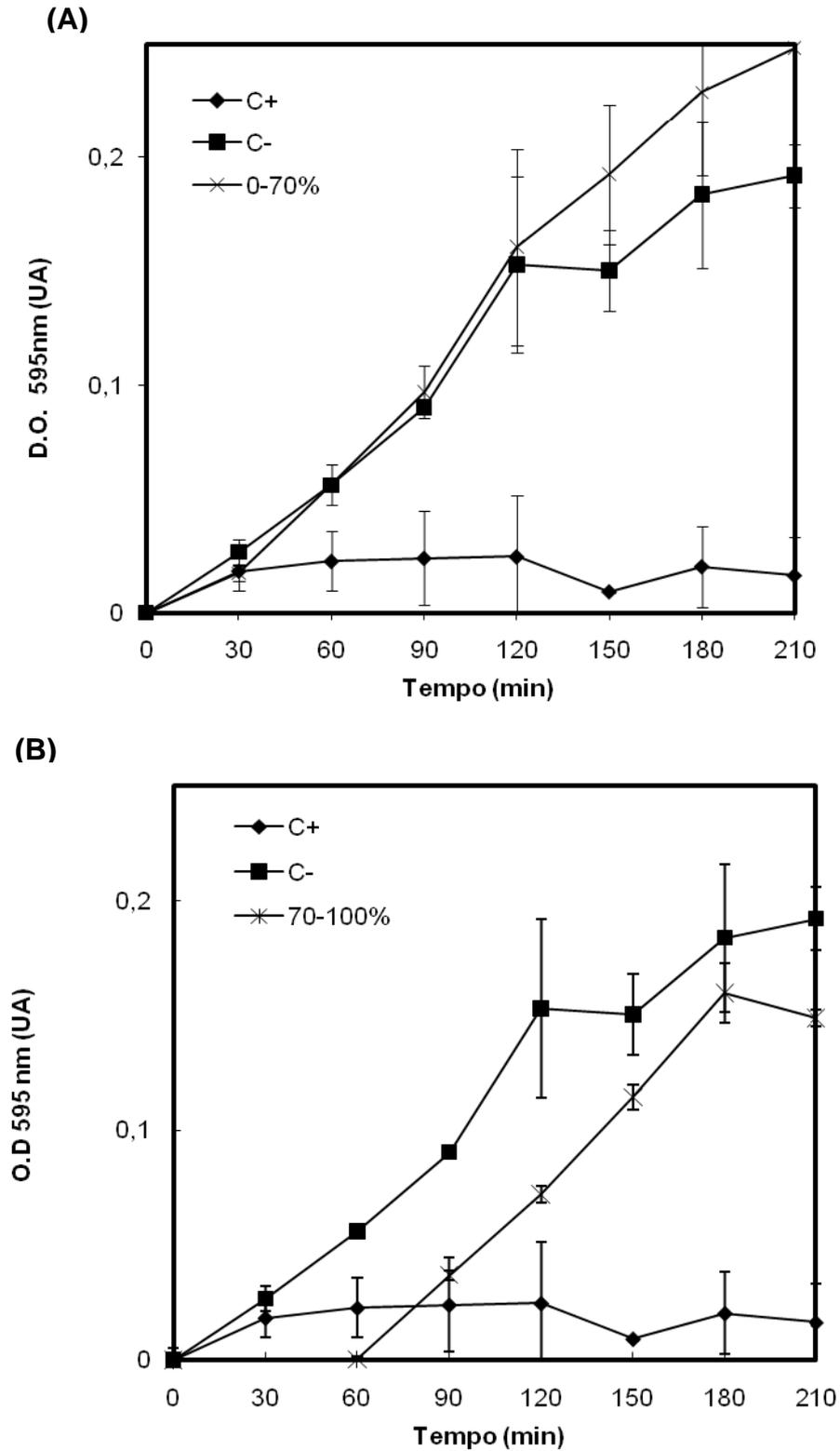


Figura 8 Avaliação da atividade antimicrobiana de proteínas de sementes de *P. alata* Curtis proveniente da fração da precipitação com sulfato de amônio de (A) 0-70% e de (B) 70-100% contra a bactéria patogênica ao homem, *Salmonella typhimurium*. O C+ correspondeu a o cultivo da bactéria na presença de cloranfenicol a 60 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. O C- correspondeu ao cultivo da bactéria na ausência de qualquer composto antibacteriano. Os ensaios foram realizados em triplicata. A barra representa desvio-padrão.

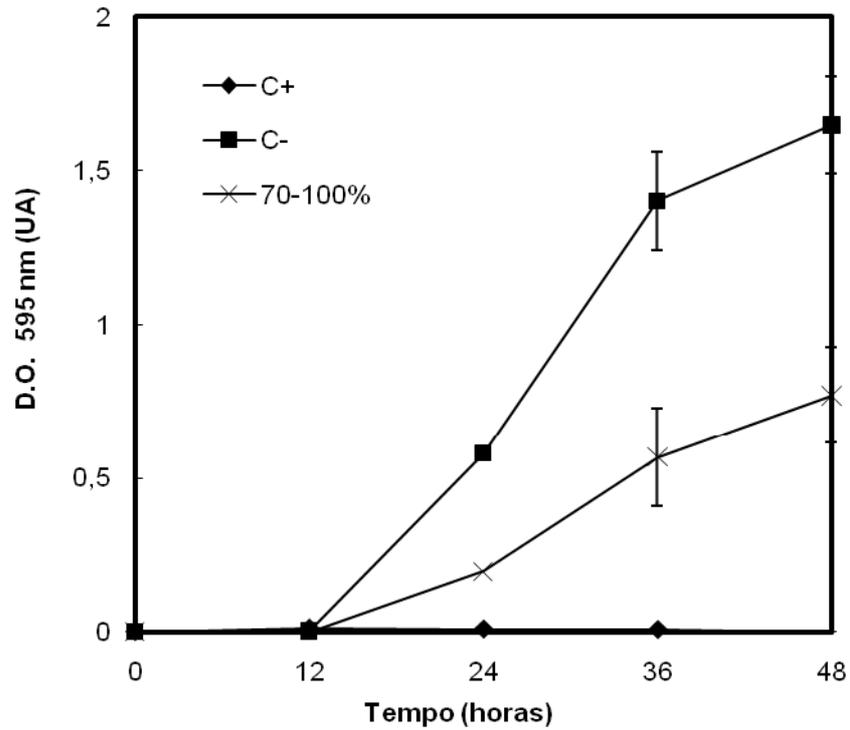


Figura 2 Avaliação da atividade antimicrobiana de proteínas de sementes de *Passiflora alata* Curtis das frações da precipitação com sulfato de amônio contra o fungo fitopatogênico *Colletotrichum gloeosporioides*. O C+ correspondeu a o cultivo do fungo na presença de Anfotericina B a $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$. O C- correspondeu ao cultivo do fungo na ausência de qualquer composto antifúngico. Os ensaios foram realizados em triplicata. A barra representa desvio-padrão.

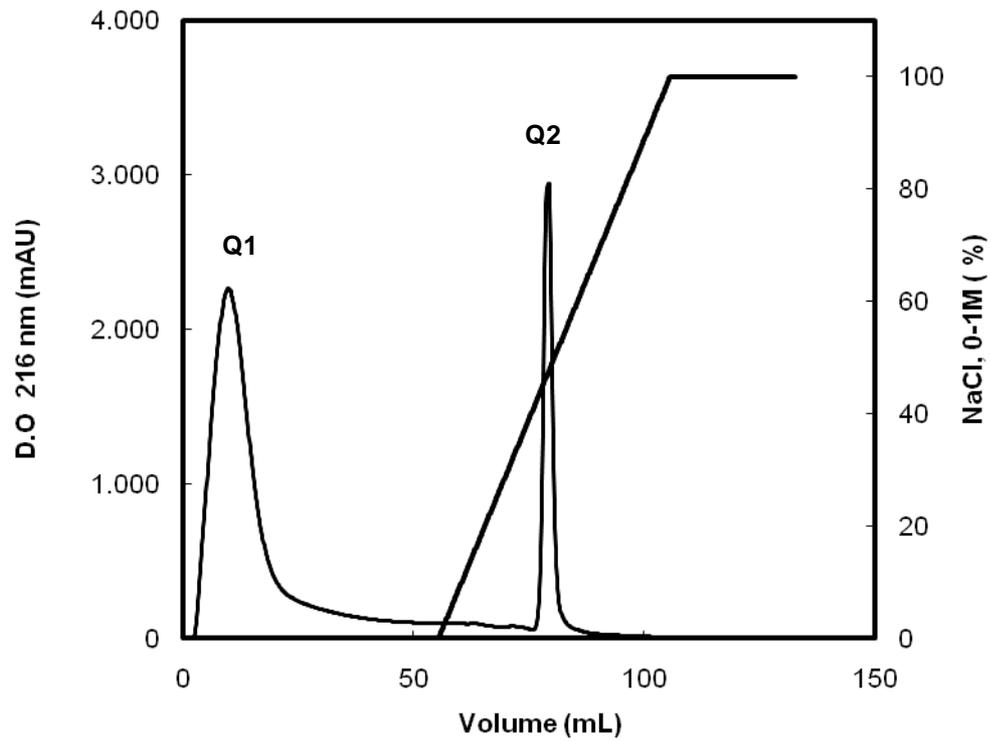
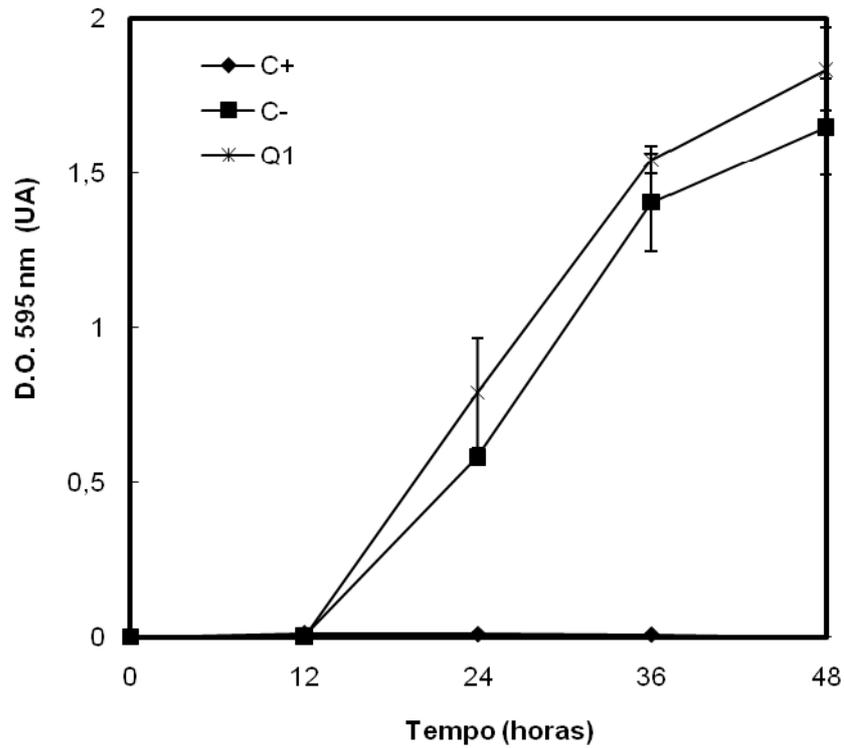


Figura 3 Etapas cromatográficas de purificação. (A) Cromatografia de troca aniônica na coluna Q-Sepharose. Q1 representa a fração não absorvida e Q2, representa a fração adsorvida e a linha diagonal representa o gradiente de NaCl (0-1M).

