



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE BIOCÊNCIAS
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

FRANCISCO CHAGAS BARBALHO NETO

Microdesmia rigida (BENTH.) SOTHERS
& PRANCE: PROSPECÇÃO DE LECTINAS E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE
ANTIFÚNGICA

MOSSORÓ, RN

2023

FRANCISCO CHAGAS BARBALHO NETO

***Microdesmia rigida* (BENTH.) SOTHERS
& PRANCE: PROSPECÇÃO DE LECTINAS E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE
ANTIFÚNGICA**

Monografia apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Michele Dalvina Correia da Silva, Profa. Dra.

Coorientadora: Márcia Michelle de Queiroz Ambrósio, Profa. Dra.

MOSSORÓ, RN

2023

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

B229m Barbalho Neto, Francisco Chagas.
Microdesmia rígida (Benth.) Sothers & Prance:
Prospecção de lectinas e avaliação de atividade
antifúngica / Francisco Chagas Barbalho Neto. -
2023.
52 f. : il.

Orientadora: Michele Dalvina Correia da Silva.
Coorientadora: Márcia Michelle de Queiroz
Ambrósio.
Monografia (graduação) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Curso de Biotecnologia,
2023.

1. bioativo. 2. oiticica. 3.
fitohemaglutinina. 4. antifúngico. I. Correia da
Silva, Michele Dalvina, orient. II. de Queiroz
Ambrósio, Márcia Michelle, co-orient. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada por sistema gerador automático em conformidade
com AACR2 e os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Biblioteca Campus Mossoró / Setor de Informação e Referência
Bibliotecária: Keina Cristina Santos Sousa e Silva
CRB: 15/120

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

FRANCISCO CHAGAS BARBALHO NETO

***Microdesmia rigida* (BENTH.) SOTHERS
& PRANCE: PROSPECÇÃO DE LECTINAS E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE
ANTIFÚNGICA**

Monografia apresentada à Universidade
Federal Rural do Semi-Árido como parte dos
requisitos para obtenção do título de Bacharel
em Biotecnologia.

Defendida em: 10/10/2023

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 MICHELE DALVINA CORREIA DA SILVA
Data: 21/10/2023 19:13:03-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Michele Dalvina Correia da Silva, Profa. Dra. (UFERSA)
Presidente

Documento assinado digitalmente
 MARCIA MICHELLE DE QUEIROZ AMBROSIO
Data: 21/10/2023 21:04:24-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Márcia Michelle de Queiroz Ambrósio, Profa. Dra. (UFERSA)
Membro Examinador

Documento assinado digitalmente
 ANTONIO OLIVEIRA DE BRITO JÚNIOR
Data: 22/10/2023 07:21:26-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Antônio Oliveira de Brito Júnior, Bel. em Biotecnologia (Agrícola Famosa)
Membro Examinador

À minha mãe, meu pai e irmãs, dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Gilson e Erineide, e avós, Margarida e Francisco, por todo amor, apoio e carinho que me foi dado antes e durante minha trajetória acadêmica.

Às minhas irmãs, Jéssica, Mércia, Gilcineide e Gilcilene, por todo apoio e companheirismo que me sustentaram em momentos difíceis.

Às minhas outras mães, Poliana e Rita, obrigado por todos os momentos em que me fizeram sentir amado e especial.

Aos meus irmãos, Rellyson e Eduardo, por serem sempre meus pontos de apoio e por tornarem a jornada da vida confortável e prazerosa.

À Ana Karolina, por todo suporte emocional e profissional que me foi ofertado durante este período tão importante de nossas vidas.

Aos meus amigos Marielly, Mônica, Pedro Augusto, Vitória, Silvan, Marcileide, Lenise, Juliana e todos os meus companheiros de vida. Obrigado por fazerem parte desse momento tão especial e único na minha vida.

Aos meus amigos do LABCEMOL, Brito, Lidiane, Jady, Maely e Lucas. Obrigado por tornarem os dias de trabalho tão especiais e produtivos. Sem vocês essa experiência não teria sido a mesma.

À Profa. Dra. Michele Dalvina, por todo apoio na pesquisa e na minha trajetória acadêmica, que sempre se dispôs a contribuir, de modo profissional e humanizado, no meu desenvolvimento e amadurecimento profissional.

À Profa. Dra. Márcia Michelle, pela orientação e apoio técnico-científico no desenvolvimento desse trabalho.

À banca examinadora, pela disponibilidade, profissionalismo e pelas inúmeras contribuições para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao CNPq, pelo programa institucional de bolsas de iniciação científica, que contribuiu financeiramente para o desenvolvimento dessa pesquisa.

À UFERSA, pelo apoio estrutural e pelas inúmeras oportunidades acadêmicas e profissionais que me foram ofertadas.

“Somos apenas uma estirpe avançada de macacos em um planeta menor de uma estrela muito comum. Mas podemos entender o universo. Isto nos torna muito especiais.”

Stephen Hawking

RESUMO

O uso contínuo e extenso de defensivos químicos na agricultura promove graves impactos no meio ambiente e na saúde das populações. A podridão causada por espécies de *Fusarium*, sendo as principais *Fusarium falciforme* e *Fusarium sulawesiense*, vem causando muitos danos à cultura do melão, com grande necessidade de alternativas para o manejo, sendo os biopesticidas as alternativas mais sustentáveis. As lectinas são proteínas que se ligam de forma reversível e específica a carboidratos e apresentam atividades com aplicabilidades biotecnológicas, como antimicrobiana. *Microdesmia rigida* (Benth.) Sothers & Prance é conhecida por apresentar alto teor de óleos fixos nas sementes, utilizados na produção industrial de tintas e vernizes. No entanto, o potencial biotecnológico da espécie quanto à constituição proteica e as propriedades biológicas relacionadas não tem sido investigado. O objetivo do trabalho foi investigar a presença de lectinas em folhas e sementes de *M. rigida* para a caracterização da atividade lectínica e o potencial isolamento de uma lectina, bem como avaliar seu potencial contra cepas de fitopatógenos do gênero *Fusarium*. Extratos brutos de folhas e sementes foram preparados em NaCl 0,15 M ou em tampão citrato-fosfato 0,1 M, pH 6,5, submetidos a fracionamento proteico com sulfato de amônio e dialisados. As amostras foram submetidas a ensaios de atividade hemaglutinante (AH), dosagem proteica e determinação de AH específica (AHE); as frações proteicas dialisadas tiveram AH caracterizada na presença de carboidratos, sob diferentes temperaturas e valores de pH, e foram caracterizadas por diferentes matrizes cromatográficas. Todas as preparações e um extrato hidroalcolico de sementes (preparado em etanol a 95 %, EH) foram avaliados quanto ao potencial antifúngico sobre *F. falciforme* e *F. sulawesiense*. Todas as amostras apresentaram elevada AH com diferentes tipos de eritrócitos humanos, bem como teor proteico. As frações proteicas de sementes apresentaram elevada AHE (ESs-F1, AHE: 2.497,56; Ess-F2, AHE: 5.243,37; Est-F1, AHE: 5.004,10; Est-F2, AHE: 26.301,04). Os títulos de AH das amostras foram estáveis após incubações em temperaturas variando de 20 a 100 °C e foram mais elevados entre pH 6,5 e 7,5 (em faixa de pH de 4,5 a 9,0). A cromatografia de Est-F1 em quitina foi eficiente para isolar pools proteicos com atividade lectínica e elevada AHE. O EH apresentou um percentual significativo de inibição do crescimento micelial de ambas as espécies. Os dados sugerem que as sementes de *M. rigida* possuem lectinas termoestáveis com alta afinidade a diferentes eritrócitos e afinidade à quitina. Além disso, *M. rigida* possui metabólitos que inibem o crescimento de *F. falciforme* e *F. sulawesiense*, indicando seu potencial uso para a formulação de um biopesticida.

Palavras-chaves: bioativo, oitica, fitohemaglutinina, antifúngico.

ABSTRACT

The continuous and extensive use of chemical pesticides in agriculture has a serious impact on the environment and on people's health. Rot caused by *Fusarium* species, the main ones being *Fusarium falciforme* and *Fusarium sulawesiense*, has caused a lot of damage to the melon crop, with a great need for management alternatives, with biopesticides being the most sustainable alternatives. Biopesticides are more sustainable alternatives for controlling phytopathogens. Lectins are proteins that bind reversibly and specifically to carbohydrates and have activities with biotechnological applications, such as antimicrobials. *Microdesmia rigida* (Benth.) Sothers & Prance is known for having a high content of fixed oils in its seeds, which are used in the industrial production of paints and varnishes. However, the biotechnological potential of the species in terms of its protein constitution and related biological properties has not been investigated. The aim of this study was to investigate the presence of lectins in *M. rigida* leaves and seeds in order to characterize their lectin activity and the potential isolation of a lectin, as well as to evaluate its potential against strains of phytopathogens of the *Fusarium* genus. Crude extracts of leaves and seeds were prepared in NaCl 0.15 M or citrate-phosphate buffer 0.1 M, pH 6.5, subjected to protein fractionation with ammonium sulphate and dialyzed. The samples were subjected to haemagglutinating activity (HA) assays, protein dosage and specific HA determination; the dialysed protein fractions had their HA characterized in the presence of carbohydrates, under different temperatures and pH values and were characterized by chromatographic matrices. All the preparations and a hydroalcoholic extract of the seeds (prepared in 95% ethanol, EH) were evaluated for their antifungal potential against *F. falciforme* and *F. sulawesiense*. All the samples showed high AH with different types of human erythrocytes, as well as protein content. The seed protein fractions showed high AHE (ESs-F1, AHE: 2,497.56; ESs-F2, AHE: 5,243.37; ESt-F1, AHE: 5,004.10; ESt-F2, AHE: 26,301.04). The AH titers of the samples were stable after incubations at temperatures ranging from 20 to 100 °C and were highest between pH 6.5 and 7.5 (in a pH range of 4.5 to 9.0). Chromatography of ESt-F1 on chitin was efficient in isolating protein pools with lectin activity and high AHE. EH showed a significant percentage of inhibition of the mycelial growth of both species. The data suggest that *M. rigida* seeds have thermostable lectins with high affinity to different erythrocytes and affinity to chitin. In addition, *M. rigida* has metabolites that inhibit the growth of *F. falciforme* and *F. sulawesiense*, indicating its potential use for the formulation of a biopesticide.

