



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA/ BIOTECNOLOGIA

**João Suender Moreira**

**IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS ANTIMICROBIANAS DE FLORES  
DE ALECRIM-PIMENTA (*Lippia sidoides*): UMA NOVA  
ESTRATÉGIA NO COMBATE A PATÓGENOS**

Juiz de Fora

2009

**JOÃO SUENDER MOREIRA**

**IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS ANTIMICROBIANAS DE FLORES  
DE ALECRIM-PIMENTA (*Lippia sidoides*): UMA NOVA  
ESTRATÉGIA NO COMBATE A PATÓGENOS**

Dissertação de mestrado do curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, para obtenção do título de Mestre na área de Genética e Biotecnologia.

**Orientador: Octávio Luiz Franco**

**Co-orientadora: Nádia Rezende Barbosa**

Juiz de Fora

2009

MOREIRA, J. S. Identificação de proteínas antimicrobianas de flores de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides*): uma nova estratégia no combate a patógenos. Juiz de Fora (MG) 2009. 154f. Dissertação de Mestrado (Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas) Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora.

**JOÃO SUENDER MOREIRA**

**IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS ANTIMICROBIANAS DE FLORES  
DE ALECRIM-PIMENTA (*Lippia sidoides*): UMA NOVA  
ESTRATÉGIA NO COMBATE A PATÓGENOS**

Dissertação de mestrado do curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, para obtenção do título de Mestre na área de Genética e Biotecnologia.

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>.Nádia Rezende Barbosa  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Simoni Campos Dias  
Universidade Católica de Brasília

---

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

## DEDICO ESSA DISSERTAÇÃO

*À Deus, presente no mais íntimo do meu ser, morada de minha alma, fonte infinita de amor...*

*Aos meus pais, Maria e Elson, que me trouxeram aqui, que sempre me apoiaram como podem e que mesmo à distância, continuam sempre me apoiando...*

*À minha namorada, Lis, pelo apoio, compreensão e respeito de sempre...*

*À minha filha, Sophia, meu sol...*

*A todos os meus irmãos, por desejarem sempre o melhor para mim...*

*À baba...*

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof.Dr. Octávio Luiz Franco,  
por acreditar em mim, pelas palavras  
sábias, pelo incentivo e apoio sempre...

À Universidade Católica de Brasília, por permitir  
a realização dos meus experimentos no CAPB...

Ao Prof. Dr. Marcelo O. Santos,  
pelo apoio em Juiz de Fora...

À minha co-orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nádia Rezende Barbosa,  
por me disponibilizar o Laboratório *Niqua*,  
e por todas as sugestões...

Ao Prof. Dr. Lyderson Facio Viccini,  
pelas amostras de *Lippia*...

À prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ilka Vasconcelos,  
Pelo seqüenciamento das proteínas...

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Ferreira,  
pelos recursos disponibilizados  
para as minhas viagens...

Ao Renato, pelo suporte dado

neste trabalho...

À Simone, pela presteza nos esclarecimentos e  
dicas sempre importantes...

Às meninas, Ana Paula, Junya e Letícia  
pelas coletas e extrações...

Ao Diego, por me deixar ficar em  
sua casa em Juiz de Fora...

À FAPEMIG, pelo suporte financeiro...

Aos meus amigos...

À todos do Centro de análises  
Proteômicas e Bioquímicas  
pela equipe que somos ...

À todos do Laboratório de genética  
em Juiz de Fora pela minha acolhida ...

Aos professores da UFJF,  
pelos ricos ensinamentos  
e dedicação...

## RESUMO

Um dos principais problemas mundiais na agricultura está diretamente relacionado às enormes perdas na produção causada por fungos fitopatogênicos, onde sua infecção nas culturas se dá desde o plantio até a pós-colheita. O fungo *Botrytis cinerea*, causador do mofo cinzento em mais de 200 espécies de plantas é um grande problema no agronegócio em todo o mundo. O uso de fungicidas é o principal método de controle em plantas, enquanto os resultados obtidos de imediato e a facilidade de aplicação justificam o seu uso. No entanto, o uso contínuo de fungicidas pode promover a seleção de fungos resistentes além de causar a contaminação de ecossistemas. Com o objetivo de encontrar uma solução para esse problema, diversos estudos tem se concentrado na busca de novas alternativas de controle, como por exemplo, as proteínas de plantas com atividades antifúngicas (AFPs). Nesse sentido, uma seleção de peptídeos antimicrobianos de flores, folhas e sementes de espécies do gênero *Lippia* bem como o isolamento de peptídeos antifúngicos de flores de *Lippia sidoides* foi o objetivo desse trabalho. Neste trabalho, a purificação e identificação de dois novos peptídeos de aproximadamente 10 kDa e 15 kDa de flores de Alecrim-pimenta (*Lippia sidoides*) foi descrito. As flores de *L. sidoides*, depois de secadas em estufa a 25° por cinco dias, foram submetidas à extração de proteínas com solução de HCl 0,1% e NaCl 0,6M, seguido por precipitação com sulfato de amônia (100%). Após a precipitação, o extrato foi dialisado contra água destilada (*cut off* 1,0 kDa) e liofilizado. A fração rica foi aplicada em cromatografia hidrofóbica Octyl-sepharose, seguida por cromatografia de fase-reversa de HPLC (Vydac C18-TP). Bioensaios com EB, e fração PR *in vitro* indicaram a inibição do crescimento do fungo *Botrytis cinerea*. As sequências N-terminal, obtidas por degradação de Edman, seguidas por alinhamento indicam que esses dois peptídeos podem ser classificados com proteínas R NBS-LRR. Esta descoberta pode contribuir, futuramente, para o desenvolvimento de produtos biotecnológicos como drogas antifúngicas e plantas transgênicas com resistência elevada a fungos patogênicos.

**Palavras-chave:** *Lippia sidoides*, Octyl-Sepharose, peptídeos antimicrobianos, *Botrytis cinerea*, proteínas R NBS-LRR.

## ABSTRACT

One of the major global issues in agriculture could be directly related to the severe production crop losses caused by phytopathogenic fungi, especially when infection affects post-harvest cultures. In this view, the fungus *Botrytis cinerea* is able to cause gray mold in more than 200 species of plants, being considered a major problem for the agribusiness. The use of fungicides is a primary fungi control method in plants, due to velocity and facility of application. However, the continuous use of fungicides may promote the selection of resistant fungi and also the ecosystems contamination. Aiming to find different solutions to this problem, several studies have focused on the search for new alternatives to fungi control, such as plant proteins with antifungal activities (AFPs). In this view, a selection of antimicrobial peptides from flowers, leaves and seeds from *Lippia* genus and further isolation of antifungal peptides from *Lippia sidoides* flowers was focused in this work. In this work, the purification and identification of two novel peptides of approximately 10 kDa and 15 kDa from flowers of rosemary-pepper (*L. sidoides*) was described. *L. sidoides* flowers were oven dried at 25 °C for 5 days, following protein extraction with a solution containing 0.1% HCl 0.6 M NaCl, and further ammonium sulfate precipitation (100%). After precipitation the extract was dialyzed against distilled water (cut off 1.0 kDa) and lyophilized. The rich fraction was applied onto an Octyl-Sepharose hydrophobic chromatography, followed by HPLC reversed-phase chromatography (Vydac C18-TP). Bioassays using crude extract and *in vitro* PR fraction indicated the inhibition of *Botrytis cinerea* growth. N-termini sequences, obtained by the Edman degradation, followed by alignment indicate that these two peptides can be classified as NBS-LRR R proteins. This discovery may help in a near future to the development of biotechnology products such as antifungal drugs and transgenic plants with enhanced resistance to fungal pathogens.

**Keywords:** *Lippia sidoides*, Octyl-Sepharose, antimicrobial peptides, *Botrytis cinerea*, NBS-LRR protein R

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Morangos infectados por *Botrytis cinerea*. Seta preta indica os morangos infectados (Fonte: <http://www.uoguelph.ca/~gbarron/MISCELLANEOUS/botryt1.jpg>) 3
- Figura 2:** Ilustração de conídios do fungo *B. cinerea*. Na direita: conídios arredondados em forma de cacho de uva. Na esquerda: Conídios incolores e colônias de fungos maduros na coloração marrom (fotografia original x 125) (Fonte: [http://www-biol.paisley.ac.uk/bioref/Fungi/Botrytis\\_cinerea.html](http://www-biol.paisley.ac.uk/bioref/Fungi/Botrytis_cinerea.html)). 5
- Figura 3:** Foto do arbusto de *Lippia sidoides* mostrando folhas e flores (Autor: João S. Moreira). 26
- Figura 4:** Fluxograma com a metodologia de identificação das proteínas antifúngicas de flores secas de *L. sidoides*. 28
- Figura 5:** Atividade antifúngica do extrato bruto de *Lippia sidoides* em meio BDA com 200 µg de proteínas contra *Botrytis cinerea*. (a) Flores secas; (b) flores frescas. ■ Corresponde ao controle positivo; ▣ controle negativo (água destilada); □. Amostra protéica de extrato bruto. O desvio padrão é representado por barras verticais. 38
- Figura 6:** Atividade antibacteriana do extrato bruto de flores frescas de *Lippia rotundifolia* em meio LB líquido com 200 µg de proteínas contra (a) *Klebsiella pneumoniae*; (b) *Proteus sp.*; (c) *Escherichia coli*; (d) *Streptococcus pyogenes*. (e) extrato bruto de flores secas de *Lippia rotundifolia* contra *Streptococcus pyogenes*. Amostra de extrato bruto é representado por ▲; controle positivo (captan 1%) ◆; controle negativo (água destilada) ■. O desvio padrão é representado por barras verticais. 40

**Figura 7:** Atividade antibacteriana do extrato bruto de flores frescas de *Lippia rubela* em meio LB líquido com 200 µg de proteínas contra (a) *Klebsiella pneumoniae*. Extrato bruto de sementes de *Lippia rubela* contra (b) *Streptococcus pyogenes*; (c) *Proteus sp.*; (d) *Klebsiella pneumoniae*; (e) *E. coli*. Amostra de extrato bruto é representado por ▲; controle positivo (captan 1%) ◆; controle negativo (água destilada) ■. Desvio padrão é representado por barras verticais. 41

**Figura 8:** Atividade antibacteriana do extrato bruto de flores frescas de *Lippia salvifolia* em meio LB líquido com 200 µg de proteínas contra (a) *Klebsiella pneumoniae*; (b) *Proteus sp.*; (c) *Escherichia coli*; (d) *Streptococcus pyogenes*. Amostra de extrato bruto é representado por ▲; controle positivo (captan 1%) ◆; controle negativo (água destilada) ■. O desvio padrão é representado por barras verticais. 43

**Figura 9:** Atividade antibacteriana do extrato bruto de folhas frescas de *Lippia salvifolia* em meio LB líquido com 200 µg de proteínas contra (a) *Klebsiella pneumoniae*; (b) *Proteus sp.*; (c) *Escherichia coli*; (d) *Streptococcus pyogenes*. Extrato bruto de semente de *Lippia salvifolia* contra (e) *Klebsiella pneumoniae*. Amostra de extrato bruto é representado por ▲; controle positivo (captan 1%) ◆; controle negativo (água destilada) ■. O desvio padrão é representado por barras verticais. 44

**Figura 10:** Atividade antibacteriana do extrato bruto de flores frescas de *Lippia sidoides* em meio LB líquido com 200 µg de proteínas contra (a) *Klebsiella pneumoniae*; (b) *Proteus sp.*; (c) *Streptococcus pyogenes*; (d) *Escherichia coli*. Amostra de extrato bruto é representado por ▲; controle positivo (captan 1%) ◆; controle negativo (água destilada) ■. O desvio padrão é representado por barras verticais. 45

**Figura 11:** Atividade antibacteriana do extrato bruto de flores secas de *Lippia sidoides* em meio LB líquido com 200 µg de proteínas contra (a) *Klebsiella pneumoniae*; (b) *Proteus sp.*; (c) *Streptococcus pyogenes*; (d) *Escherichia coli*. Amostra de extrato bruto é representado por ▲; controle positivo (captan 1%) ◆; controle negativo (água destilada) ■. O desvio padrão é representado por barras verticais. 46

**Figura 12:** Atividade antibacteriana do extrato bruto de sementes de *Lippia sidoides* em meio LB líquido com 200 µg de proteínas contra (a) *Klebsiella pneumoniae*; (b) *Proteus sp.*; (c) *Streptococcus pyogenes*. Amostra de extrato bruto é representado por ▲; controle positivo (captan 1%) ◆; controle negativo (água destilada) ■. O desvio padrão é representado por barras verticais. 47

**Figura 13:** Perfis cromatográficos. (a) Cromatografia de troca catiônica em coluna SP-Sepharose. (b) Cromatografia em coluna hidrofóbica Octyl-Sepharose. PNR e PR correspondem a pico não retido e pico retido respectivamente. A seta indica a eluição das proteínas retidas com tampão fosfato de sódio 50m M pH 7,2 + NaCl 2M (a) e com tampão fosfato de sódio 50m M pH 7,2 sem (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,7 M (b). 49

**Figura 14:** Atividade antifúngica em meio BDA com 200 µg de proteínas das frações protéicas resultantes de cromatografia em coluna Octyl-Sepharose contra *Botrytis cinerea*. ■Corresponde ao controle positivo; ▣ Controle negativo (água destilada); □ PR; ▤ PNR. O desvio padrão é representado por barras verticais. 51

**Figura 15:** Cromatograma de HPLC fase reversa (Vydac C-18TP 522) das proteínas retidas (PR) de flores secas de *Lippia sidoides* usando coluna analítica com fluxo de 1,0 ml / min-1. TFA 0,1% foi usado como pareador iônico e a linha diagonal indica o gradiente linear de acetonitrila (0-100%). 53

**Figura 16:** SDS-PAGE de três etapas de purificação das proteínas de flores secas de *Lippia sidoides*. **1** representa o marcador molecular em todos os géis; **2** amostras protéicas do EB; **3** fração PNR da cromatografia em coluna Octyl-Sepharose; **4** fração PR da cromatografia em coluna Octyl-sepharose. 55

**Figura 17:** Alinhamento da sequencia N-terminal dos resíduos de aminoácidos do peptídeo LsAMP1 com proteínas R NBS-LRR pelo ClustalW. As marcações em preto dos resíduos de aminoácidos de todas as seqüências mostram a similaridade entre as seqüências. (\*) Indica os resíduos completamente conservados. Em cada alinhamento é mostrado o número de acesso no NCBI, o nome, o organismo, a sequencia e a referência. 58

**Figura 18:** Alinhamento da sequência N-terminal dos resíduos de aminoácidos do peptídeo LsAMP2 com duas proteínas R NBS-LRR pelo ClustalW e demais proteínas hipotéticas. As marcações em preto dos resíduos de aminoácidos de todas as sequências mostram a similaridade entre as seqüências. (\*) Indica os resíduos completamente conservados. Em cada alinhamento é mostrado o número de acesso no NCBI, o nome, o organismo, a sequência e a referência.

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Ocorrência mundial de resistência Fonseca listando as principais doenças e fungicidas (adaptado de BREN, 1999). 14
- Tabela 2:** Famílias de proteínas PR (Adaptado de FERREIRA *et al.*, 2007) 18
- Tabela 3:** Algumas classes de proteínas antifúngicas (Adaptado de FERREIRA *et al.*, 2007). 19
- Tabela 4:** Espécies de *Lippia* utilizadas e suas partes constituintes em cada condição para extração protéica. 30
- Tabela 5:** Porcentagem de inibição de cada espécie de *Lippia sp* contra o fungo patogênico *Botrytis cinerea* e contra bactérias patogênicas humanas. Amostra EB corresponde à amostra de extrato bruto da espécie citada; CP corresponde ao Controle Positivo; CN corresponde ao Controle Negativo. \* Representa o bioensaio em que a quantificação foi feita em mm<sup>2</sup> comparado com os controles e não em porcentagem. - corresponde a bioensaio não realizado. Extrato bruto de espécies de gênero *Lippia* avaliadas quanto à atividade antimicrobiana. 200 µg.mL<sup>-1</sup> de proteínas de cada amostra foi usado para o ensaio contra microorganismos. 37
- Tabela 6:** Porcentagem de inibição de crescimento do fungo *Botrytis cinerea* Obtido das frações PR e PNR da cromatografia em coluna Octyl-Sepharose comparada CN: controle negativo e CP: controle positivo. 51

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

**(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:** Sulfato de amônio

**5-FC:** 5 Fluorocitosina

**aa:** aminoácidos

**AFPs:** Proteínas de plantas com atividade antifúngicas

**AmB:** “Anfotericin B” Amfotericina B

**AMPs:** “*antimicrobial proteins*” proteínas antimicrobianas

**ATP:** Adenosina trifosfato

**BDA:** Meio de cultura sólido (Ágar batata dextrose: 1,0 g de glicose, 10g de batata e 2,5g de Agar, água destilada)

**cAMP:** monofosfato adenosina ciclica

**CN:** Controle negativo

**CP:** Controle positivo

**EB:** Extrato bruto

**G:** gravidade

**Glu:** glutamato

**Gly:** Glicina

**H<sup>+</sup>-ATPase:** Translocador de prótons adenosina trifosfatase

**HCl:** ácido clorídrico

**HPLC:** “High performance liquid chromatography” Cromatografia líquida de alta performance

**LB:** Luria Bertani 50% bacteriotripton, 25% extrato de levedura e NaCl 5,0 g.L<sup>-1</sup> e água destilada.

**LPS:** Lipopólissacarídeo

**LsAMP1:** Peptídeo antimicrobiano 1 de *Lippia sidoides*

**LsAMP2:** Peptídeo antimicrobiano 2 de *Lippia sidoides*

**LTP:** “Lipid-transfer proteins” Proteínas transferidoras de lipídeos

**MAPK:** proteína quinase ativadora de mitose

**MBP:** proteínas que se ligam a mirosinases

**NaD1:** Defensina de *Nicotiana glauca* 1

**NBS-LRR proteins:** “Nucleotide-binding site leucine-rich repeat protein” Proteína com repetição rica em leucina e com sítio de ligação no nucleotídeo

**NMR:** Ressonância magnética nuclear

**OD:** Densidade ótica

**pH:** potencial hidrogênio iônico

**PhD1:** Defensina de *Petunia hybrida* 1

**PNR:** proteínas não retidas

**PR :** Proteínas relacionadas com patogênese

**PR:** Proteínas retidas

**Proteínas G:** Proteínas que se ligam ao nucleotídeo Guanidina

**Proteínas R:** proteínas codificadas por genes R “resistência”

**RIPs:** Proteínas inativadoras de ribossomos

**RP-HPLC:** “Reserved-phase high-performance liquid chromatography”  
Cromatografia líquida de alta performance por fase reversa

**SDS:** Dodecil sulfato de sódio

**SDS-PAGE:** “Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis”

Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

**TFA:** Ácido trifluoroacético

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1	Os fungos como agentes infecciosos em plantas.....	1
1.2	O fungo <i>botrytis cinerea</i> .....	2
1.3	O uso de agentes antifúngicos no controle de doenças em plantas.....	6
1.4	Principais classes de agentes antifúngicos.....	7
1.4.1	Agentes de baixa especificidade bioquímica.....	8
1.4.2	Agentes de alta especificidade bioquímica.....	8
1.4.3	Compostos usados no controle do <i>Botrytis cinerea</i> : os Botryticidas.....	11
1.5	O problema da resistência a fungicidas.....	12
1.6	O problema da contaminação de ecossistemas por fungicidas.....	16
1.7	Proteínas antifúngicas: uma alternativa promissora ao controle de fungos fitopatogênicos.....	16
1.8	Proteínas antimicrobianas de flores.....	22
1.9	Flores de <i>Lippia sidoides</i> : uma nova fonte de peptídeos botryticidas.....	25
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
2.1	Objetivo geral.....	27
2.2	Objetivos específicos.....	27
<b>3</b>	<b>MATERIAL e MÉTODOS.....</b>	<b>28</b>
3.1	Extração protéica.....	29
3.2	Bioensaio contra o fungo <i>Botrytis cinerea</i> .....	31
3.3	Bioensaio contra bactérias.....	31
3.4	Isolamento das proteínas com atividade antimicrobiana.....	32
3.5	Análises de massa molecular por <i>SDS-PAGE</i> .....	33
3.6	Transfêrencia das proteínas para resina PVDF.....	34
3.7	Seqüenciamento por degradação de Edman.....	34
3.8	Análise <i>in silico</i> .....	34
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>36</b>
4.1	Bioensaios com extrato bruto (EB) de flores secas de <i>Lippia sidoides</i> contra o fungo fitopatogênico <i>Botritis cinerea</i> .....	36
4.2	Bioensaios com extrato bruto (EB) de espécies de <i>Lippia sp.</i> contra bactérias.....	39
4.3	Purificação das proteínas antifúngicas de flores secas de <i>L. sidoides</i> .....	48
4.4	Bioensaio com as frações PR e PNR de flores secas de <i>L. sidoides</i> em cromatografia com coluna Octyl-Sepharose.....	50
4.5	Isolamento das proteínas da fração PR em HPLC de fase reversa.....	52
4.6	Análise da massa molecular de proteínas de <i>Lippia sidoides</i> .....	54
4.7	Sequenciamento das proteínas da fração PR e análise <i>in silico</i> .....	56
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>61</b>
<b>6</b>	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>62</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>63</b>

<b>8</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>75</b>
<b>8.1</b>	ANEXO I – Soluções e meios de cultura.....	75
<b>7.1</b>	ANEXO II - Bioensaio com EB de flores de <i>Lippia sidoides</i> em meio BDA com 200 µg. mL <sup>-1</sup> de proteínas contra <i>Botrytis cinerea</i> . (a) Amostra de flores secas; (B) Amostra de flor fresca. CP representa por Controle positivo (captan1%); CN controle negativo (água destilada).....	77
<b>7.2</b>	ANEXO III- Atividade antifúngica em meio BDA com 200 µg.mL <sup>-1</sup> de proteínas das frações protéicas resultantes de cromatografia em coluna Octyl-Sepharose contra <i>Botrytis cinerea</i> .PR representa fração proteínas retidas; PNR fração proteínas não retidas; CP Controle positivo (captan 1%); CN controle negativo(água destilada).....	78
<b>7.3</b>	ANEXO IV - Atividade antifúngica em meio BDA com 50 µg.mL <sup>-1</sup> de proteínas dos picos 1, 2, 3, 4 e 5 do cromatograma gerados pela RP-HPLC. CP representa o controle positivo (captan 1%); CN controle negativo (água destilada).....	79

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1. OS FUNGOS COMO AGENTES INFECCIOSOS EM PLANTAS

Os fungos são organismos eucariontes heterotróficos que possuem parede celular constituída basicamente por quitina e glucanos. A absorção de nutrientes solúveis ocorre graças à secreção de várias enzimas que degradam e medeiam substâncias assimiláveis. Existem milhares de espécies que se desenvolvem em substratos como matéria orgânica em decomposição, plantas e animais e formam o processo de biodegradação dos restos de vegetais e animais. Fungos responsáveis pela degradação de organismos em decomposição são conhecidos como saprófitas. Os que formam associação simbiótica com plantas ou qualquer outro organismo, cuja relação forneça benefício a ambos são chamados de mutualistas (SILVA et al., 2006) e os que produzem infecções em plantas e animais são chamados de parasitas (ALEXOPOULOS, MIMS e BLACKWELL, 1996).

Os fungos parasitas constituem um dos grupos mais importantes entre os agentes causadores de doenças do tipo infecciosas que provocam enfermidades nas plantas. Não se sabe bem o número exato de fungos fitopatogênicos, porém estima-se que pode haver mais de dez mil espécies pertencentes a diversas categorias taxonômicas. As infecções causadas por fungos, desde o plantio à pós-colheita, resultam anualmente em perdas enormes, sendo causas de severos problemas sociais e econômicos em países por todo o mundo (PUNJA, 2004). Em países tropicais, as perdas na produção de alimentos causadas por doenças fúngicas podem ser de aproximadamente 25% desde a colheita até a venda. Entretanto, esse valor pode chegar a 50% devido a elevadas temperaturas pós-colheita que acelera a senescência (PRUSKY e KOLATTUKUDY, 2007).

## 1.2 O FUNGO *Botrytis cinerea*

O fungo *Botrytis cinerea* pertencente ao gênero *Botrytis* reconhecido em 1729 durante muito tempo foi confundido com *Sclerotinea* spp. A separação definitiva desses dois gêneros foi feita por Smith (1900). *Botrytis cinerea* é um ascomiceto responsável pelo mofo cinzento em cerca de 240 espécies de plantas incluindo uva, alface, tomate, tabaco e morango, fato este, que o classifica como um dos mais importantes fitopatógenos e também um dos mais estudados, devido ao seu impacto no agronegócio em todo o mundo (Figura 1). Somente na cultura de uva, uma fruta extremamente importante economicamente, estima-se que a perda na colheita devida à infecção por *Botrytis cinerea* seja de 2 bilhões de dólares por ano em todo o mundo (VIVIER e PRETORIUS, 2002).