(A)



(B)

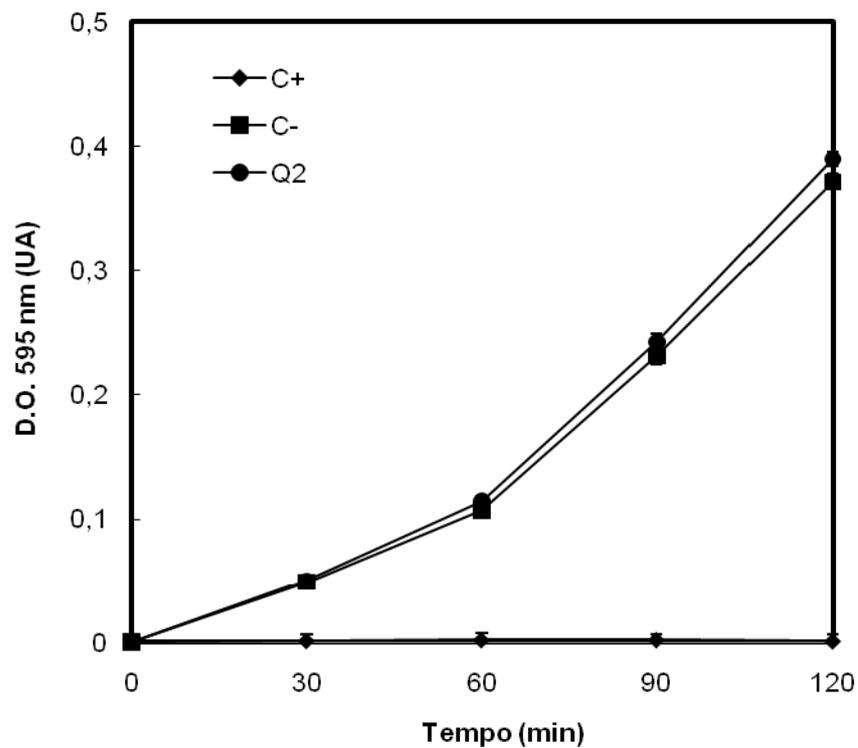


Figura 4 Avaliação antimicrobiana das frações da coluna cromatográfica Q-Sepharose. (A) e (B) representam respectivamente a atividade antimicrobiana de Q1 (fração não adsorvida) e Q2 (fração adsorvida) contra a bactéria patogênica ao homem, *S. typhimurium*. O C+ correspondeu a o cultivo da bactéria na presença de cloranfenicol a 60 µg.mL⁻¹. O C- correspondeu ao cultivo da bactéria na ausência de qualquer composto antibacteriano. Os ensaios foram realizados em triplicata. A barra representa desvio-padrão.

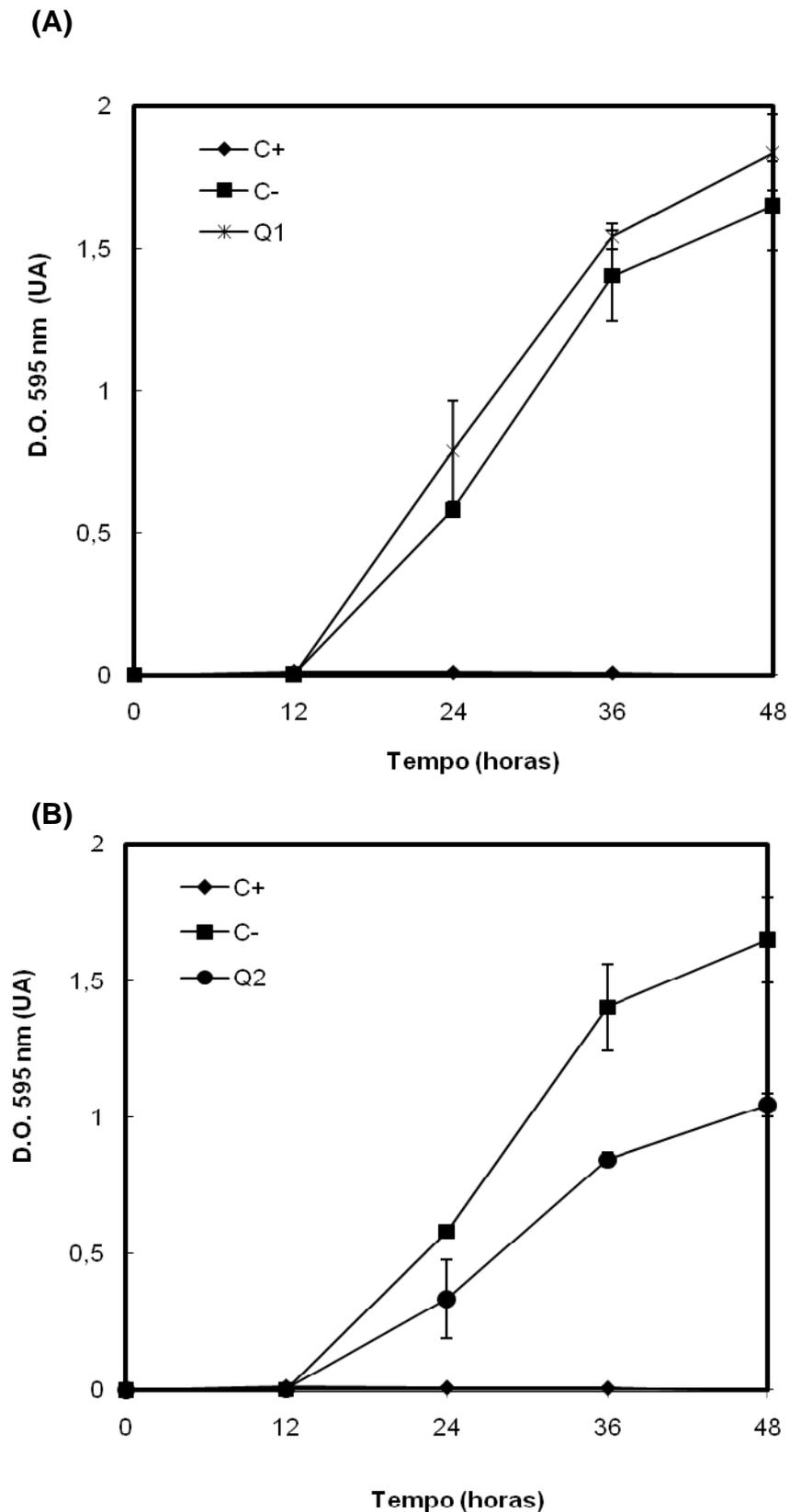


Figura 52 Avaliação antimicrobiana das frações da coluna cromatográfica Q-Sepharose. (A) e (B) representam respectivamente a atividade antimicrobiana de Q1 (fração não adsorvida) e Q2 (fração adsorvida) contra o fungo fitopatogênico *Colletotrichum gloeosporioides*. O C+ correspondeu a o cultivo do fungo na presença de Anfotericina B a $30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. O C- correspondeu ao cultivo do fungo na ausência de qualquer composto antifúngico. Os ensaios foram realizados em triplicata. A barra representa desvio-padrão.

O grupo de proteínas com atividade antifúngica, que correspondeu fração Q2, foi submetido à cromatografia líquida de fase reversa em coluna Vydac C₄ (Figura 13 A). Essa etapa cromatográfica gerou duas frações, estas nomeadas de C4-1 e C4-2 somente a fração majoritária (C4-1) apresentou atividade antifúngica. Essa fração eluída a 27% de acetonitrila apresentou atividade de 27,7% contra *C. gloeosporioides* (Figura 14). Esta fração foi posteriormente recromatografada na mesma coluna e condições (Figura 13 B). A fração purificada foi nomeada de *Pa*-AFP1. Em relação à fração C4-2 a seqüência da mesma foi obtida, entretanto essa fração não apresentou qualquer atividade antifúngica.

4.2 Caracterização bioquímica de *Pa*-AFP1

Para avaliar o grau de pureza do arranjo estrutural da cadeia, *Pa*-AFP1, foi preparada em presença ou ausência de β -mercaptoetanol e posteriormente foi submetida a análise do perfil protéico em Tricina-SDS-PAGE (Figura 15). Na presença de β -mercaptoetanol observou-se a presença de duas distintas massas moleculares, uma pequena com cerca de 4,5 kDa e uma maior com 7,0 kDa. Entretanto na ausência de β -mercaptoetanol, notou-se um massa molecular difusa no gel com aproximadamente 11,5 kDa. Esses dados indicaram que a proteína apresenta uma conformação heterodimérica. Para confirmar a massa molecular obtida pelo gel, *Pa*-AFP1 foi submetido a análise por espectrometria de massa, o qual revelou uma massa molecular de 11.569,763 Da (Figura 15). A dupla carga consistiu de 5.584,33 Da. Esses resultados mostraram que não existe alguma separação dos dímeros durante a cromatografia de fase reversa.