Keywords: bioactive, oiticica, phytohemagglutinin, antifungal.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– <i>Microdesmia rigida</i> (Benth.) Sothers & Prance	10
Figura 2	– Folhas de <i>Microdesmia rigida</i> (Benth.) Sothers & Prance	11
Figura 3	– Frutos de <i>Microdesmia rigida</i> (Benth.) Sothers & Prance	12
Figura 4	– Influência da variação de temperatura e pH na AH das amostras obtidas de sementes de <i>Microdesmia rigida</i> (Benth.) Sothers & Prance	24
Figura 5	– Cromatografia em quitina da fração proteica de sementes de <i>Microdesmia rigida</i> (Benth.) Sothers & Prance, obtida por saturação salina (60 % de sulfato de amônio) do extrato bruto em tampão citrato-fosfato 0,1 M (pH 6,5) seguida de diálise (ESt-F1).	30
Figura 6	– Percentual de inibição do crescimento de <i>Fusarium falciforme</i> e de <i>Fusarium sulawesiense</i> , <i>in vitro</i> , pelas amostras obtidas de sementes de <i>Microdesmia rigida</i> (Benth.) Sothers & Prance, após 10 e 22 dias de incubação, respectivamente.	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	–	Atividades biológicas de tecidos de <i>Microdesmia rigida</i> (Benth.) Sothers & Prance	10
Tabela 2	–	Concentração proteica e atividade hemaglutinante específica (AHE) das amostras obtidas de <i>Microdesmia rigida</i> (Benth.) Sothers & Prance	21

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AH	Atividade hemaglutinante
AHE	Atividade hemaglutinante específica
ApulSL	Lectina de sementes de <i>Apuleia leiocarpa</i>
CRD	Carbohydrate recognition domain
EFs	Extrato bruto de folhas de <i>Microdesmia rigida</i> em NaCl 0,15 M
EFs-F1	Fração proteica de folhas de <i>M. rigida</i> , obtida por saturação do extrato bruto em NaCl 0,15 M com sulfato de amônio a 30 %, seguida de diálise.
EFs-F2	Fração proteica de folhas de <i>M. rigida</i> , obtida por saturação do extrato bruto em NaCl 0,15 M com sulfato de amônio a 30-60 %, seguida de diálise.
EFs-F3	Fração proteica de folhas de <i>M. rigida</i> , obtida por saturação do extrato bruto em NaCl 0,15 M com sulfato de amônio a 60-90 %, seguida de diálise.
EFt	Extrato bruto de folhas de <i>Microdesmia rigida</i> em tampão citrato-fosfato 0,1 M (pH 6,5)
EFt-F1	Fração proteica de folhas de <i>M. rigida</i> , obtida por saturação do extrato bruto em tampão citrato-fosfato 0,1 M (pH 6,5) com sulfato de amônio a 30 %, seguida de diálise.
EFt-F2	Fração proteica de folhas de <i>M. rigida</i> , obtida por saturação do extrato bruto em tampão citrato-fosfato 0,1 M (pH 6,5) com sulfato de amônio a 30-60 %, seguida de diálise.
EFt-F3	Fração proteica de folhas de <i>M. rigida</i> , obtida por saturação do extrato bruto em tampão citrato-fosfato 0,1 M (pH 6,5) com sulfato de amônio a 60-90 %, seguida de diálise.
EH	Extrato hidroalcoólico de sementes de <i>Microdesmia rigida</i>
ESs	Extrato bruto de sementes de <i>Microdesmia rigida</i> em NaCl 0,15 M
ESs-F1	Fração proteica de sementes de <i>M. rigida</i> , obtida por saturação do extrato bruto em NaCl 0,15 M com sulfato de amônio a 60 %, seguida de diálise.
ESs-F2	Fração proteica de sementes de <i>M. rigida</i> , obtida por saturação do extrato bruto em NaCl 0,15 M com sulfato de amônio a 60-90 %, seguida de diálise.
Est	Extrato bruto de sementes de <i>Microdesmia rigida</i> em tampão citrato-fosfato 0,1 M (pH 6,5)

ESt-F1	Fração proteica de sementes de <i>M. rigida</i> , obtida por saturação do extrato bruto em tampão citrato-fosfato 0,1 M (pH 6,5) com sulfato de amônio a 60 %, seguida de diálise.
ESt-F2	Fração proteica de sementes de <i>M. rigida</i> , obtida por saturação do extrato bruto em tampão citrato-fosfato 0,1 M (pH 6,5) com sulfato de amônio a 60-90 %, seguida de diálise.
NaCl	Cloreto de sódio
PgTeL	<i>Punica granatum</i> sarcotesta lectin (lectina da sarcotesta de <i>Punica granatum</i>)
pH	Potencial hidrogeniônico
QoI	Quinone outside Inhibitor
WSMoL	Water soluble <i>Moringa oleifera</i> lectin (lectina de <i>Moringa oleifera</i> solúvel em água)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	4
2.1 Importância da agricultura e a problemática dos pesticidas	4
2.1.1 Cultura do meloeiro	4
2.2 Aspectos gerais sobre <i>Fusarium</i> spp. e seu impacto no cultivo do meloeiro	5
2.2.1 Controle de fitopatógenos, desenvolvimento de resistência e biopesticidas	6
2.3 Lectinas vegetais	7
2.4 Família Chrysobalanaceae e gênero <i>Licania</i>	8
2.4.1 <i>Microsdemia rigida</i> (BENTH.) Sothers & Prance	9
3. OBJETIVOS	14
3.1 Objetivo geral.....	14
3.2 Objetivos específicos.....	14
4. MATERIAIS E MÉTODOS	15
4.1 Obtenção e caracterização de preparações	15
4.1.1 Coleta do material vegetal e processamento.....	15
4.1.2 Preparo dos extratos brutos em NaCl 0,15 M ou em tampão citrato-fosfato	15
4.1.3 Preparo dos extratos hidroalcoólicos	15
4.1.4 Fracionamento salino e diálise	16
4.1.5 Ensaio de atividade hemaglutinante	16
4.1.6 Dosagem proteica	16
4.1.7 Caracterização da atividade lectínica na presença de carboidratos	17
4.1.8 Efeito da variação da temperatura na atividade lectínica	17
4.1.9 Efeito da variação do pH na atividade lectínica	17
4.1.10 Cromatografia para isolamento de lectina.....	17
4.2 Teste de atividade antifúngica	18
4.3 Análise estatística.....	19
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	34
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

1. INTRODUÇÃO

A agricultura é o setor da economia que representa a maior parcela da fonte de renda e geração de empregos no Brasil. Em janeiro de 2022, o país atingiu seu recorde em exportações de alimentos, resultando em um faturamento de US\$ 19,67 bilhões (Governo Federal Do Brasil, 2022). No entanto, a produção agrícola em larga escala contribui com uma das maiores problemáticas da atualidade: a geração de resíduos tóxicos. Especialmente no que se trata do uso de pesticidas por países, o Brasil está no topo do ranking, sendo considerado “o maior consumidor de pesticidas do mundo” (Gonzales, 2020).

O manejo inadequado desses agroquímicos em lavouras tem afetado negativamente a saúde dos brasileiros. Trabalhadores das grandes lavouras, habitantes de regiões próximas aos campos de cultivo e consumidores dos derivados dessas lavouras têm desenvolvido doenças, devido a exposição direta ou indireta aos pesticidas químicos, como diversos tipos de câncer (Friedrich et al., 2021), malformação congênita (Costa et al., 2021) e outros efeitos deletérios no sistema imunológico (Dalbó et al., 2019).

Apesar de seus efeitos nocivos à saúde das pessoas e ao meio ambiente, os agroquímicos ainda são amplamente utilizados no controle de pragas na agricultura, por exemplo, em plantações de frutíferas como o meloeiro, o mamoeiro, e a melancia (SANTOS et al., 2021; PARK et al., 2010). As doenças de plantas, também denominadas fitopatologias, são causadas principalmente por microrganismos, como os fungos. Nas plantações de melão (*Cucumis melo*), que é uma cultura de grande importância para o agronegócio brasileiro, se destacam os fungos do gênero *Fusarium*, como o *Fusarium falciforme* e o *Fusarium sulawesiense* que causam a podridão peduncular, afetando drasticamente sua produção. A ausência de alternativas para o controle eficiente desses fitopatógenos demanda pelo desenvolvimento de estudos voltados para essa problemática (Araújo et al., 2020).

Com o surgimento da biotecnologia, algumas técnicas começaram a ser aplicadas na agricultura como alternativas ao uso de pesticidas químicos, como a produção de alimentos transgênicos e o uso de biopesticidas. Os biopesticidas vêm se destacando no mercado internacional de produtos agrícolas e no controle de doenças nas plantações. Eles podem ser constituídos por bactérias, fungos, vírus, nematoides, ou seus metabólitos, e atuam de modo específico sobre os organismos alvos (Melo, Swarowsky, 2022).

Os biopesticidas de origem vegetal são uma boa alternativa para o controle de doenças em plantas, pois suas formulações são à base de produtos naturais contendo biomoléculas com ação pesticida, como é o caso das proteínas que possuem propriedades antimicrobiana ou inseticida (Butu, Rodino, Butu, 2022).

Proteínas da classe das lectinas vêm sendo estudadas acerca de seu potencial antimicrobiano, ou seja, sua habilidade de inativar, inibir ou estacionar a proliferação e o desenvolvimento de microrganismos patogênicos (Fonseca et al., 2022). Essas proteínas são expressas em diversas espécies de diferentes *taxa*, no entanto, são mais comumente investigadas em espécies vegetais (Konozy et al., 2022), nas quais podem estar envolvidas em mecanismos de defesa contra patógenos. As lectinas se ligam a carboidratos de maneira específica e reversível e, por isso, possuem habilidade para reconhecer moléculas em superfícies celulares e outras estruturas, promovendo diversos efeitos biológicos. Estudos revelam que algumas lectinas promovem atividade antimicrobiana (Fonseca et al., 2022), inseticida (Oliveira et al., 2020), imunomoduladora (Farias et al., 2022), antitumoral (Patriota et al., 2021), dentre diversos outros efeitos. Portanto, essas proteínas são ferramentas moleculares que podem ser úteis para a solução de diversas problemáticas.

Várias plantas endêmicas do semiárido brasileiro são alvo de estudos voltados tanto para as características que as conferem resistência ao clima severo do bioma, quanto para sua constituição química, pois podem ter compostos que são de interesse da indústria (Lisboa et al., 2020). Esse é o caso da espécie *Microdesmia rigida* (Benth.) Sothers & Prance, pertencente à família Chrysobalanaceae, popularmente conhecida como “oiticica”. Essa planta é usada tradicionalmente no tratamento de diabetes, distúrbios gastrointestinais e promove, também, efeito diurético (Agra et al., 2007; Alves, Nascimento, 2010; Castilho, Kaplan, 2008). Além disso, apresenta atividade antioxidante - devido à presença de compostos fenólicos, entre eles, possíveis flavonoides na sua composição molecular - e antimicrobiana contra cepas de bactérias gram-positivas e de leveduras (Macêdo, 2011; Morais, 2015).