Este fungo possui o ciclo de vida necrotrófico, que se estabelece e multiplica inicialmente em tecidos mortos e posteriormente coloniza tecidos vivos. A temperatura propícia para a sua esporulação é entre 15 e 25°C, ocorrendo a liberação dos esporos nas horas mais quentes do dia. Após a infecção e morte do tecido do hospedeiro, o fungo pode sobreviver e esporular como saprófita no tecido necrosado ou pode produzir estruturas de sobrevivência por um longo período, chamadas esclerócio, que permite o fungo a sobreviver em ambientes com condições adversas e também produzir apotécio, uma estrutura reprodutiva em forma de cálice produtora de esporos após o processo sexual, que, possui uma capacidade considerável para produzir sucessivas culturas de conídios classificados como propágulos de vida curta e sobrevivência dependente de condições exógenas como temperatura, umidade e luminescência (Figura 2) (SMITH, 1980) (HOLZ et al., 2007). Quando submetidos em condições adversas, uma alternativa para a sobrevivência deste fungo é uma propágulo microscópico, o microconídeo, que em geral é encontrado em culturas envelhecidas de fungos ou quando o ambiente está contaminado por outros microorganismos (LORENZ e EICHHORN, 1983). Os propágulos podem ser dispersos pelo vento, chuva ou insetos e cada parte do fungo pode servir como unidade de dispersão sendo que o vento é geralmente considerado a mais importante forma de dispersão (AYLOR, 1990).



**Figura 1:** Morangos infectados por *Botrytis cinerea*. Seta preta indica os morangos infectados (Fonte: <http://www.uoguelph.ca/~gbarron/MISCELLANEOUS/botryt1.jpg>).

De maneira geral, o fungo *Botrytis* é bem conhecido por ter habilidade de formar grandes lesões no tecido do hospedeiro ou infecções latentes em sementes e frutos jovens. Dessa forma, a rota usada pelo patógeno para entrar no hospedeiro

representa um importante papel no estabelecimento da infecção (CHOQUER et al., 2007). Nas culturas de morango e pêra, a infecção dos estames é um dos principais locais de penetração (KOCK e HOLZ, 1992). Outra forma de infecção é a penetração na cutícula ileso e em aberturas naturais. Em frutos como nectarina, pêra e uva, a penetração pode ocorrer no centro das células da epiderme, na superfície adjacente das células guarda e em estômatos abertos (FOURIE e HOLZ, 1995). O patógeno também pode penetrar nos tecidos através de ferimentos (HOLZ, 1999) ou diretamente pela ação dos apressórios, mediadas pela secreção de enzimas que degradam a parede celular (RHA et al., 2006). Para vencer as defesas dos hospedeiros, *B. cinerea* é capaz de perceber sinais físicos e químicos da planta e responder com uma atividade metabólica apropriada requerida para o desenvolvimento da patogênese. Todas essas respostas requerem uma rede de vias de transdução de sinais, como a ativação das proteínas G, cAMP e proteínas quinase ativadoras de mitose (MAPK). De acordo com a comunicação e percepção de sinais externos, o fungo pode ativar ou inativar determinados genes ou grupos de genes, desenvolvendo a resposta requerida pelo patógeno (MITCHELL et al., 1995; BOLKER, 1998; XU, 2000). Quando o hospedeiro já está infectado, o fungo é capaz de produzir compostos que matam as células do hospedeiro antes dessas serem invadidas por hifas. Estes compostos podem ser toxinas de inúmeras classes, ácido oxálico (AO) e espécies reativas a oxigênio (VERHOEFF et al., 1987; REBORDINOS, et al. 1996; PATYKOWSKI e URBANEK, 2003).



**Figura 2:** Ilustração de conídios do fungo *B. cinerea*. Na direita: conídios arredondados em forma de cacho de uva. Na esquerda: Conídios incolores e colônias de fungos maduros na coloração marrom (fotografia original x 125) (Fonte: [http://www-biol.paisley.ac.uk/bioref/Fungi/Botrytis\\_cinerea.html](http://www-biol.paisley.ac.uk/bioref/Fungi/Botrytis_cinerea.html)).

### 1.3 O USO DE AGENTES ANTIFÚNGICOS NO CONTROLE DE DOENÇAS EM PLANTAS

Os agentes antifúngicos são substâncias que podem produzir uma modificação na estrutura de uma célula fúngica e inibir seu desenvolvimento, alterando a sua viabilidade e a capacidade de sobrevivência sem alterar as células do hospedeiro (KERIDGE. e VANDEN, 1990). Estes são classificados de acordo com a sua estrutura química, seu espectro (amplo ou restrito) e seu mecanismo de ação (CHEN e SORREL, 2007).

Os agentes antifúngicos são usados na agricultura há cerca de 200 anos para proteger as plantas de ataques de fungos. Inicialmente, esses agentes eram usados principalmente para a proteção de sementes de cereais e videiras, sendo que a partir de 1920, alguns passaram a ser produzidos em escala industrial. Durante a segunda guerra mundial, os agentes antifúngicos foram utilizados como arma química e a partir de então, sua produção e consumo expandiram muito. No Brasil, passaram a ser usados com mais intensidade a partir da década de 60, sendo que em 1975 o Plano Nacional de Desenvolvimento (PND), responsável pela abertura do Brasil ao comércio de agrotóxicos, condicionou o agricultor a comprar fungicidas com recursos do crédito rural. Somada à propaganda dos fabricantes, essa obrigatoriedade causou um grande aumento na utilização de fungicidas no Brasil, o que resultou também num aumento de problemas como intoxicação e contaminação de solos causados por esses compostos (OPAS/OMS, 1996).

Alguns dos primeiros agentes antifúngicos produzidos, cujo suas formulações são à base de cobre e enxofre ainda são muito empregados, e, outros como ftalamidas, ditiocarbamatos, dinitrofenólicos e clorofenólicos são usados constantemente a mais de 30 anos (GHANNOUM e RICE, 1999). Agentes antifúngicos mais eficientes e potentes, com novas formulações e com atividade sistêmica que não eram encontrados anteriormente, foram introduzidos no Brasil entre as décadas de 60 e 70. Alguns desses compostos são as 2-amino-pirimidinas, benzimidazóis, carboxanilidas, fosfortiolatos, morfolínicos, dicarboximidas, fenilamidas, e inibidores de desmetilação do esterol (DMI's). Na década de 80, houve a introdução de inúmeros análogos químicos que já existiam com alguns poucos incrementos em suas propriedades. Contudo, nesses últimos anos, vários

compostos novos foram lançados comercialmente ou estão em estágio avançado de desenvolvimento. Os agentes antifúngicos novos são geralmente utilizados em pequenas quantidades, devido ao seu aumento na eficiência, porém, sua margem de segurança para mamíferos e outros organismos que não são alvos, não diminuiu. Com frequência a atividade inespecífica é maior quando os novos fungicidas são comparados diretamente com os antigos compostos (DELP, 1980). Cerca de 140 compostos com ação fungicida são utilizados na agricultura mundial. Somente em 1993, o valor total de vendas para o consumidor final foi de aproximadamente 4,7 bilhões de dólares (BRENT, 1999). No Brasil, as vendas de fungicidas no ano de 1996 foram de 276 milhões de dólares, que representa 22% das vendas totais de defensivos agrícolas (FERREIRA, TSUNECHIRO e BARBOSA, 1998).

#### **1.4 PRINCIPAIS CLASSES DE AGENTES ANTIFÚNGICOS**

O termo fungicida é usado quando se quer referir a tratamento ou controle de doenças em plantas e o termo droga antifúngica é usado para tratamento de doenças em animais e mais precisamente em humanos (CARLILE et al., 2001). Os agentes antifúngicos diferem muito em sua natureza química, e em outras propriedades como o modo de ação. De acordo com Carlile et al. (2001), esses agentes podem ser classificados em dois grandes grupos: agentes de baixa e alta especificidade bioquímica.

##### **1.4.1 Agentes de baixa especificidade bioquímica**

Os agentes de baixa especificidade bioquímica atuam em muitos constituintes e processos da célula. Esses fungicidas incluem sais (APPEL, 2000), derivados orgânicos de vários metais (GERBER, LEÓNARD e HANTSON, 2002), formas inorgânicas de enxofre (COOPER e WILLIAMS, 2004) e alguns compostos orgânicos usados como fungicidas de contato por persistirem na superfície da planta por um longo período protegendo-a (REIGART e ROBERTS, 1999). Os fungicidas à base de enxofre foram os primeiros a serem introduzidos no mercado e são usados até hoje para prevenir infecções como as que surgem nas videiras. Por outro lado, os fungicidas à base de dióxido de enxofre também são muito usados para prevenir danos ao vinho e suco de frutas causado por leveduras. O mais antigo fungicida conhecido é a calda bordaleza criada para proteger as plantas de várias doenças. Essa calda é feita da mistura de sulfato de cobre e hidróxido de cálcio. Outro fungicida bastante usado é feito a base de ácidos fracos como ácido sórbico, ácido benzóico e ácido acético para preservar comida e produtos domésticos (CARLILE et al., 2001).

#### **1.4.2 Agentes de alta especificidade bioquímica**

Diferentemente, os agentes de alta especificidade bioquímica interagem com um simples componente ou processo bioquímico da célula. Essas substâncias são usadas como fungicidas de contato por não serem transportados pelo sistema vascular das plantas e por formar uma barreira de proteção quando aplicado nas folhas, e, como fungicidas sistêmicos, pois são absorvidos pelas plantas, principalmente, pela raiz e translocados principalmente pelo xilema (CARLILE et al., 2001). No uso clínico, drogas antifúngicas administradas oralmente ou por injeção intravenosa em pacientes fazem parte desse grupo. Os inibidores de mitose de fungos representados pelas griseofulvinas que são produtos metabólicos de várias espécies de *Penicillium sp.* (KOBAYASHI e MEDOFF, 1977), atuam impedindo a polimerização da tubulina e no alongamento dos microtúbulos, enquanto os benzimidazóis que atuam também nos microtúbulos por ligação nas  $\beta$ -tubulinas

(HOLLOMON et al., 1998), usado na prevenção ou tratamento de doenças de plantas causadas por vários fungos. Outro agente de alta especificidade são os inibidores da síntese de ácido nucléico representado pela 5-fluorocitosina (5-FC), eficiente no tratamento de algumas infecções como candidíases, criptococoses e cromomicoses (POLAK, 1990; GRAYBILL, 2000). Kasungamicina é inibidor da síntese de proteínas usado no tratamento do arroz contra *Pyricularia oryzae* que impede a ligação do aminoacil t-RNA ao ribossomo (MANKIN, 2006). A carboxamida, inibidor da respiração celular são eficientes contra patógenos basideomicetos de plantas que interagem com o complexo oxiredutase ubiquinina-succinato, inibindo a transferência de elétrons entre succinato e coenzima Q na mitocôndria (STEFFENS, PELL e TIEN, 1996). Um grande número de agentes antifúngicos atua na prevenção da síntese de ergosterol (BOSSCHE, ENGELEN e ROCHETTE, 2003).

Os azóis, maiores representantes dessa classe, atuam inibindo uma enzima do citocromo P-450, a  $14\alpha$ -demetilase, que age na fase inicial da síntese do ergosterol e provoca o acúmulo de diversos esteróis intermediários. Este mecanismo de ação provoca a redução da integridade da membrana celular e a alteração da atividade de diversas enzimas oxidativas (COMO e DISMUKES, 1994). São dois grupos de azóis usados: os imidazóis (cetoconazóis, miconazóis, clotrimazóis e econazóis) e os triazóis (fluconazóis, itraconazóis, voriconazóis e posaconazóis). Os imidazóis foram os primeiros azóis desenvolvidos e foram produzidos no final da década de 60, sendo administrados sistematicamente e de uso tópico, porém, foi comprovado que o clotrimazol provocava auto-indução de enzimas de degradação do feto, provocando sua morte e o miconazol usado inicialmente em tratamento de micose apresentava graves problemas de toxicidade no paciente quando administrado contra o fungo *S. prolificans*, causador de micoses resistentes (HENNEQUIN et al., 1997). O primeiro imidazol administrado oralmente (cetoconazol) foi produzido na década de 80 e devido a vários efeitos colaterais produzidos, este foi convertido em triazol (EDWARDS, 1997). Os triazóis têm sido amplamente usados em tratamentos contra infecção de fungos superficiais. Dentre os triazóis, o fluconazol tem boa atividade contra espécies de *Candida sp.* e *Cryptococcus sp.* que provocam micoses endêmicas (GOA e BARADELL, 1995),

entretanto, há resistência a essa droga em algumas espécies de *Candida sp.* (CANUTO e RODERO, 2002). O itraconazol tem atividade contra leveduras, porém possui uma desvantagem por ter bioutilidade variável e desagradável sabor (BOSSCHE, ENGELEN e ROCHETTE, 2003). O voriconazol e o posaconazol são a segunda geração de triazóis com um grande espectro de atividade contra leveduras, *C. neoformans*, espécies de *Fusarium sp.* e *Aspergillus sp.* O voriconazol, licenciado em maio de 2007, é ativo contra espécies de *Candida sp.* resistentes a fluconazol e o posaconazol, é pouco solúvel e produz efeitos colaterais como lesão neurológica e desmielinização de neurônios em modelos animais quando administrado em tratamento prolongado (TOBÓN et al., 2003; CHEN, e SORREL, 2007).

Os polienos são fungicidas primeiramente sintetizados por actinomicetos do gênero *Streptomyces* que rompem a membrana plasmática. Foram os primeiros antifúngicos produzidos durante a década de 50, sendo atualmente subdivididos em trienos (rapamicina), tetraenos (natamicina), pentaenos (pentamicina), heptaenos (anfotericina B e candicidina) e os pseudo-heptaenos/tetraenos, nistatina (BOSSCHE et al., 2003). Os polienos se ligam ao ergosterol provocando a formação de poros na membrana, causando mudanças do estado físico e resultando em elevado deslocamento de prótons entre os meios interno e externo (REVANKAR e GRAYBILL, 2003). O efeito dos polienos no gradiente de prótons é resultado de uma interação com o translocador de prótons adeninosina trifosfatase ( $H^+$ -ATPase) que é encontrado na membrana plasmática de várias espécies de fungos (BOSSCHE et al., 2003). Existem hoje centenas de compostos diferentes dentro dessas subclasses, porém, o mais importante é a anfotericina B (AmB). Segundo Deray et al. (2002), uma grande desvantagem no uso da anfotericina B é a alta toxicidade dessa substância, o que pode provocar alteração na função renal.

#### **1.4.3 Compostos usados no controle do *B. cinerea*; os botryticidas**

O principal mecanismo de controle desse fungo tem sido a aplicação de fungicidas. A maioria dos botryticidas são fungicidas de alta especificidade bioquímica que podem ser classificados de acordo com o modelo bioquímico de ação. São cinco categorias distintas: fungicidas que afetam a respiração celular, compostos que inibem a síntese de microtubulos, compostos que afetam a osmoregulação, fungicidas que inibem a biosíntese de metionina e inibidores da biossíntese de esterol (LEROUX, 2007). Por outro lado, o desenvolvimento de resistência a muitos desses compostos já tem sido relatado e, como consequência, em muitos países as agências reguladoras tem restringido o uso de pesticidas novos e estabelecidos (GULLINO e KUIJIPERS, 1994). Inicialmente, foi citada a resistência ao grupo benzimidazol como carbendazim e benomil, e posteriormente, as dicarboximidas, como iprodiona, procimidona e vinclozolina (LATORRE et al., 1994). Mais recentemente, foi observada resistência a anilopirimidinas em vinhedos no Chile e em culturas de abóbora, feijão e tomate (MOYANO et al., 2004) e também a inibidores de síntese de esterol (ELAD, 1992). Futuramente, há a necessidade de desenvolver novos botryticidas. Alternativas poderão ser usadas como controle do *Botrytis* como, por exemplo, o sal mineral, o controle biológico como um dos exemplos o fungo *Clonostachys rosea* que é capaz de suprimir a esporulação (COTA et al., 2008), além do recente aumento da produção de variedades transgênicas com genes exógenos de fitoalexinas (DELAUNOIS et al., 2009) e peptídeos de defesa (ANURADHA et al., 2008).

Um fungicida antes de ser lançado no mercado tem que ser testado em laboratório e em casas de vegetação contra diferentes patógenos fúngicos e também em campo contra determinadas doenças de plantas cultivadas em diferentes regiões e países. O fungicida só será desenvolvido em nível comercial se apresentar ação contra doenças importantes em um número grande de ensaios e safras. Classificam-se os patógenos que foram controlados pelo fungicida como susceptíveis e os que não são controlados ou pouco controlados como naturalmente resistentes ou resistentes por herança (BRENT, 1999). Porém, existe também a resistência adquirida. Este caso é observado em populações do patógeno alvo expostos durante anos ao fungicida comercial, adquirindo posterior resistência em resposta ao uso repetido do fungicida ou ao uso de outro fungicida que apresenta relação química e/ou relação com o mecanismo de ação antifúngica. Até a década de 70, existiam poucos casos de resistência a fungicidas, porém, com a introdução de fungicidas sistêmicos a resistência teve um aumento significativo. Neste caso, o tempo para emergir a resistência diminuiu. No entanto, os primeiros fungicidas à base de cobre e enxofre não mostraram o aparecimento de resistência em fungos durante o seu uso (GHINI, 2001) (Tabela 1).

O início da resistência tem sido associado com frequência com a total ou quase total falha em controlar a doença e é caracterizada por uma repentina perda de efetividade e pela presença de populações de patógenos antes susceptíveis. Uma vez adquirida, a resistência é herdada, devido a alterações na constituição genética da população de patógenos (CARLILE et al., 2001). O mecanismo de resistência mais comumente conhecido é a alteração bioquímica do sítio alvo do fungicida. Podendo explicar o porquê da resistência de patógenos ser na maioria das vezes maior em fungicidas modernos, uma vez que sua ação é primariamente em um único sítio alvo. Neste caso, uma simples mutação em um único gene pode causar a alteração, que os torna menos vulneráveis ao composto químico (BRENT, 1999). Por outro lado, os fungicidas mais antigos penetram nas células dos fungos e agem como um inibidor genérico de várias enzimas afetando muitos sítios alvo. Por isso, até hoje muitos desses fungicidas ainda são usados com alta taxa de eficiência porque para caracterizar a resistência, os sítios dos genes dos patógenos teriam que

sofrer mudança simultaneamente para impedir a ação do fungicida. Neste aspecto, a possibilidade disso ocorrer é mínima (GHINI, 2001). Porém, como os principais fungicidas mais antigos são compostos de enxofre ou de cobre, um problema comumente observado no seu uso é a fitotoxicidade, fortemente apresentada em culturas em estágio de floração, cucurbitáceas, macieiras, plantas ornamentais, tomate e plântulas de fumo sob condições de temperatura elevada, que se traduz por queima das folhas, desfolha como resultado na diminuição da produção e comprometimento dos equipamentos causado por corrosão (REIGART e ROBERTS, 1999).

Após o lançamento de fungicidas sistêmicos no mercado, vários casos de resistência ocorreram. Fungicidas do grupo dos benzimidazóis foram usados na década de 70 no norte da França para o controle do *Botrytis* em videiras que configurou rapidamente resistência, enquanto na Itália e sul da França esses fungicidas ainda eram efetivos (BRENT, 1999). Outro caso de resistência foi relatado nos Estados Unidos nessa mesma década com a doença do oídeo do pepino cultivado em estufa após um ano de aplicação de benzimidazol (BRENT, 1999). Apesar da incidência de resistência, o grupo dos benzimidazóis ainda é usado com frequência porque nenhum levantamento completo decorrente do seu uso foi feito até agora (GHINI, 2001). O grupo dos fenilamidas foi posto no mercado em 1977. Esse grupo tem uma peculiaridade, porque agem apenas em patógenos oomicetos, e não possui nenhum efeito sobre outros fungos. O primeiro caso de resistência dessa classe de fungicidas ocorreu na década de 1980, contra o fungo *Pseudoperonospora cubensis* causador do oídeo na cultura de pepino em Israel e no controle da requeima da batata (*Phytophthora infestans*) na Europa. Infelizmente, o único método de controle contra patógenos oomicetos é o uso de compostos químicos (BRENT, 1999). Grupos de fungicidas novos estão sendo criados e o que se pode notar é que tentativas isoladas por parte dos laboratórios no controle de certas doenças foram apenas parcialmente bem sucedidas.

**Tabela 1:** Ocorrência mundial de resistência fúngica listando as principais doenças e fungicidas (adaptado de BREN, 1999).

Data da primeira Observação (Aprox.)	Fungicida ou classe de fungicida	Classificação quanto à especificidade Bioquímica	Anos de uso comercial antes da observação da resistência (Aprox.)	Principais doenças	Espécie causadora da doença
1960	Hidrocarbonetos aromáticos	Baixa	20	Bolor verde e azul em citrus	<i>Penicillium spp.</i>
1964	Organo-mercuriais	Baixa	40	Mancha amarela ou crestada das folhas de cereais	<i>Pyrenophora spp.</i>
1969	Dodine	Baixa	10	Sarna da macieira	<i>Venturia inaequalis</i>
1970	Benzimidazóis	Alta	2	Muitas doenças-alvo e patógenos	
1971	2-Amino-pirimidinas	Alta	2	Oídeo do pepino e da cevada	<i>Sphaerotheca fuliginea</i> e <i>Erysiphe graminis</i>
1971	Kasugamicida	Alta	6	<i>Brusone</i> de arroz	<i>Magnaporthe grisea</i>
1976	Fosforotiolatos	Alta	9	<i>Brusone</i> de arroz	<i>Magnaporthe grisea</i>
1977	Trifeniltinas	Alta	13	Mancha da folha da beterraba açucareira	<i>Cercospora betae</i>
1980	Fenilamidas	Alta	2	Requeima da batata e mildio da videira	<i>Phytophthora infestans</i> e <i>Plasmopara viticola</i>
1982	Dicarboximidas	Alta	5	Mofo cinzento da videira	<i>Botrytis cinerea</i>
1982	Inibidores da desmetilação do esterol (DMIs)	Alta	7	Oídeo do pepino e da cevada	<i>Sphaerotheca fuliginea</i> e <i>Erysiphe graminis</i>
1985	Carboxinilidas	Alta	7	Carvão da cevada	<i>Ustilago nuda</i>

## **1.6 O PROBLEMA DA CONTAMINAÇÃO DE ECOSISTEMAS POR FUNGICIDAS**

O método de controle mais usado contra doenças causadas por fungos são os fungicidas e é a única forma de controle para diversos problemas fitossanitários. Algumas vantagens no uso de fungicidas são o aumento da produtividade, a facilidade de aplicação, os resultados rapidamente obtidos e a sua especificidade no controle de doenças. No entanto, o uso contínuo de fungicidas além de promover a seleção de fungos resistentes, pode provocar sérios danos à saúde humana e a contaminação de ecossistemas aquáticos e terrestres (SILVA et al., 2007). Segundo Chaim et al. (1999), mesmo quando aplicado sobre as plantas, cerca de 50% da dose poderá ter como destino final o solo, independentemente da forma como for realizada a aplicação e, após ter chegado ao solo, o fungicida pode ter seu destino influenciado por dois principais tipos de transporte: lixiviação e escoamento superficial. O uso de fungicidas e outros pesticidas causam a contaminação em poços, lagos, água subterrânea e minas em decorrência da lixiviação (DOMAGALSKI e DUBROVSKY, 1992; FLURY, 1996; JUNIOR e SILVA, 2007). Segundo Laabs et al. (2002), da região mato-grossense ao nordeste do pantanal, foi encontrado tebuconazol em alguns pontos no período de colheita. De acordo com Garbellini e Uliana (2007), o uso do fungicida carbaril na agricultura pode indiretamente produzir resíduos em águas superficiais e nos sedimentos do solo, como resultado de ventos ou interações, com partículas de solo.

## **1.7 PROTEÍNAS ANTIFÚNGICAS: UMA ALTERNATIVA PROMISSORA AO CONTROLE DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS**

Todos os organismos vivos desde animais, plantas e microorganismos são constantemente confrontados por vários patógenos diferentes. Deste modo, de

uma maneira geral, os organismos devem ter, em resposta a este processo, desenvolvido mecanismos eficientes de defesa contra esses ataques. Um dos mais sofisticados mecanismos conhecidos é composto por anticorpos e células *killer* que reconhecem e eliminam invasores específicos e também possuem memória imunológica, discriminando produtos do seu próprio metabolismo de produtos que não são do seu metabolismo (AERTS et al., 2008). Essas respostas imunes adaptativas são somente elaboradas em um pequeno subgrupo de organismos vivos e grande vertebrados. As plantas e outros grupos organismos para se defenderem desenvolveram um grande arranjo de moléculas incluindo proteínas e peptídeos antimicrobianos (THEVISSSEN et al., 2007). Uma grande variedade de organismos é capaz de produzir proteínas e peptídeos com atividade antimicrobiana como parte de sua primeira linha de defesa (MONTESINOS, 2007; JENSSEN et al., 2006). Por serem simples produtos da transcrição de um único gene, essas proteínas são liberadas rapidamente após uma infecção com um gasto limitado de energia e biomassa, e podem eficientemente repelir invasores patogênicos (BOMAN, 2003; PELEGRINI e FRANCO, 2005; TAVARES et al., 2008; AERTS et al., 2008).