O sequenciamento parcial de *Pa*-AFP1 por degradação e Edman revelou um fragmento N-terminal de 31 resíduos de aminoácidos, que correspondem a: PGAGSQEERMQGQMEGQDFSHEERFLSMVRE. Essa seqüência, quando avaliada no banco de dados, mostrou alta identidade com seqüências de peptídeos e proteínas da família das proteínas albumina 2S (Figura 16). Por exemplo, foi encontrada uma identidade de 72% e 57% de identidade de *Pa*-AFP1 com o peptídeo isolado de *Pe*-AFP1 de *Passiflora edulis* (PELEGRINI *et al.*, 2009) e *Ficus pumila* var. *awkeotsang* (CHUA *et al.*, 2008), respectivamente. Comparação da

estrutura primária de *Pa*-AFP1 com outras representantes da família albumina 2S mostrou que Gln13 e resíduos não polares na posição 14, 19 e 26 são altamente conservados. A fração Q.2.5 também foi submetida ao sequenciamento, gerando um fragmento de 21 resíduos (PEQGEEQQHLFQRXAQFRDLDE) que apresentou também similaridades com proteínas da família albumina 2S.

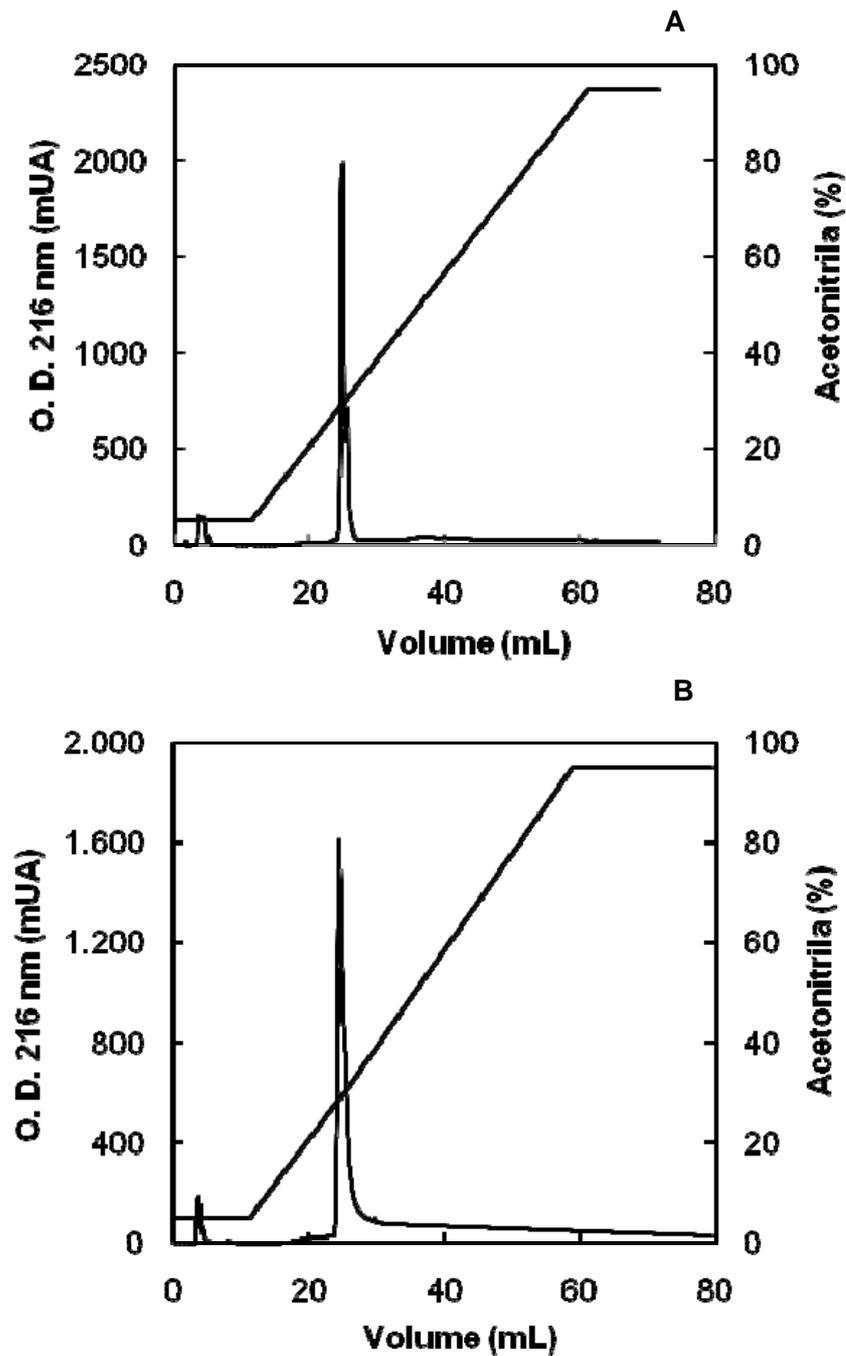


Figura 6 Cromatografia líquida de fase reversa em coluna Vydac C-4TP. A) Amostra proveniente da Q2 (Q-Sepharose). C4-1 e C4-2, correspondem as frações eluídas da cromatografia de fase reversa. B) Recromatografia da amostra C4-1, proveniente da cromatografia de fase reversa em coluna C4. A linha diagonal representa o gradiente de acetonitrila.

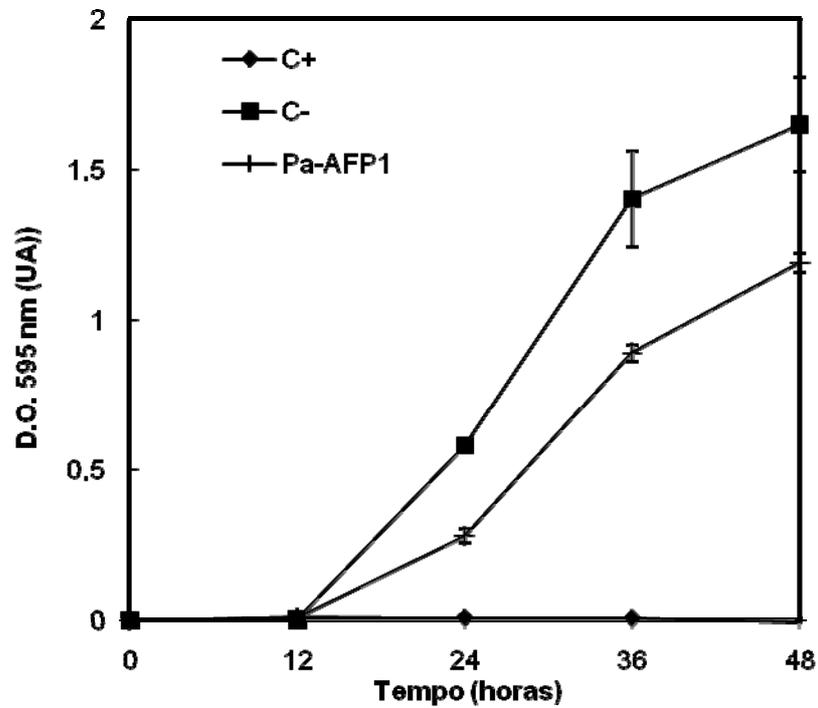


Figura 7 Avaliação da atividade antifúngica de proteínas de sementes de *Passiflora alata Curtis* da fração Q.2.4, proveniente da cromatografia de fase reversa em coluna C₄. As proteínas estavam a uma concentração de 100 $\mu\text{g. mL}^{-1}$. O C+ correspondeu a o cultivo do fungo na presença de Anfotericina B a 30 $\mu\text{g. mL}^{-1}$. O C- correspondeu ao cultivo do fungo na ausência de qualquer composto antifúngico. Os ensaios foram realizados em triplicata. A barra representa desvio-padrão.

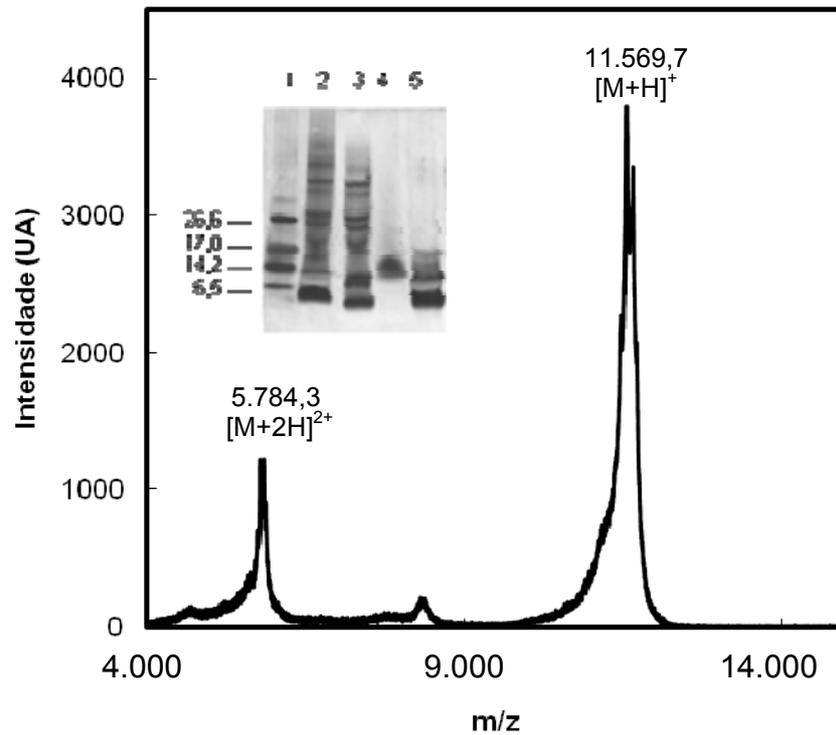


Figure 15 Análise da massa molecular por Tricina-SDS-PAGE de diferentes passos de purificação. (1), marcador molecular; (2) fração de 70-100% proveniente da saturação com sulfato de amônio; (3), fração Q2 (obtida da Q-Sepharose); (4) e (5) fração purificada (obtida da coluna C4) em ausência e presença de β -mercaptoetanol respectivamente. Espectro de massa obtida do MALDI-Tof de *Pa-AFP1*. A massa 5.784,3 representa a forma duplamente carregada.