Tendo em vista a presença de metabólitos secundários bioativos em *Microdesmia rigida*, bem como sua vasta aplicabilidade na medicina popular e propriedades biológicas, a caracterização de lectinas presentes em tecidos desta planta poderá elevar o valor biotecnológico da espécie, além de possibilitar a descoberta de novas atividades biológicas, como a atividade contra microrganismos fitopatogênicos. Se confirmada a ação antifúngica promovida por preparações de *M. rigida*, a espécie pode ser explorada para o desenvolvimento

de novas alternativas de controle de doenças na agricultura local, mais sustentáveis e com melhor custo-benefício. A utilização de biomoléculas pesticidas também contribui para a melhoria da qualidade dos alimentos provenientes do campo, por diminuir os impactos dos pesticidas químicos na saúde da população. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi prospectar lectinas em tecidos de *M. rigida* e avaliar o potencial antifúngico de preparações obtidas.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Importância da agricultura e a problemática dos pesticidas químicos

O setor agrícola tem importante papel na economia dos países em desenvolvimento, seja na geração de empregos para a população, seja na exportação de alimentos e produtos voltados para o cultivo de plantas (Pellegrina, 2022). No Brasil, o número de exportações atingiu seu recorde em janeiro de 2022, resultando em um faturamento de US\$ 19,67 bilhões (Governo Federal do Brasil, 2022), evidenciando ainda mais a importância desse setor para o país.

Apesar do foco da agricultura no Brasil ser o comércio internacional, o consumo de alimentos pelos brasileiros tem importante contribuição na produção agrícola no país, pois, além de ser o maior país da América Latina – o que possibilita a utilização de um maior território para as plantações – possui também o maior número populacional, logo, tem uma população que consome muito do que produz (Pellegrina, 2022).

No entanto, apesar de sua notável influência no setor econômico, a agricultura brasileira causa impactos negativos na vida da população e no meio ambiente, devido ao uso exacerbado de pesticidas químicos para prevenir e tratar as doenças nas lavouras, o que confere ao Brasil o título de “maior consumidor de pesticidas do mundo” (Gonzales, 2020). Esse título põe em questionamento a qualidade dos alimentos produzidos no país e de que forma isso pode afetar a saúde dos consumidores. O cultivo do meloeiro é um exemplo de cultivar de grande importância para o país que faz o uso de fungicidas químicos, os quais geram grandes quantidades de resíduos tóxicos.

2.1.1 Cultura do meloeiro

O meloeiro (*Cucumis melo* L.) pertence à família das cucurbitáceas, assim como a melancia, a abóbora e o pepino. Por conta da sua capacidade de se adaptar às condições tropicais, essa hortaliça-fruta possui um destaque na agricultura brasileira, principalmente na região Nordeste do país (Araújo et al., 2016; Lima et al., 2017). Sua implementação no Brasil ocorreu na década de 60, inicialmente em São Paulo, e no Rio Grande do Sul; mas, as condições climáticas desses estados não foram favoráveis para o seu cultivo (Melo, 2019) e, por esse motivo, atualmente, a região Nordeste concentra o maior percentual da produção de melão no Brasil (Agrianual, 2015).

Existe uma demanda internacional por esses frutos, principalmente europeia. Em 2022, cerca de 257 mil toneladas de melões foram exportadas somente para o Reino Unido, Países Baixos e Espanha, sem levar em consideração os demais países que importam esse fruto (Anuário Brasileiro De Horti & Fruti, 2022). Os estados brasileiros que concentraram os maiores números de produção de melão em 2019 foram Ceará e Rio Grande do Norte, segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE).

O cultivo do meloeiro tem importante participação no setor econômico do Rio Grande do Norte, tendo em vista que o estado possui recordes de produção e exportações do fruto. A cidade de Mossoró, por exemplo, é destaque na produção de melão utilizando um sistema de irrigação localizado (Vanomark et al., 2018). O estudo de Lima et al. (2019) relata que o crescimento na produção do melão é acompanhado pelo crescimento populacional nas regiões rurais da cidade. No entanto, o cultivo do meloeiro, assim como o de outras culturas, é alvo de diversas fitopatologias que afetam a qualidade e a quantidade de sua produção. É exemplo, a podridão peduncular, causada por fungos do gênero *Fusarium*; no entanto as espécies *F. falciforme* e *F. sulawesiense* se mostraram mais agressivas, quanto à infecção do fruto (Nogueira et al. 2022). Pensando nisso, diversos estudos são voltados para a obtenção de alternativas para o controle de doenças nessa cultura.

2.2 Aspectos gerais sobre *Fusarium* spp. e seu impacto no cultivo do meloeiro

O gênero *Fusarium* é um táxon que inclui mais de mil espécies de fungos dos mais variados nichos ecológicos. Os seus representantes são comumente encontrados como saprófitos e habitando o solo, mas a sua maior importância econômica está relacionada às espécies fitopatogênicas. O alto grau de diversidade morfológica, fisiológica e ecológica garante que fungos desse gênero ocorram em várias partes do mundo, especialmente em climas tropicais, nos quais são capazes de sobreviver por um longo período devido a sua capacidade de formar estruturas de sobrevivência, denominadas clamidósporos, frequentemente encontradas no solo (Lazarotto, 2013).

Fungos desse gênero causam principalmente o apodrecimento de raízes e caules das cultivares. Quanto ao seu mecanismo de ação para invadir o tecido do hospedeiro, esses fungos destroem o sistema vascular da planta, impedindo assim a passagem de nutrientes e água para o tecido infectado (Taylor et al., 2019). Além disso, o desenvolvimento da planta é afetado devido à produção de metabólitos fúngicos, principalmente enzimas e micotoxinas, que a longo

prazo causam a morte do hospedeiro (Gordon, 2017). O estudo de Bani et al. (2018) relata que após a morte do hospedeiro, o fungo migra para a superfície e produz esporos que serão transportados até o solo para que o ciclo infeccioso reinicie.

As micotoxinas produzidas por *Fusarium* spp. são amplamente investigadas. Os estudos quanto a esses metabólitos estão focados nas culturas de grãos (como soja, café e milho), porque a presença dessas micotoxinas os tornam impróprios para plantio e consumo devido à sua alta toxicidade e carcinogenicidade (Bianchini et al., 2015; Lainhart, 2018). As fusarinas são exemplos de micotoxinas produzidas por *Fusarium* spp. (produzidas por *F. oxysporum* e outras espécies do gênero). Essa micotoxina é um policetídeo que possui quatro tipos (A, B, C e D) bastante ocorrentes em grãos de milho, sendo o tipo C a forma mais preocupante dessa micotoxina, por apresentar propriedades mutagênicas. A zearalenona, também denominada toxina F-2, é uma micotoxina bastante encontrada em cereais como o arroz, o trigo e a cevada. Essa toxina causa a acidificação pelo bloqueio de liberação de H⁺ na planta, ocasionando na redução do comprimento das raízes (Lazarotto, 2013; Perincherry et al., 2019).

Na cultura do meloeiro, as doenças ocasionadas por espécies de *Fusarium* podem se manifestar em diversos tecidos da planta; no entanto, é mais comum ocorrer a infecção dos frutos no momento da colheita. O contato direto dos fungos com a região peduncular, local onde é feito o corte para separar o fruto da planta, promove a infecção no melão (Terao et al., 2008). As espécies *F. falciforme* e *F. sulawesiense* são conhecidas por causar a podridão peduncular em consequência da infecção promovida pela ausência de esterilidade do ambiente onde o fruto será colhido. Esses fungos se proliferam no interior do fruto, devido a disponibilidade de nutrientes, deixando-os impróprios para comercialização e consumo. Isso gera perdas significativas nas plantações de meloeiro, o que afeta diretamente a economia das regiões produtoras desse fruto. Por esse motivo, alternativas para o controle desses fitopatógenos tem sido investigada.

2.2.1 Controle de fitopatógenos, desenvolvimento de resistência e biopesticidas

O controle de doenças em plantas é, em grande parte, baseado no uso de pesticidas químicos, pois eles se mostram mais rápidos no controle de pragas e fitopatologias, quando comparados ao controle biológico, físico e cultural (Gonzales, 2020). Para os fungos do gênero *Fusarium* que afetam as plantações de melão, atualmente, utiliza-se o fungicida comercial Imazalil como controle químico. No entanto, devido aos efeitos prejudiciais à saúde das

populações e ao meio ambiente que os resíduos gerados por esse composto possuem, a *European Chemicals Agency* proibiu seu uso em alimentos exportados para a Europa (ECHA, 2023). Essa decisão afeta diretamente a economia das regiões que produzem e exportam frutos que precisam do tratamento químico para o controle de doenças, como o meloeiro.

Além disso, o uso de pesticidas químicos contribui para o desenvolvimento de novos mecanismos de resistência em fitopatógenos. Existem diversos mecanismos de resistência que os fungos desenvolveram aos fungicidas, como o decréscimo na permeabilidade e da afinidade ao sítio ligação pelo fungicida, bem como a adaptação por evitamento, que ocorre quando o fungo se adapta ao bloqueio de um determinado sítio, de tal modo que o seu metabolismo não dependa daquele local bloqueado (Zambolim, 2014).

Santos et al. (2021) observaram que os fungos do gênero *Neophysopella* spp. começaram a desenvolver resistência aos fungicidas utilizados nas plantações de uvas. Em tese, o fungicida (QoI - *Quinone oxidase Inhibitor*) deveria inibir a respiração celular do fungo através do sítio de ligação do complexo bc1, impedindo assim a transferência de elétrons e a formação de novas moléculas de ATP. No entanto, no fungo, houve alteração de alguns códons de aminoácidos, alterando o citocromo b, fazendo-o irreconhecível ao fungicida (Santos, et al., 2020).

Devido essas problemáticas relacionadas ao uso de pesticidas químicos, a procura por alternativas de controle de doenças, mais sustentáveis e menos prejudiciais à saúde, aumentou nos últimos anos. Isso promoveu o surgimento dos biopesticidas, produtos naturais que podem ser constituídos por bactérias, fungos, vírus, nematoides, ou seus metabólitos, e que possuem versatilidade no controle de doenças em plantas (Melo, Swarowsky, 2022).

Há também biopesticidas de origem vegetal. Esses são uma boa alternativa para o controle de fitopatógenos, pois suas formulações são à base de produtos naturais contendo biomoléculas com ação pesticida, como é o caso das proteínas que possuem propriedades antimicrobianas (Butu, Rodino, Butu, 2022). Pensando nisso, produtos naturais provenientes de plantas, como os metabólitos secundários, óleos essenciais e proteínas, têm sido investigados acerca de seu potencial contra fitopatógenos, tendo em vista a versatilidade nos efeitos biológicos dessas biomoléculas (Khursheed, et al., 2022) e nos mecanismos de ação relacionados.