A diversidade de proteínas antimicrobianas é enorme, sendo que até agora, centenas de diferentes tipos foram identificados desde a década de 80, onde foi introduzido o termo proteína relacionada com patogênese (PR) designando proteínas produzidas pela planta hospedeira apenas em situações patológicas ou relacionadas, que incluem infecção viral, fúngica e bacteriana, ataques parasitas por nematóides, insetos e animais herbívoros (ANTONIOW et al., 1980). As proteínas PR foram inicialmente caracterizadas como tipicamente ácidas, de baixa massa molecular, alta resistência a degradação proteolítica e foram localizadas em sua maioria, em espaços extracelulares e intracelulares de folhas. Atualmente, tem-se encontrado proteínas PR em diferentes órgãos e tecidos de plantas, enquanto que a sua biossíntese é considerada o maior mecanismo de defesa de plantas contra fungos fitopatogênicos (ODJAKOVA e HADJIIVANOVA, 2001). As PR incluem diversos diferentes grupos baseados em sua característica estrutural e funcional sendo agrupadas em famílias de proteínas, de acordo com a similaridade de sequências, relação sorológica, e/ou atividade biológica ou enzimática. Atualmente, dezessete classes de PR são classificadas e numeradas na ordem em que foram

descobertas (tabela 2) (FERREIRA et al., 2007). Dentre essas, treze classes possuem atividade contra fungos, sendo estas isoladas e caracterizadas de centenas de organismos como mamíferos, moluscos, insetos, bactérias fungos e plantas (Tabela 3) (SELITRENNIKOFF, 2001). Proteínas antifúngicas (AFP) estão envolvidas em resistência induzida ou constitutiva ao ataque de fungos e são produzidos por uma enorme variedade de organismos como insetos, mamíferos, fungos, bactérias, anfíbios e plantas sendo também classificados de acordo com o modo de ação (JENSSEN et al., 2006). Muitas das proteínas antifúngicas descritas na literatura não são proteínas PR, e a mais importante diferença entre proteínas antifúngicas e proteínas PR é que, as PR são induzidas em resposta a uma infecção e não são necessariamente antimicrobianas, enquanto que as proteínas antifúngicas podem estar presentes em qualquer organismo sem necessariamente serem induzidas (FERREIRA et al., 2007). Embora ainda não seja consenso geral onde termina o peptídeo (AMP) e onde começa uma proteína antimicrobiana, assume-se que, as proteínas possuem massa molecular maior que 5 kDa ou aproximadamente 50 resíduos de aminoácidos. Então, alguns grupos de compostos antifúngicos como as defensinas de plantas, são ambos proteínas e peptídeos antimicrobianos (AMP) (FERREIRA et al., 2007). Peptídeos antimicrobianos (AMPs) são catiônicos e frequentemente adotam estruturas anfipáticas que permite maior facilidade de interagir com paredes ou membranas celulares de microorganismos (BROWN e HANCOCK, 2006). O espectro de ação dos AMPs não se restringe a somente um tipo de microorganismo, podendo ser efetivo contra fungos, bactérias e protozoários.

Como a sensibilidade à presença de proteínas antifúngicas é grande, ocorrendo à inibição do crescimento fúngico na adição de até mesmo poucos micromolares de proteínas, estas macromoléculas se tornaram ferramentas importantes no combate de pragas e demais doenças na agricultura.

**Tabela 2:** Famílias de proteínas PR (Adaptado de FERREIRA et al., 2007)

<b>Família</b>	<b>Membro</b>	<b>Propriedade bioquímica</b>	<b>Massa molecular (kDa)</b>
PR-1	Tabaco PR-1	Desconhecida	15-17
PR-2	Tabaco PR-2	$\beta$ - 1,3 glucanase	30-41
PR-3	Tabaco P,Q	Quitinase classe I, II, IV, VI, VII	35-46
PR-4	Tabaco R	Proteínas ligantes de quitina	13-14
PR-5	Tabaco S	Thaumatococcus-like	16-26
PR-6	Inibidor do tomate I	Inibidor de proteinase	8-22
PR-7	Tomate P69	Endoproteinase	69
PR-8	Quitinase de pepino	Quitinase classe III	30-35
PR-9	Lignina formadora de peroxidase e tabaco	Peroxidase (POC)	50-70
PR-10	PR-1 de salsa	Ribonuclease-like	18-19
PR-11	Classe de quitinase V de tabaco	Quitinase classe V	40
PR-12	Rs-AFP3 de rabanete	Defensinas	5
PR-13	THI-1,2 DE <i>Arabidopsis</i>	Tioninas	5-7
PR-14	LTP 4 de cevada	Proteínas transferidoras de lipídeos	9
PR-15	OxOa de cevada	Oxalato oxidase	22-25
PR-16	OxOLP de cevada	Proteínas similares a oxalato oxidase	100 (hexamero)
PR-17	PRp27 de tabaco	Desconhecida	?

**Tabela 3:** Algumas classes de proteínas antifúngicas (Adaptado de FERREIRA et al., 2007).

<b>Classe</b>	<b>Ocorrência</b>	<b>Maior característica</b>	<b>Mecanismo de ação</b>
Proteínas PR-1	Plantas	Massa molecular de 15 – 17 kDa. Homólogas à superfamília de proteínas ricas em cisteína	Desconhecido
$\beta$ -glucanases	Microorganismos, plantas, invertebrados e vertebrados	Atividade 1,3 $\beta$ -endoglucanase	Hidrólise da estrutura 1,3- $\beta$ -glucano presente na parede dos fungos
Quitinases	Vírus, bactérias, fungos, moluscos, peixes, plantas, insetos, mamíferos e anfíbios	Massa molecular de 26-43 kDa	Cliva polímeros de quitina da parede celular
Proteínas que se ligam a quitina	Bactérias, plantas, insetos e crustáceos	Massa molecular de 3.1-20 kDa	Ligante de quitina (?)
Proteínas semelhantes à thaumatina	Plantas	Massa molecular ~22 kDa. Parte dos aminoácidos são homólogos à thaumatina	Não completamente entendido. Alguns causam mudanças na permeabilidade celular, ligam-se a 1,3- $\beta$ -glucano.
Defensinas/ tioninas	Mamíferos, fungos, insetos e plantas	Baixa massa molecular, proteínas ricas em cisteínas	Inibição de fungos provavelmente ocorre através do mecanismo de efluxo de íons.
Proteínas semelhantes à ciclofilinas	Bactérias, plantas animais e fungos	Exemplo: mungina	Desconhecido
Proteínas ricas em glicina/ histidina	Insetos	Extremamente ricas em glicina e histidina	Desconhecido
Proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs)	Fungos e plantas	RNA <i>N</i> -glicosidase que depurinam rRNA	Inativam os ribossomos dos fungos <i>in vitro</i> e <i>in situ</i>

---

Proteínas transferidoras de lipídeos (LTPs)	Mamíferos, plantas, fungos e bactérias	Massa molecular de ~8.7 kDa	Desconhecido
Proteínas killer	Levedura	Leveduras secretam toxina killer resistentes suas toxinas mas sensíveis a outras toxinas	Vários mecanismos de ação
Inibidor de proteases	Plantas animais e outros microorganismos	Proteínas inibidoras de serina e protease cisteína	Desconhecido
Albuminas 2S	Plantas	Baixa massa molecular e muitas pontes dissulfeto	Desconhecido
Outras proteínas	Plantas	Exemplos: viridina e snakin-1	Desconhecido

---

Os mecanismos de ação das AFPs são variados. A estrutura alvo das AFPs estende desde a parte externa da célula fúngica, a parede celular, a membrana plasmática e vários alvos intracelulares (THEIS e STAHL, 2004). Quitina é um homopolímero natural e o maior componente da parede celular em fungos filamentosos. Em plantas, ocorre a síntese de um grande número de proteínas de defesa capaz de se ligar a quitina. Essa ligação acontece através de uma sequência conservada de aminoácidos conhecida como domínio que se liga a quitina, causando a formação de poros na parede celular dos fungos, através da deacetilação da quitina, gerando quitosano (FERREIRA et al., 2007). Um outro alvo das AFPs é a membrana plasmática. A interação com a membrana do fungo leva a formação de poros, efluxo dos componentes celulares e trocas no potencial de membrana (TOSSI, SANDRI e GIANGASPERO, 2000). Uma primeira forma de atuação das AFPs na membrana dos fungos é através de uma interação entre as cargas positivas das proteínas e as cargas negativas da superfície da membrana. Outra interação que permite a formação de poros é diretamente com o ergosterol, constituinte que pode apresentar até 2% do peso seco da membrana do fungo (FERREIRA et al., 2007). Assim sendo, essas proteínas antimicrobianas, por terem um largo espectro de atividade, vem sendo testados com maior frequência nos últimos anos como agentes farmacêuticos para o desenvolvimento de substâncias para o tratamento de doenças (SELITRENNIKOFF, 2001). Na agroindústria, genes que codificam diversos AMPs tem sido usados no melhoramento de plantas, servindo inclusive como molde para a construção de AMPs sintéticos que, segundo Montesinos (2007), tem sido expressados em um grande número de plantas.

## 1.8 PROTEÍNAS ANTIMICROBIANAS DE FLORES

Os AMPs tem sido muito estudados em tecidos de plantas como raízes, folhas e sementes, embora estes possam ser também sintetizados em tecido floral. Estes órgãos vegetais tem sido pouco estudados em comparação a outros tecidos, e é possível que contenham um grande arsenal de AMPs com atividade inibitória contra fitopatógenos. Apenas algumas classes de AMPs como defensinas, proteínas transferidoras de lipídeos (LTPs), proteínas que se ligam a mirosinases (MBPs), peptídeos tipo-heveína e snakinas foram encontrados e relatados até agora em tecido floral (TAVARES et al., 2008). Estes podem ser divididos de acordo com a sua carga exposta, em grupos catiônicos e não catiônicos. Os mais comuns AMPs encontrados em flores pertencem ao grupo catiônico e o seu mecanismo de ação envolve a permeabilização da camada lipídica (RADEK e GALLO, 2007).

As defensinas de flores, também conhecidas como gama-tioninas, são uma das mais importantes e mais bem estudadas classes de AMPs. Seu tamanho é de aproximadamente 5 kDa e seus relatos mostram atividade inibitória contra fungos, bactérias e insetos (FRANCO et al., 2006; ZÉLICOURT et al., 2007). As defensinas de flores partilham uma estrutura em dobramento tridimensional, estabilizada por quatro pontes dissulfeto que incorporam os motivos  $\alpha\beta$  estabilizados por cisteínas (TAVARES et al., 2008). Além das cisteínas, outros resíduos são extremamente conservados em todas as defensinas de plantas como a Ser<sup>7</sup>, um anel aromático na posição 10, Gly<sup>12, 32</sup> e Glu<sup>27</sup> (PELEGRINI e FRANCO, 2005). A estrutura tridimensional das defensinas é controlada por uma tripla folha- $\beta$  antiparalela e uma simples  $\alpha$ -hélice colocada em paralelo com uma folha- $\beta$  (BRUIX et al., 1993). A primeira defensina floral que foi caracterizada estruturalmente por ressonância magnética nuclear (NMR) foi NaD1 isolada de *N. alata* (LAY e ANDERSON, 2005). Janssen et al. (2003), isolaram da planta *Petunia hybrida* a defensina PhD1, o primeiro membro de uma subclasse de defensinas de plantas que contém cinco pontes dissulfeto.

Uma segunda classe, as proteínas transferidoras de lipídeos (LTPs) de flores são pequenas proteínas básicas e solúveis que podem estar envolvidas no transporte de lipídeos e esfingolipídios através da membrana celular (GARCIA et al., 1995; GUERBETTE et al., 1999; DIZZ et al., 2006; TAVARES et al., 2008). Como as defensinas, os LTPs normalmente apresentam oito cisteínas em uma posição conservada, formando quatro pontes dissulfeto (MATSUHIRA et al., 2007). Em *Arabidopsis thaliana*, muitos dos genes que codificam LTPs são expressos em folhas, nas células da epiderme de flores e em raiz, enquanto, a associação dessas com defensinas podem inibir o crescimento de fungos e bactérias em plantas (MOLINA e GARCIA, 1993).

Outra classe que apresenta atividade contra fungos, insetos e outros patógenos são as proteínas que se ligam a mirosinases (MBPs). Estas proteínas são extremamente catiônicas e estão envolvidas no desenvolvimento das plantas, apresentando duas pontes dissulfeto (TAVARES et al., 2008). De acordo com Capella et al. (2001), o modo de ação das MBPs contra fungos é a associação com a hidrólise de glucosinolatos por enzimas mirosinases, produzindo um grande número de moléculas com vários modos de ação, ocorrendo a redução de sua expressão após a abertura floral.

Peptídeos tipo heveína de flores são pequenos ligantes de quitina que consistem de 43 resíduos de aminoácidos contendo oito pontes dissulfeto ligadas por resíduos de cisteína. Foi inicialmente isolada de *Rubber latex*, mostrando que a sua síntese é gerada com uma sequência sinal de 17 resíduos de aminoácidos seguidos pelo domínio heveína de 43 resíduos e uma região carboxi-terminal de 144 resíduos (BROEKAERT et al., 1990; NIELSEN et al., 1997; KOO et al., 2002). O monitoramento da hibridização identificou os genes de expressão dos peptídeos que se ligam a quitina somente em botões florais jovens (TAVARES et al., 2008). Koo et al. (2002), isolaram o peptídeo tipo heveína de tabaco Pn-AMP que apresenta atividade contra *Phytophthora parasitica*.

Já as snakinas de flores são AMPs compostos por 63 resíduos de aminoácidos com doze cisteínas extremamente conservadas dobrando esses peptídeos em uma estrutura estável com cargas básicas expostas (SEGURA et al.,

1999). De acordo com Lobo et al. (2002), responsáveis por isolar o AMP snakina-2, este apresentou atividade contra as bactérias *Ralstonia solanacearum*, *Erwinia chrysanthemi* e contra o fungo *Botrytis cinerea*. Outra snakina isolada por Segura et al. (1999), snakina-1 apresentou atividade contra a bactéria *Clavibacter michiganensis* e contra o fungo *Botrytis cinerea*.

### **1.9 FLORES DE *Lippia sidoides*: UMA NOVA FONTE DE PEPTÍDEOS BOTRYTICIDAS**

O gênero *Lippia* está amplamente distribuído nos neotrópicos, sendo encontrados como plantas herbáceas, arbustos ou pequenas árvores. Segundo Troncoso (1974), o número de espécies estimado é de 160, sendo que a maioria delas concentra-se no Brasil, Paraguai e Argentina, embora poucas espécies sejam consideradas endêmicas do continente africano. O Brasil é uma das regiões de maior biodiversidade do mundo e uma das principais zonas de crescimento e diversificação de plantas do gênero *Lippia*, contendo aproximadamente 75% das espécies desse gênero. Especificamente no Estado de Minas Gerais, encontra-se um grande número dessas espécies (SALIMENA, 1991; VICCINI et al., 2004; VICCINI et al., 2005). Plantas do gênero *Lippia* são muito utilizadas na cultura popular devido às suas propriedades medicinais como atividade antiespasmódica e sedativa; agindo no tratamento de dores estomacais, sintomas da gripe, bronquite, infecções cutâneas, diarreia e desordens menstruais, além de propriedades antitérmicas e antiinflamatórias (PASCUAL et al., 2001). Nesse gênero foram relatados ainda efeitos sedativos dependente da dose no sistema nervoso central, incluindo hipnose, hipotermia e propriedades anticonvulsivas (ELIZABETSK et al., 1999; GHELARDINI et al., 1999; VALE et al., 1999; RE et al., 2000).

*Lippia sidoides* é arbusto silvestre que mede até 2 m de altura. O caule apresenta casca sulcada e frágil, podendo atingir 8 cm no seu maior diâmetro (MARTINS et al., 2000). Os ramos são providos de folhas simples, aromáticas,

pecíolos curtos e bastante delgados. O limbo é oval-lanceolado com ápice acuminado, base atenuada e margens crenadas que medem de 2 a 7 cm de comprimento por 1 a 3,5 cm de largura, tendo ambas as faces revestidas por pêlos pouco visíveis, porém sensíveis ao tato mostrando pontos granulosos visíveis na face superior (MATOS e OLIVEIRA, 1998). As flores, cujo pedúnculo é longo, são pequenas (cerca de 1 a 2 mm), branco amareladas e dispostas em inflorescência subglobosas a subpiramidais (Figura 3) (MATOS, 1998). Os frutos estão reunidos em um conjunto de contorno quadrangular em torno de um eixo mais ou menos longo e as sementes são extremamente pequenas (MATOS e OLIVEIRA, 1998). Existem vários trabalhos que relatam atividade antimicrobiana com *Lippia sidoides*, porém, todos esses trabalhos são realizados com óleo essencial demonstrando inibição contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, incluindo entre elas várias espécies de *Streptococcus sp.* que estão associados a furúnculos e outras doenças, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus mutans* associado a cáries dentárias, *Corynebacteria sp.* (mau cheiro nos pés), *Micrococcus spp.*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes* (flora normal da pele), *Pseudomonas aeruginosa* (oportunista em infecções do trato urinário e respiratório), *Escherichia coli*, *Mycobacterium smegmatis*, *Nocardia asteróides* (infecções pulmonar com formas metastáticas em outros locais) e fungos, tais como *Candida albicans* (infecções bucal e da garganta e outros órgãos), *Tricophyton spp* (dermatomicoses)., *Aspergillus niger*, *A. versicolor* e *A. flavus* (AGUIAR e MATOS, 1984; LEMOS et al., 1990; SOUZA et al., 1991; BOTELHO e SOARES, 1994; LACOSTE et al., 1994, 1996; MORAIS et al., 1996; XIMENES et al., 1996; MATOS e OLIVEIRA, 1998; MATOS, 1998; NUNES et al., 1998;). Trabalhos mostram que compostos secundários como o timol e o carvacrol são os principais responsáveis pela atividade antimicrobiana (CRAVEIRO, 1981). Assim, a busca por novas moléculas como peptídeos antimicrobianos em plantas do gênero *Lippia* torna-se necessária, visto que, a cada dia novos casos de resistência de microorganismos surgem e, a descoberta desses peptídeos produzidos com mecanismos biotecnológicos é uma nova promessa para o combate.



**Figura 3:** Foto do arbusto de *Lippia sidoides* mostrando folhas e flores (Autor: João S. Moreira).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

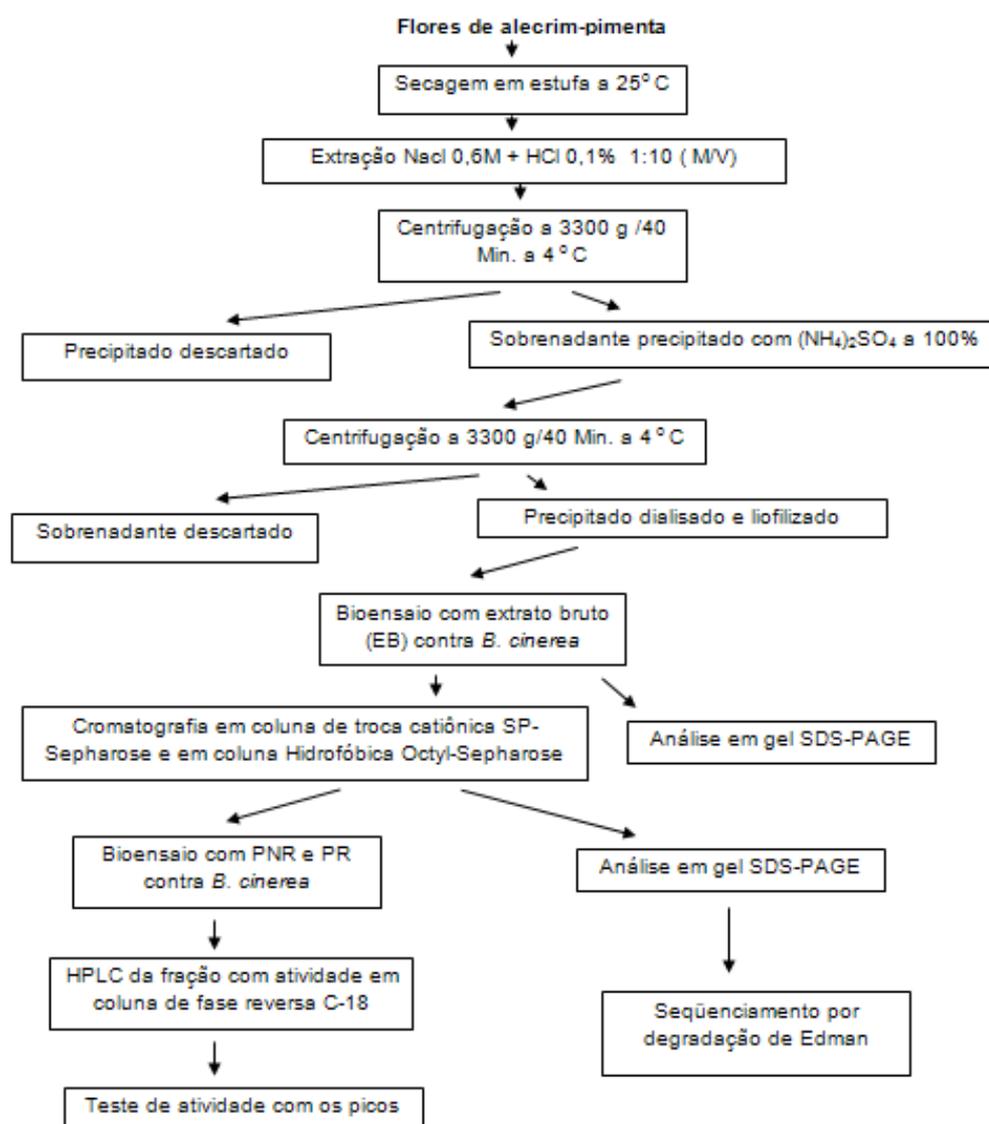
Busca e isolamento de peptídeos antimicrobianos de espécies do gênero *Lippia* com atividade contra diferentes patógenos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar e Isolar peptídeos de flores de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides*) utilizando cromatografia aberta Octyl-Sepharose seguida por cromatografia de fase reversa em HPLC.
- Avaliar a atividade utilizando os peptídeos purificados contra o fungo fitopatogênico *Botrytis cinerea* e bactérias patogênicas humanas.
- Sequenciar os peptídeos isolados que mostraram atividade.
- Realizar bioensaios com os peptídios isolados contra o fungo *Botrytis cinerea*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Para um melhor acompanhamento de todas as etapas desenvolvidas no trabalho, foi elaborado um fluxograma com toda a metodologia de identificação, análise e testes antifúngicos “*in vitro*” de proteínas de flores secas de alecrim-pimenta (*L. sidoides*) (Figura 4).



**Figura 4:** Fluxograma com a metodologia de identificação das proteínas antifúngicas de flores secas de *L. sidoides*.

### 3.1 EXTRAÇÃO PROTEICA

Inicialmente, algumas espécies do gênero *Lippia* foram submetidas ao processo de extração proteica. Flores, folhas e sementes de *Lippia rotundifolia*, *Lippia salvifolia*, *Lippia rubela* e *Lippia sidoides* foram coletadas no herbário da Universidade Federal de Juiz de Fora. Para isto, foram separados os órgãos (folha e flor) em extrato seco quando colocados em estufa a 35°C por dois dias e, extrato fresco quando submetidas à extração após a coleta (Tabela 4). As flores e folhas foram coletadas no período de floração entre janeiro e fevereiro /ano.

Para a extração das proteínas das flores e folhas secas, um liquidificador foi usado para triturá-las com adição de solução de extração contendo HCl 0,1% e NaCl 0,6 M na proporção 1: 10 (massa / volume). A mesma solução foi usada para flores, folhas frescas e sementes para a extração na proporção de 1: 5 (massa / volume) logo após a coleta, permanecendo todos os extratos durante 4 horas sob agitação constante em agitador magnético a 4°C. O extrato bruto gerado foi centrifugado por 40 min. a 3.300 g a 4°C, sendo o precipitado descartado. O sobrenadante foi submetido à precipitação com sulfato de amônio  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  a 100% de saturação com constante agitação em agitador magnético durante 12 horas. Após a precipitação, o material novamente foi centrifugado por 40 minutos a 3.300 g. em 4°C e o sobrenadante descartado. O precipitado foi colocado em membrana de diálise (*cut off* 1,0 kDa) contra água destilada por 24 horas. O material dialisado foi centrifugado a 3.300 g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e liofilizado.