Código	Espécies	Alinhamento	Referência	
Esse trabalho	<i>Passiflora alata</i>	01 PGAGSQEERMQGQMEGQ-DFSHEERFLSMVRE	31	Esse trabalho
P84884	<i>Passiflora edulis</i>	01 -----QSERFEQQMQGQ-DFSHDERFLSQAA-	25	(PELEGRINI <i>et al.</i> , 2009)
-	<i>Passiflora edulis</i>	01 -----PSERCRRQMGGQ-DFS-----	15	(AGIZZIO <i>et al.</i> , 2003)
AAP31047	<i>Vitis vinifera</i>	38 QFQGSQSQRRCRQIQGQ-QFQQCERYIRQQAE	68	(SEGURA <i>et al.</i> , 1999)
ACI41244	<i>Sesamum indicum</i>	40 -----QSQQCRQQLQGR-QFRSCQRYLSQGRS	65	Submissão direta
AAA33066	<i>Gossypium hirsutum</i>	33 -----RDSCEQQIRKQAHKHCQKYMEEELG	58	(GALAU <i>et al.</i> , 1992)
ABK80757	<i>Ficus pumila var</i>	26 -----EDCSRQIQWR-DLSDCMRYLREQLL	49	(CHUA <i>et al.</i> , 2008)
Q6PSU2	<i>Arachis hypogaea</i>	46 -----RRCQSQLERAN-LRPCEQHLMQKIQ	69	Submissão direta
AAB22711	<i>Raphanus sativum</i>	09 -----RCRREFQQAQWLRACQHLHRQ--	30	(CAMMUE <i>et al.</i> , 1992)

Figure 16 Alinhamento da sequência N-terminal de *Pa*-AFP1 com outros membros da família 2S albumina.

5 DISCUSSÃO

Em estudos anteriores, peptídeos e proteínas antifúngicas com similaridades a albuminas 2S foram identificados em sementes de *P. edulis* (AGIZZIO *et al.*, 2003; PELEGRINI *et al.*, 2009). Tais estudos mostraram que as proteínas com similaridade em albuminas 2S foram capazes de inibir os fungos fitopatogênicos, como *F. oxysporum*, *C. lindemuthianum*, *S. cerevisiae* e *C. musae* (AGIZZIO *et al.*, 2003), *T. harzianum*, *F. oxysporum*, e *A. fumigatus* (PELEGRINI *et al.*, 2009). No presente trabalho uma proteína antifúngica com similaridade a albuminas 2S foi purificada a partir de sementes de *Passiflora alata*.

No presente trabalho, proteínas de todas as etapas de purificação foram avaliadas contra diferentes patógenos de plantas e humanos. Proteínas derivadas de saturação com sulfato de amônio foram capazes de inibir o crescimento de *C. gloeosporioides*. No entanto nenhuma atividade para bactérias e leveduras foi observada. Resultados anteriores do nosso grupo mostraram que *Pe-AFP1*, um peptídeo similar à albumina 2S isolada de *P. edulis* foi incapaz de inibir o crescimento de *Klebsiella* sp. e *Proteus* sp e também foi ineficaz em inibir o crescimento das leveduras *P. brasiliensis* e *C. albicans*, em detrimento da atividade antifúngica contra *T. harzianum*, *F. oxysporum* e *A. fumigatus* (PELEGRINI *et al.*, 2009). Outra proteína albumina 2S isolada de *P. edulis* também foi capaz de inibir o desenvolvimento de vários fungos (AGIZZIO *et al.*, 2003) o que nos leva acreditar que esse grupo de proteínas apresenta também, além da função de reserva, propriedades antimicrobianas.

Alguns estudos têm revelado que proteínas com similaridade às albuminas 2S também apresentam atividade contra fungos filamentosos, como àquelas encontradas em *M. paviflora* (WANG e BUNKERS, 2000), espécies de brassicáceas (CAMMUE *et al.*, 1992) e *T. officinale* Wigg. (ODINTSOVA *et al.*, 2010). Ainda, recentes investigações mostraram que albumina 2S isolada de *C. annuum* L. apresenta clara atividade inibitória contra leveduras, mostrando assim que as proteínas pertencentes a esta classe também podem controlar fungos não filamentosos (RIBEIRO *et al.*, 2007). Em resumo, os dados aqui relatados sugerem que a albumina 2S atividade apresenta predominantemente atividade inibitória

contra fungos fitopatogênicos. No entanto, não é possível excluir, até o momento, a possibilidade de encontrar novas albuminas 2S com a atividade bacteriana.

Análises de massa molecular de *Pa*-AFP1 por Tricina-SDS-PAGE revelaram uma massa molecular de 11.500 Da, quando essa proteína foi tratada na ausência β -mercaptoetanol. No entanto, quando esta amostra protéica foi tratada com β -mercaptoetanol, observou-se duas subunidades diferentes (4.500 e 7.000 Da), sugerindo assim a existência de subunidades ligadas por pontes dissulfeto. O β -mercaptoetanol é um agente redutor e tem a capacidade de desfazer pontes dissulfeto (WU e MUIR, 2008), sendo freqüentemente utilizado para analisar a estrutura quaternária da proteína. O comportamento associado a subunidades separação por agentes redutores tem sido notavelmente descritas para as proteínas pertencentes à família de albumina 2S (CAMMUE *et al.*, 1992; ARAGÃO *et al.*, 1999; PARK, CHONG JING *et al.*, 2000). Como observado para Pf2-RP, uma albumina 2S de *P.edulis*, na presença do agente redutor, essa proteína apresentou duas massas moleculares aparentes, um menor com 3.500 Da e um maior de 8000 Da. Da mesma forma, albuminas 2S de *Lupinus albus* e *Lupinus cosentini* foram separadas em duas proteínas distintas em presença de agente redutor (SALMANOWICZ e WEDER, 1997; WEDER *et al.*, 1997). Entretanto, exceções podem ser consideradas no caso da albumina 2S de *Fagopyrum esculentum* Moench. (RADOVIC *et al.*, 1999) e *Helianthus annus* L., (KORTT e CALDWELL, 1990) onde o padrão de polipeptídeos revelou-se o mesmo, independentemente da presença ou ausência de agente redutor. Ainda, análises por espectrometria de massa de *Pa*-AFP1, mostraram uma massa apenas uma molecular semelhante àquela obtida por Tricina-SDS-PAGE quando *Pa*-AFP1 não foi tratada com β -mercaptoetanol, corfirmado assim a massa molecular da proteína purificada.

6 CONCLUSÃO

Os dados aqui apresentados indicam que proteínas e peptídeos da família albumina 2S em adição ao seu comum papel como estoque podem apresentar múltiplas funções. Aparentemente, a atividade antifúngica parece ser mais comum que previamente demonstrado, sendo esta encontrada em várias espécies de plantas (TERRAS *et al.*, 1995; PARK, CHONG JING *et al.*, 2000). Além disso, a funcional multiplicidade de albumina 2S e outros peptídeos de defesa, tais como proteínas ricas em glicinas (PELEGRINI *et al.*, 2009) e defensinas (TAVARES, P. M. *et al.*, 2008) têm se tornado uma característica notória das proteínas de defesa de plantas, mostrando dessa forma, o enorme potencial desses compostos como ferramentas biotecnológicas. Em adição às múltiplas funções previamente apresentadas, as albuminas 2S podem ser sintetizadas como diferentes isoformas, como aqui observado, ampliando a possibilidade de funções e alvos. Esses dados, de acordo como previamente apresentado, sugerem que a família das albuminas 2S poderia ser um grupo multigênico como observado para outros grupos de defesa de plantas (VAN DER KLEI *et al.*, 1993). Esses resultados conduzem a pesquisa por novos peptídeos e proteínas antifúngicas no gênero *Passiflora*, que sugere no mínimo quatro diferentes formas de proteínas 2S antifúngicas, ampliando cada vez mais as perspectivas de encontrar novos peptídeos bioativos em mais de 500 espécies desse gênero (FEUILLET, 2004). Em conclusão, foi apresentado aqui a primeira proteína antifúngica (*Pa-AFP1*) com similaridades às albuminas 2S isoladas de sementes de *Passiflora alata* Curtis, contribuindo assim para aumentar a pequena lista de albuminas 2S com propriedades antifúngicas. Além disso, a proteína dimérica, poderia ser usada no desenvolvimento de produtos biotecnológicos contra *C. gloeosporioides*, um fungo que causa vultosos prejuízos econômicos na produção agrícola de plantas frutíferas (FREEMAN *et al.*, 1996; TEIXEIRA *et al.*, 2006; CHOWDHURY e RAHIM, 2009).

7 REFERÊNCIAS

AILTON, R; OLIVEIRA, A. R. Agressividade de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2009. Disponível em: http://bbeletronica.cnph.embrapa.br/2009/bpd/bpd_53.pdf. Acesso em: 28 de maio de 2010.

AGIZZIO, A. P., CARVALHO, A. O., RIBEIRO, S. F., MACHADO, O. L., ALVES, E. W., OKOROKOV, L. A., SAMARAO, S. S., BLOCH, C., JR., PRATES, M. V. e GOMES, V. M. 2003. A 2S albumin-homologous protein from passion fruit seeds inhibits the fungal growth and acidification of the medium by *Fusarium oxysporum*. **Arch Biochem Biophys**, **416**, n.2, Aug 15, p.188-195.

ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHAFFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W. e LIPMAN, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res**, **25**, n.17, Sep 1, p.3389-3402.

ANTONIW, J. F., RITTER, C. E., PIERPOINT, W. S. e VAN LOON, L. C. 1980. Comparison of Three Pathogenesis-related Proteins from Plants of Two Cultivars of Tobacco Infected with TMV. **J Gen Virol**, **47**, n.1, March 1, 1980, p.79-87.

ARAGÃO, F. J. L., BARROS, L. M. G., SOUSA, M. V. D., GROSSI DE SÁ, M. F., ALMEIDA, E. R. P., GANDER, E. S. e RECH, E. L. 1999. Expression of a methionine-rich storage albumin from the Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K., Lecythidaceae) in transgenic bean plants (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae). **Genetics and Molecular Biology**, **22**, n., p.445-449.

ARBUCKLE, T. E., LIN, Z. e MERY, L. S. 2001. An Exploratory Analysis of the Effect of Pesticide Exposure on the Risk of Spontaneous Abortion in an Ontario Farm Population. **Environmental Health Perspectives**, **109**, n.8, p.851-857.

ASIEGBU, F. O., CHOI, W., LI, G., NAHALKOVA, J. e DEAN, R. A. 2003. Isolation of a novel antimicrobial peptide gene (Sp-AMP) homologue from *Pinus sylvestris* (Scots pine) following infection with the root rot fungus *Heterobasidion annosum*. **FEMS Microbiology Letters**, **228**, n.1, p.27-31.