2.3 Lectinas vegetais

O metabolismo vegetal, em resposta às demandas inerentes ao estágio de desenvolvimento, bem como a diversos fatores abióticos e bióticos extrínsecos, produz muitas biomoléculas com funções diversas, incluindo algumas associadas a mecanismos de defesa. Entre essas moléculas de defesa, algumas podem ser proteínas da classe das lectinas (Cummings et al., 2022).

As lectinas são proteínas reconhecidas por se ligarem de maneira específica e reversível a carboidratos e a glicoconjugados, podendo exercer inúmeras funções biológicas (Sharon; LIS, 1987). Essas proteínas são encontradas em diversas espécies de diferentes taxa, no entanto, as espécies vegetais são as mais amplamente investigadas como fontes, em potencial, de lectinas com propriedades de interesse para o desenvolvimento de produtos biotecnológicos, aplicados em setores voltados à saúde humana, animal e à agricultura (Konozy et al., 2022; Coninck, Van Damme, 2021).

Assim como ocorre com outras classes de proteínas, são estabelecidas classificações e subclassificações para lectinas que geralmente estão relacionadas à quantidade de sítios ligantes, ou seja, os locais na estrutura terciária das biomoléculas com os quais outras moléculas interagem e, na maioria dos casos, desencadeiam uma função biológica (Cummings et al., 2022).

Dentre as classificações dessas proteínas, há a proposta com base em seus sítios ligantes a carboidratos, sendo diferenciadas como merolectinas, que possuem apenas um sítio de ligação a carboidrato; hololectinas, que possuem dois sítios de ligação a carboidratos de mesmo tipo; superlectinas, que são denominadas dessa forma, por terem sítios distintos de ligações a carboidratos de tipos diferentes; quimerolectinas que possuem, além dos sítios de ligação a carboidratos, um outro sítio catalítico que desempenha uma função biológica distinta (Peumans; Van Damme, 1995).

As lectinas vegetais possuem diversos efeitos biológicos de interesse biotecnológico, podendo exercer atividade antimicrobiana (Fonseca et al., 2022), inseticida (Oliveira et al., 2020), imunomoduladora (Farias et al., 2022), antitumoral (Patriota et al., 2021), dentre outros efeitos. No caso dos fungos de interesse agrícola, as lectinas geralmente afetam o crescimento fúngico através da inibição da germinação dos esporos ou do crescimento micelial (Fonseca et al., 2022).

2.4 Família Chrysobalanaceae e gênero *Licania*

Dentre a vasta biodiversidade da flora brasileira, encontra-se a família Chrysobalanaceae, que é constituída por 26 gêneros e tem pouco mais de 530 espécies identificadas na literatura, com 330 delas presentes no território brasileiro (Silva; Alves, 2020). Apesar da maior parte das espécies dessa família estarem localizadas na região Norte do país - mais especificamente na região amazônica – o Nordeste brasileiro possui cerca de 26 % delas em seu território, sendo 21 espécies endêmicas dessa região (Flora Do Brasil, 2020).

As características morfológicas das espécies da família Chrysobalanaceae são bastante homogêneas. Os espécimes geralmente tem porte arbóreo; no entanto, podem também ser arbustivos, com folhas simples e inteiras, e flores períginas com estilete ginobásico (Silva; Alves, 2020).

O gênero *Licania* é um dos gêneros que compõem a família Chrysobalanaceae e é constituído por cerca de 213 espécies (Marques et al., 2006) distribuídas, principalmente, pelos países neotrópicos da América do Sul (Brasil, Venezuela e Guiana) e na América Central, no caso do México (Braca, et al., 2003). Esse gênero foi descrito em 1775, por Aublet, em sua pesquisa “*Histoire des plantes de la Guiane Française*”.

No Brasil, há ocorrência desse gênero em todas as regiões do país, especialmente no Norte e Nordeste, onde exercem um papel importante, especialmente no setor econômico, pois os frutos de algumas delas são utilizados como matéria prima na produção de sabão e vernizes, e a casca é usada na fabricação de cerâmicas (Marques et al., 2006).

Atualmente, através de uma análise filogenética molecular, o gênero *Licania* foi revisto (considerado altamente polifilético) e uma nova classificação foi apresentada, em que o gênero *Licania* foi subdividido em 8 gêneros (incluindo *Licania*) (Sothers; Prance; Chase, 2016). Nesse estudo, a família Chrysobalanaceae é apontada como sendo constituída por 16 gêneros neotropicais.

2.4.1 *Microdesmia rigida* (Benth.) Sothers & Prance

Popularmente conhecida como “oiticica”, *Microdesmia rigida* (Benth.) Sothers & Prance (Figura 1) é a classificação taxonômica mais recente para a espécie (Sothers; Prance; Chase, 2016) anteriormente classificada como *Licania rigida* Benth., motivo pelo qual os artigos científicos citados nesse trabalho se referem à espécie como *L. rigida*, inclusive os artigos publicados após a divulgação da nova classificação.

M. rigida é uma espécie endêmica e de boa distribuição na região Nordeste do Brasil, especialmente nos estados do Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Bahia e Piauí (Bezerra, 2011). Assim como a maioria das espécies do gênero *Licania*, a oiticica tem grande influência no setor econômico da região, pois o óleo de suas amêndoas pode ser extraído e utilizado na indústria de tintas de automóvel e de impressoras, e vernizes, devido sua rapidez no processo de secagem. Esse óleo também é utilizado na produção de sabão e tem grande importância para as indústrias oleoquímicas, em razão do seu alto rendimento e facilidade de extração (Lisboa et al., 2020).

Figura 1. *Microdesmia rigida* (Benth.) Sothers & Prance.



Fonte: Arquivo pessoal

Apesar de sua significativa influência no setor econômico da região em que está distribuída, a oiticica ainda é pouco investigada quanto a sua aplicabilidade biotecnológica, que é um fator importante para a valorização da espécie. No entanto, alguns estudos foram realizados a partir de tecidos de *M. rigida* e tiveram atividades biológicas relatadas, as quais são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Atividades biológicas de tecidos de *Microdesmia rigida* (Benth.) Sothers & Prance

Atividade biológica	Tecido vegetal	Tipo de preparação	Referência Bibliográfica
Anticoagulante	Folhas	Extrato hidroalcoólico	Luz, et al., 2021
Antifúngica	Folhas	Extrato etanólico	Freitas, et al., 2019
Antimicrobiano	Folhas	Extrato hidroalcoólico	Morais, 2022
Antioxidante	Folhas	Extrato hidroalcoólico	Farias, et al., 2013
Antioxidante	Sementes	Extrato hidroalcoólico	Pessoa et al., 2016
Inseticida	Folhas	Extrato Salino (NaCl 0,15 M)	Gomes, et al., 2022
Toxicidade ausente	Folhas	Extrato hidroalcoólico	Luz, et al., 2021

Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

Freitas et al. (2019) verificaram que o extrato etanólico das folhas da oiticica (Figura 2) possui atividade antimicrobiana, inibindo a formação de biofilmes por *Candida* sp. (Freitas et al., 2019), e associaram essa característica aos seus metabólitos secundários, como os flavonoides. Em um estudo fitoquímico, Pessoa et al. (2016) descreveu mais detalhadamente a presença de outros metabólitos secundários, como taninos e outros compostos fenólicos. Ainda neste estudo, foi identificada a presença de atividade antioxidante e ausência de citotoxicidade do extrato hidroalcoólico das folhas de *M. rigida*. Em outro estudo, o extrato etanólico das folhas de *M. rigida* também apresentou atividade anticoagulante (Luz et al., 2021), que foi associada à presença de uma diversidade de metabólitos secundários na constituição das folhas, especialmente os flavonoides. Os flavonoides são conhecidos, principalmente, pelo potencial antioxidante, devido aos radicais fenólicos que os constituem (Oliveira et al., 2006).

Figura 2. Folhas de *Microdesmia rigida* (Benth.) Sothers & Prance.



Fonte: Arquivo pessoal

Como citado anteriormente, a amêndoa do fruto de *M. rigida* (Figura 3) tem uma participação significativa no setor econômico do semiárido brasileiro, devido ao seu alto teor de óleos fixos que são utilizados em diversos setores produtivos. As amêndoas apresentam entre 3,1 e 5,0 cm de comprimento, entre 1,3 e 1,7 cm de largura e entre 1,2 e 1,7 cm de espessura. Em sua porção externa, apresenta coloração verde no tegumento, que esmaece à medida que vai perdendo água. Quando desidratadas, adquirem uma cor escura, o que pode estar associado a oxidação dos óleos fixos quando entram em contato com o ar (Diniz et al., 2015).

Figura 3. Frutos de *Microdesmia rigida* (Benth.) Sothers & Prance.



Fonte: Arquivo pessoal

O início da utilização dessas amêndoas como produto comercial não é recente, tendo em vista que a Brasil Oiticica S/A – indústria de extração e comercialização do óleo proveniente das amêndoas de *M. rigida* – foi fundada em Fortaleza, Ceará, em 1934. Essa empresa foi responsável pela exportação de milhões de dólares em produtos provenientes de *M. rigida*, fato este que gerou empregos e um período de progresso na região na qual a indústria estava inserida (Queiroga et al., 2013).

Os estudos sobre outras aplicabilidades biotecnológicas do fruto de *M. rigida* ainda são escassos, apesar de sua aplicabilidade econômica nacionalmente reconhecida. No entanto, em um estudo de Oliveira et al. (2012), observou-se que o óleo extraído das amêndoas de *M. rigida* pode ser usado como matéria-prima na produção de biodiesel, devido ao alto rendimento de extração. Não há outros trabalhos na literatura que discutam a aplicação dessas amêndoas do ponto de vista biológico.

Considerando o potencial biotecnológico pouco explorado de *M. rigida*, uma espécie endêmica, amplamente distribuída no Nordeste do Brasil e de importância industrial, esse trabalho objetivou a prospecção de proteínas da classe das lectinas em *M. rigida*, uma vez que as lectinas biomoléculas úteis para diversas aplicações biotecnológicas. Com enfoque na problemática das fitopatologias, causadas por *Fusarium* spp. em plantas de interesse agrícola cultivadas no Nordeste brasileiro, o trabalho objetivou também avaliar o potencial antifúngico de preparações obtidas de *M. rigida* em cepas de *F. falciforme* e *F. sulawesiense* causadores de podridão peduncular.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Prospectar lectinas em preparações obtidas de folhas e de sementes de *M. rigida* e avaliar o potencial antifúngico de preparações obtidas de diferentes tecidos vegetais em cepas de *F. falciforme* e *F. sulawesiense*.