**Tabela 4:** Espécies de *Lippia* utilizadas e suas partes constituintes em cada condição para extração protéica.

<b>Espécie</b>	<b>Parte constituinte</b>	<b>Condição</b>
<i>Lippia rotundifolia</i>	Flor	Seca e fresca
<i>Lippia salvifolia</i>	Flor Folha Semente	Fresca Fresca seca
<i>Lippia rubela</i>	Flor Semente	Fresca Seca
<i>Lippia sidoides</i>	Flor Semente	Seca e Fresca Seca

### 3.2 BIOENSAIO CONTRA O FUNGO *Botrytis cinerea*

Para avaliação da atividade antimicrobiana contra fungo, foi utilizado EB contra *Botrytis cinerea*. Duzentos e cinquenta  $\mu\text{L}$  de EB foi inoculada na concentração de  $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de proteínas. O ensaio foi feito de acordo com Wang e Ng (2004; 2007) com pequenas modificações em meio de cultura sólido Agar batata dextrose (BDA) (Anexo I), depositado em placa de Petri 100 x 15 mm. Meio  $\text{cm}^2$  do fungo *Botrytis cinerea* previamente crescido foi inoculado no centro da placa e 3 pequenos furos foram feitos no meio BDA margeando o inóculo para a colocação das amostras. Os meios foram colocados em temperatura ambiente ( $25^\circ \text{C}$ ) por sete dias e posteriormente, os resultados obtidos foram avaliados com o auxílio do programa *ImageJ*.( <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) com a medição dos halos em volta dos discos. Como controle positivo foi usado o fungicida Captan a 1% e como controle negativo foi usado água destilada. O ensaio foi feito em triplicata.

Nos ensaios seguintes, as frações de proteínas PNR e PR resultantes da cromatografia bem como as frações cromatográficas de HPLC foram analisadas quanto à atividade antimicrobiana pelo mesmo método de bioensaio descrito acima. Quando feito com as frações da cromatografia, foi usado para o ensaio 200  $\mu\text{g}$  de proteínas e com as frações cromatográficas de HPLC, foi usado 95  $\mu\text{L}$  na concentração de 50  $\mu\text{g}$  de proteínas. Todos os ensaios foram feitos em triplicata.

### 3.3 BIOENSAIO CONTRA BACTÉRIAS

Foi realizado ensaio de atividade antimicrobiana com os extratos bruto (EB) das espécies de *Lippia* contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas de acordo com Pelegrini et al. (2006). Previamente, as bactérias foram replicadas em

meio de cultura Luria Bertani (LB) (Anexo I) durante 18 horas a 37°C sob agitação em *shacker* a 240 RPM. As bactérias usadas nos ensaios foram: *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus sp*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*. No ensaio, foi usado como controle negativo (CN) água destilada e como controle positivo (CP) cloranfenicol 40 µg.mL<sup>-1</sup>. A concentração das amostras avaliadas foi de 200 µg.mL<sup>-1</sup>. As soluções com as bactérias contendo as amostras de EB foram incubadas a 37°C sob agitação a 240 RPM . em períodos de 1, 2, 3 e 4 horas. O crescimento bacteriano foi monitorado através de leitura em espectrofotômetro num comprimento de onda de 595 nm a cada hora. A densidade ótica inicial (OD) foi de 0,05 que corresponde a aproximadamente 5 x10<sup>6</sup> células por mL e usado 1 mL de volume final para cada amostra. Para cada amostra, os ensaios foram feitos em triplicata

### **3.4 ISOLAMENTO DAS PROTEÍNAS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

A fração precipitada com sulfato de amônio, dialisada e liofilizada foi aplicada em coluna SP-Sepharose (GE Healthcare/Suécia) de troca catiônica com um fluxo de 0,6 mL.min<sup>-1</sup>. Foram aplicados 10 ml de amostra na concentração de 800 µg.mL<sup>-1</sup>. A coluna SP- Sepharose foi previamente equilibrada com tampão de equilíbrio (Anexo I). O tampão de equilíbrio, também utilizado para a remoção das proteínas não retidas (PNR), enquanto que as proteínas retidas (PR) foram eluídas com tampão de eluição (Anexo I). Foi feito o monitoramento da eluição das proteínas em espectrofotômetro, empregando comprimento de onda fixo de 280 nm. Uma segunda coluna foi usada, uma vez que não foi possível separar nenhuma proteína na fração retida da coluna catiônica SP-Sepharose. O extrato bruto (EB) foi aplicado em coluna hidrofóbica Octyl-Sepharose (GE Healthcare/Suécia). A resina foi previamente equilibrada em tampão de equilíbrio (Anexo I). As PNR foram eluídas com o mesmo tampão de equilíbrio, enquanto as PR foram separadas com tampão de eluição (Anexo I). A eluição foi feita com fluxo de 0,5 mL. min<sup>-1</sup>, com volume de 2 mL por fração para ambas as colunas. As frações retidas e não retidas de proteínas

extraídas da cromatografia com a coluna Octyl-Sepharose foram separadas e submetidas à nova diálise com membrana de poro de 1,0 kDa, seguido de liofilização. Essas frações foram avaliadas quanto a sua atividade antifúngica. Em seguida, 320  $\mu\text{L}$  de amostra das PR que apresentou atividade, foram dissolvidos com o pareador iônico ácido trifluoracético (TFA) a 0,1% e aplicados em cromatografia de fase reversa com coluna analítica de HPLC (Vydac C-18TP 522). As proteínas retidas foram eluídas usando gradiente linear de acetonitrila (0 -100%) em 65 minutos com fluxo de  $1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  monitorado a 216 nm.

### **3.5 ANÁLISES DE MASSA MOLECULAR POR SDS-PAGE**

Análises de massa molecular foram feitas por SDS-PAGE, em gel de poliacrilamida 15% de acordo com Laemmli (1970). Alíquotas de cinquenta microgramas de proteínas foram precipitadas com ácido tricloroacético (TCA) 75% sendo que para cada 1,0 mL de amostra, 133  $\mu\text{L}$  de TCA a 75% foram adicionados e em seguida, colocado em geladeira por 45 min. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 15 min a 10.200 g em temperatura ambiente e descartado o sobrenadante. Duas lavagens dos precipitados foram conduzidas com 1,0 mL de acetona gelada e o material foi novamente centrifugado por 15 minutos a 9.300 g em temperatura ambiente. As amostras foram ressuspensas em 4  $\mu\text{l}$  de tampão de amostra (Anexo I) e 16  $\mu\text{l}$  de água destilada, fervidas por 10 minutos em seguida. A corrida foi feita a 200 V e 20 mA por cerca de 90 minutos. Os géis foram corados com nitrato de prata, de acordo com o método descrito por Blum et al. (1987).

### **3.6 TRANSFERÊNCIA DAS PROTEÍNAS PARA RESINA PVDF**

Após a análise da massa molecular em SDS-PAGE e a separação das proteínas por peso molecular, as proteínas foram transferidas do gel para uma membrana de PVDF com o equipamento Trans blot sd semi-dry transfer cell (BIO RAD). Para a transferência, folhas de papel filtro foram umidecidas com tampão de transferência (Anexo I), colocadas entre o gel e a membrana e aplicado 35 V, 10mA e 1W por 1 hora.

### **3.6 SEQUENCIAMENTO POR DEGRADAÇÃO DE EDMAN**

As amostras obtidas da cromatografia em coluna Octyl-sepharose que apresentaram atividade contra fungos, após serem analisadas em SDS-PAGE e transferidas para a resina de PVDF, foram submetidas ao sequenciamento por degradação de Edman. As sequências de aminoácidos, a partir do N-terminal das proteínas isoladas de flores de alecrim-pimenta, foram determinadas usando degradação automática padrão de Edman, de 2 a 5 pMol de amostra alquilada em sequenciador PPSQ-23 Shimadzu (GRAY, 1967; GRAY e SMITH, 1970).

### **3.7 ANÁLISES *IN SILICO***

As sequências de aminoácidos foram comparadas com outras seqüências de proteínas de plantas depositadas no NCBI Protein Data Bank ([www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov)) utilizando o programa Blastp (CHEN, STRAUSS e WONG, 1998). Foi utilizado o programa ClustalW (THOMPSON, HIGGINS e GIBSON, 1994) para o

desenvolvimento de alinhamento múltiplo das sequências de proteínas similares às sequências obtidas.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

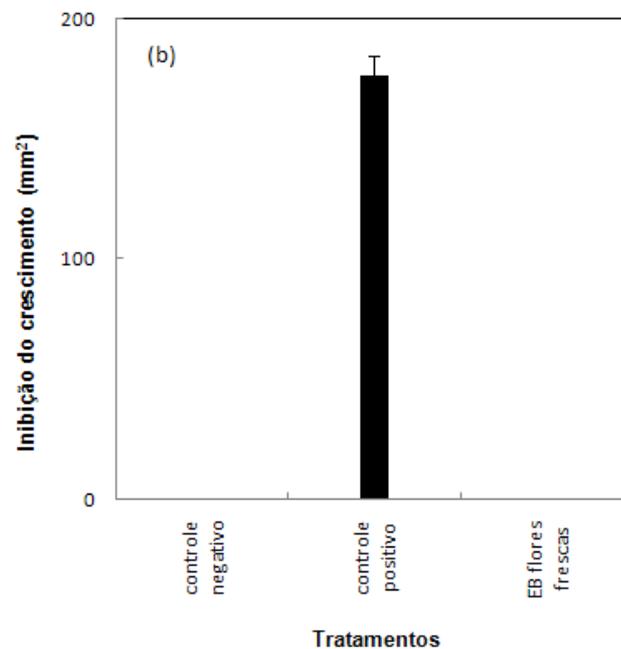
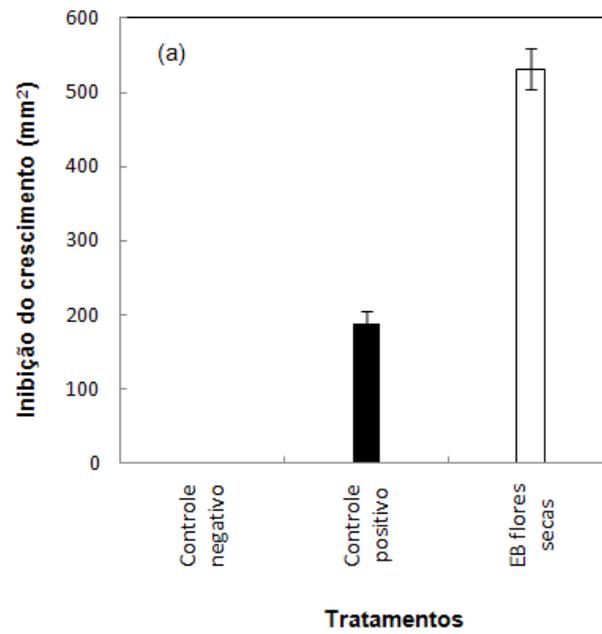
### 4.1 BIOENSAIOS COM EXTRATO BRUTO (EB) DE FLORES SECAS DE *Lippia sidoides* CONTRA O FUNGO FITOPATOGÊNICO *Botrytis cinerea*

Para avaliação da atividade antimicrobiana de flores secas e frescas de *L. sidoides* contra o fungo *Botrytis cinerea*, bioensaios foram realizados. O ensaio foi feito em meio sólido BDA onde foram colocados 200 µg das proteínas do EB. Com flores secas, a inibição de crescimento do fungo foi de 1,8 vezes mais que o controle positivo (Tabela 5) (Figura 5a) (Anexo I). Por outro lado, o ensaio com proteínas do EB de flores frescas não apresentou inibição (Tabela 5) (Figura 5b) (Anexo I).

Devido ao resultado encontrado no bioensaio com EB de flor seca de *Lippia sidoides*, resolvemos dar sequencia ao processo de purificação dessa amostra uma vez que o nosso projeto já estava definido, cujo objetivo era trabalhar com proteínas antifúngicas, e também devido à quantidade de amostras que tínhamos à disposição. Bioensaios contra bactérias foram feitos com outras espécies de *Lippia sp.*, com o intuito de avaliarmos quais espécies teriam atividade antimicrobiana, mas não foram trabalhadas a partir do extrato bruto. Outro inconveniente foi a grande limitação devido a pequena quantidade de amostras disponíveis dessas outras espécies de *Lippia sp.* Por este motivo, a partir desses primeiros ensaios, todo o processo de purificação foi conduzido apenas utilizando amostras de flores secas de *L. sidoides*, que apresentou boa inibição do fungo *Botrytis cinerea*.

**Tabela 5:** Porcentagem de inibição de cada espécie de *Lippia sp* contra o fungo patogênico *Botrytis cinerea* e contra bactérias patogênicas humanas. Amostra EB corresponde à amostra de extrato bruto da espécie citada; CP corresponde ao Controle Positivo; CN corresponde ao Controle Negativo. \* Representa o bioensaio em que a quantificação foi feita em mm<sup>2</sup> comparado com os controles e não em porcentagem. - corresponde a bioensaio não realizado.

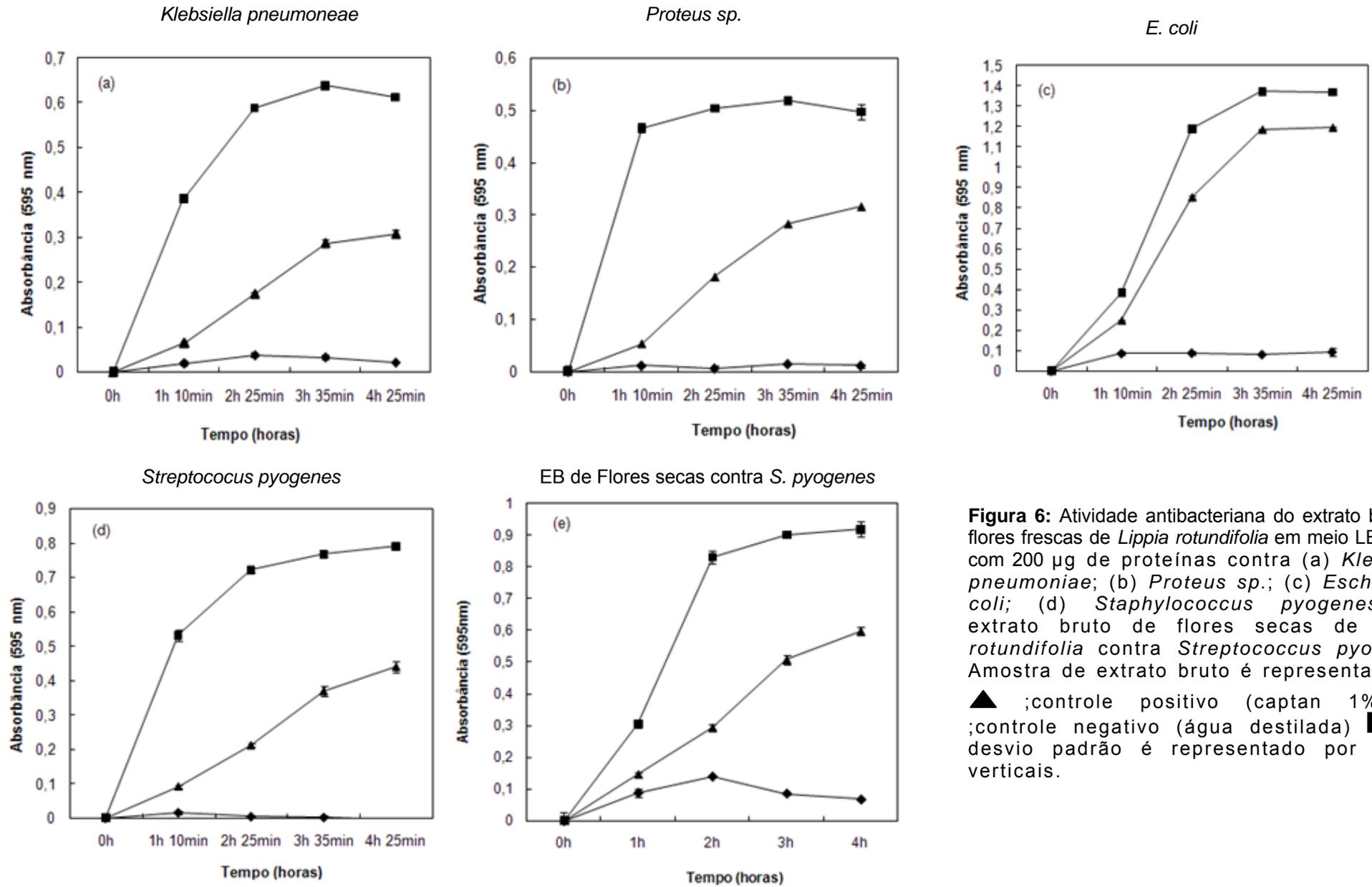
		<i>Botrytis cinerea</i> *			<i>Klebsiella pneumoniae</i>			<i>Escherichia coli</i>			<i>Streptococcus pyogenes</i>			<i>Proteus sp.</i>		
		Amostra EB	CP	CN	Amostra EB	CP	CN	Amostr a EB	CP	CN	Amostra EB	CP	CN	Amostra EB	CP	CN
<b><i>Lippia sidoides</i></b>	Flor seca	530,8 ± 27,73	188,8 ± 15,88	O	0	84,99 ± 0,16	0	0	87,76 ± 2,86	0	0	92,16 ± 1,75	0	0	91,61 ± 1,69	0
	Flor fresca	0	176,5 ± 13,91	0	0	87,32 ± 2,13	0	0	92,64 ± 1,18	0	0	90,32 ± 2,80	0	0	88,47 ± 1,27	0
<b><i>Lippia salvifolia</i></b>	Flor fresca	-	-	-	0	99,38 ± 1,17	0	0	91,60 ± 0,54	0	0	99,24 ± 2,30	0	0	91,50 ± 0,16	0
	Folha fresca	-	-	-	0	99,38 ± 1,17	0	53,06 ± 1,72	91,60 ± 0,54	0	47,80 ± 2,92	99,24 ± 2,30	0	0	91,50 ± 0,16	0
	Semente	-	-	-	99,30 ± 0,29	98,60 ± 0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b><i>Lippia rotundifolia</i></b>	Flor seca	-	-	-	49,60 ± 1,15	96,46 ± 0,23	0	12,60 ± 0,31	93,22 ± 1,46	0	44,28 ± 2,14	100 ± 0,073	0	36,66 ± 0,56	100 ± 0,70	0
	Flor fresca	-	-	-	-	-	-	-	-	-	35,07 ± 1,38	92,60 ± 0,22	0	-	-	-
<b><i>Lippia rubela</i></b>	Flor fresca	-	-	-	0	80,50 ± 0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Semente	-	-	-	0	91,28 ± 1,72	0	0	100 ± 5,79	0	0	97,49 ± 1,28	0	0	77,35 ± 6,76	0



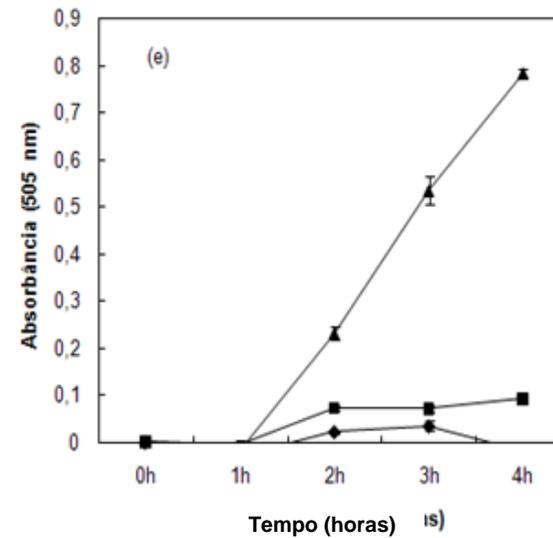
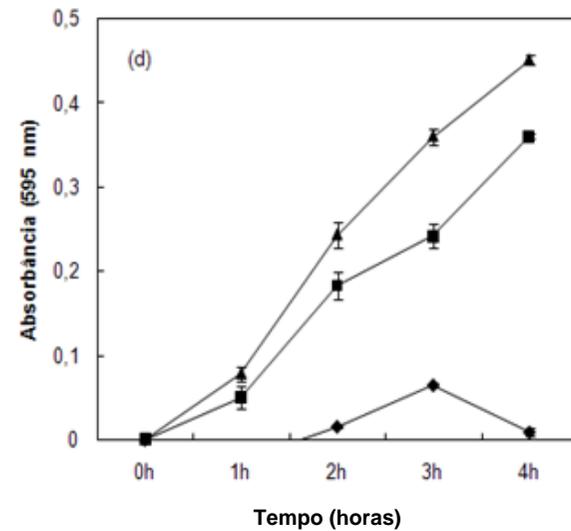
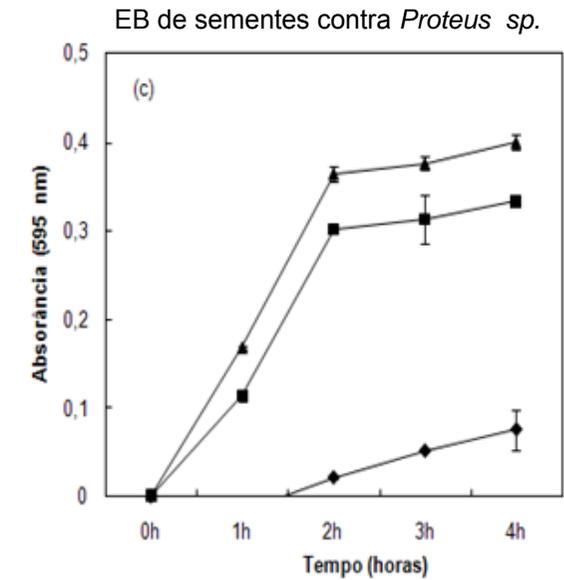
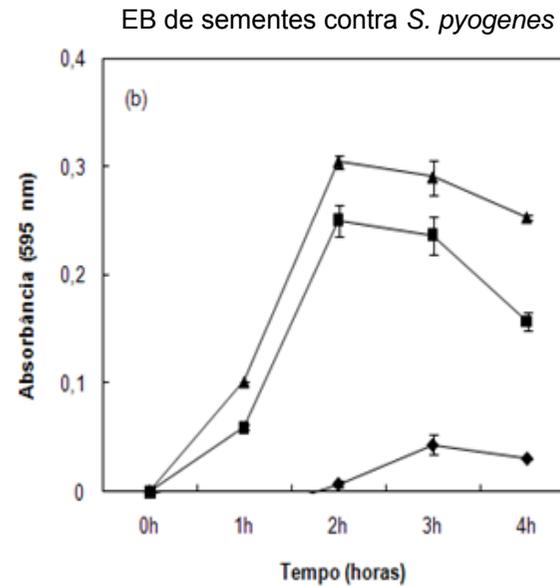
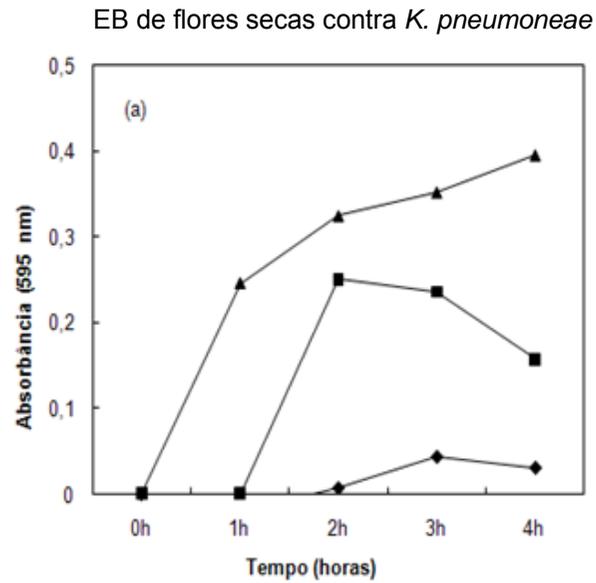
**Figura 5:** Atividade antifúngica do extrato bruto de *Lippia sidoides* em meio BDA com 200  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  de proteínas contra *Botrytis cinerea*. (a) Flores secas; (b) flores frescas. ■ Corresponde ao controle positivo; ▣ controle negativo (água destilada); □ Amostra protéica de extrato bruto. O desvio padrão é representado por barras verticais.