BATEMAN, A., BIRNEY, E., CERRUTI, L., DURBIN, R., ETWILLER, L., EDDY, S. R., GRIFFITHS-JONES, S., HOWE, K. L., MARSHALL, M. e SONNHAMMER, E. L. L. 2002. The Pfam Protein Families Database. **Nucl. Acids Res.**, **30**, n.1, January 1, 2002, p.276-280.

BERROCAL-LOBO, M., SEGURA, A., MORENO, M., LOPEZ, G., GARCIA-OLMEDO, F. e MOLINA, A. 2002. Snakin-2, an Antimicrobial Peptide from Potato Whose Gene Is Locally Induced by Wounding and Responds to Pathogen Infection. **Plant Physiol.**, **128**, n.3, March 1, 2002, p.951-961.

_____. 2002. Snakin-2, an antimicrobial peptide from potato whose gene is locally induced by wounding and responds to pathogen infection. **Plant Physiol**, **128**, n.3, Mar, p.951-961.

BESELER, C., STALLONES, L., HOPPIN, J. A., ALAVANJA, M. C., BLAIR, A., KEEFE, T. e KAMEL, F. 2006. Depression and pesticide exposures in female spouses of licensed pesticide applicators in the agricultural health study cohort. **J Occup Environ Med**, **48**, n.10, Oct, p.1005-1013.

BESSIRE, M., CHASSOT, C., JACQUAT, A. C., HUMPHRY, M., BOREL, S., PETETOT, J. M., METRAUX, J. P. e NAWRATH, C. 2007. A permeable cuticle in Arabidopsis leads to a strong resistance to Botrytis cinerea. **Embo J**, **26**, n.8, Apr 18, p.2158-2168.

BJORLING-POULSEN, M., ANDERSEN, H. R. e GRANDJEAN, P. 2008. Potential developmental neurotoxicity of pesticides used in Europe. **Environ Health**, **7**, n., p.50.

BOLLER, T. e HE, S. Y. 2009. Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. **Science**, **324**, n.5928, May 8, p.742-744.

BRAGA, M. F., SILVA, J. R., RUGGIERO, C. B., A. M. B., VASCONCELOS, M. A., BATISTA, A. D., PIKANÇO, G. A. e PEIXOTO, M. Demandas para as Pesquisas Visando à Exploração Diversificada. In: Faleiro, F. G., Junqueira, N. T. V., *et al* (Ed.) 2006. Maracujá: demandas para pesquisa: Embrapa cerrados, p.37-39

BRENT, K. J. e HOLLOMON, D. W. 2007. **Fungicide Resistance: The assessment of Risk**. Bristol: Fungicide Resistance Action Committee

BROGDEN, K. A. 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nat Rev Microbiol**, **3**, n.3, Mar, p.238-250.

BROWN, J. C., JOLLIFFE, N. A., FRIGERIO, L. e ROBERTS, L. M. 2003. Sequencespecific, golgi-dependent vacuolar targeting of castor bean 2S albumin. **Plant Journal**, **36**, n., p.711-719.

CAMMUE, B. P., DE BOLLE, M. F., TERRAS, F. R., PROOST, P., VAN DAMME, J., REES, S. B., VANDERLEYDEN, J. e BROEKAERT, W. F. 1992. Isolation and characterization of a novel class of plant antimicrobial peptides form *Mirabilis jalapa* L. seeds. **J Biol Chem**, **267**, n.4, Feb 5, p.2228-2233.

CAMMUE, B. P., THEVISSSEN, K., HENDRIKS, M., EGGERMONT, K., GODERIS, I. J., PROOST, P., VAN DAMME, J., OSBORN, R. W., GUERBETTE, F., KADER, J. C. e ET AL. 1995. A potent antimicrobial protein from onion seeds showing sequence homology to plant lipid transfer proteins. **Plant Physiol**, **109**, n.2, Oct, p.445-455.

CERVI, A. C. 1997. Passifloraceae do Brasil: estudo do gênero *Passiflora* L., subgênero *Passiflora*. **FontQueria**, p.1-92.

CHISHOLM, S. T., COAKER, G., DAY, B. e STASKAWICZ, B. J. 2006. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. **Cell**, **124**, n.4, Feb 24, p.803-814.

CHOON KOO, J., JIN CHUN, H., CHEOL PARK, H., CHUL KIM, M., DUCK KOO, Y., CHEOL KOO, S., MI OK, H., JEONG PARK, S., LEE, S.-H., YUN, D.-J., OH LIM, C., DONG BAHK, J., YEOL LEE, S. e CHO, M. J. 2002. Over-expression of a seed specific hevein-like antimicrobial peptide from *Pharbitis nil* enhances resistance to a fungal pathogen in transgenic tobacco plants. **Plant Molecular Biology**, **50**, n.3, p.441-452.

CHOWDHURY, M. N. A. e RAHIM, M. A. 2009. Integrated Crop Management to Control Anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) of Mango. **Journal of Agriculture and Rural Development**, **7**, n., p.115-120.

CHRISTOPHE, A., JOZEF, D., LUIZ, A. B. C., MARIA JOSÉ, A. M. S., MARC, M. e JOËL, V. 1986. The amino-acid sequence of the 2S sulphur-rich proteins from seeds of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*). **European Journal of Biochemistry**, **159**, n.3, p.597-601.

CHUA, A. C., HSIAO, E. S., YANG, Y. C., LIN, L. J., CHOU, W. M. e TZEN, J. T. 2008. Gene families encoding 11S globulin and 2S albumin isoforms of jelly fig (*Ficus awkeotsang*) Achenes. **Biosci Biotechnol Biochem**, **72**, n.2, Feb, p.506-513.

CONAB. 2009. Boletim agrometeorológico. **Companhia Nacional de Abastecimento**, abril, n., p.31.

CRAIK, D. J. Discovery and applications of the plant cyclotides. **Toxicon, In Press, Corrected Proof**, n.

CRAIK, D. J., MYLNE, J. S. e DALY, N. L. 2010. Cyclotides: macrocyclic peptides with applications in drug design and agriculture. **Cell Mol Life Sci**, **67**, n.1, Jan, p.9-16.

DANGL, J. L. e JONES, J. D. 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. **Nature**, **411**, n.6839, Jun 14, p.826-833.

DHAWAN, K., KUMAR, S. e SHARMA, A. 2001. Anxiolytic activity of aerial and underground parts of *Passiflora incarnata*. **Fitoterapia**, **72**, n.8, Dec, p.922-926.

DURRANT, W. E. e DONG, X. 2004. Systemic acquired resistance. **Annu Rev Phytopathol**, **42**, n., p.185-209.

DUVICK, J. P., ROOD, T., RAO, A. G. e MARSHAK, D. R. 1992. Purification and characterization of a novel antimicrobial peptide from maize (*Zea mays* L.) kernels. **J Biol Chem**, **267**, n.26, Sep 15, p.18814-18820.

EDMAN, P. 1949. A method for the determination of amino acid sequence in peptides. **Arch Biochem**, **22**, n.3, Jul, p.475.

EKINCI, D. e BEYDEMIR, S. 2010. Risk assessment of pesticides and fungicides for acid-base regulation and salt transport in rainbow trout tissues. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, **97**, n.1, p.66-70.

EPPLE, P., APEL, K. e BOHLMANN, H. 1997. Overexpression of an endogenous thionin enhances resistance of Arabidopsis against Fusarium oxysporum. **Plant Cell**, **9**, n., p.509-520.

FARR, D. F., AIME, M. C., ROSSMAN, A. Y. e PALM, M. E. 2006. Species of Colletotrichum on Agavaceae. **Mycological Research**, **110**, n.12, p.1395-1408.

FEUILLET, C. 2004. Passiflora phellos, a new species in sugenus Passiflora (Passifloraceae). **Novon**, **14**, n., p.285-287.

FLORES, T., ALAPE-GIRON, A., FLORES-DIAZ, M. e FLORES, H. E. 2002. Ocatin. A Novel Tuber Storage Protein from the Andean Tuber Crop Oca with Antibacterial and Antifungal Activities. **Plant Physiol.**, **128**, n.4, April 1, 2002, p.1291-1302.

FRANCO, O. L., MELO, F. R., MENDES, P. A., PAES, N. S., YOKOYAMA, M., COUTINHO, M. V., BLOCH, C., JR. e GROSSI-DE-SA, M. F. 2005. Characterization of two Acanthoscelides obtectus alpha-amylases and their inactivation by wheat inhibitors. **J Agric Food Chem**, **53**, n.5, Mar 9, p.1585-1590.

FRANCO, O. L., MURAD, A. M., LEITE, J. R., MENDES, P. A., PRATES, M. V. e BLOCH, C., JR. 2006. Identification of a cowpea gamma-thionin with bactericidal activity. **Febs J**, **273**, n.15, Aug, p.3489-3497.

FREEMAN, S., KATAN, T. e SHABI, E. 1995. Characterization of Colletotrichum gloeosporioides Isolates from Avocado and Almond Fruits with Molecular and Pathogenicity Tests. **APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY**, **62**, n.3, p.1014-1020.

_____. 1996. Characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from avocado and almond fruits with molecular and pathogenicity tests. **Appl Environ Microbiol**, **62**, n.3, Mar, p.1014-1020.

_____. 1998. Characterization of *Colletotrichum* Species Responsible for Anthracnose Diseases of Various Fruits. **Plant Disease**, **82**, n.6, p.596-605.

FUJIMURA, M., IDEGUCHI, M., MINAMI, Y., WATANABE, K. e TADERA, K. 2005. Amino Acid Sequence and Antimicrobial Activity of Chitin-Binding Peptides, Pp-AMP 1 and Pp-AMP 2, from Japanese Bamboo Shoots (*Phyllostachys pubescens*). **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, **69**, n.3, p.642-645.

GALAU, G. A., WANG, H. Y. e HUGHES, D. W. 1992. Cotton Mat5-A (C164) Gene and Mat5-D cDNAs Encoding Methionine-Rich 2S Albumin Storage Proteins. **Plant Physiol**, **99**, n.2, Jun, p.779-782.