3.2 Objetivos específicos

- Estabelecer um protocolo eficiente de extração proteica de tecidos de *M. rigida*.
- Caracterizar as preparações proteicas de tecidos de *M. rigida* quanto à presença de lectinas bioativas e quanto à atividade lectínica sob diferentes condições físico-químicas.
- Isolar uma possível lectina a partir de frações proteicas.
- Verificar a ação antifúngica de preparações obtidas de diferentes tecidos vegetais em cepas de *F. falciforme* e *F. sulawesiense*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O procedimento experimental foi realizado no Laboratório de Biologia Celular e Molecular (LABCEMOL), que faz parte do complexo de laboratórios do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS), localizado no prédio CCBS-Biociências II, no Campus Oeste da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), bem como no Laboratório de Fitopatologia e Microbiologia, localizado no Prédio de Fitossanidade, no Campus Oeste da UFERSA.

4.1. Obtenção e caracterização das preparações

4.1.1. Coleta do material vegetal e processamento

Uma exsicata da espécie vegetal em estudo foi identificada no Herbário Dárdano de Andrade-Lima da UFERSA. A coleta do material vegetal para análise experimental foi realizada no início da manhã ou ao final da tarde, evitando-se período de chuva. Os tecidos coletados foram imediatamente levados ao laboratório; os tecidos vegetais a serem analisados foram separados, higienizados e submetidos à secagem em temperatura ambiente. Após secos, os tecidos vegetais foram separadamente triturados e peneirados até formarem farinhas finas, as quais foram armazenadas a - 20 °C até o uso.

4.1.2. Preparo dos extratos brutos em NaCl 0,15 M ou em tampão citrato-fosfato

As farinhas dos tecidos vegetais em análise foram submetidas a processos de extração proteica (a 10 %, p/v) em NaCl 0,15 M ou em solução tampão citrato-fosfato 0,1 M, pH 6,5 (preparado em NaCl 0,15 M), sob agitação constante durante 16 horas, em temperatura ambiente. Em seguida, os dois extratos foram filtrados, centrifugados (a 8000 rpm, por 20 minutos, a 4 °C) e os sobrenadantes obtidos foram denominados extrato bruto de sementes em NaCl 0,15 M (ESs), extrato bruto de folhas em NaCl 0,15 M (EFs), extrato bruto de sementes em tampão citrato-fosfato 0,1 M (pH 6,5) (ESt) e extrato bruto de folhas em tampão citrato-fosfato 0,1 M (pH 6,5) (EFt).

4.1.3. Preparo dos extratos hidroalcoólicos

Diferentes tecidos vegetais (folhas, galhos, casca da árvore, casca do fruto, sementes) foram submetidos a extração hidroalcoólica, visando a extração de metabólitos secundários. Para cada tecido, 5 g da farinha foi misturada com 50 mL de uma solução de etanol a 95 % em água (v/v) (extração a 10 %, p/v). A mistura foi mantida em frasco âmbar, sob proteção da luz

por 12 dias, com agitações curtas a cada 24 horas. Ao final da maceração, a mistura foi filtrada em gaze e, em seguida, filtrada em papel filtro qualitativo. O extrato hidroalcoólico (EH), obtido de cada tecido vegetal, foi armazenado a -18 °C até o uso (Oliveira et al., 2015).

4.1.4. Fracionamento salino e diálise

Os extratos brutos de *M. rigida* foram submetidos à precipitação proteica fracionada utilizando sulfato de amônio em diferentes porcentagens de saturação (30, 30-60 e 60-90 %). A adição do sulfato de amônio a 30 % foi feita lentamente para a completa solubilização do sal. Após isso, a solução foi mantida em agitação constante por 4 horas, seguida de uma centrifugação (20 minutos, a 8000 rpm, a 4 °C). O pellet obtido (fração concentrada de proteínas) foi solubilizado em pequeno volume de NaCl 0,15 M e o sobrenadante da centrifugação foi submetido à saturação seguinte com sulfato de amônio (30-60 %); o processo foi repetido até a finalização das três saturações e obtenção de frações proteicas precipitadas.

Cada fração proteica obtida foi submetida ao processo de diálise exaustiva em membrana semipermeável de celulose contra a solução de extração (NaCl 0,15 M ou tampão citrato-fosfato 0,1 M), por diferentes períodos a depender da porcentagem de saturação salina previamente utilizada para obtenção das frações (três horas para a fração obtida por saturação a 30 %, cinco horas para a fração obtida por saturação a 60 % e nove horas para a fração obtida por saturação a 90 %).

4.1.5. Ensaio de atividade hemaglutinante

Em placas de microtitulação, cada preparação em análise foi submetida a uma diluição seriada em NaCl 0,15 M; em seguida, uma suspensão de eritrócitos glutarizados (a 2,5 %, v/v) em NaCl 0,15 M (Bing et al., 1967) foi adicionada em todos os poços do ensaio. Após incubação por 45 minutos, em repouso, o título da atividade hemaglutinante (AH) foi determinado como o inverso da maior diluição que apresentou total aglutinação (Correia; Coelho, 1995). Cada preparação foi ensaiada com diferentes eritrócitos humanos (sistema ABO). A AH específica (AHE) foi determinada como a AH dividida pela concentração proteica (em mg/mL).

4.1.6. Dosagem proteica

A estimativa de proteínas das preparações foi realizada (Lowry et al., 1951), utilizando albumina sérica bovina para construir uma curva padrão com valores compreendidos entre 31,25 e 500 µg/mL.

4.1.7. Caracterização da atividade lectínica na presença de carboidratos

Em placas de microtitulação, cada preparação em análise foi submetida a diluições seriadas em soluções de carboidratos (concentrações entre 25 e 200 mM) preparadas em NaCl 0,15 M; os ensaios foram incubados por 15 minutos em repouso e, em seguida, uma suspensão de eritrócitos glutarizados em NaCl 0,15 M (a 2,5 %, v/v) foi adicionada em todos os poços de cada ensaio. Após nova incubação por 45 minutos em repouso, o título da AH foi determinado. A inibição total, parcial, ou ausência de inibição da AH de cada preparação por carboidratos foi determinada pela comparação com o título da AH em NaCl 0,15 M, utilizando a mesma suspensão de eritrócitos (Correia; Coelho, 1995).

4.1.8. Efeito da variação da temperatura na atividade lectínica

As preparações foram incubadas em temperaturas variando de 30 a 90 °C, por 30 minutos. Após incubação, as preparações foram resfriadas até a temperatura ambiente e submetidas a ensaios de AH. A variação da AH de cada preparação em consequência da pré-incubação em cada temperatura foi determinada pela comparação com o título da AH em NaCl 0,15 M, a 20 °C.

4.1.9. Efeito da variação do pH na atividade lectínica

As preparações foram incubadas com soluções tampão em diferentes valores de pH compreendidos entre 4,5 e 9 (utilizando volumes iguais de preparação e solução tampão), por 30 minutos. Após incubação, as preparações foram submetidas a ensaios de AH. A variação da AH de cada preparação em consequência da pré-incubação em cada valor de pH foi determinada pela comparação com o título da AH (da preparação diluída de forma equivalente) em NaCl 0,15 M.

4.1.10. Cromatografia para isolamento de lectina

As preparações selecionadas (considerando AH, AHE, bom rendimento em termos de volume e proteína total, afinidade a carboidratos) foram submetidas a métodos cromatográficos de afinidade (utilizando gel de Guar e quitina) e de exclusão molecular (utilizando Sephadex® G-75). Em cada processo, a coluna cromatográfica foi pré-equilibrada com o tampão de extração e a cromatografia foi mantida sob fluxo contínuo (20 mL/h), com coleta de frações (2 mL/6 min) até o final do processo. As frações coletadas foram monitoradas por espectrofotometria (UV, absorbância a 280 nm) e ensaios de AH. Após o equilíbrio da coluna,

a preparação em análise foi aplicada e o material não adsorvido foi coletado até que a absorbância fosse nula; em seguida, uma solução adequada (solução de carboidrato, NaCl 1 M, ácido acético 1 M ou outra, conforme características da matriz e do processo cromatográfico) foi utilizada para a eluição de possíveis proteínas adsorvidas. Pools cromatográficos foram submetidos à diálise exaustiva, quando necessário, a ensaios de AH e à estimativa proteica para a determinação da AHE.

4.2. Teste de atividade antifúngica

Duas espécies de fungo do gênero *Fusarium* (*F. falciforme*, CML 4175, GenBank MT476611 e *F. sulawesiense*, CLM 4176, GenBank MT476613) foram selecionadas para avaliar o potencial antifúngico das amostras obtidas dos tecidos de *M. rigida*. Inicialmente, em um ensaio piloto, foram avaliadas todas as preparações obtidas de folhas e de sementes (extratos em NaCl 0,15 M e frações proteicas; extratos em tampão citrato-fosfato 0,1 M e frações proteicas; extratos hidroalcoólicos); também foram avaliados os extratos hidroalcoólicos (em etanol a 95 %, v/v) de outros tecidos vegetais (galhos, casca da árvore, casca do fruto). A partir dos resultados obtidos no ensaio piloto, preparações obtidas de folhas e de sementes foram selecionadas para o teste a ser realizado com as devidas replicatas e repetições independentes.

Cada preparação selecionada foi esterilizada em microfiltro PVDF (0,20 µm), seguida da inoculação de 100, 250 ou 500 µL das preparações vegetais, por espalhamento com alça de Drigalski, em toda a superfície do meio de cultura (35 mL de meio BDA suplementado com estreptomicina) em placa de Petri (90 mm x 15 mm). Como controle negativo, foram utilizados 100 µL das soluções de extração das preparações (tampão citrato-fosfato 0,1 M, pH 6,5; etanol a 95 %) e, como controle positivo, foi utilizado 100 µL do fungicida Magnate® (Imazalil).