#### 4.2 BIOENSAIOS COM EXTRATO BRUTO (EB) DE ESPÉCIES DE *Lippia sp.* CONTRA BACTÉRIAS

Com o objetivo de avaliar as atividades antimicrobianas dos extratos brutos de todas as espécies de *Lippia* submetidas ao processo de extração de proteínas, bioensaios foram conduzidos contra algumas bactérias patogênicas humanas (Tabela 5). Foram colocados 200 µg de amostra em cada ensaio e o monitoramento do crescimento bacteriano foi feito em espectrofotômetro a 595 nm. Amostras extraídas de flores frescas de *Lippia rotundifolia* apresentaram inibição de crescimento da bactéria *Klebsiella pneumoniae* de 46,6 % (Tabela 5) (Figura 6a). A mesma amostra também inibiu o crescimento de *Proteus sp.* em 36,7% (Tabela 5) (Figura 6b) e de *E. coli* em 12,6% (Tabela 5) (Figura 6c). Essas mesmas bactérias Gram-negativas, principais responsáveis por infecções hospitalares gastrointestinais e urinárias tiveram o seu crescimento inibido por um peptídeo rico em glicina extraído da goiaba (PELEGRINI et al., 2008). Amostras de flores frescas de *L. rotundifolia* também apresentaram inibição de crescimento da bactéria Gram-positiva *Streptococcus pyogenes* de 42,3% (Tabela 5) (Figura 6d), inibição observada também com peptídeo derivado da semente de moringa (*Moringa oleifera*), cujo sua estrutura foi otimizada por Suarez et al. (2005). Inibição de 35,1% foi observada, mas com amostra de flores secas de *L. rotundifolia* contra *S. pyogenes* (Tabela 5) (Figura 6e). Portanto, de acordo com os resultados obtidos, fica evidente que algumas flores de *Lippia rotundifolia* possuem proteínas que inibem tanto bactérias Gram-positivas quanto bactérias Gram-negativas mostrando uma alta seletividade. Não obstante, tanto as flores secas quanto as frescas também mostraram atividade inibitória contra as bactérias. Flores frescas de *Lippia rubela* e sementes também foram submetidas ao processo de extração protéica seguido de ensaio, sendo o extrato de flor fresca contra a bactéria *Klebsiella pneumoniae* (Tabela 5) (Figura 7a) e o de semente contra as bactérias *K. pneumoniae* (Tabela 5) (Figura 7b), *Proteus sp.* (Figura 7c) *S. pyogenes*.(Figura 7d) e *E. coli* (Figura 7e). Entretanto, não foi observada a inibição de crescimento dos microorganismos testados em nenhum dos bioensaios.



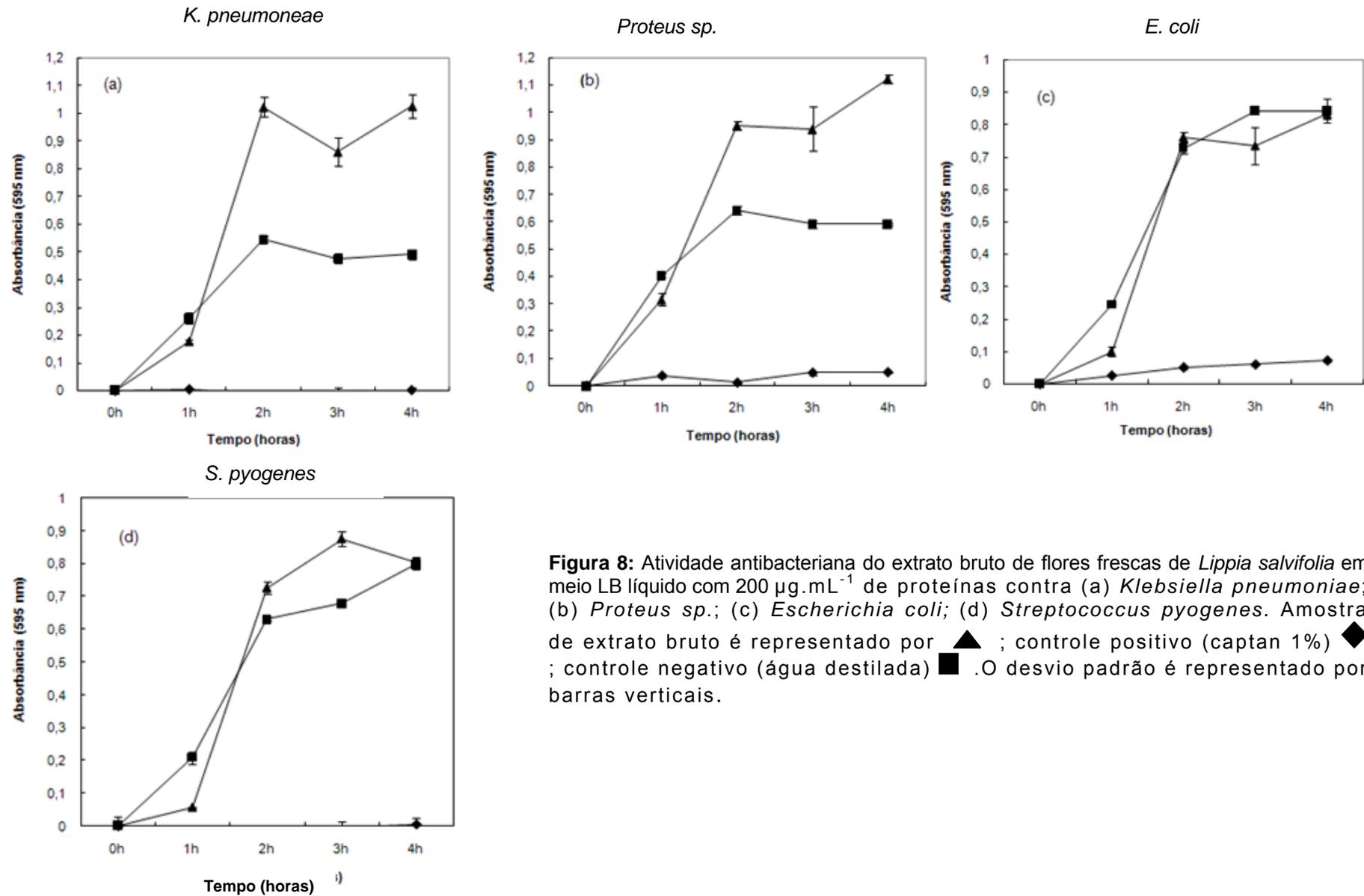
**Figura 6:** Atividade antibacteriana do extrato bruto de flores frescas de *Lippia rotundifolia* em meio LB líquido com 200 µg de proteínas contra (a) *Klebsiella pneumoniae*; (b) *Proteus sp.*; (c) *Escherichia coli*; (d) *Staphylococcus pyogenes*. (e) extrato bruto de flores secas de *Lippia rotundifolia* contra *Streptococcus pyogenes*. Amostra de extrato bruto é representado por ▲; controle positivo (captan 1%) ◆; controle negativo (água destilada) ■. O desvio padrão é representado por barras verticais.



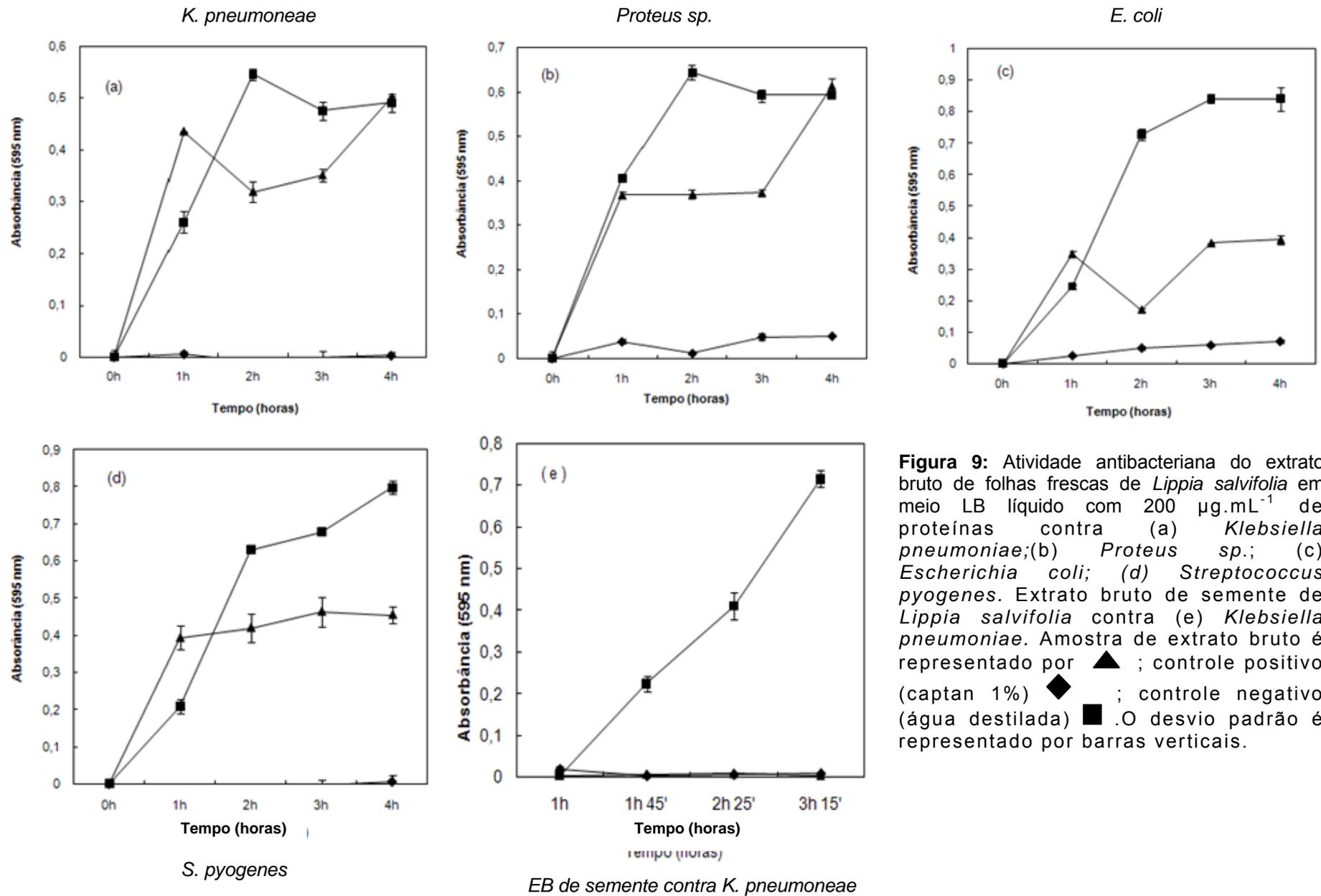
**Figura 7:** Atividade antibacteriana do extrato bruto de flores frescas de *Lippia rubela* em meio LB líquido com 200 µg de proteínas contra (a) *Klebsiella pneumoniae*. Extrato bruto de sementes de *Lippia rubela* contra (b) *Streptococcus pyogenes*; (c) *Proteus sp.*; (d) *Klebsiella pneumoniae*; (e) *E. coli*. Amostra de extrato bruto é representado por ▲; controle positivo (captan 1%) ◆; controle negativo (água destilada) ■. Desvio padrão é representado por barras verticais.

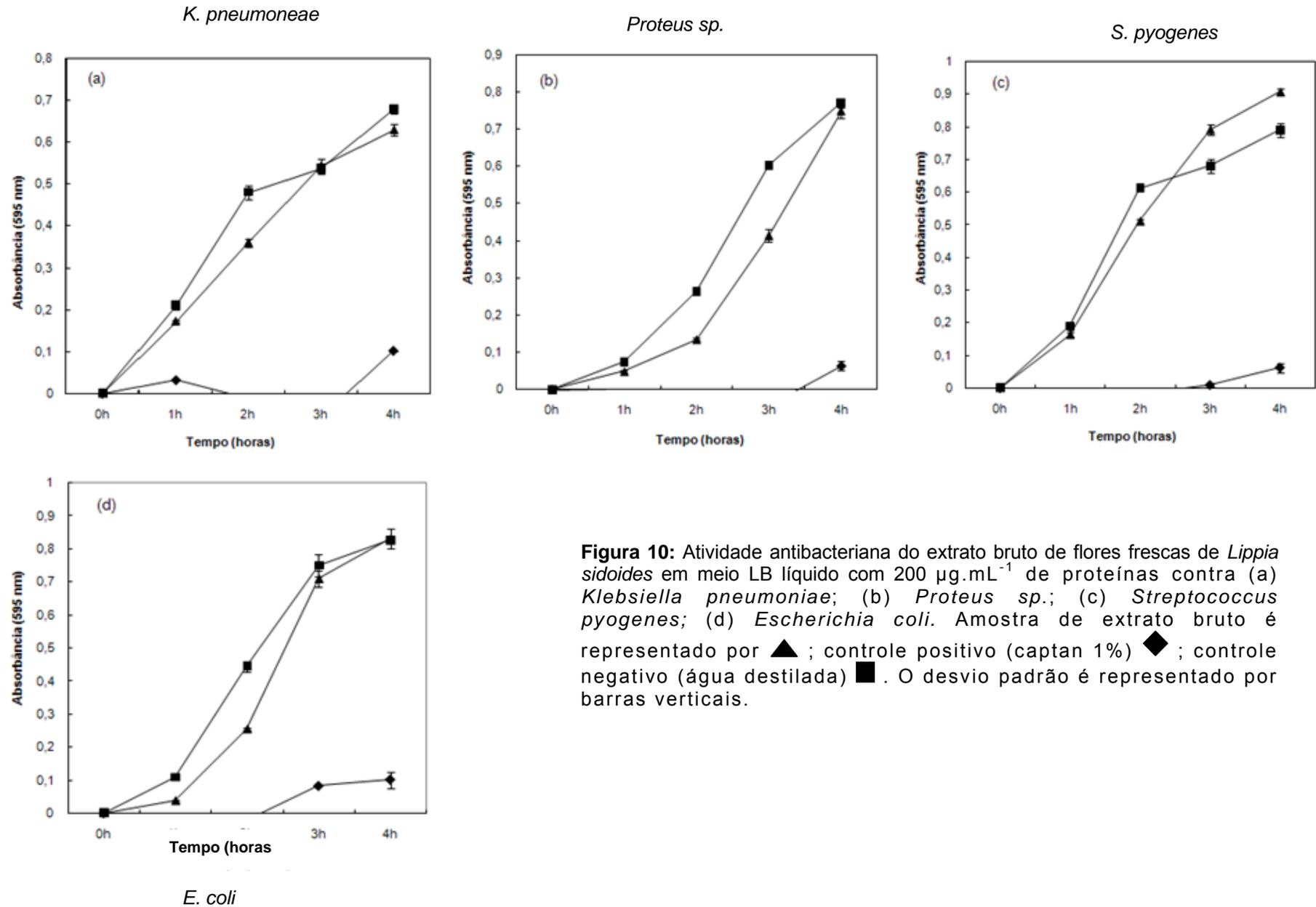
Da espécie *Lippia salvifolia*, foi feito bioensaio utilizando EB de flores e folhas frescas e sementes. A inibição de crescimento das bactérias *K. pneumoniae* (Figura 8a), *Proteus sp.* (Figura 8b), *E. coli* (Figura 8c) e *S. pyogenes* (Figura 8d) foi avaliada utilizando flores (Tabela 5), entretanto, nenhuma atividade antimicrobiana foi observada. Extratos de folhas frescas foram desafiados contra as mesmas bactérias não se observando atividade contra *K. pneumoniae* (Tabela 5) (Figura 9a) e *Proteus sp.* (Figura 9b). Por outro lado, observou-se uma redução de 53,1% no crescimento de *E. coli* (Tabela 5) (Figura 9c) e de 47,8% em *S. pyogenes* (Tabela 5) (Figura 9d), mostrando que proteínas presentes nas folhas de *L. salvifolia* possuem especificidade de ação contra algumas bactérias, além de combater tanto bactérias gram-negativas quanto gram-positivas. O EB extraído da semente de *L. salvifolia* foi desafiado contra a bactéria *K. pneumoniae* e mostrou ser capaz de inibir o seu crescimento em 99,3% (Tabela 5), sendo este o melhor resultado de atividade antibacteriana dentre todas as extrações feitas e uma promissora fonte de pesquisa (Figura 9e).

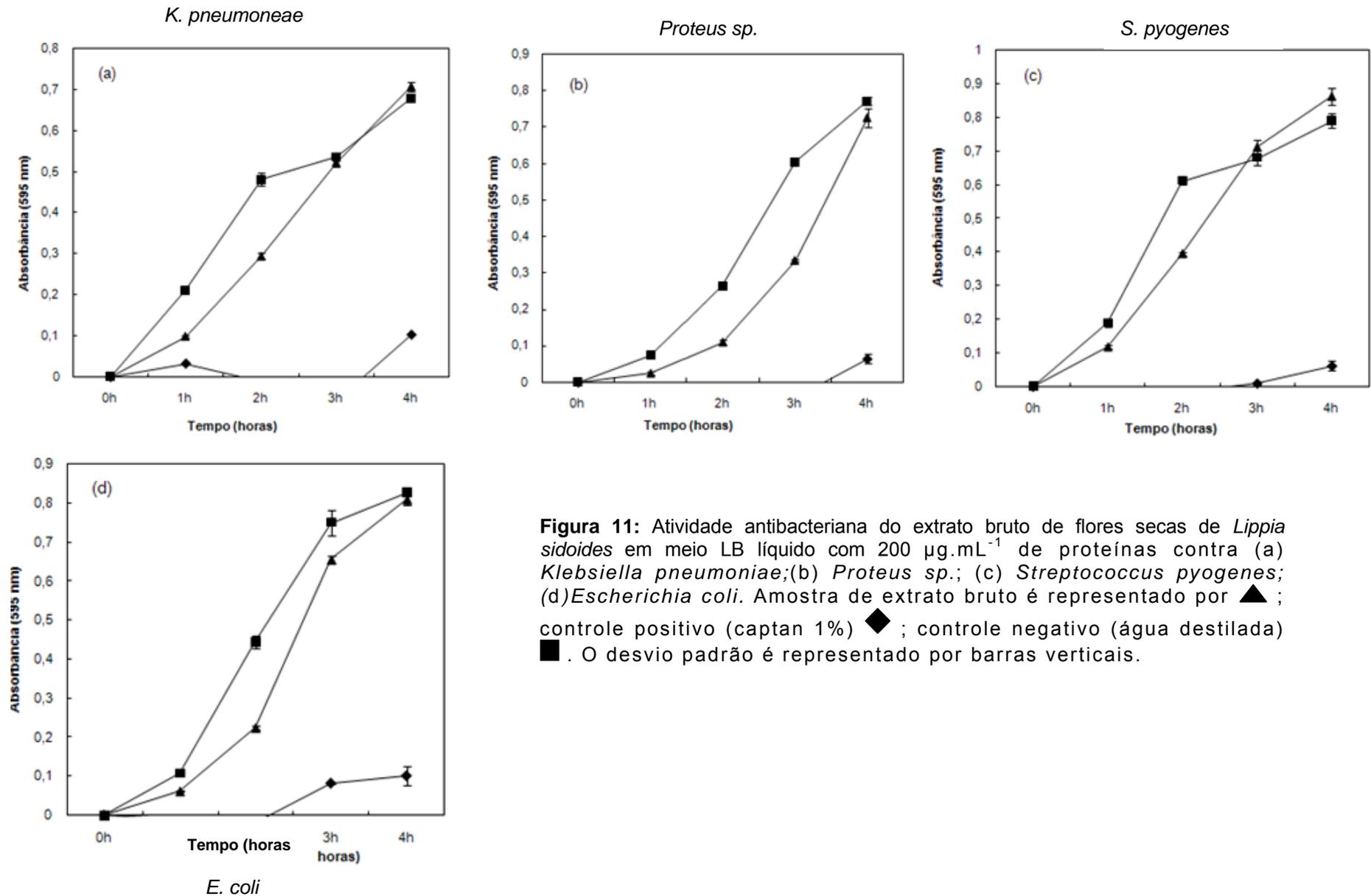
Flores secas e frescas de *Lippia sidoides* também tiveram os seus extratos brutos desafiados contra essas mesmas bactérias (Tabela 5) (Figura 10; Figura 11). Além de ensaio com flores, EB de sementes de *L. sidoides* também foi avaliado (Tabela 5) (Figura 12). Porém, nenhum dos extratos tanto de flores quanto de sementes foi capaz de inibir o crescimento bacteriano.

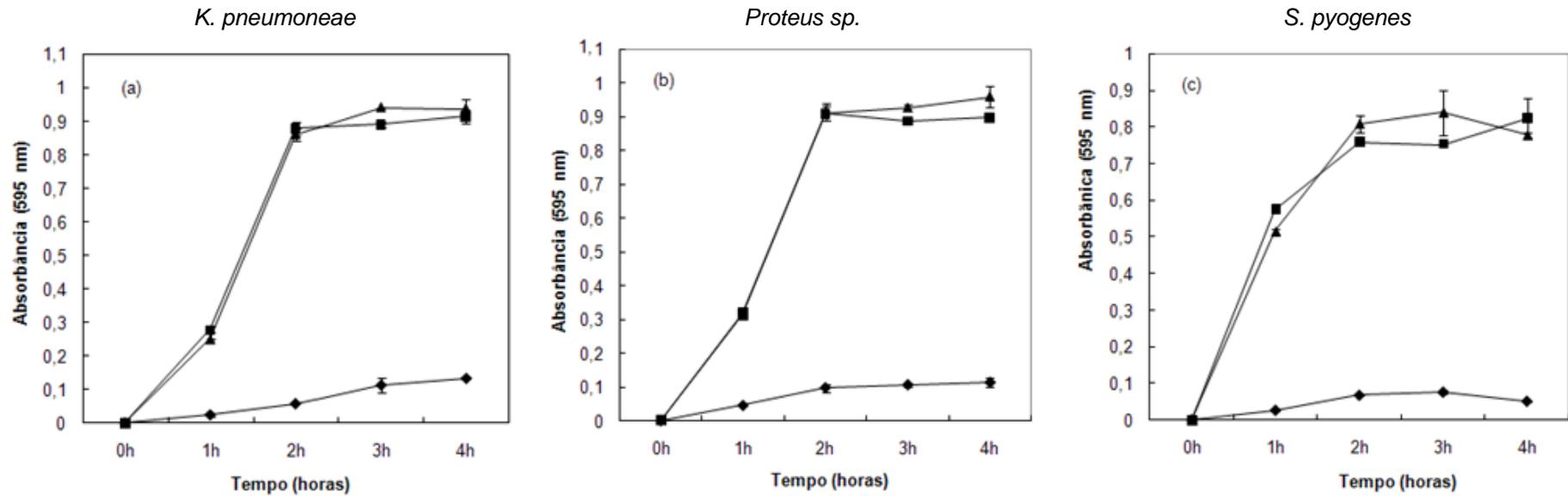


**Figura 8:** Atividade antibacteriana do extrato bruto de flores frescas de *Lippia salvifolia* em meio LB líquido com  $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de proteínas contra (a) *Klebsiella pneumoniae*; (b) *Proteus sp.*; (c) *Escherichia coli*; (d) *Streptococcus pyogenes*. Amostra de extrato bruto é representado por ▲; controle positivo (captan 1%) ◆; controle negativo (água destilada) ■. O desvio padrão é representado por barras verticais.







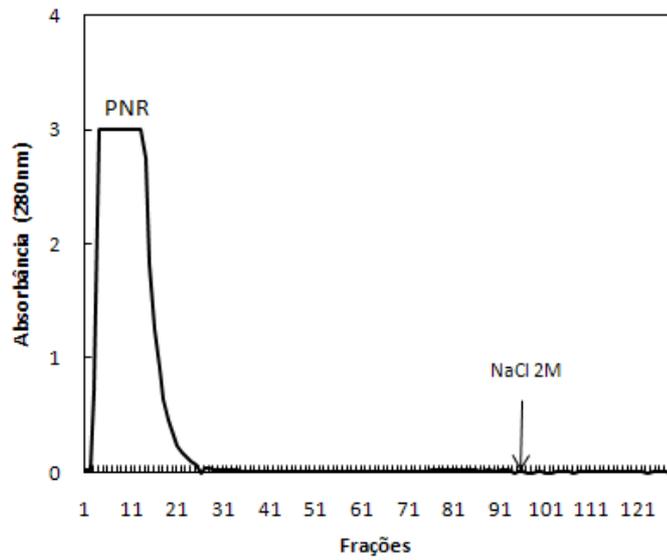


**Figura 12:** Atividade antibacteriana do extrato bruto de sementes de *Lippia sidoides* em meio LB líquido com  $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de proteínas contra (a) *Klebsiella pneumoniae*; (b) *Proteus sp.*; (c) *Streptococcus pyogenes*. Amostra de extrato bruto é representado por ▲; controle positivo (captan 1%) ◆; controle negativo (água destilada) ■. O desvio padrão é representado por barras verticais.