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

GARINO, C., ZUIDMEER, L., MARSH, J., LOVEGROVE, A., MORATI, M., VERSTEEG, S., SCHILTE, P., SHEWRY, P., ARLORIO, M. e VAN REE, R. 2010. Isolation, cloning, and characterization of the 2S albumin: A new allergen from hazelnut. **Mol Nutr Food Res**, Apr 1.

GENOVESE, M. I. e LAJOLO, F. M. 1996. In Vitro Digestibility of Albumin Proteins from *Phaseolus vulgaris* L. Effect of Chemical Modification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **44**, n.10, p.3022-3028.

GISI, U. e COHEN, Y. 1996. RESISTANCE TO PHENYLAMIDE FUNGICIDES: a case study with *phytophthora infestans* involving mating type and race structure. **Annu Rev Phytopathol**, **34**, n., p.549-572.

GLAZEBROOK, J. 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. **Annu Rev Phytopathol**, **43**, n., p.205-227.

GOHRE, V. e ROBATZEK, S. 2008. Breaking the barriers: microbial effector molecules subvert plant immunity. **Annu Rev Phytopathol**, **46**, n., p.189-215.

GRAYER, R. J. e KOKUBUN, T. 2001. Plant-fungal interactions: the search for phytoalexins and other antifungal compounds from higher plants. **Phytochemistry**, **56**, n.3, Feb, p.253-263.

GREENSHIELDS, D. L. e JONES, J. D. G. 2008. Plant Pathogen Effectors: Getting Mixed Messages. **18**, n.3, p.R128-R130.

HALL, T. BioEdit: Biological sequence alignment editor for Windows 95/98/NT/2000/XP 1999.

HAMMAMI, R., BEN HAMIDA, J., VERGOTEN, G. e FLISS, I. 2009. PhytAMP: a database dedicated to antimicrobial plant peptides. **Nucleic Acids Res**, **37**, n.Database issue, Jan, p.D963-968.

HAMMOND-KOSACK, K. E. e RUDD, J. J. 2008. Plant resistance signalling hijacked by a necrotrophic fungal pathogen. **Plant Signal Behav**, **3**, n.11, Nov, p.993-995.

HARA-NISHIMURA, I., SHIMADA, T., HATANO, K., TAKEUCHI, Y. e NISHIMURA, M. 1998. Transport of storage proteins to protein storage vacuoles is mediated by large precursor-accumulating vesicles. **Plant Cell**, **10**, n., p.825-836.

HARRISON, S. J., MCMANUS, A. M., MARCUS, J. P., GOULTER, K. C., GREEN, J. L., NIELSEN, K. J., CRAIK, D. J., MACLEAN, D. J. e MANNERS, J. M. 1999. Purification and characterization of a plant antimicrobial peptide expressed in *Escherichia coli*. **Protein Expr Purif**, **15**, n.2, Mar, p.171-177.

HARTMANN, R. e MEISEL, H. 2007. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. **Curr Opin Biotechnol**, **18**, n.2, Apr, p.163-169.

HAWKSWORTH, D. L. 1991. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. **Mycological Research**, **95**, n.6, p.641-655.

HOLLOMON, D. W. e BRENT, K. J. 2009. Combating plant diseases--the Darwin connection. **Pest Manag Sci**, **65**, n.11, Nov, p.1156-1163.

HOPPIN, J. A., VALCIN, M., HENNEBERGER, P. K., KULLMAN, G. J., UMBACH, D. M., LONDON, S. J., ALAVANJA, M. C. e SANDLER, D. P. 2007. Pesticide use and chronic bronchitis among farmers in the Agricultural Health Study. **Am J Ind Med**, **50**, n.12, Dec, p.969-979.

HUANG, R. H., XIANG, Y., TU, G. Z., ZHANG, Y. e WANG, D. C. 2004. Solution structure of Eucommia antifungal peptide: a novel structural model distinct with a five-disulfide motif. **Biochemistry**, **43**, n.20, May 25, p.6005-6012.

HYDE, K. D., CAI, L., CANNON, P. F., CROUCH, J. A., CROUS, P. W., DAMM, U., GOODWIN, P. H., CHEN, H., JOHNSTON, P. R., JONES, E. B. G., LIU, Z. Y., MCKENZIE, E. H. C., MORIWAKI, J., NOIREUNG, P., PENNYCOOK, S. R., PFENNING, L. H., PRIHASTUTI, H., SATO, T., SHIVAS, R. G., TAN, Y. P., TAYLOR, P. W. J., WEIR, B. S., YANG, Y. L. e ZHANG, J. Z. 2009. Colletotrichum – names in current use. **Fungal Diversity**, **39**, n., p.147-182.

IRITI, M. e FAORO, F. 2009. Chemical diversity and defence metabolism: how plants cope with pathogens and ozone pollution. **Int J Mol Sci**, **10**, n.8, Oct, p.3371-3399.

IRWIN, S. D., KEEN, J. N., FINDLAY, J. B. C. e LORD, J. M. 1990. The Ricinus communis 2S albumin precursor: A single preproprotein may be processed into two different heterodimeric storage proteins. **Mol.Gen. Genet**, **222**, n., p.400-408.

JOSEFSSON, L. G., LENMAN, M., ERICSON, M. L. e RASK, L. 1987. Structure of a gene encoding the 1.7 S storage protein, napin, from Brassica napus. **J Biol Chem**, **262**, n.25, Sep 5, p.12196-12201.

JUDD, W., CAMPBELL, C., KELLOG, E., STEVENS, P. e DONOGHU, M. 2008. **Sistemática Vegetal: um enfoque filogenético**. Artmed

JUNQUEIRA, N. T. V., ANSELMO, R. M., PINTO, A. C. Q., RAMOS, V. H. V., PEREIRA, A. e NASCIMENTO, A. C. 2001. **Severidade da Antracnose e perda de matéria fresca do Maracujá-Doce em dois ambientes de armazenamento**. Brasília: Embrapa Cerrados

KAMALDEEP, D., SURESH, K. e ANUPAM, S. 2003. Aphrodisiac activity of methanol extract of leaves of *Passiflora incarnata* Linn. in mice. **Phytotherapy Research**, **17**, n.4, p.401-403.

KANT, P., LIU, W.-Z. e PAULS, K. P. 2009. PDC1, a corn defensin peptide expressed in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris* inhibits growth of *Fusarium graminearum*. **Peptides**, **30**, n.9, p.1593-1599.

KNIGHT, S. C., ANTHONY, V. M., BRADY, A. M., GREENLAND, A. J., HEANEY, S. P., MURRAY, D. C., POWELL, K. A., SCHULZ, M. A., SPINKS, C. A., WORTHINGTON, P. A. e YOULE, D. 1997. Rationale and perspectives on the development of fungicides. **Annual Review of Phytopathology**, **35**, n., p.349-372.

KOCH, E. e SLUSARENKO, A. 1990. Arabidopsis is susceptible to infection by a downy mildew fungus. **Plant Cell**, **2**, n.5, May, p.437-445.

KOO, J. C., LEE, S. Y., CHUN, H. J., CHEONG, Y. H., CHOI, J. S., KAWABATA, S., MIYAGI, M., TSUNASAWA, S., HA, K. S., BAE, D. W., HAN, C. D., LEE, B. L. e CHO, M. J. 1998. Two hevein homologs isolated from the seed of *Pharbitis nil* L. exhibit potent antifungal activity. **Biochim Biophys Acta**, **1382**, n.1, Jan 15, p.80-90.

KORTT, A. A. e CALDWELL, J. B. 1990. Low molecular weight albumins from sunflower seed: identification of a methionine-rich albumin. **Phytochemistry**, **29**, n.9, p.2805-2810.

KOYANO, S., TAKAGI, K., TESHIMA, R. e SAWADA, J. 2006. Molecular Cloning of cDNA, Recombinant Protein Expression and Characterization of a Buckwheat 16-kDa Major Allergen. **International Archives of Allergy and Immunology**, **140**, n.1, p.73-81.

KROJ, T., RUDD, J. J., NURNBERGER, T., GABLER, Y., LEE, J. e SCHEEL, D. 2003. Mitogen-activated protein kinases play an essential role in oxidative burst-independent expression of pathogenesis-related genes in parsley. **J Biol Chem**, **278**, n.4, Jan 24, p.2256-2264.

LAGRIMINI, L. M., BURKHART, W., MOYER, M. e ROTHSTEIN, S. 1987. Molecular cloning of complementary DNA encoding the lignin-forming peroxidase from tobacco: Molecular analysis and tissue-specific expression. **Proc Natl Acad Sci U S A**, **84**, n.21, Nov, p.7542-7546.

LEHMANN, K., SCHWEIMER, K., REESE, G., RANDOW, S., SUHR, M., BECKER, W. M., VIETHS, S. e ROSCH, P. 2006. Structure and stability of 2S albumin-type peanut allergens: implications for the severity of peanut allergic reactions. **Biochem J**, **395**, n.3, May 1, p.463-472.

LEHRER, R. I., LICHTENSTEIN, A. K. e GANZ, T. 1993. Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. **Annu Rev Immunol**, **11**, n., p.105-128.

LEYK, S., BINDER, C. R. e NUCKOLS, J. R. 2009. Spatial modeling of personalized exposure dynamics: the case of pesticide use in small-scale agricultural production landscapes of the developing world. **Int J Health Geogr**, **8**, n., p.17.

LIGGITT, J., JENKINSON, P. e PARRY, W. P. 1997. The role of saprophytic microflora in the development of Fusarium ear blight of winter wheat caused by Fusarium culmorum. **Crop Prot.**, **16679–685**, n., p.679–685.

LIN, J., SHEWRY, P. R., ARCHER, D. B., BEYER, K., NIGGEMANN, B., HAAS, H., WILSON, P. e ALCOCER, M. J. C. 2006. The Potential Allergenicity of Two 2S Albumins from Soybean (*Glycine max*): A Protein Microarray Approach. **International Archives of Allergy and Immunology**, **141**, n.2, p.91-102.

LINTHORST, H. J., DANHASH, N., BREDERODE, F. T., VAN KAN, J. A., DE WIT, P. J. e BOL, J. F. 1991. Tobacco and tomato PR proteins homologous to win and pro-hevein lack the "hevein" domain. **Mol Plant Microbe Interact**, **4**, n.6, Nov-Dec, p.586-592.

MANDAL, S. M., DEY, S., MANDAL, M., SARKAR, S., MARIA-NETO, S. e FRANCO, O. L. 2009. Identification and structural insights of three novel antimicrobial peptides isolated from green coconut water. **Peptides**, **30**, n.4, p.633-637.