Após a aplicação das amostras e dos controles, os discos miceliais (5 mm de diâmetro) foram introduzidos sobre o meio de cultivo, no centro das placas de Petri que, em seguida, foram mantidas a 28 ± 2 °C em estufa incubadora tipo “demanda bioquímica de oxigênio” (B.O.D.). As placas foram observadas diariamente, até o crescimento fúngico total nas placas do controle negativo (THAO et al., 2021), o que durou 10 dias para *F. falciforme* e 22 dias para *F. sulawesiense*. Todo o experimento foi realizado em triplicata, com cinco repetições para cada amostra. Para avaliar a potencial inibição do crescimento fúngico, foi utilizada a fórmula descrita por Oliveira et al (2020), mostrada abaixo, na qual, IC é referente ao percentual de inibição de crescimento; DT é a média do diâmetro de crescimento do fungo que foi submetido

ao tratamento com as amostras ou com o controle positivo; por fim, DC representa a média do diâmetro de crescimento do fungo que foi submetido ao tratamento com as soluções para o controle negativo de inibição do crescimento (grupo tratado com soluções de extração).

$$IC (\%) = \frac{(DC - DT)}{DC} \times 100 \quad \text{Equação (1)}$$

4.3. Análise estatística

Os resultados obtidos nos testes antifúngicos foram tabulados em planilha do Excel e suas médias e desvios padrões foram calculados. Testes de Shapiro-Wilk e Levene foram executados para análise de normalidade e homogeneidade de variâncias, respectivamente. Uma ANOVA foi executada para análise de variância, seguida de teste de Tukey para comparação das médias dos grupos amostrais, considerando um nível de 5 % de significância. Todos os testes estatísticos foram executados no software JAMOV.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Poucos trabalhos relatam a diversidade e aplicações biotecnológicas dos constituintes moleculares de *M. rigida*. Os potenciais antioxidante e antimicrobiano, bem como a ausência de citotoxicidade, já são comprovados (Batista et al., 2022, Morais, 2022). Além disso, Pessoa et al. (2016) revelaram o potencial antioxidante do extrato hidroalcolico das sementes de *M. rigida*. Nesse sentido, este trabalho tem sido pioneiro em avaliar a presença de lectinas e o potencial contra fitopatógenos de diferentes preparações de *M. rigida*.

Para avaliação da atividade lectínica em folhas e sementes de *M. rigida*, dois protocolos de extração foram utilizados. No primeiro deles, as extrações foram realizadas com NaCl 0,15 M (EFs e ESs); no segundo método, foi utilizado tampão citrato-fosfato 0,1 M, pH 6,5, preparado em NaCl 0,15 M (EFt e ESt). A finalidade da extração de proteínas com os dois tipos de soluções contendo sal em baixa molaridade foi avaliar a eficiência na obtenção e estabilização das proteínas solubilizadas, tendo em vista que eventuais desnaturações de possíveis lectinas presentes nas preparações impediriam a detecção da sua atividade. Além disso, foram preparadas frações proteicas, a partir de ambos os extratos, com adição de sulfato de amônio em diferentes saturações, o que auxiliou na caracterização do conteúdo proteico dos extratos brutos devido ao aumento da concentração proteica.

Todas as amostras apresentaram elevados títulos de AH quando testadas com eritrócitos humanos (sistema ABO). A Tabela 2 mostra que, dentre as preparações obtidas das folhas de *M. rigida*, o EFs apresentou o maior título de AHE; dentre as amostras de sementes, a ESt-F2 revelou maior título de AHE. As frações proteicas de ambos os extratos (EFs e EFt) revelaram AH elevada e apresentaram baixa variação nos títulos AH quando houve alternância no tipo de eritrócito utilizado, o que pode indicar que lectinas presentes nas amostras possuem baixa especificidade quanto aos resíduos de carboidratos presentes na superfície dessas células.

Os eritrócitos humanos (sistema ABO) são diferenciados uns dos outros quanto aos antígenos presentes na membrana celular. O antígeno H, que é um complexo formado por vários monossacarídeos, está presente em todos os tipos de eritrócitos do sistema ABO, no entanto, são as modificações (adição de outros monossacarídeos) em sua estrutura que definem qual a tipagem sanguínea de um indivíduo. No caso dos eritrócitos tipos A e B, há adição de um resíduo de N-acetilgalactosamina e D-galactose, respectivamente. Já os eritrócitos tipo AB

possuem ambas as modificações no antígeno H, diferentemente do tipo O que não possui nenhuma modificação nesse mesmo antígeno (Mattos, 2016; Rizzo et al., 2014).

Tabela 2. Concentração proteica e atividade hemaglutinante específica (AHE) das amostras obtidas de *Microdesmia rigida* (Benth.) Sothers & Prance

Folhas			
Amostra	Tipo de eritrócito	Concentração proteica (mg.mL ⁻¹)	AHE (AH.mg.mL ⁻¹)
EFs	A	16,71	31.375,70
EFs-F1	A	20,45	50,07
EFs-F2	O	25,66	319,25
EFs-F3	AB	29,61	138,33
EFt	B	10,84	1.511,43
EFt-F1	A	13,87	73,82
EFt-F2	B	30,12	271,97
EFt-F3	AB	31,78	257,77
Sementes			
Amostra	Tipo sanguíneo	Concentração proteica (mg.mL ⁻¹)	AHE (AH.mg.mL ⁻¹)
ESs	A	38,64	13.570,18
ESs-F1	A	13,12	2.497,56
ESs-F2	B	6,25	5.243,37
ESst	B	33,21	15.787,05
ESst-F1	B	13,10	5.004,10
ESst-F2	B	9,97	26.301,04

AHE = AH-1 / mg/mL (título da atividade hemaglutinante dividido pelo teor proteico, em mg/mL). EFs: extrato bruto de folhas em NaCl 0,15 M. EFs-F1, EFs-F2 e EFs-F3: frações proteicas de folhas de *M. rigida*, obtidas, respectivamente, por saturações do extrato bruto em NaCl 0,15 M com sulfato de amônio a 30 %, 30-60 % e 60-90 %, seguidas de diálise. EFt: extrato bruto de folhas em tampão citrato-fosfato 0,1 M (pH 6,5). EFt-F1, EFt-F2 e EFt-F3: frações proteicas de folhas de *M. rigida*, obtidas, respectivamente, por saturações do extrato bruto em tampão citrato-fosfato 0,1 M (pH 6,5) com sulfato de amônio a 30 %, 30-60 % e 60-90 %, seguidas de diálise. ESs: extrato bruto de sementes em NaCl 0,15 M. ESs-F1 e ESs-F2: frações proteicas de sementes de *M. rigida*, obtidas, respectivamente, por saturações do extrato bruto em NaCl 0,15 M com sulfato de amônio a 60 % e 60-90 %, seguidas de diálise. ESst: extrato bruto de sementes em tampão citrato-fosfato 0,1 M (pH 6,5). ESst-F1 e ESst-F2: frações

proteicas de sementes de *M. rigida*, obtidas, respectivamente, por saturações do extrato bruto em tampão citrato-fosfato 0,1 M (pH 6,5) com sulfato de amônio a 60 % e 60-90 %, seguidas de diálise.

Logo, considerando que os eritrócitos utilizados no teste de AH possuem padrões de glicosilações diferentes em seu glicocálix, supõe-se que na presença de lectinas bioativas nas preparações obtidas das folhas de *M. rigida*, os títulos de AH apresentariam uma maior variação quando o tipo de eritrócito testado foi alternado. Além disso, a alta concentração de metabólitos secundários nesse tecido, como compostos fenólicos e flavonoides (Morais et al., 2022), pode incluir os taninos, que podem indiretamente inibir lectinas devido a sua complexação com íons metálicos importantes para a ativação de algumas dessas proteínas (em casos de lectinas dependentes de íons) ou até mesmo causar hemólise, que visualmente assemelhasse à AH – e, por isso, podem dificultar a detecção da atividade lectínica (Deng et al., 2019).

As preparações obtidas das sementes de *M. rigida* também apresentaram elevados títulos de AH com eritrócitos humanos. No entanto, diferentemente das amostras obtidas das folhas, as preparações de sementes revelaram uma maior variação nos títulos de AH quando houve alternância no tipo de eritrócito testado. Como foi discutido anteriormente, essa diferença entre os títulos de AH pode indicar as diferentes especificidades de lectinas em diferentes amostras um ou mais tipos de carboidratos presentes na membrana dos diferentes eritrócitos. Na literatura, há relatos de lectinas vegetais que possuem ligação específica com eritrócitos de apenas um tipo sanguíneo humano, como é caso da lectina de *Phaseolus limenses*, que possui especificidade para eritrócitos do tipo A, ou a lectina de *Bandeiraea simplicifolia* que se liga especificamente à eritrócitos do tipo B (Boyd; Reguera, 1949; Makela; Makela, 1956). Essas informações corroboram a hipótese da presença de lectinas nas sementes de *M. rigida*.

A estimativa proteica revelou alto teor proteico em todas as preparações obtidas, com destaque para as frações proteicas das folhas, obtidas a partir de ambos os tipos de protocolo de extração (Tabela 2). No entanto, sugere-se que, além das proteínas, haja presença de diversas outras moléculas, como carboidratos, lipídeos e compostos fenólicos que podem atuar como interferentes no método utilizado para a quantificação proteica (Peterson, 1979), contribuindo para estimativas proteicas elevadas.

As frações proteicas obtidas das sementes apresentaram uma dosagem de proteínas mais baixa, quando comparadas com as frações proteicas das folhas. Esse resultado sugere que a precipitação de proteínas foi eficiente na obtenção de frações proteicas com prevalência de

conteúdo proteico e com baixa quantidade de interferentes, ou seja, outras moléculas que não são proteínas. Essa hipótese foi corroborada quando calculado o título de AHE das amostras.

Para a determinação da AHE, foi considerado o título mais elevado de AH apresentado por cada preparação, o que variou quanto ao tipo de eritrócito utilizado. As preparações proteicas obtidas de sementes apresentaram valores de AHE bem mais elevados, quando comparadas com as frações proteicas obtidas a partir das folhas. A elevada AHE das frações proteicas de sementes indica a eficiência do protocolo de purificação parcial de lectinas de sementes de *M. rigida* pelo método de fracionamento salino. Além disso, os valores baixos da AHE nas amostras de folhas, corroboram a hipótese da presença de outras moléculas não proteicas, interferentes no método de quantificação utilizado.