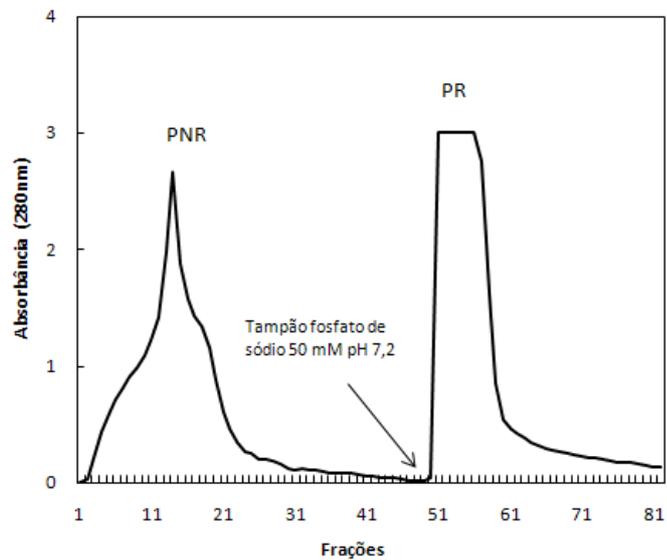
### 4.3 PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS ANTIFÚNGICAS DE FLORES SECAS DE *L. sidoides*

A amostra de EB de *L. sidoides* que apresentou atividade antifúngica contra o fungo *Botrytis cinerea* foi submetida ao processo de separação das proteínas através de cromatografia em coluna aberta. Após ser dialisado, liofilizado e ressuspendido, o EB foi quantificado de acordo com o método descrito por Bradford (1976). A separação das proteínas foi feita primeiramente em coluna SP-Sepharose que tem como característica a separação por forte troca catiônica (WU et al., 2005; LEUNG e NG, 2007; LIN e NG, 2008). As proteínas não retidas (PNR) foram retiradas com tampão de equilíbrio (Anexo I) e as proteínas retidas (PR) foram retiradas com tampão de eluição (Anexo I) (Figura 13a). Porém, a partir dos resultados do cromatograma, foi preciso fazer a troca da coluna uma vez que nenhuma proteína ficou retida, mostrando que as proteínas presentes no extrato não interagem por troca catiônica. A coluna adotada foi a Octyl-Sepharose, cujo, sua principal característica é a separação de proteínas hidrofóbicas. Característica que também é apresentada em peptídeos de defesa, visto que peptídeos anfifílicos apresentam forças eletrostáticas e hidrofóbicas (KHANDELIA, IPSEN e MOURITSEN, 2008). As PNR foram retiradas com tampão de equilíbrio (Anexo I) e, as PR foram retiradas com adição de tampão de eluição (Anexo I) (Figura 13b) A partir da análise dos cromatogramas apresentados, a coluna Octyl-Sepharose foi escolhida para as próximas análises cromatográficas com a finalidade de separar as proteínas para os próximos experimentos, visto que essa coluna tem sido bastante usada na purificação de peptídeos antimicrobianos (REMIGER, et al., 1999; AHERN, VERSCHUEREN e SINDEREN, 2003; LIENQUEO et al., 2007; LEE, CHUREY e WORABO, 2008;).

(a)



(b)



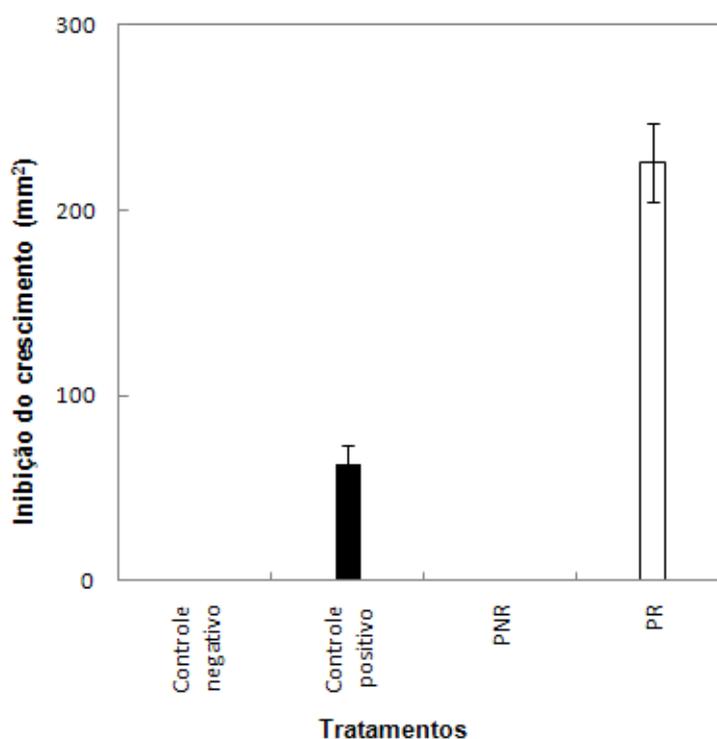
**Figura 13:** Perfis cromatográficos. (a) Cromatografia de troca catiônica em coluna SP-Sepharose. (b) Cromatografia em coluna hidrofóbica Octyl-Sepharose. . PNR e PR correspondem a pico não retido e pico retido respectivamente. A seta indica a eluição das proteínas retidas com tampão fosfato de sódio 50m M pH 7,2 + NaCl 2M (a) e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,7 M (b).

#### 4.4 BIOENSAIO COM AS FRAÇÕES PR E PNR DE FLORES SECAS DE *Lippia sidoides* EM CROMATOGRAFIA COM COLUNA OCTYL-SEPHAROSE

As frações protéicas separadas em cromatografia aberta com a coluna de Octyl-sepharose foram testadas contra *B. cinerea*. Foram usados 200 µg das proteínas de PNR e PR. No ensaio com PNR, nenhuma inibição de crescimento do fungo foi mostrada (Tabela 6) (Figura 14) (Anexo II), enquanto que PR apresentou uma redução 2,6 vezes maior no crescimento do *Botrytis* comparado com o controle positivo. A fração PR foi aplicada em RP-HPLC e feito Bioensaio dos picos do cromatograma gerado. Foi aplicado 50 µg de proteínas, porém, não mostrou nenhuma inibição de crescimento do fungo (Anexo III). Uma provável explicação para a não inibição nesse ensaio seria a superestimação da quantidade de proteínas quando feita a quantificação, ou também, a escolha errada dos picos que foram testados.

**Tabela 6:** Porcentagem de inibição de crescimento do fungo *Botrytis cinerea* Obtido das frações PR e PNR da cromatografia em coluna Octyl-Sepharose comparada CN: controle negativo e CP: controle positivo.

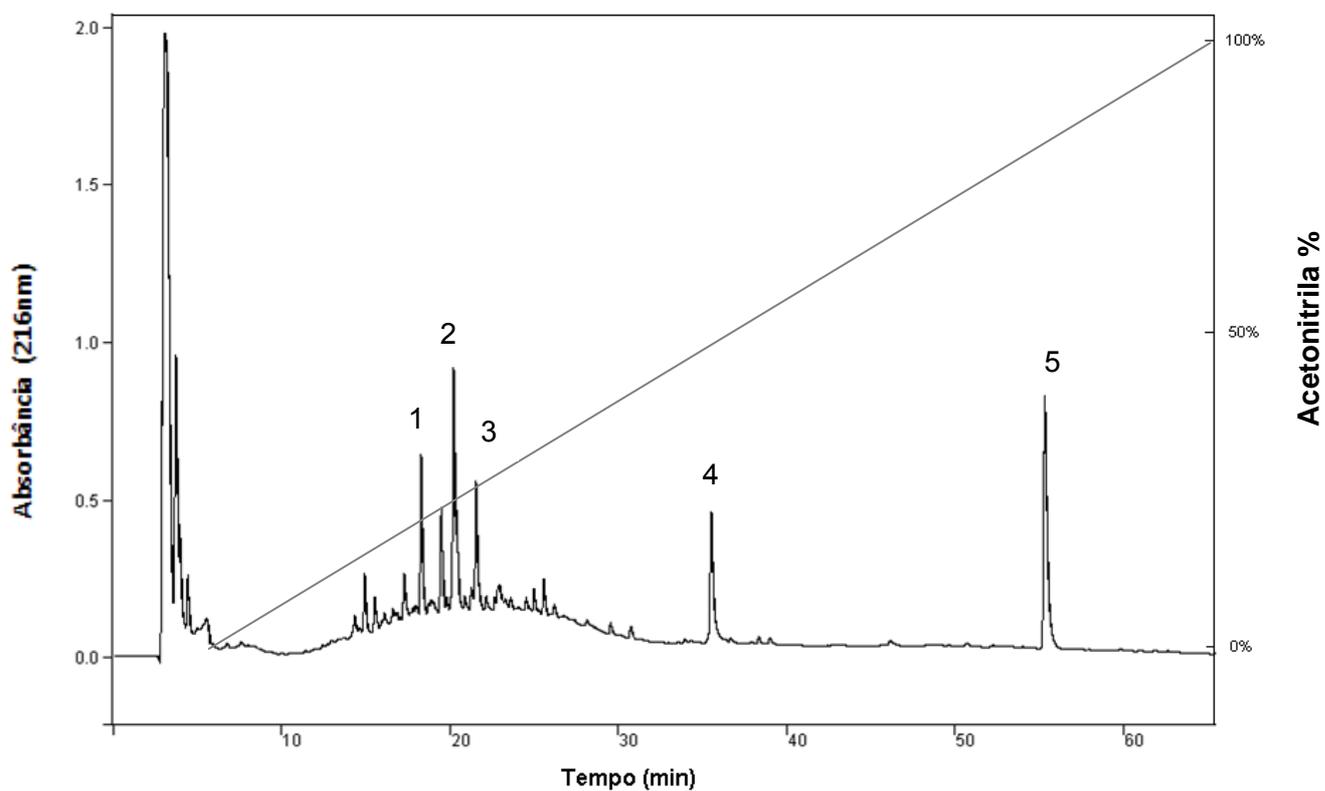
		<i>Botrytis cinerea</i>		
		Amostra	CP	CN
<i>Lippia sidoides</i>	PR	225,76 ± 21,69	53,63 ± 10,14	0
	PNR	0	175,26 ± 10,14	0



**Figura 14:** Atividade antifúngica em meio BDA com 200 µg de proteínas das frações protéicas de *Lippia sidoides* resultantes de cromatografia em coluna Octyl-Sepharose contra *Botrytis cinerea*. ■ Corresponde ao controle positivo; ▣ Controle negativo (água destilada); □ PR; ▨ PNR. O desvio padrão é representado por barras verticais.

#### 4.5 ISOLAMENTO DAS PROTEÍNAS DA FRAÇÃO PR EM HPLC DE FASE REVERSA

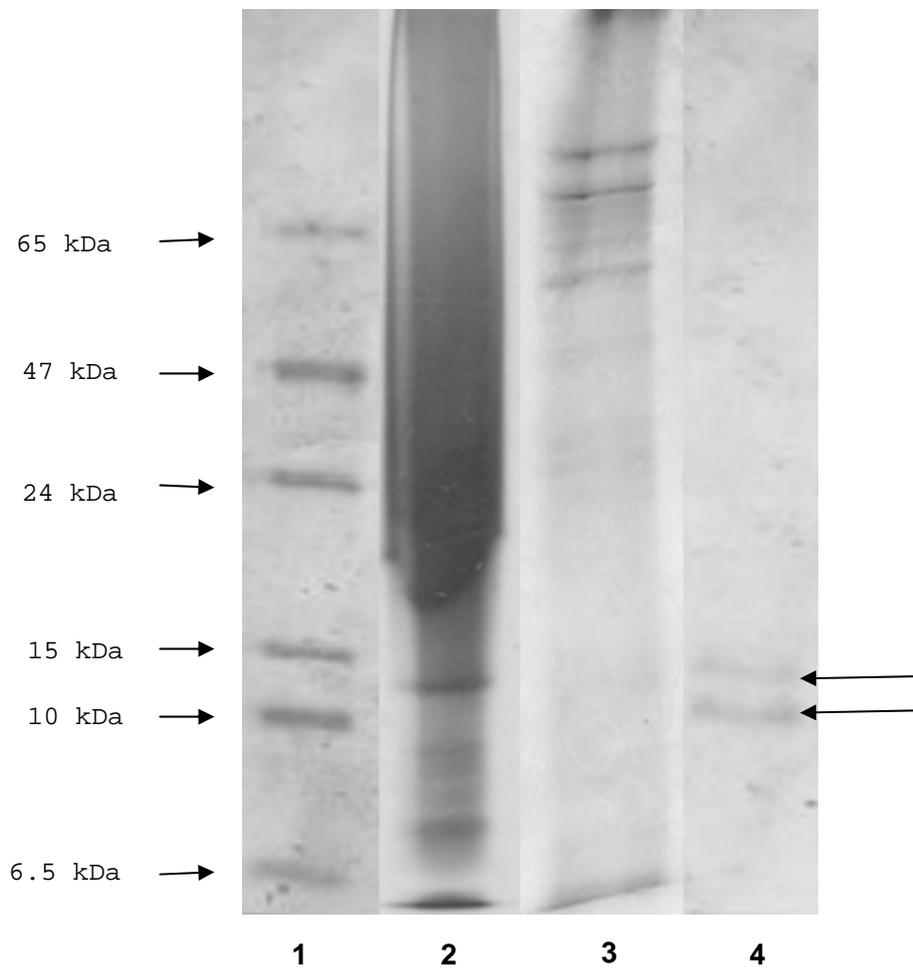
Para o isolamento das proteínas contidas na fração PR da cromatografia Octyl-Sepharose, PR foi aplicado em uma coluna de fase reversa HPLC (Vydac C18-TP), que separa as proteínas de acordo com a sua hidrofobicidade e as proteínas foram eluídas usando um gradiente linear de acetonitrila (0-100%) durante 65 min de eluição. As proteínas eluídas de acordo com o cromatograma gerado mostraram alguns picos entre 20 e 80% de acetonitrila (Figura 15). Os picos 1, 2, 3, 4 e 5 foram escolhidos para teste de atividade antifúngica porque as concentrações de acetonitrila desses picos em colunas de fase reversa podem indicar a eluição de peptídeos antimicrobianos como defensinas isolada de feijão de corda (FRANCO et al., 2006), fabantina de vagem de fava (ZHANG e LEWS, 1997), peptídeo rico em glicina de sementes de goiaba (PELEGRINI et al., 2008), defensina de semente de lentilha (FINKINA et al., 2008) e um novo peptídeo antimicrobiano do carrapato *Ixodes sinenses* (LIU et al., 2008).



**Figura 15:** Cromatograma de HPLC fase reversa (Vydac C-18TP 522) das proteínas retidas (PR) de flores secas de *Lippia sidoides* usando coluna analítica com fluxo de  $1,0 \text{ ml} / \text{min}^{-1}$ . TFA 0,1% foi usado como pareador iônico e a linha diagonal indica o gradiente linear de acetonitrila (0-100%).

#### 4.6 ANÁLISE DA MASSA MOLECULAR DE PROTEÍNAS DE *Lippia sidoides*

As análises de massa molecular por eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS (SDS-PAGE) foram feitas em todas as etapas de purificação para acompanhar o isolamento das proteínas de flores secas de *Lippia sidoides*. Foi feito SDS-PAGE 15% para as amostras de EB que mostrou a separação de algumas proteínas com diferentes massas moleculares que variaram de 15 kDa a 6.5 kDa (Figura 16). Após a aplicação do EB em coluna Octyl-Sepharose, uma outra análise de massa molecular feita apenas com as frações PR e PNR obtidas apresentaram perfis diferentes de massa molecular de proteínas. Apenas duas proteínas com massa molecular com menos de 15 kDa e outro com aproximadamente 10kDa respectivamente, aparecem na fração PR (Figura 16), diferentemente da fração PNR, que apresentou um número maior de bandas variando de 70 kDa a 6,5 kDa, porém, não mostrando proteínas com massa molecular entre 15 e 10 kDa. As frações coletadas dos picos de RP-HPLC também foram submetidas à análise SDS-PAGE. Os picos I, II, III, IV e V (Figura 15) do cromatograma não apresentaram nenhum bandejamento de proteínas (dados não mostrados), devida a baixa concentração dos picos eluídos. Uma importante observação deve ser feita em relação às duas bandas de proteínas que aparecem entre 10 e 15 kDa no gel de EB e também no PR: Em todas as etapas de purificação seguida por bioensaio e análise de massa molecular, essas proteínas apareceram, sendo que o ensaio com PR mostrou uma inibição de crescimento do fungo, indicando que essas podem apresentar atividade antifúngica.



**Figura 16:** SDS-PAGE de três etapas de purificação das proteínas de flores secas de *Lippia sidoides*. 1 representa o marcador molecular em todos os géis; 2 amostras protéicas do EB; 3 fração PNR da cromatografia em coluna Octyl-Sepharose; 4 fração PR da cromatografia em coluna Octyl-Sepharose.

#### 4.5 SEQUENCIAMENTO DAS PROTEÍNAS DA FRAÇÃO PR E ANÁLISE *IN SILICO*

Na análise da massa molecular da fração PR, foram mostradas duas proteínas que variavam entre 15 e 10 kDa, as mesmas que no ensaio mostraram

atividade contra *B.cinerea*. Essas proteínas foram submetidas ao sequenciamento N-terminal por degradação de Edman e revelaram fragmentos distintos. As sequências foram comparadas com outras, depositadas no NCBI protein data bank ([www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov)). A primeira seqüência gerada do peptídeo de aproximadamente 10 kDa mostrada em SDS-PAGE, apresentou 18 resíduos de aminoácidos com similaridade de 88,9% com duas proteínas R de resistência a doenças, sendo uma do tipo NBS-LRR e outra com domínio NBS-LRR de arroz (CHOW et al., 2004) e oito proteínas tipo - Rp1 com similaridade entre 88,3% e 77,7% com proteínas do milho e sorgo (Figura 17). A primeira proteína R NBS-LRR possui 876 resíduos de aminoácidos, a segunda 1211, enquanto as outras proteínas Rp1 possuem entre 1278 e 1297 resíduos de aminoácidos. Proteínas R NBS-LRR, são proteínas de resistência a doenças que contém uma série de repetições ricas em leucina, um sítio de ligação no nucleotídeo e um domínio variável carboxi- e amino-terminal (MCHALE, et al., 2006). As proteínas Rp1 são codificadas por genes R de milho que conferem diferentes tipos de resistência a fungos, porém, a mais comum é a resistência ao fungo que causa ferrugem foliar (*Puccinia sorghi*) (COLLINS et al., 1999). Esses, são genes de resistência a doenças altamente complexos e por desigualdade de recombinação, pode resultar na variação de tamanho e organização (RAMAKRISHNA et al., 2002) e que são responsáveis pelo maior modo de defesa das plantas contra uma grande quantidade de patógenos. Os mesmos genes R responsáveis por codificar as proteínas Rp1, codificam também as proteínas R NBS-LRR. As NBS-LRRs são uma grande variedade de proteínas R de muitos organismos que servem como plataforma de interação, sendo que geneticamente, são determinantes de respostas específicas. Segundo Plocik, Layden e Kesseli (2004), proteínas R do hospedeiro possuem receptores específicos que reconhecem a avirulência do patógeno (Avr) enquanto que sua interação produz uma resposta de defesa da planta chamada resposta hipersensitiva que impede a progressão do patógeno, através de uma variedade de mecanismos. Cada proteína NBS-LRR possui uma região NBS conservada para a hidrólise e ligação de ATP que resulta em alterações conformacionais na sinalização ativando a resposta de defesa e morte celular e uma região LRR que está envolvida, predominantemente, na interação intramolecular regulatória resultando em uma série de respostas de defesa nas plantas como, por exemplo, o fluxo de cálcio e íons, a ativação de uma explosão

oxidativa, uma cascata de proteínas kinases associadas à mitose, a indução de genes relacionados à patogênese e uma resposta hipersensitiva (MCHALE et al., 2006). Belkhadir, Subramaniam e Dangl (2004) apresentaram uma série de fragmentos purificados com grande variação de massa molecular de um complexo NBS-LRR de cevada, que corrobora com os resultados encontrados na purificação de proteínas de flores secas *Lippia sidoides* mostrando um fragmento (Ls-AMP1) de aproximadamente 10 kDa. Dessa forma, com o alinhamento da sequência N-terminal do peptídeo Ls-AMP1 com sequências de proteínas R NBS-LRR e proteínas Rp1 (Figura 16) com o programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>), foi mostrado uma grande homologia do peptídeo com proteínas R, onde podemos sugerir a classificação dessa proteína na superfamília de proteínas NBS-LRR.

**Figura 17:** Alinhamento da seqüência do N-terminal Dos resíduos de aminoácidos do peptídeo LsAMP1 com proteínas R NBS-LRR pelo ClustalW. As marcações em preto dos resíduos de aminoácidos de todas as seqüências mostram a similaridade entre as seqüências. (\*) Indica os resíduos completamente conservados. Em cada alinhamento é mostrado o número de acesso no NCBI, o nome, o organismo, a seqüência e a referência.

Nº acesso NCBI	Nome	Organismo	Sequência	Referencia
	Ls-AMP1	<i>Lippia sidoides</i>	1 E A L Y N S E D L Y E E T S D S D D 18	-
AAV32240	Proteína NBS-LRR	<i>Oryza sativa</i>	72 E A L Y N A E D L L D E T S D A D D 196	Direct submission
AAS79735	Proteína NBS-LRR	<i>Oryza sativa</i>	72 E A L Y N A E D L L D E T S D A D D 196	Direct submission
AAO16686	Proteína tipo Rp1	<i>Zea mays</i>	72 E A F Y D A E D L L D E T S D K D D 196	RAMAKRISHNA et al., 2002
AAQ74890	Proteína tipo Rp1	<i>Sorghum bicolor</i>	72 E A F Y D A E D L L D E T S D K D D 196	Direct submission
ABI94578	Pi37	<i>Zea mays</i>	72 Q A F Y N A E D L L D E T S N M D D 194	LIN, et al., 2007
BAB92535	Rp1-kp1	<i>Zea mays</i>	72 Q A F Y N A E D L L D E T S N M D D 194	SASAKI, et al., 2002
BAB92541	Rp1-kp1	<i>Zea mays</i>	72 Q A F Y N A E D L L D E T S N M D D 194	SASAKI, et al., 2002
AAM03019	Rp1-4	<i>Zea mays</i>	72 E A F Y D A E D L L D E T S N S D D 192	RAMAKRISHNA et al., 2002
AAK06860	Rp1-dp7	<i>Oryza sativa</i>	72 E A Y Y D A E D L L D E T S D R D D 192	SUN et al., 2001
AAD47197	Complexo RP1-D	<i>Sorghum bicolor</i>	72 E A Y Y D A E D L L D E T S D R D D 192	COLLINS et al., 1999
			* * * * * * * *	

A segunda seqUência gerada do peptídeo de cerca de 15 kDa mostrada em SDS-PAGE apresentou 19 resíduos de aminoácidos com similaridade de 94,7% com uma proteína NBS-LRR de 682 kDa de uva (VELASCO et al., 2007). Já com as outras seqUências, houve uma variação entre 52,6% e 63,1 % de similaridade. No alinhamento da seqUência N-terminal do peptídeo Ls-AMP2 com uma seqUência da proteína R NBS-LRR e proteínas hipotéticas (Figura 18) com o programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) , também foi mostrado uma grande homologia dessa proteína com proteínas R, onde podemos sugerir que esse peptídeo também pertence superfamília de proteínas NBS-LRR.

Segundo Pellegrini et al. (2004), a fragmentação da ovoalbumina, uma proteína de 450 kDa e uma das mais abundantes no ovo de aves, gerou cinco peptídeos com atividade antimicrobiana contra *Bacillus subtilis* e *Candida albicans*. Parish et al. (2001) mostraram que diferentes fragmentos da hemoglobina humana são responsáveis por uma substancial atividade antimicrobiana contra bactérias e fungos. Em outro trabalho, Pellegrini et al. (1999) isolaram e identificaram três domínios bactericidas na molécula de  $\alpha$ -lactoalbumina bovina, com atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Portanto, como com a análise *in silico* dos fragmentos gerados por degradação de Edman, podemos ver que essas seqUências possuem uma alta homologia com proteínas R NBS-LRR que, em geral, possuem entre 86 a 190 kDa. Aqui, propomos que a presença desses dois peptídeos no extrato de flores secas de *L. sidoides* seria derivado da clivagem dessas proteínas maiores, também utilizadas como fontes de reserva, em peptídeos menores com funções alternativas como mostrado acima, que por sua vez, possuem atividade antimicrobiana.