MARCUS, J. P., GREEN, J. L., GOULTER, K. C. e MANNERS, J. M. 1999. A family of antimicrobial peptides is produced by processing of a 7S globulin protein in *Macadamia integrifolia* kernels. **Plant J**, **19**, n.6, Sep, p.699-710.

_____. 1999. A family of antimicrobial peptides is produced by processing of a 7S globulin protein in *Macadamia integrifolia* kernels. **The Plant Journal**, **19**, n.6, p.699-710.

MARTIN, M. e GARCIA-FIGUERES, F. 1999. *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* cause anthracnose on olives. **European Journal of Plant Pathology**, **105**, n., p.733-741.

MATINS, I., MELLO, S. C. M., ÁVILA, Z. R., PÁDUA, R. R. e PEIXOTO, J. R. 2005. Produção de *Colletotrichum gloeosporioides* em meio líquido. **Brasília-DF. Embrapa recursos genéticos e biotecnologia. Circular técnica 45. pg**, p.1-6.

MELCHERS, L. S., APOTHEKER-DE GROOT, M., VAN DER KNAAP, J. A., PONSTEIN, A. S., SELA-BUURLAGE, M. B., BOL, J. F., CORNELISSEN, B. J., VAN DEN ELZEN, P. J. e LINTHORST, H. J. 1994. A new class of tobacco chitinases homologous to bacterial exo-chitinases displays antifungal activity. **Plant J**, **5**, n.4, Apr, p.469-480.

MENDGEN, K. e HAHN, M. 2002. Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. **Trends in Plant Science**, **7**, n.8, p.352-356.

MENÉNDEZ-ARIAS, L., MONSALVE, R. I., GAVILANES, J. e RODRÍGUEZ, R. 1987. Molecular and spectroscopic characterisation of a low molecular weight seed storage protein from yellow mustard (*Sinapis alba* L.). **International Journal of Biochemistry**, **19**, n.10, p.899-907.

MÉTRAUX, J. P., STREIT, L. e STAUB, T. 1988. A pathogenesis-related protein in cucumber is a chitinase. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, **33**, n.1, p.1-9.

MIAO, V. P., COVERT, S. F. e VANETTEN, H. D. 1991. A fungal gene for antibiotic resistance on a dispensable ("B") chromosome. **Science**, **254**, n.5039, Dec 20, p.1773-1776.

MICHAUD, J. P. 2001. Responses of two ladybeetles to eight fungicides used in Florida citrus: implications for biological control. **J Insect Sci**, **1**, n., p.6.

MONK, B. C. e PERLIN, D. S. 1994. Fungal plasma membrane proton pumps as promising new antifungal targets. **Crit Rev Microbiol**, **20**, n.3, p.209-223.

MONTANHER, A. B., ZUCOLOTTO, S. M., SCHENKEL, E. P. e FRODE, T. S. 2007. Evidence of anti-inflammatory effects of *Passiflora edulis* in an inflammation model. **J Ethnopharmacol**, **109**, n.2, Jan 19, p.281-288.

MÜNCH, S., LINGNER, U., FLOSS, D. S., LUDWIG, N., SAUER, N. e DEISING, H. B. 2008. The hemibiotrophic lifestyle of *Colletotrichum* species. **Journal of Plant Physiology**, **165**, n.1, p.41-51.

NASSIRI-ASL, M., SHARIATI-RAD, S. e ZAMANSOLTANI, F. 2007. Anticonvulsant effects of aerial parts of *Passiflora incarnata* extract in mice: involvement of benzodiazepine and opioid receptors. **BMC Complement Altern Med**, **7**, n., p.26.

NGUYEN, P., PETTERSSON, O. V., OLSSON, P. e LILJEROTH, E. 2009. Virulência de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* de populações selvagens de *Stylosanthes* spp. **Europe Journal of Plant Pathology**, **127**, n., p.73-87.

NISCHWITZ, C., LANGSTON, D., SANDERS, H. F., TORRANCE, R., LEWIS, K. J. e GITAITIS, R. D. 2008. First Report of *Colletotrichum gloeosporioides* Causing "Twister Disease"™ of Onion (*Allium cepa*) in Georgia. **Plant Disease**, **92**, n.6, p.974-974.

ODINTSOVA, T. I., ROGOZHIN, E. A., SKLYAR, I. V., MUSOLYAMOV, A. K., KUDRYAVTSEV, A. M., PUKHALSKY, V. A., SMIRNOV, A. N., GRISHIN, E. V. e EGOROV, T. A. 2010. Antifungal activity of storage 2S albumins from seeds of the invasive weed dandelion *Taraxacum officinale* Wigg. **Protein Pept Lett**, **17**, n.4, Apr 1, p.522-529.

OKUSHIMA, Y., KOIZUMI, N., KUSANO, T. e SANO, H. 2000. Secreted proteins of tobacco cultured BY2 cells: identification of a new member of pathogenesis-related proteins. **Plant Mol Biol**, **42**, n.3, Feb, p.479-488.

OLIVER, R. e IPCHO, S. 2004. *Arabidopsis* pathology breathes new life into the necrotrophs-vs.-biotrophs classification of fungal pathogens. **Molecular Plant Pathology**, **5**, n.4, p.347-352.

ORSI, L., DELABRE, L., MONNEREAU, A., DELVAL, P., BERTHOU, C., FENAU, P., MARIT, G., SOUBEYRAN, P., HUGUET, F., MILPIED, N., LEPORRIER, M., HEMON, D., TROUSSARD, X. e CLAVEL, J. 2009. Occupational exposure to pesticides and lymphoid neoplasms among men: results of a French case-control study. **Occup Environ Med**, **66**, n.5, May, p.291-298.

PANDYA, M. J., SESSIONS, R. B., WILLIAMS, P. B., DEMPSEY, C. E., TATHAM, A. S., SHEWRY, P. R. e CLARKE, A. R. 2000. Structural characterization of a methionine-rich, emulsifying protein from sunflower seed. **Proteins**, **38**, n.3, Feb 15, p.341-349.

PANTOJA-UCEDA, D., BRUIX, M., SANTORO, J., RICO, M., MONSALVE, R. e VILLALBA, M. 2002. Solution structure of allergenic 2 S albumins. **Biochem Soc Trans**, **30**, n.Pt 6, Nov, p.919-924.

PARK, C. J., PARK, C. B., HONG, S.-S., LEE, H.-S., LEE, S. Y. e KIM, S. C. 2000. Characterization and cDNA cloning of two glycine- and histidine-rich antimicrobial peptides from the roots of shepherd's purse, *Capsella bursa-pastoris*. **Plant Molecular Biology**, **44**, n.2, p.187-197.

PARK, C. J., PARK, C. B., HONG, S. S., LEE, H. S., LEE, S. Y. e KIM, S. C. 2000. Characterization and cDNA cloning of two glycine- and histidine-rich antimicrobial peptides from the roots of shepherd's purse, *Capsella bursa-pastoris*. **Plant Mol Biol**, **44**, n.2, Sep, p.187-197.

PARRENT, J. L., JAMES, T. Y., VASAITIS, R. e TAYLOR, A. F. 2009. Friend or foe? Evolutionary history of glycoside hydrolase family 32 genes encoding for sucrolytic activity in fungi and its implications for plant-fungal symbioses. **BMC Evol Biol**, **9**, n., p.148.

PELEGRINI, P., FARIAS, L., SAUDE, A., COSTA, F., BLOCH, C., SILVA, L., OLIVEIRA, A., GOMES, C., SALES, M. e FRANCO, O. 2009. A Novel Antimicrobial Peptide from *Crotalaria pallida* Seeds with Activity Against Human and Phytopathogens. **Current Microbiology**, **59**, n.4, p.400-404.

RADOVIC, R. S., MAKSIMOVIC, R. V., BRKLJACIC, M. J., VARKONJI GASIC, I. E. e SAVIC, P. A. 1999. 2S Albumin from Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) Seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **47**, n.4, p.1467-1470.

REGENTE, M. e DE LA CANAL, L. 2001. Do sunflower 2S albumins play a role in resistance to fungi? **Plant Physiology and Biochemistry**, **39**, n.5, p.407-413.

RIBEIRO, S. F. F., CARVALHO, A. O., DA CUNHA, M., RODRIGUES, R., CRUZ, L. P., MELO, V. M. M., VASCONCELOS, I. M., MELO, E. J. T. e GOMES, V. M. 2007. Isolation and characterization of novel peptides from chilli pepper seeds: Antimicrobial activities against pathogenic yeasts. **Toxicon**, **50**, n.5, p.600-611.

RICHARD P, O. e SIMON V. S, I. 2004. Arabidopsis pathology breathes new life into the necrotrophs-vs.-biotrophs classification of fungal pathogens. **Molecular Plant Pathology**, **5**, n.4, p.347-352.

RICO, M., BRUIX, M., GONZALEZ, C., MONSALVE, R. I. e RODRIGUEZ, R. 1996. 1H NMR assignment and global fold of napin Bnlb, a representative 2S albumin seed protein. **Biochemistry**, **35**, n.49, Dec 10, p.15672-15682.

RUGGIERO, C. e MARTINS, A. B. J. Implatação da cultura e propagação. In: Ruggiero, C. (Ed.) 1987. Legis Summa. Ribeirão Preto: Legis Summa,

RYALS, J. A., NEUENSCHWANDER, U. H., WILLITS, M. G., MOLINA, A., STEINER, H. Y. e HUNT, M. D. 1996. Systemic Acquired Resistance. **Plant Cell**, **8**, n.10, Oct, p.1809-1819.

SALMANOWICZ, B. P. e WEDER, J. K. P. 1997. Primary structure of 2S albumin from seeds of *Lupinus albus*. **Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A**, **204**, n.2, p.129-135.

SALOMÃO, T. A. e ANDRADE, V. M. M. Botânica. In: Ruggiero, C. (Ed.) 1987. Maracujá. Ribeirão Preto: Legis Summa, p.20-39

SEGURA, A., MORENO, M., MADUEÑA±O, F., MOLINA, A. e GARCÍA-A-OLMEDO, F. 1999. Snakin-1, a Peptide from Potato That Is Active Against Plant Pathogens. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, **12**, n.1, p.16-23.