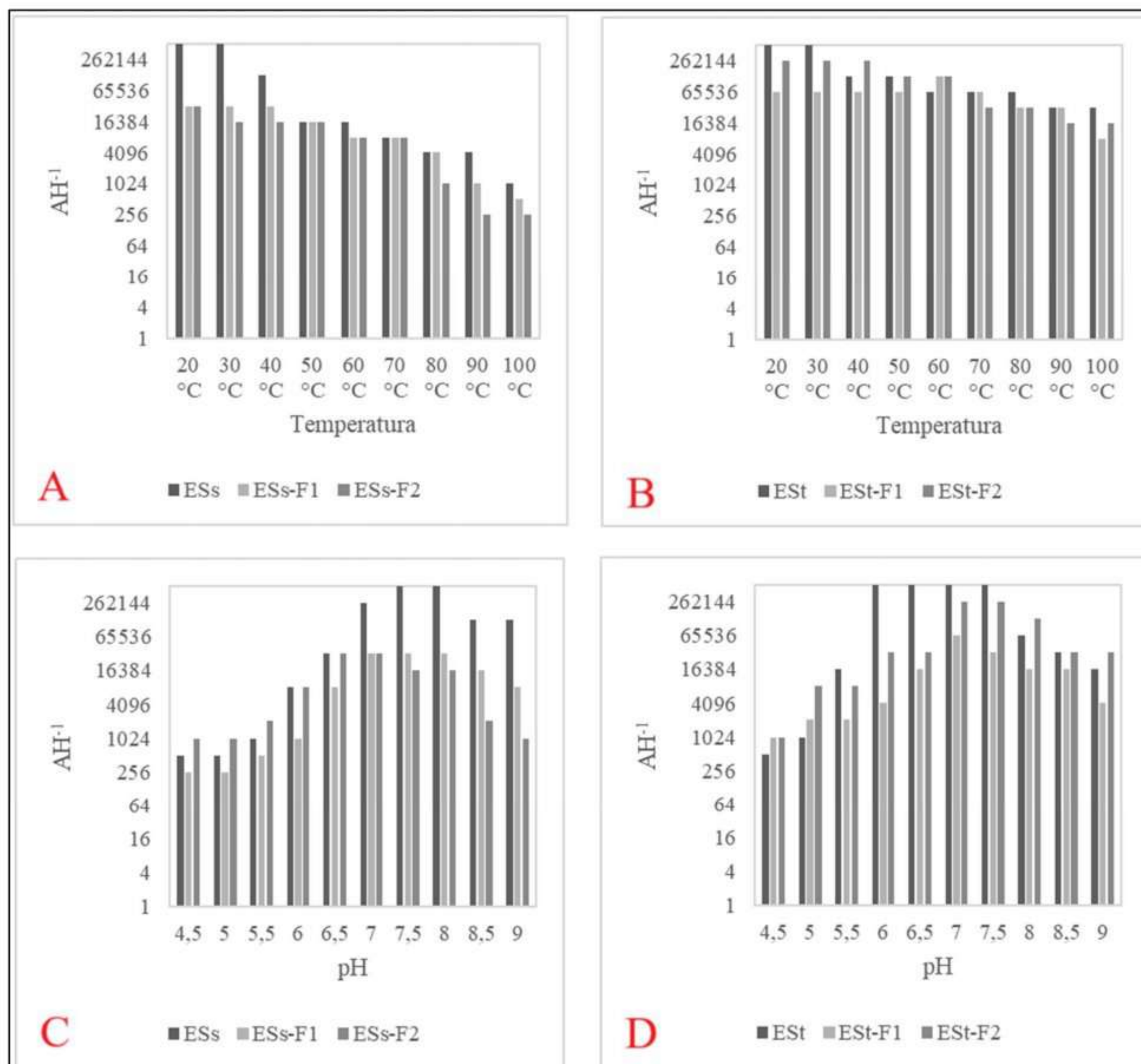
Com base nos valores de AHE de todas as preparações, aquelas obtidas das sementes, por apresentarem AHE elevada, foram selecionadas para outras análises de caracterização da atividade lectínica, bem como para processos cromatográficos objetivando uma possível purificação lectínica.

No teste de inibição de AH, os carboidratos D-glicose, D-manose ou D-galactose não promoveram inibição total ou parcial de AH das frações proteicas. É possível que lectinas presentes nas preparações possuam especificidade a outros tipos de monossacarídeos não testados ou, ainda, apresentem afinidade por oligossacarídeos complexos.

Na avaliação do efeito da temperatura sob a AH das preparações das sementes (Figura 4A e 4B), foi verificado que todas mantiveram a atividade de aglutinação de eritrócitos, mesmo em temperaturas muito elevadas (100 °C); no entanto, o extrato bruto em tampão citrato-fosfato 0,1 M e as frações obtidas a partir desse extrato (Figura 4B) apresentaram títulos de AH mais elevados em altas temperaturas do que as preparações em NaCl 0,15 M (Figura 4A), indicando que o tampão auxiliou na estabilização da atividade hemaglutinante de possíveis lectinas.

Apesar da AH ter sido mantida após incubação em todas as temperaturas testadas, foi também observado um decréscimo significativo nos títulos de AH em função do aumento da temperatura, o que, do ponto de vista biológico é coerente pois, geralmente, as proteínas são desnaturadas em altas temperaturas em razão das mudanças na sua conformação tridimensional (Davis & Williams, 1998).

Figura 4. Influência da variação de temperatura e pH na AH das amostras obtidas de sementes de *Microdesmia rigida* (Benth.) Sothers & Prance.



Avaliação do efeito da variação de temperatura e pH na AH das amostras preparadas em NaCl 0,15 M (A e C, respectivamente) e em tampão citrato-fosfato 0,1 M, pH 6,5 (B e D, respectivamente) obtidas das sementes de *M. rigida*. AH⁻¹: Título de atividade hemaglutinante. ESs: extrato bruto de sementes em NaCl 0,15 M. ESs-F1 e ESs-F2: frações proteicas de sementes de *M. rigida*, obtidas, respectivamente, por saturações do extrato bruto em NaCl 0,15 M com sulfato de amônio a 60 % e 60-90 %, seguidas de diálise. Est: extrato bruto de sementes em tampão citrato-fosfato 0,1 M (pH 6,5). Est-F1 e Est-F2: frações proteicas de sementes de *M. rigida*, obtidas, respectivamente, por saturações do extrato bruto em tampão citrato-fosfato 0,1 M (pH 6,5) com sulfato de amônio a 60 % e 60-90 %, seguidas de diálise.

Proteínas que apresentam estabilidade total ou parcial de sua estrutura nativa em altas temperaturas são classificadas como termoestáveis (Bischof; He, 2005). Logo, esse conceito se aplica ao conteúdo lectínico encontrado nas preparações proteicas obtidas das sementes de *M. rigida*, pois a presença de AH em amostras que foram expostas a temperaturas elevadas,

consideradas desnaturantes para muitas proteínas, indica que lectinas presentes nessas amostras mantiveram seus sítios de ligação a carboidratos ativos, o que implica dizer que mantiveram sua conformação nativa, podendo ter sofrido apenas uma desnaturação parcial.

Na literatura, há inúmeras lectinas que são classificadas como termoestáveis; por exemplo, as lectinas que foram isoladas do floema de diversas espécies de Cucurbitaceae apresentaram estabilidade em sua estrutura nativa, mesmo quando foram submetidas a um tratamento térmico a 80 °C (Swamy; Mondal, 2023). Há também a lectina de sementes de *Apuleia leiocarpa* (ApulSL), que manteve sua atividade hemaglutinante mesmo quando tratada termicamente a 100 °C (Carvalho et al., 2015). Portanto, esses dados fortalecem a hipótese da presença de lectinas termoestáveis em sementes de *M. rigida*.

Além da avaliação do efeito da temperatura sobre a AH, também foi analisada a estabilidade da atividade lectínica em diferentes faixas de pH. Assim como as temperaturas elevadas, o potencial hidrogeniônico (pH) muito ácido ou muito básico pode promover a desnaturação de proteínas através da desestabilização das interações entre as cadeias laterais dos aminoácidos, e nos grupos terminais amino e carboxil, promovendo a perda parcial ou total das funções biológicas (Dumetz et al., 2008). No caso das lectinas, quando a variação de pH promove a desnaturação dos sítios de ligação a carboidratos (CRD, do *inglês carbohydrate recognition domain*), isso afeta diretamente a detecção da atividade lectínica pelo teste de AH ou qualquer outro método de detecção que demande a lectina em sua conformação nativa.

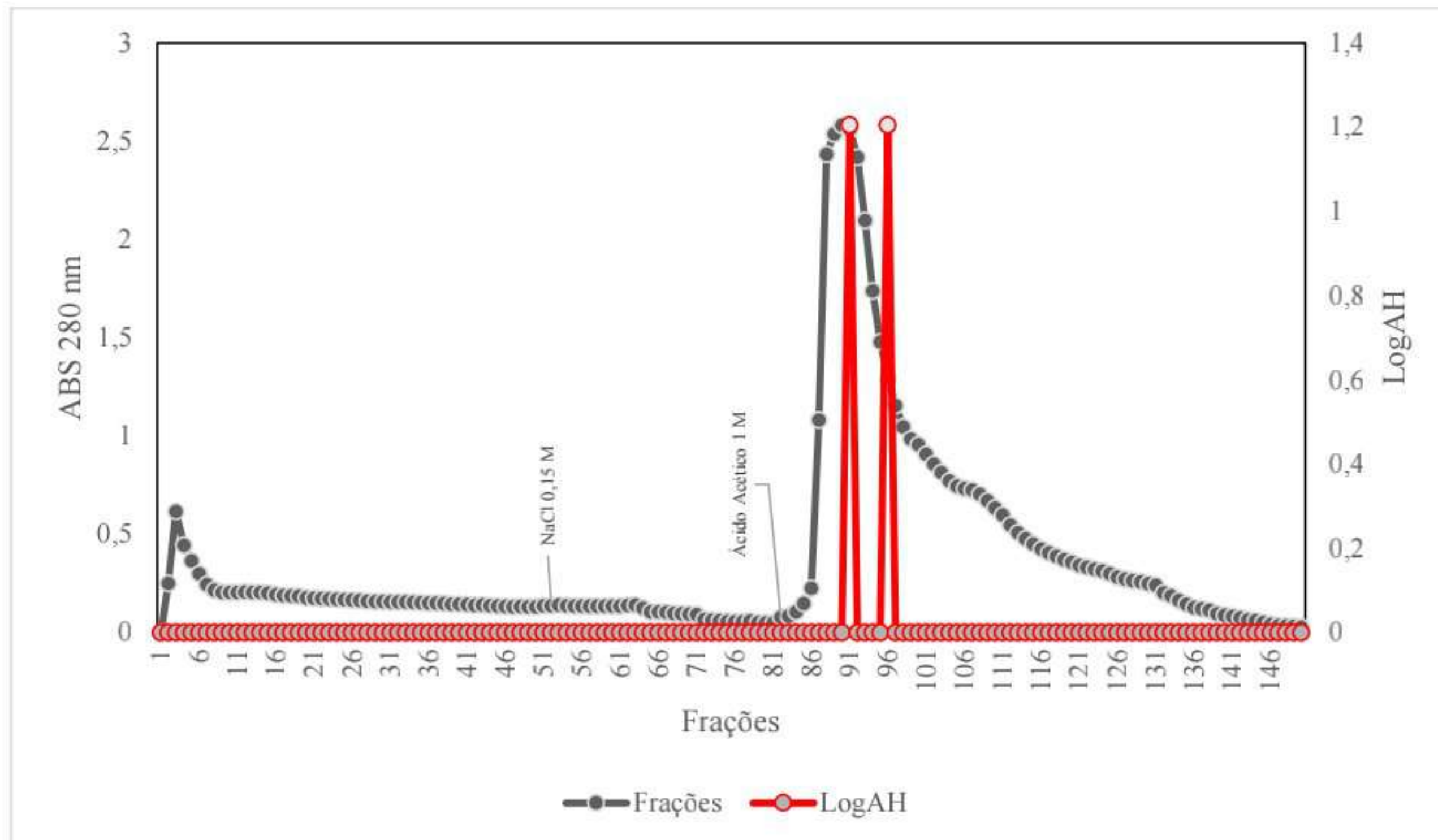
Todas as amostras revelaram elevada AH em todos os valores de pH testados. As preparações em NaCl 0,15 M (Figura 4C) apresentaram títulos de AH mais elevados entre pH 6,5 e 8,5, a depender da preparação. As preparações em tampão citrato-fosfato 0,1 M (pH 6,5) (Figura 4D) apresentaram AH ótima em pH 7 e 7,5, e o ESt revelou ótima AH numa faixa maior de pH, entre 6,0 e 7,5, contribuindo novamente com a hipótese de que o tampão mantém as lectinas, presentes nas amostras, menos suscetíveis a desnaturação em decorrência de condições físico-químicas que podem causar perda de estabilidade estrutural.