**Figura 18:** Alinhamento da sequência do N-terminal Dos resíduos de aminoácidos do peptídeo LsAMP2 com duas proteínas R NBS-LRR pelo ClustalW e demais proteínas hipotéticas. As marcações em preto dos resíduos de aminoácidos de todas as sequências mostram a similaridade entre as sequências. (\*) Indica os resíduos completamente conservados. Em cada alinhamento é mostrado o número de acesso no NCBI, o nome, o organismo, a sequência e a referência.

Nº acesso NCBI	Nome	Organismo	Sequência	Referencia
	Ls-AMP2	<i>Lippia sidoides</i>	1 S P P E A - A Y G P G N T N S D - S G D K 19	
CAN81810	Proteína NBS-LRR	<i>Vitis vinifera</i>	393 S P P E A - A E A G D T T E S N - N D N S 435	VELASCO et al., 2007
ACF85898	1..309	<i>Zea mays</i>	194 A P P E A - A A G Q G Q V V G G - - - - 215	Direct submission
ACF88117	1..309	<i>Zea mays</i>	194 A P P E A - A G G Q G Q V V G G - - - - 215	Direct submission
NP001046754	Os02g0448000	<i>Oryza sativa</i>	196 A P P E A - A G G Q G Q V V G G - - - - 217	OHYANAGI et al., 2006
BAD28974	DUF296	<i>Oryza sativa</i>	196 A P P E A - A G G Q G Q V V G G - - - - 217	Direct submission
BAF08668	Os02g0448000	<i>Oryza sativa</i>	196 A P P E A - A G G Q G Q V V G G 217	International Rice Genome Sequencing Project
EAY85693	Osl_07061	<i>Oryza sativa</i>	196 A P P E A - A G G Q G Q V V G G 217	YU et al., 2005
EAZ22891	1..316	<i>Oryza sativa</i>	196 A P P E A - A G G Q G Q V V G G - 217	YU et al., 2005
CAN70304	1..694	<i>Vitis vinifera</i>	395 E A P W I - A T G P S S P T P Q - P G S S 440	YU et al., 2005

\*

\*

\*

## 5 CONCLUSÕES

Embora exista uma enorme quantidade de trabalhos relatando o isolamento e purificação de proteínas/peptídeos antimicrobianos (AMPs), os resultados aqui demonstrados trazem novas e importantes informações a respeito da purificação de proteínas com atividade antimicrobiana. Este foi o primeiro trabalho desenvolvido com flores de uma espécie do gênero *Lippia*, e um dos poucos trabalhos que relatam a purificação de AMPs a partir de amostras de flores, talvez devido à baixíssima quantidade de proteínas encontrada nos extratos. A começar pelo método de extração, que mostrou ser um método eficiente para tal propósito, seguido pelo processo de cromatografia aberta em coluna hidrofóbica e RP-HPLC que também apresentaram ótimos resultados de separação de proteínas. Os ensaios contra bactérias demonstraram atividade antimicrobiana com algumas espécies do gênero *Lippia* como, por exemplo, flores frescas de *Lippia rotundifolia*, folhas frescas de *Lippia salvifolia* e semente de *Lippia salvifolia* que inibiram as bactérias *K. pneumoniae*, *Proteus sp.* e *S. pyogenes* e *E. coli*. Estes extratos se tornaram promissoras fontes de investigação. O ensaio antifúngico com peptídeos de flores secas de *Lippia sidoides* (Ls-AMP1) e (Ls-AMP2) mostraram uma eficiente inibição no crescimento do fitopatógeno *Botrytis cinerea*. Com a comparação das seqüências e com o alinhamento, podemos sugerir que os peptídeos Ls-AMP1 e Ls-AMP2 pertencem ao grande grupo das proteínas R NBS-LRR, que são resultado de proteínas maiores, onde, após terem sido clivadas por proteinases, geraram peptídeos com atividade antimicrobiana. Esses peptídeos poderão ser usados para fins biotecnológicos na engenharia genética para o desenvolvimento de produtos antimicrobianos mais eficientes e alternativos.

## 6 PERSPECTIVAS

O isolamento e a caracterização de peptídeos com atividade antimicrobiana têm sido cada vez mais relatados, mostrando a busca e a necessidade de aplicação de novas moléculas no controle tanto de patogenicidades humanas como de fitopatogenicidades. O uso de ferramentas biotecnológicas nos permite o aprimoramento em termos estruturais, funcionais e produção dessas moléculas. Nesse sentido, os AMPs isolados de flores de *Lippia sidoides* poderão:

- Ser clonados e expressados em sistemas heterólogos, para a ampliação de atividade antimicrobiana contra de microorganismos ainda não testados.
- Ser completamente seqüenciados elucidando assim as suas sequencias.
- Produção de plantas transgênicas resistentes a *Botrytis cinerea*.
- Síntese e produção desses AMPs em larga escala como alternativa ao controle de pelo menos um fungo fitopatogênico: *Botrytis cinerea*.
- Elucidação doS mecanismoS de ação de LsAMP1 e LsAMP2.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AERTS, A. M.; FRANÇOIS, I. E. J. A.; CAMMUE, B. P. A.; THEVISSSEN, K. 2008. The mode of antifungal action of plants, insects and human defensins, **Cellular and Molecular Life Sciences** **65**: 2069-2079.
- AGUIAR, M. L. B. A.; MATOS, F. J. A. 1984 Atividade antibiótica de plantas medicinais nordestinas. **Ciência e Cultura** **36**: 465.
- AHERN, M.; VERSCHUEREN, S.; SINDEREN, D.V. 2003 Isolation and characterization of a novel bacteriocin produced By *Bacillus thuringiensis* strain B439. **FEMS Microbiology Letters** **220**: 127-131.
- ALEXOPOULOS C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. 1996. Introductory mycology. 4th ed. Wiley J and sons, Inc., New York.
- ANTONIOW, J. F.; RITTER, C. E.; PIERPOINT, W. S.; LOON, L. C. V. 1980 Comparison of three pathogenesis-related proteins from plants of two cultivars of tobacco infected with TMV. **Journal of General Virology**. **47**: 79-87.
- ANURADHA, T. S.; DIVYA, K.; JAMI, S. K.; KIRTI, P. B. 2008 Transgenic tobacco and peanut plants expressing a mustard defensin show resistance to fungal pathogens. **Plant Cell Report** **27**: 1777-1786.
- APPEL, K. E. 2000 The carcinogenicity of the biocide ortho-phenylphenol. **Archives of Toxicology** **74**: 61-71.
- AYLOR, D. E. 1990 The role of intermittent wind in the dispersal of fungal pathogens. **Annual Review of Phytopathology** **28**: 73-92.
- BECHINGER, B.; LOHNER, K.; 2006 Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta**, **1758**: 1529-1539.
- BELKHADIR, Y.; SUBRAMANIAM, R.; DANGL J. L. 2004 Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR proteins and their partners. **Current Opinion and Plant Biology** **7**: 39- 399.
- BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. 1987 Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. **Electrophoresis** **8**:93-99.
- BOLKER, M. 1998 Sex and crime: Heterotrimeric G proteins in fungal mating and pathogenesis. **Fungal Genetics and Biology** **25**: 143-156.
- BOMAN, H. G. 2003 Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. **Journal of Internal Medicine**, **254**:197-215.
- BOSSCHE, H. V.; ENGELEN, M.; ROCHETTE, F. 2003 Antifungal agents of use in animal health-chemical, biochemical and pharmacological aspects. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**. **26**: 5-29

- BOTELHO, M. A.; SOARES, J. B. 1994 O óleo essencial de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) na prevenção de cárie dental. **XIII Simpósio de plantas medicinais do Brasil**. Fortaleza, Ceará. Resumo 020, pág. 45
- BRADFORD, M. M. 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry** **72**:248-54.
- BRENT, K. J. 1999. Resistência a fungicidas em patógenos de plantas cultivadas: como manejá-la? **Global corp protection federation**.
- BROEKAERT, W.; HYUNG-IL, L.; KUSH, A.; CHUA, M. H.; RAIKHEL, N. 1990 Wound-induced accumulation of mRNA containing a hevein sequence in laticifers of rubber tree (*Hevea brasiliensis*). **Proceedings of the National Academy of Sciences** **87**:7633-7.
- BROWN, K. L.; HANCOCK, R. E. W. 2006 Cationic host defense (antimicrobial) peptides. **Current Opinion in Immunology** **18**:24-30.
- BRUIX, M.; JIMENEZ, M. A.; SANTORO, J.; GONZALEZ, C.; COLILLA, F. J.; MENDEZ, E. et al. 1993 Solution structure of gamma 1-H and gamma 1- purothionins from barley and wheat endosperm determined by 1H-NMR: a structural motif common to toxic arthropod proteins. **Biochemistry** **32**:715-24.
- CANUTO, M. M.; RODERO, F. G. 2002 Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. **Lancet Infectious Diseases** **2**: 550-563.
- CAPELLA, A. N.; MENOSSI, M.; ARRUDA, P.; BENEDETTI, C. E. 2001 COI1 affects myrosinase activity and controls the expression of two flower-specific myrosinase-binding protein homologues in *Arabidopsis*. **Planta** **213**:691-699.
- CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C.; GOODAY, G. W. 2001 The fungi. 2nd ed. **Academic press**, London.
- CHAIN, A.; VALARINI, P. J.; OLIVEIRA, D. A.; MORSOLETO, R. V.; PIO, L. C. 1999 Avaliação de perdas de pulverização em culturas de feijão e tomate. **Embrapa Meio Ambiente. Boletim de pesquisa** **2** p29.
- CHEN, J. STRAUSS, D.; WONG, L. 1998 Using kleisli to bring out features in BLASTP results. **Genome Informatics. Workshop on Genome Informatics** **9**: 102-111.
- CHEN, S. C. A.; SORREL, T. C. 2007. Antifungal agents, **New Drugs, Old Drugs**, **187**: 404-409.
- CHOQUER, M.; FOURNIER, E.; KUNZ, C.; LEVIS, C.; PRADIER, J. M.; SIMON, A.; VIAUD, M. 2007 *Botrytis cinerea* virulence factors: news insights into a necrotrophic and polyphageus pathogen. **FEMS Microbiology Letters** **277**: 1-10.
- CHOW, T.; HSING, Y. **Direct submission**. 2004

COCA, M.; BORTOLOTTI, C.; RUFAT, M.; PEÑAS, G.; ERITJA, R.; THARREAU, D.; DELPOZO, A. M.; MESSEGUER, J.; SAN, S. B. 2004 Transgenic rice plants expressing the antifungal AFP protein from *Aspergillus giganteus* show enhanced resistance to the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Plant Molecular Biology** **54**: 245-259

COLEY-SMITH, J.R.; VERHOHEFF, K.; JARVIS, W.R. 1980 The biology of *botrytis*, **London**.

COLLINS, N.; DRAKE, J.; AYLIFFE, M.; SUN, Q.; ELLIS, J.; HULBERT, S.; PRYOR, T. 1999 Molecular characterization of the maize Rp1-D rust resistance haplotype and its mutants. **The Plant Cell**. **11**: 1365-1376.

COLMENARES, A. J.; ALEU, J.; DURÁN, P. R. COLLADO, I. G.; HERNÁNDEZ, G. R. 2002 The putative role of botrydial and related metabolites in the infection mechanism of *Botrytis cinerea*. **Journal of Chemical Ecology** **28**: 997-1005

COMO, J. A.; DISMUKES, W. E. 1994 Oral azole drugs as systemic antifungal therapy. **The New England Journal of Medicine** **330**:263-272.

COOPER, R. M.; WILLIAMS, J. S. 2004 Elemental sulphur as an induced antifungal substance in plant defense. **Journal of Experimental Botany** **55**: 1947-1953.

COTA, L. V.; MAFFIA, L. A.; MIZUBUTI, E. S. G. 2008 Brazilian isolates of *Clonostachys rosea*: colonization under different temperature and moisture conditions and temporal dynamics on strawberry leaves. **Letters in Applied Microbiology** **46**: 312-317.

CRAVEIRO, A.; FERNANDES, A. G.; ANDRADE, C. H. S.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W.; MACHADO, M. I. L. 1981 Óleos essenciais de plantas do Nordeste. **Editora da Universidade Federal do Ceará**, fortaleza. pp 110-112, 121-123.

DELAUNOIS, B.; CORDELIER, S.; CONREUX, A.; CLÉMENT, C. JEANDET, P. 2009 Molecular engineering of resveratrol in plants. **Plant Biotechnology Journal** **7**: 2-12.

DELP, C. J. 1980 Coping with resistance to plant disease control agents. **Plant Disease** **64**:652-658.

DERAY G. 2002. Amphotericin B nephrotoxicity, **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy** **49**:37-41.

DIZ, M. S. S.; CARVALHO, A. O.; RODRIGUES, R.; NEVES, F. A.G.C.; CUNHA, M.; ALVES, E. W.; *et al.* 2006 Antimicrobial peptides from *chilli pepper* seeds causes yeast plasma membrane permeabilization and inhibits the acidification of the medium by yeast cells. **Biochimica et Biophysica Acta** **1760**:1323-1332.

DOMAGALSKI, J. L.; DUBROVSKY, N. M. 1992 Pesticide residues in ground water of the San Joaquin Valley, California. **Journal of Hydrology**, **130**: 299-338.

EDWARDS J. E. 1997. International conference for the development of a consensus on the management and prevention of severe candidal infections. **Clinical Infectious Diseases** **25**:43-49.

ELAD, Y. 1992 Reduced sensitivity of *Botrytis cinerea* to two sterol biosynthesis-inhibiting fungicides: fenetazole and fenetril. **Plant Pathology** **41**: 47-54

ELAD, Y.; WILLIAMSON, B.; TUDZINSKI, P.; DELEN, N. 2007. *Botrytis*, biology, pathology and control - *Botrytis* spp. and diseases they cause in agricultural systems – an introduction. **Springer**.

FAVRE, B.; RYDER, N. S. 1997 Characterization of squalene epoxidase activity from the pathogenic yeast *Candida albicans*. **Gene** **189**: 119-126

FERREIRA, C. R. R. P. T.; TSUNECHIRO, A.; BARBOSA, M. Z. 1998 Análise do comportamento das vendas de fungicidas no Brasil, 1986-1996. <http://www.iea.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=978>

FERREIRA, R. B.; MONTEIRO, S.; FREITAS, R.; SANTOS, C. N.; CHEN, Z.; BATISTA, L. M. DUARTE, J.; BORGES, A.; TEIXEIRA, A. R. 2007 The role of plant defense proteins in fungal pathogenesis. **Molecular Plant Pathology** **8**: 1-24

FINKINA, E. L.; SHRAMOVA, E. L.; TAGAEV, A. A.; OVCHINNIKOVA, T. V. 2008 A novel defensin from the lentil *Lens culinaris* seeds. **Biochemical and Biophysical Research Communications** **371**: 860-865.

FLURY, M. 1996 Experimental evidence of transport of pesticides through field soils: a review. **Journal of Environmental Quality** **25**: 25-45.

FOURIE, J. F.; HOLZ, H. 1995 Initial infection processes by *Botrytis cinerea* on nectarine and plum fruit and the development of decay. **Phytopathology** **85**: 82-87.

FRANCO, O. L.; MURAD, A. M.; LEITE, J. R.; MENDES, P. A. M.; PRATES, M. V.; JUNIOR, C. B. 2006 Identification of cowpea gamma-thionin with bacterial activity. **The FEBS Journal** **273**: 3489-3497.

FRECER, V.; HO, B.; DING, J. L. 2004 *De novo* design of potent antimicrobial peptides. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **48**:3349-3357.

GARBELLINI, G. S.; ULIANA, C. V. 2007 Toxicidez, degradação no meio ambiente e métodos eletroanalíticos de detecção do pesticida carbaril. **Pesticidas: revista de ecotoxicologia e meio ambiente** **17**: 29-36.

GARCIA, O. F.; MOLINA, A. SEGURA, A.; MORENO, M. 1995 The defensive role of nonspecific lipid-transfer proteins in plants. **Trends in Microbiology** **3**:72-84.

GERBER, G. B.; LÉONARD, A.; HANTSON, P. 2002 Carcinogenicity, mutagenicity and teratogenicity of manganese compounds. **Critical Reviews in Oncology/Hematology** **42**: 25-34.

GHANNOUM, M. A.; RICE, L. B. 1999. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** **12**: 501-517.

GHINI, R. 2001. Resistência de fungos a fungicidas. **Embrapa Meio Ambiente**, [http://www.radiobrás.gov.br/ct/artigos/2001/artigo\\_280901.htm](http://www.radiobrás.gov.br/ct/artigos/2001/artigo_280901.htm)

GOA, K. L.; BARRADELL, L. B. 1995. Fluconazole - an update on its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic use in major superficial and systemic mycoses in immunocompromised patients. **Drugs** 50:658-590.

GRAY, W. R. 1967 Dansyl chloride procedure. **Methods in Enzymology** 11: 139-151.

GRAY, W. R.; SMITH, J. F. 1970 Rapid sequence analysis of small peptides. **Analytical Biochemistry** 33: 36-42

GRAYBILL, J. R. 2000. Systemic antifungal drugs. Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi, **Revista Iberoamericana de Micología**. Bilbao.

GUERBETTE, F.; GROSOBOIS, M.; JOLLIOT, C. A.; KADER, J.; ZACHWISKI, A. 1999 Comparison of lipid binding and transfer properties of two lipid transfer proteins from plants. **Biochemistry** 38:14131-14137

GULLINO, M. L.; KUIJPERS, L. A. M. 1994 Social and political implications of managing plant diseases with restricted fungicides in Europe. **Annual Review of Phytopathology** 32: 559-579

HANCOCK, R. E. W. 2001 Cationic peptides: effects in innate immunity and novel antimicrobials. **Lancet Infectious Disease**, 1: 156-164.

HENNEQUIN, C.; BERNAILLY, N.; SILLY, C.; SORIN, M.; SCHEINMANN, LENOIR, G.; GAILLARD, J. L.; BERCHE, P. 1997. In vitro susceptibilities to amphotericin B, itraconazole, and miconazole of filamentous fungi isolates from patients with cystic fibrosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 41:2064-2066.

HOLLOMON, D. W.; BUTTERS, J. A.; BARKER, H.; HALL, L. 1998 Fungal  $\beta$ -tubulin as a fusion protein, binds benzimidazole and phenylcarbamate fungicides. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 42: 2171-2173.

HOLZ, G. 1999 Behaviour and infection pathways of diverse fungal pathogens on fruit. In: Conference Handbook, **12th Biennial Australasian Plant Pathology Society Conference**, Canberra, Australia, p. 257.

HOLZ, G.; COERTZE, S.; WILLIAMSON, B. 2007 *Botrytis*, biology, pathology and control - The ecology of *Botrytis* in plant surfaces. **Springer**.

JENSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R. E. W. 2006. Peptide antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, 19: 491-511.

JUNIOR, R. P. S.; SILVA, J. P. 2007 Potencial de contaminação da água subterrânea por pesticidas na bacia do rio dourados, **Pesticidas: revista de ecotoxicologia e meio ambiente** 17: 87-106.

- KERRIDGE D.; BOSSCHE H. V. 1990. Handbook of experimental pharmacology. Chemotherapy of fungal diseases. **Drug Discovery: a Biochemist Approach**. Ed: Ryley J.F. Berlin-Heidelberg, Springer Verlag.
- KHANDELIA, H.; IPSEN, J. H.; MOURITSEN, O. G. 2008 The impact of peptides on lipid membranes. **Biochimica et Biophysica Acta 1778**: 1528-1536
- KOBAYASHI, G. S.; MEDOFF, G. 1977 Antifungal agents: recent developments. **Annual Reviews Microbiology. 31**: 291-308
- KOCK, D. S. L.; HOLZ, G. 1992 Blossom-end rot of pears: systemic infection of flowers and immature fruit by *Botrytis cinerea*. **Journal of Phytopathology 135**: 317-327
- KOO, J. C.; CHUN, H. J.; PARK, H. C.; et al. 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**: 441-452.
- LAABS, V.; AMELUNG, W.; PINTO, A. A.; WANTZEN, M.; SILVA, C. J.; ZECH, W. 2002 Pesticides in surface water, sediment, and rainfall of the northeastern Pantanal basin, Brazil. **Journal Environment Quality 31**: 1636-1648.
- LACOSTE, E.; MANDIN D.; CHAUMONT, J. P.; PLUMEL, M. M.; CRAVEIRO, A. A.; MATOS, F. J. A. 1994 Avaliação das propriedades antibacterianas e antifúngicas *in vitro* do óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham. Sobre a microflora cutânea. **XIII Simpósio de plantas medicinais do Brasil**. Fortaleza, Ceará. Resumo 081.
- LACOSTE, E.; CHAUMONT, J. P.; MANDIN, D.; PLUMEL, M. M.; MATOS, F. J. A. 1996 Les propriétés antiseptiques de l'huile essentielle de *Lippia sidoides* Cham. Application à la microflore cutanée. **Annales Pharmaceutiques Françoises 54**: 228-230.
- LAEMMLI, U. K. 1970 Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature 227**: 680-685.
- LATORRE, B. A.; FLORES, V.; SARA, A. 1994 Dicarboximide resistant isolates of *Botrytis cinerea* from table grapes in Chile: Survey and characterization. **Plant Disease 78**: 990-994
- LAY, F. T.; ANDERSON, M. A. 2005 Defensins - components of the innate immune system in plants. **Current Protein and Peptide Science 6**: 85-101
- LEE, H.; CHUREY, J. J.; WORABO, R. W. 2008 Purification and structural characterization of bacillomycin F produced by a bacterial honey isolate active against *Byssochlamys fulva* H25. **Journal Applied Microbiology 105**: 663-673.
- LEMOIS, T. L. G.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W.; CRAVEIRO, A. A.; CLARK, A. M.; MCCHENNEY, J. D. 1990 Antimicrobial activity of essential oils of Brazilian plants. **Phytoterapy Research 4**: 82-84.
- LEROUX, P. 2007 Chemical control of *Botrytis* and its resistance to chemical fungicides. **Springer**.

LEUNG, E. H. W.; NG, T. B. 2007 A relative stable antifungal peptide from buckwheat seeds with antiproliferative activity toward cancer cells. **Journal of Peptides Science** **13**: 762-767.

LIENQUEO, M.; SALAZAR, O.; HENRIQUEZ, K.; CALADO, C. R. C.; FONSECA, L. P.; CABRAL, J. M. S. 2007 Prediction of retention time of cutinases tagged with hydrophobic peptides in hydrophobic interaction chromatography. **Journal of Chromatography A** **1154**: 460-463.

LIN, F.; CHEN, S.; QUE, Z. ; WANG, L. ; LIU, X. ; PAN, Q. 2007 The blast resistance gene Pi37 encodes a nucleotide binding site leucine rich repeat protein and is a member of a resistance gene cluster on rice chromosome 1. **Genetics** **177**: 1871-1880.

LIN, P.; NG, T. B. 2008 A novel and exploitable antifungal peptide from kale (*Brassica alboglabra*) seeds. **Peptides** **29**: 1664-1671.

LIU, Z.; LIU, H.; LIU, X; WU, X. 2008 Purification and cloning of a novel antimicrobial peptide from salivary glands of the hard tick, *Ixodes sinenses*. **Comparative Biochemistry and physiology part B** **149**: 557-561.

LOBO, M. B.; SEGURA, A.; MORENO, M.; LÓPEZ, G.; OLMEDO, F. G.; MOLINA, A. 2002 Snakin-2, an antimicrobial peptide from potato whose gene is locally induced by wounding and responds to pathogen infection. **Plant physiology** **128**: 951-961.

LORENZ, D. K.; EICHHORN, K. W. 1983 Investigations on *Botryotinia fuckeliana* Whetz, the perfect stage of *Botrytis cinerea*, **Pers. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz** **90**: 1-11.

MANKIN, A. 2006 Antibiotic blocks mRNA path on the ribosome. **Nature Structural e Molecular Biology** **13**: 858-860.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. 2000 Plantas medicinais. **Universidade Federal de Viçosa** pp. 73-75.

MATOS, F. J. A. 1998 Farmácias vivas. **Editores Universidade do ceará**. Fortaleza, 65-67.

MATOS, F. J. A.; OLIVEIRA, F. 1998 *Lippia sidoides* Cham. – Farmacognosia, química e farmacologia. **Revista Brasileira de Farmácia** **79**: 84-87.

MATSUHIRA, H.; SHINADA, H.; YUI, K. R.; HAMATO, N.; UMEDA, M.; MIKAMI, T.; et al. 2007 An anther-specific lipid transfer protein gene in sugar beet: its expression is strongly reduced in male-sterile plants with owen cytoplasm. **Physiology Plant** **129**:407–14.

MCHALE, L.; TAN, X.; KOEHL, P.; MICHELMORE, R. W. 2006 Plant NBS-LLR proteins: adaptable guards. **Genome Biology** **7**: 212.

MITCHELL, T. K.; DEAN, R. A. 1995 The cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit is required for appressorium formation and pathogenesis by the rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. **The Plant Cell** **7**: 1869-1878.