SELS, J., MATHYS, J., DE CONINCK, B. M. A., CAMMUE, B. P. A. e DE BOLLE, M. F. C. 2008. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. **Plant Physiology and Biochemistry**, **46**, n.11, p.941-950.

SERRANO, R. 1988. Structure and function of proton translocating ATPase in plasma membranes of plants and fungi. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes**, **947**, n.1, p.1-28.

SILVA-SANCHEZ, C., DE LA ROSA, A. P. B., LEÓN-GALVAN, M. F., DE LUMEN, B. O., DE LEON-RODRIGUEZ, A. e DE MEJIA, E. G. 2008. Bioactive Peptides in Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) Seed. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **56**, n.4, p.1233-1240.

SIRIKANTARAMAS, S., YAMAZAKI, M. e SAITO, K. 2009. A survival strategy: the coevolution of the camptothecin biosynthetic pathway and self-resistance mechanism. **Phytochemistry**, **70**, n.15-16, Oct-Nov, p.1894-1898.

SIVASITHAMPARAM, K., DIXON, K. W. e BARRETT, R. L. 2002. **Microorganisms in plant conservation and biodiversity**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 378 p.

SNELDERS, E., HUIS IN 'T VELD, R. A., RIJS, A. J., KEMA, G. H., MELCHERS, W. J. e VERWEIJ, P. E. 2009. Possible environmental origin of resistance of *Aspergillus fumigatus* to medical triazoles. **Appl Environ Microbiol**, **75**, n.12, Jun, p.4053-4057.

SNELDERS, E., VAN DER LEE, H. A., KUIJPERS, J., RIJS, A. J., VARGA, J., SAMSON, R. A., MELLADO, E., DONDEERS, A. R., MELCHERS, W. J. e VERWEIJ, P. E. 2008. Emergence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* and spread of a single resistance mechanism. **PLoS Med**, **5**, n.11, Nov 11, p.e219.

SOMSSICH, I. E., SCHMELZER, E., BOLLMANN, J. e HAHLBROCK, K. 1986. Rapid activation by fungal elicitor of genes encoding "pathogenesis-related" proteins in cultured parsley cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, **83**, n.8, Apr, p.2427-2430.

STRANGE, R. N. e SCOTT, P. R. 2005. Plant disease: a threat to global food security. **Annual Review Phytopathology**, **43**, n., p.83-116.

SZABO, L. J. e BUSHNELL, W. R. 2001. Hidden robbers: the role of fungal haustoria in parasitism of plants. **Proc Natl Acad Sci U S A**, **98**, n.14, Jul 3, p.7654-7655.

TAILOR, R. H., ACLAND, D. P., ATTENBOROUGH, S., CAMMUE, B. P. A., EVANS, I. J., OSBORN, R. W., RAY, J. A., REES, S. B. e BROEKAERT, W. F. 1997. A Novel Family of Small Cysteine-rich Antimicrobial Peptides from Seed of *Impatiens balsamina* Is Derived from a Single Precursor Protein. **Journal of Biological Chemistry**, **272**, n.39, September 26, 1997, p.24480-24487.

TAM, J. P., LU, Y.-A., YANG, J.-L. e CHIU, K.-W. 1999. An unusual structural motif of antimicrobial peptides containing end-to-end macrocycle and cystine-knot disulfides. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **96**, n.16, August 3, 1999, p.8913-8918.

TAPIA-TUSSELL, R., QUIJANO-RAMAYO, A., CORTES-VELAZQUEZ, A., LAPPE, P., LARQUE-SAAVEDRA, A. e PEREZ-BRITO, D. 2008. PCR-Based Detection and Characterization of the Fungal Pathogens *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum capsici* Causing Anthracnose in Papaya (*Carica papaya* L.) in the Yucatan Peninsula. **Molecular Biotechnology**, **40** n., p.293-298.

TATYANA, I. O., ALEXANDER, A. V., ANNA, A. S., ALEXANDER, K. M., EKATERINA, I. F., NATALIA, V. K., EUGENE, A. R., TATYANA, V. K., VITALII, A. P., EUGENE, V. G. e TSEZI, A. E. 2009. A novel antifungal hevein-type peptide from *Triticum kiharaeseeds* with a unique 10-cysteine motif. **FEBS Journal**, **276**, n.15, p.4266-4275.

TAVARES, L. S., SANTOS, M. D. O., VICCINI, L. F., MOREIRA, J. S., MILLER, R. N. G. e FRANCO, O. L. 2008. Biotechnological potential of antimicrobial peptides from flowers. **Peptides**, **29**, n.10, p.1842-1851.

TAVARES, P. M., THEVISSSEN, K., CAMMUE, B. P. A., FRANCOIS, I. E. J. A., BARRETO-BERGTER, E., TABORDA, C. P., MARQUES, A. F., RODRIGUES, M. L. e NIMRICHTER, L. 2008. In vitro activity of the antifungal plant defensin RsAFP2 against *Candida* isolates and its in vivo efficacy in prophylactic murine models of candidiasis. **Antimicrob. Agents Chemother.**, September 29, 2008, p.AAC.00448-00408.

TEIXEIRA, F. R., LIMA, M. C. O. P., ALMEIDA, H. O., ROMEIRO, R. S., SILVA, D. J. H., PEREIRA, P. R. G., FONTES, E. P. B. e BARACAT-PEREIRA, M. C. 2006. Bioprospection of Cationic and Anionic Antimicrobial Peptides from Bell Pepper Leaves for Inhibition of *Ralstonia solanacearum* and *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* Growth. **Journal of Phytopathology**, **154**, n.7-8, p.418-421.

_____. 2006. Bioprospection of Cationic and Anionic Antimicrobial Peptides from Bell Pepper Leaves for Inhibition of *Ralstonia solanacearum* and *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* Growth. **Journal of Phytopathology**, **154**, n., p.418-421.

TERRAS, F. R. G., EGGERMONT, K., KOVALEVA, V., RAIKHEL, N. V., OSBORN, R. W., KESTER, A., REES, S. B., TORREKENS, S., LEUVEN, F. V., VANDERLEYDEN, J., CAMMUE, B. P. A. e BROEKAERT, W. F. 1995. Small Cysteine-Rich Antifungal Proteins from Radish: Their Role in Host Defense. **Plant Cell**, **7**, n.5, May 1, 1995, p.573-588.

THAN, P. P., PRIHASTUTI, H., PHOULIVONG, S., TAYLOR, P. W. e HYDE, K. D. 2008. Chilli anthracnose disease caused by *Colletotrichum* species. **J Zhejiang Univ Sci B**, **9**, n.10, Oct, p.764-778.

THOMPSON, J. D., HIGGINS, D. G. e GIBSON, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res**, **22**, n.22, Nov 11, p.4673-4680.

TSUNEDA, A., WANG, W., TSUNEDA, I. e CURRAH, R. S. 2009. Endomembrane system of aspen root cells plays a key role in defense against a common fungal root endophyte, *Cryptosporiopsis radicola*. **Mycologia**, **101**, n.2, Mar-Apr, p.182-189.

VAN DER KLEI, H., VAN DAMME, J., CASTEELS, P. e KREBBERS, E. 1993. A fifth 2S albumin isoform is present in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiol**, **101**, n.4, Apr, p.1415-1416.

VAN LOON, L. C. e VAN STRIEN, E. A. 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, **55**, n., p.85-87.

VERA, P. e CONEJERO, V. 1988. Pathogenesis-Related Proteins of Tomato : P-69 as an Alkaline Endoproteinase. **Plant Physiol**, **87**, n.1, May, p.58-63.

VERONESE, P., RUIZ, M. T., COCA, M. A., HERNANDEZ-LOPEZ, A., LEE, H., IBEAS, J. I., DAMSZ, B., PARDO, J. M., HASEGAWA, P. M., BRESSAN, R. A. e NARASIMHAN, M. L. 2003. In defense against pathogens. Both plant sentinels and foot soldiers need to know the enemy. **Plant Physiol**, **131**, n.4, Apr, p.1580-1590.

VERWEIJ, P. E., SNELDERS, E., KEMA, G. H., MELLADO, E. e MELCHERS, W. J. 2009. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a side-effect of environmental fungicide use? **Lancet Infect Dis**, **9**, n.12, Dec, p.789-795.

VITALE, A. e HINZ, G. 2005. Sorting of proteins to storage vacuoles: how many mechanisms? **Trends in Plant Science**, **10**, n.7, p.316-323.

WAARD, M. A., GEORGOPOULOS, S. G., HOLLOMON, D. W., ISHII, H., LEROUX, P., RAGSDALE, N. N. e SCHWINN, F. J. 1993. Chemical control of plant diseases: problems and prospects. **Annual Review Phytopathology**, **31**, n., p.403-421.

WANG, X. e BUNKERS, G. J. 2000. Potent heterologous antifungal proteins from cheeseweed (*Malva parviflora*). **Biochem Biophys Res Commun**, **279**, n.2, Dec 20, p.669-673.

WEDER, J. K. P., SALMANOWICZ, B. P. e KÖHLER, P. 1997. Primary structure of 2S albumin from seeds of *Lupinus cosentinii*. **Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A**, **205**, n.6, p.452-456.

WU, J. e MUIR, A. D. 2008. Comparative Structural, Emulsifying, and Biological Properties of 2 Major Canola Proteins, Cruciferin and Napin. **Journal of Food Science**, **73**, n.3, p.C210-C216.

XU, X., JIN, F., YU, X., REN, S., HU, J. e ZHANG, W. 2007. High-level expression of the recombinant hybrid peptide cecropinA(1-8)-magainin2(1-12) with an ubiquitin fusion partner in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, **55**, n.1, p.175-182.

YOUNT, N. Y. e YEAMAN, M. R. 2004. Multidimensional signatures in antimicrobial peptides. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **101**, n.19, May 11, 2004, p.7363-7368.

ZIGUO, Z., DAVID, B. C. e HANS, T.-C. 1995. Germin-like oxalate oxidase, a H₂O₂-producing enzyme, accumulates in barley attacked by the powdery mildew fungus. **The Plant Journal**, **8**, n.1, p.139-145.

ZUO, W.-N. e SUN, S. S. M. 1996. Purification and Characterization of the Methionine-Rich 2S Seed Proteins from the Brazil Nut Family (*Lecythidaceae*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **44**, n.5, p.1206-1210.

**ANEXO A - Identification of a *Passiflora alata* Curtis dimeric peptide
showing identity with 2S albumins**