MOLINA, A.; GARCIA, O. F. 1993 Developmental and pathogen-induced expression of three barley genes encoding lipid transfer proteins. **Plant Journal** **4**:983-991.

MONTESINOS, E. 2007 Antimicrobial peptides and plant disease control. **FEMS Microbiology Letters** **270**: 1-11.

MORAIS, S. M.; FILHO, E. S. F.; MATOS, F. J. A.; MACHADO, M. I. L.; SOARES, J. B.; ANDRADE, A. P. S.; 1996 Óleos essenciais de plantas Brasileiras: estudo químico, atividade bactericida e possível utilização em cimentos detários. **Revista Brasileira de Farmacologia** **77**: 42-44.

MOYANO, C.; GOMEZ, V.; MELGAREJO, P. 2004 Resistance to pyrimethanil and other fungicides in *Botrytis cinerea* populations collected on vegetable crops in Spain. **Journal of Phytopathology** **152**: 484-490.

Nielsen, K. K.; Nielsen, J. E.; Madrid, S. M.; Mikkelsen, J. D. 1997 Characterization of a new antifungal chitin-binding peptide from sugar beet leaves. **Plant Physiology** **113**:83-91.

NUNES, R. S.; FERREIRA, R. Q.; NETO, P. J. R.; SANTANA, D. P.; XAVIER, H. S.; XIMENE, E. A.; 1998 Atividade antifúngica de *Lippia sidoides* (Cham.) **XV Simpósio de plantas medicinais do Brasil**. Águas de Lindóia, São Paulo, Resumo 01.046 pp.54.

ODJAKOVA, M.; HADJIIVANOVA, C. 2001 The complexity of pathogen defense in plants. **Bulgaria Journal of Plant Physiology**. **27**: 101-109.

OHYANAGI, H.; TANAKA, T.; SAKAI, H.; SHIGEMOTO, Y.; YAMAGUCHI, K.; HABARA, T.; FUJII, Y.; ANTONIO, B.A.; NAGAMURA, Y.; IMANISHI, T.; IKEO, K.; ITOH, T.; GOJOBORI, T.; SASAKI, T. 2006 The rice annotation project database (RAP-DB): hu for *Oryza sativa* ssp. Japonica genome information. **Nucleic Acid Research** **34**: 741-744.

OPAS/OMS, 1996 Manual de vigilância da saúde de populações expostas a agrotóxicos. **Organização panamericana da saúde. Repatição santária pan-americana, Escritório Regional da Organização Mundial de Saúde, Brasília – Brasil**.

PACETTI, S. A.; GELONE S. P. 2003. Caspofungin acetate for treatment of invasive fungal infections, **The Annals of Pharmacotherapy** **37**:90-98.

PARISH, C. A.; JIANG, H.; TOKIWA, Y.; BEROVA, N.; NAKANISHI, K.; MCCABE, D.; ZUCKERMAN, W.; XIA, M. M.; GABAY, J. E. 2001 Broad-spectrum antimicrobial activity of hemoglobin. **Bioorganic e Medicinal Chemistry** **9**: 377-382

PASCUAL, M. E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; et al. 2001 *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology** **76**: 201-214.

PATYKOWSKI, J.; URBANEK, H. 2003 Activity of enzymes related to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation and metabolism in leaf apoplastic fraction of tomato leaves infected with *Botrytis cinerea*. **Journal of Phytopathology** **151**: 153-161

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

PELEGRINI, P. B.; NORONHA, E. F.; MUNIZ, M. A. R.; VASCONCELOS, I. M.; CHIARELLO, M. D.; OLIVEIRA, J. T. A.; FRANCO, O. L. 2006 An antifungal peptide from passion fruit (*Passiflora edulis*) seeds with similarities to 2S albumin protein. **Biochimica et Biophysica Acta** **1764**: 1141- 1146.

PELEGRINI, P. B.; MURAD, A. M.; SILVA, L. P.; SANTOS, R. C. P.; COSTA, F. T.; TAGLIARI, P. D.; JUNIOR, C. B.; NORONHA, E. F.; MILLER, R. N.; FRANCO, O. L. 2008 Identification of a novel storage glycine-rich peptide from guava (*Psidium guajava*) seeds with activity against gram-negative bacteria. **Peptides** **29**: 1271-1279.

PELEGRINI, A.; HULSMIEIER, A. J.; HUNZIKER, P.; THOMAS, U. 2004 Proteolytic fragments of ovoalbumin display antimicrobial activity. **Biochimica et Biophysica Acta** **1672**: 76-85.

PELEGRINI, A.; THOMAS, U.; BRAMAZ, N.; HUNZIKER, P.; FELLEBERG, R. V. 1999 Isolation and identification of three bactericidal domains in the bovine  $\alpha$ -lactalbumin molecule. **Biochimica et Biophysica Acta** **1426**: 439-448.

PLOCIK, A.; LAYDEN, J.; KESSELI, R. 2004 Comparative analysis of NBS domain sequences of NBS-LRR disease resistance genes from sunflower, lettuce and chicory. **Molecular Phylogenetics and Evolution** **31**: 154-163.

POLAK, A. 1990 Mode of action studies. In *Chemotherapy of Fungal Diseases*. Ed. Ryley, J.F. pp. 153-182. **Springer Verlag**.

PRUSKY, D.; KOLATTUKUDY, P.E. 2007 Cross-talk between host and fungus in postharvest situation and its effects on symptom development- *Food mycology: a Multifaceted Approach to Fungi and Food*. **CRC Press**.

PUNJA, Z. K. 2004. *Fungal disease resistance in plants*. **Food products press**.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. 1998 *Os reinos dos fungos*. Santa Cruz do Sul, RS: EDUNISC.

RADEK, K.; GALLO, R. 2007 Antimicrobial peptides: natural effectors of the innate immune system. **Seminars in Immunopathology** **29**:27-43

RAMAKRISHNA, W.; EMBERTON, J.; SANMIGUEL, P.; RGDEN, M.; LLACA V.; MESSING, J.; BENNETZEN, J.L. 2002 **Plant Physiology** **130**: 1728-1738.

REBORDINOS, L.; CANTORAL, J. M.; PRIETO, M. V.; HANSON, J. R.; COLLADO, I.G. 1996 The phytotoxic activity of some metabolites of *Botrytis cinerea*. **Phytochemistry** **42**: 383-387.

REIGART, J. R.; ROBERTS, J. R. 1999 Recognition and management of pesticide poisonings. <http://www.epa.gov/pesticides/safety/healthcare>.

- REMIGER, A.; EIJSINK, V. G. H.; EHRMANN, M. A.; SLETTEN, K.; NES, I. F.; VOGEL, R. F. 1999 Purification and partial amino acid sequence of plantaricin 1.25 $\alpha$  and 1.25 $\beta$ , two bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* TMW 1.25. **Journal of Applied Microbiology** **86**: 1053-1058.
- REVANKAR, S. G.; GRAYBILL, J. R. 2003. Antifungal therapy, **Clinical Mycology**. Elsevier Science, USA.
- RHA, E.; PARK, H. J.; KIM, M. O. 2006 Expression of exo-polygalacturonases in *Botrytis cinerea*. **FEMS Microbiology letters** **201**: 105-109.
- SALIMENA, P. F. R. 1991 Verbenaceae da Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil. **M.Sc. Thesis**. Universidade de São Paulo.
- SASAKI, T.; MATSUMOTO, T.; YAMAMOTO, K.; SAKATA, K. et al. 2002 The genome sequence and structure of rice chromosome 1. **Nature** **420**: 312-315.
- SEGURA, A.; MORENO, M.; MADUENO, F.; MOLINA, A.; GARCIA, O. F. 1999 Snakin-1, a peptide from potato that is active against plant pathogens. **Molecular Plant Microbe Interact** **12**:16-23.
- SELITRENNIKOFF, C. P. 2001 Antifungal proteins. **Applied and Environmental Mycobiology** **67**: 2883-2894.
- SILVA, C. L.; FOLONI, L. L.; PARAÍBA, L. C.; PLESE, L. P. M. 2007 Previsão ambiental da distribuição dos pesticidas aplicadas na cultura de arroz. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente** **17**: 75-86.
- SILVA, C. M. M. S.; FRAY, E. F.; VIEIRA, R. F. 2007 Efeitos dos fungicidas metalaxil e fenarimol na microbiota do solo **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente** **15**: 93-104.
- SILVA, H. S. A.; BETTIOL, W.; TERRASAN, C. R. F.; TOZZI, J. P. L.; MELO, I. S.; NUNES, F. V. 2006 Microorganismos endofíticos: potencial de uso como agente de biocontrole da ferrugem do cafeeiro. Boletim de pesquisa e desenvolvimento-Embrapa. [http://www.cnpma.embrapa.br/download/boletim\\_38.pdf](http://www.cnpma.embrapa.br/download/boletim_38.pdf).
- SMITH, R. E. 1900 *Botrytis* and *Sclerotinia*; their relation to certain plant diseases and to each other, **Botanical Gazette** **29**: 369-407.
- SOUZA, M. P.; MATOS, M. F. O.; MATOS, F. J. A.; MACHADO, M. I. L.; CRAVEIRO, A. A. 1991 Constituintes químicos de plantas medicinais Brasileiras. **Editora da Universidade Federal do Ceará**, fortaleza, pp. 133-139.
- STEFFENS, J. J.; PELL, E. J.; TIEN, M. 1996 Mechanism of fungicide resistance in phytopathogenic fungi. **Current Biology** **7**: 348-355.
- STRAUS, S. K.; HANCKOK, R. E. W. 2006 Mode of action of the new antibiotic for gram-positive pathogens daptomycin: Comparison whit cationic antimicrobial peptides and lipopeptides, **Biochimica et Biophysica Acta**. **1758**: 1215-1223.
- SUAREZ, M.; HAENNI, M.; CANARELLI, S.; FISCH, F. CHODANOWSKI, P.; SERVIS, C.; MICHIELIN, O.; FREITAG, R.; MOREILLON, P.; NICOLAS MERMOD,

- N. 2005 Structure-Function Characterization and Optimization of a Plant-Derived Antibacterial Peptide. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. **49**: 3847-3857
- SUN, Q.; COLLINS N.C.; AYLIFFE, M.; SMITH, S.M.; DRAKE, J.; PRYOR, T.; HULBERT, S.H. 2001 Recombination between paralogues at the Rp1 rust resistance locus in maize. **Genetics** **158**: 423-438.
- TAVARES, S. L.; SANTOS, M. O.; VICCINI, L. F.; MOREIRA, J. S.; MILLER, R.N.G.; FRANCO, O.L. 2008 Biotechnological potential of antimicrobial peptides from flowers. **Peptides** **29**: 1848-1851
- THEIS, T.; STAHL, U. 2004 Antifungal proteins: targets, mechanisms and prospective applications. **Cellular and Molecular Life Sciences** **61**: 437-455.
- THEVISSSEN, K.; KRISTENSEN, H. H.; THOMMA, B. P. H. J.; CAMMUE, B. P. A.; FRANÇOIS, I. E. J. A. 2007. Therapeutic potential of antifungal plant and insect defenses. **Drug discovery today** **12**: 966-971.
- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; 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 Research** **22**: 4673-4680.
- TOBÓN, A. M.; ARANGO, M.; FERNÁNDEZ, D.; RESTREPO, A. 2003. Mucormycosis (zigomycosis) in heart-kidney transplant recipient: recovery after posaconazole therapy. **Clinical Infectious Diseases** **36**:1488-1491.
- TOSSI, A.; SANDRI, L; GIANGASPERO, A. 2000 Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. **Biopolymers** **55**, 4–30.
- TRONCOSO, N. S. 1974 Los generos de Verbenaceas de sudamerica extra-tropical (Argenti-na, Chile, Bolívia, Paraguai, Uruguay y sur de Brasil). **Darwiniana** **18**: 295-412.
- VALE, T. G.; MATOS, F. J. A.; LIMA, T. C. M.; VIANA, G. S. B. 1999. Behavioral effects of essential oils from *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown chemotypes. **Journal of Ethnopharmacology** **67**: 127-133.
- VELASCO. R.; ZHARKIKH, A.; TROGGIO, M.; CARTWRIGHT, D.A.; CESTARO, A.; PRUSS, D.; PINDO, M.; FITZGERALD. L. M.; VEZZULLI, S.; REID, J.; et al. 2007 A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous Grapevine variety. **PLoS ONE** **12**: e1326.
- VERHOEFF, K.; LEEMAN, M.; VAN, P. R.; POSTHUMA, L.; SCHOT, N.; VAN, E. G.W. 1988 Changes in pH and the production of organic acids during colonization of tomato petioles by *Botrytis cinerea*. **Journal of Phytopathology** **122**: 327-336
- VICCINI, L. F.; COSTA, D. C. S.; MACHADO, M. A.; CAMPOS, A. L. 2004 Genetic diversity among nine species of *Lippia* (Verbenaceae) based on RAPD markers. **Plant Systematics and Evolution** **246**: 1-8.

VICCINI, L. F.; PIERRE, P. M. O.; PRAÇA, M. M.; COSTA, D. C. S.; SOUSA, S. M.; PEIXOTO, P. H. P.; SALIMENA, F. R. G. 2005 Chromosome numbers in the genus *Lippia*. **Plant Systematics and Evolution** **256**: 1-4.

VIVIER, M. A. PRETORIOUS, I. S. 2002 Genetically tailored grapevines for the wine industry. **Trends in Biotechnology** **20**: 472-478

WANG, H.; NG, T. B. 2004 Eryngin, a novel antifungal peptide from fruiting bodies of the edible mushroom *Pleurotus eryngii*. **Peptides** **25**: 1-5.

WANG, H.; NG, T. B. 2007 An antifungal peptide from red lentil seeds. **Peptides** **28**: 547-552.

WU, S.; JIA, S.; SUN, D.; CHEN, M. CHEN, X.; ZHONG, J.; HUAN, L. 2005 Purification and characterization of two novel antimicrobial peptides subpeptin JM-4A and subpeptin JM-4B produced by *Bacillus subtilis* JM4. **Current Microbiology** **51**: 292-296.

XIMENES, E. A.; FARIAS, E. T. N.; LIMA, V. C.; NASCIMENTO, M. 1996 Atividade antimicrobiana de *Lippia sidoides* (Cham.). **XIV Simpósio de plantas medicinais do Brasil**. Águas de Lindóia, São Paulo Resumo F-180. pp.127.

XU, J. R. 2000 MAP kinases in fungal pathogens. **Fungal Genetics and Biology** **31**: 137-152.

YU, J.; WANG, J.; LIN, W.; LI, S.; LI, H.; ZHOU, J.; NI, P.; DONG, W.; HU, S.; ZENG, C.; ZHANG, J.; et al. 2005 The genomes of *Oryza sativa*: a history of duplications. **PLoS Biology** **3**: e38.

ZÉLICOURT, A.; LETOUSEY, P.; THOIRON, S.; CAMPION, C.; SIMONEAU, P.; ELMORJANI, K.; et al. 2007 Ha-DEF1, a sunflower defensin, induces cell death in *Orobanche* parasitic plants. **Planta** **226**:591-600.

ZHANG, Y.; LEWIS, K. 1997 Fabatins: new antimicrobial plant peptides. **FEMS Microbiology Letters** **149**: 59-64.

## 8 ANEXOS

### 8.1 ANEXO I – SOLUÇÕES E MEIOS DE CULTURA

**Solução de extração protéica**

HCl 0,1%

NaCl 0,6M

**Meio de cultura BDA (Agar Batata Dextrose)**

1,0 g.L<sup>-1</sup> de glicose

10 g.L<sup>-1</sup> de batata

2,5 g.L<sup>-1</sup> de Agar

Água destilada.

**LB (Lauri Bertani)**

45,0 g.L<sup>-1</sup> bacteriotripton

5,0 g.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura

10,0 g.L<sup>-1</sup> de NaCl

Água destilada

**Tampão de equilíbrio da coluna Sp- Sepharose**

Fosfato de sódio 50 mM pH 7,2

**Tampão de eluição da coluna Sp-Sepharose**

Fosfato de sódio 50 mM pH 7,2 contendo 2,0 M de NaCl

**Tampão de equilíbrio da coluna Octyl-Sepharose**

Fosfato de sódio 50 mM pH 7,2 contendo sulfato de amônio 1,7 M

**Tampão de eluição da coluna Octyl-Sepharose**

Fosfato de sódio 50 mM pH 7,2

**Tampão de amostra**

Tris-HCl 20 mM pH 6,8

SDS 0,2%

azul de bromofenol 0,04%

glicerol 10%

$\beta$ -mercaptoetanol 0,04%

**Tampão de transferência**

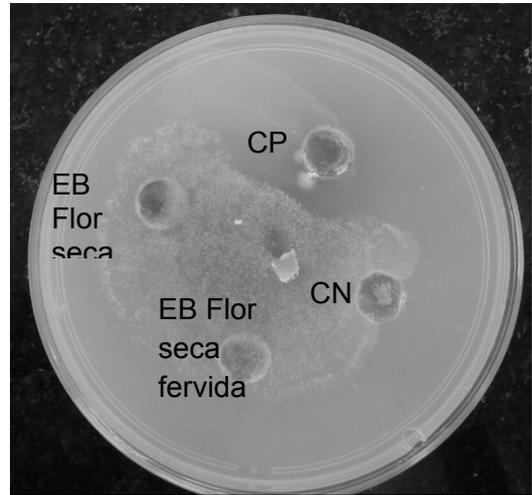
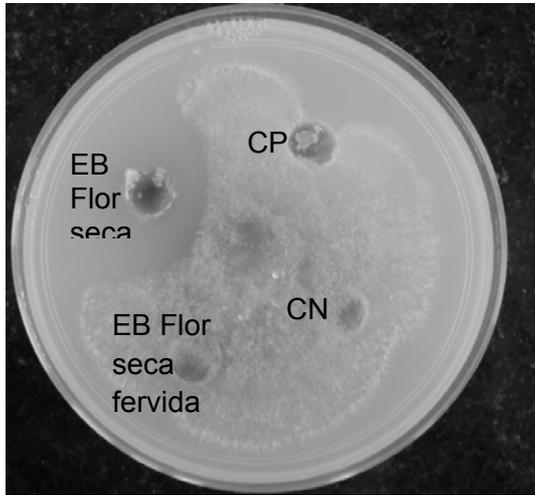
Tris 25mM pH 8,3

Glicina 192 mM

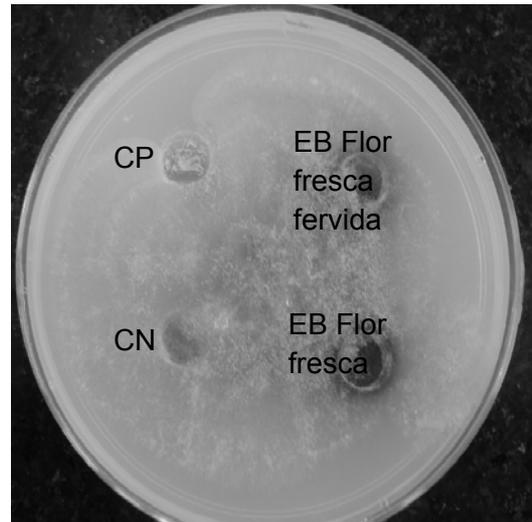
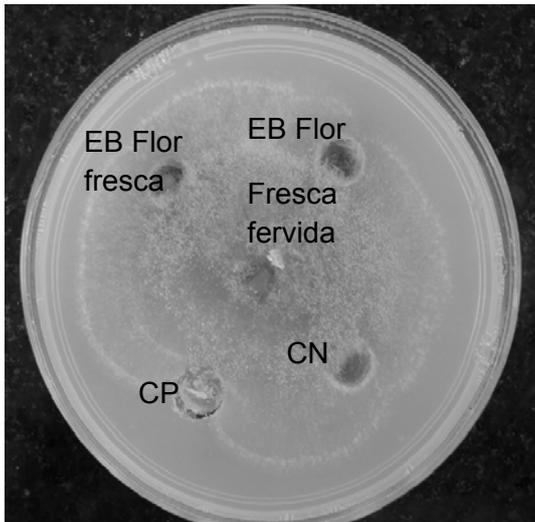
Etanol 20%

**8.2 ANEXO II** - Bioensaio com EB de flores de *Lippia sidoides* em meio BDA com  $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de proteínas contra *Botrytis cinerea*. (a) Amostra de flores secas; (B) Amostra de flor fresca. CP representa por Controle positivo (captan1%); CN controle negativo (água destilada).

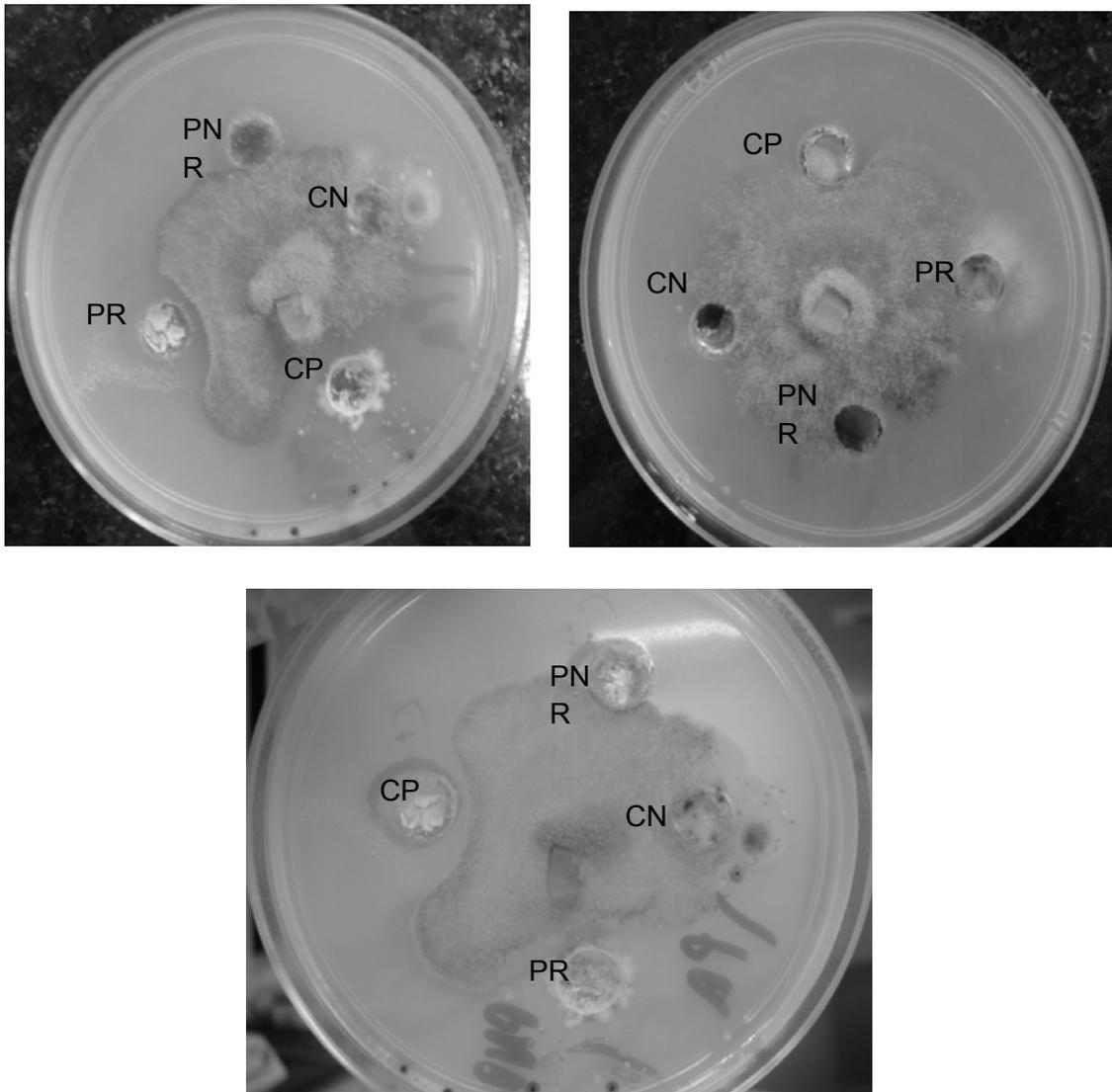
(a)



(b)



**8.3 ANEXO III** - Atividade antifúngica em meio BDA com  $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de proteínas das frações protéicas resultantes de cromatografia em coluna Octyl-Sepharose contra *Botrytis cinerea*. PR representa fração proteínas retidas; PNR fração proteínas não retidas; CP Controle positivo (captan 1%); CN controle negativo (água destilada).



**8.4 ANEXO IV** - Atividade antifúngica em meio BDA com  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de proteínas dos picos 1, 2, 3, 4 e 5 do cromatograma gerados pela RP-HPLC. CP representa o controle positivo (captan 1%); CN controle negativo (água destilada).