Há diversos relatos sobre lectinas que são capazes de promover hemaglutinação em uma larga faixa de pH. A lectina de *Phaseolus vulgaris*, por exemplo, consegue aglutinar eritrócitos mesmo entre pH 1,0 e 3,0 e, além disso, consegue restaurar sua estrutura nativa quando o meio é reajustado para pH 7,2, evidenciando a versatilidade dessas proteínas (Sun et al., 2020). Outro

exemplo é a lectina das sementes de *Parkia panurensis*, que apresenta AH entre pH 5,0 e 10,0. (Cavada et al., 2020).

Todas as frações proteicas foram analisadas quanto ao seu perfil cromatográfico utilizando suporte de quitina, Sephadex G-75 e gel de Guar. Todas as amostras (exceto ESt-F1, quando cromatografada em quitina) parecem ter apresentado uma forte interação com os suportes cromatográficos ou, ainda, a sensibilidade de proteínas aos processos pode ter causado precipitação proteica quando em contato com os suportes, não sendo obtidos quaisquer pools proteicos. No entanto, na cromatografia de ESt-F1 em quitina (Figura 5), um pool de material não adsorvido foi coletado (AH ausente) e, em seguida, um pool de material adsorvido foi eluído com ácido acético 1 M; após diálise, o adsorvido revelou AH (AH: 16^{-1}) e uma estimativa proteica de 7,2 $\mu\text{g/mL}$, apresentando AHE elevada (AHE: 2.211,38), o que indica a presença de lectina com afinidade à quitina.

Figura 5. Cromatografia em quitina da fração proteica de sementes de *Microdesmia rigida* (Benth.) Sothers & Prance, obtida por saturação do extrato bruto em tampão citrato-fosfato 0,1 M (pH 6,5) com sulfato de amônio a 60 %, seguida de diálise (ESt-F1).



ABS 280 nm: absorbância a 280 nm. LogAH: $\log_{10}$ do título de atividade hemaglutinante.

Muitas lectinas vegetais já foram isoladas por cromatografia em suporte de quitina, utilizando eluição com ácido acético 1 M, como, por exemplo, a PgTeL, a lectina de sarcotesta

de *Punica granatum*. Essa lectina possui inúmeros efeitos biológicos de interesse biotecnológico, como a atividade antibacteriana contra bactérias patogênicas humanas (Silva et al., 2016; Silva et al., 2019). A WSMoL, a lectina das sementes de *Moringa oleifera* solúvel em água (*Water soluble Moringa oleifera lectin*), é outro exemplo de lectina vegetal que foi isolada por cromatografia em suporte de quitina e eluída com ácido acético 1 M. Diversos trabalhos com essa lectina revelaram que ela possui efeito antibacteriano, nematicida e inseticida (Moura et al., 2015; Medeiros et al., 2018; Coelho et al., 2009).

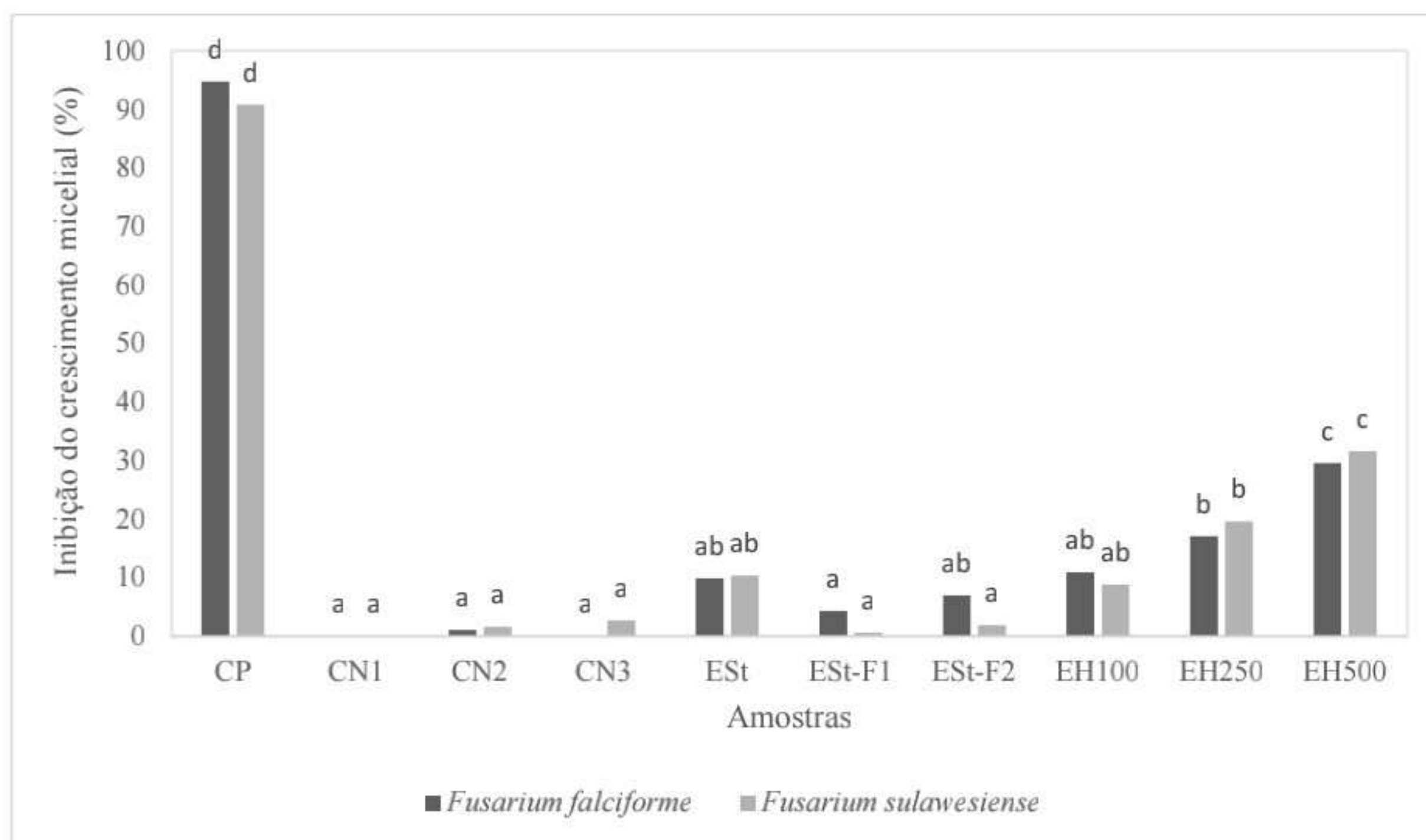
Todos os resultados relacionados à prospecção de lectinas corroboram a hipótese de que há lectinas bioativas em sementes de *M. rigida*, com habilidade para reconhecer glicanos da superfície de diferentes eritrócitos humanos, com estabilidade funcional a alterações na temperatura e no pH e com afinidade à quitina.

Nos ensaios para avaliação das preparações obtidas de sementes de *M. rigida* quanto ao potencial antifúngico sobre os fungos fitopatogênicos de importância agrícola, foram selecionadas e utilizadas duas espécies do gênero *Fusarium* (*F. falciforme* e *F. sulawesiense*), que representam um dos gêneros mais importantes no cultivo de plantas frutíferas, como o meloeiro.

Com o ensaio piloto, foi verificado que preparações obtidas de folhas e de sementes apresentaram um potencial antifúngico e, por isso, esses tecidos foram selecionados para o teste a ser realizado com as devidas replicatas e repetições independentes. Todas as preparações obtidas de folhas e de sementes foram avaliadas (extratos em NaCl 0,15 M e frações proteicas; extratos em tampão citrato-fosfato e frações proteicas; extratos hidroalcoólicos); apenas o extrato hidroalcoólico obtido de sementes apresentou ação antifúngica significativa.

A Figura 6 revela que o extrato de sementes de *M. rigida* em tampão citrato-fosfato, as frações proteicas obtidas a partir desse extrato (ESt, ESt-F1 e ESt-F2), bem como o extrato hidroalcoólico, promoveram algum efeito sobre o crescimento in vitro de pelo menos uma das espécies de fungos testadas. O extrato hidroalcoólico (250 e 500 uL) revelou um papel fungistático significativo sobre os dois fitopatógenos, quando comparado com os grupos de controle negativo (a menor dose, 250 uL, promoveu inibição de 17,02 % e 19,56 % do crescimento de *F. falciforme* e de *F. sulawesiense*, respectivamente). O tempo de crescimento total dos grupos controle negativo (CN1) foi de 10 e 22 dias, para *F. falciforme* e o *F. sulawesiense*, respectivamente, quando os dados foram coletados.

Figura 6. Percentual de inibição do crescimento de *Fusarium falciforme* e de *Fusarium sulawesiense* *in vitro* pelas amostras obtidas de sementes de *Microdesmia rigida* (Benth.) Sothers & Prance, após 10 e 22 dias de incubação, respectivamente.



CP: controle positivo, 100 μ L do fungicida Magnate® (Imazalil). CN1: controle negativo sem tratamento. CN2: controle negativo com 100 μ L de tampão citrato-fosfato 0,1 M, pH 6,5. CN3: controle negativo com 100 μ L de etanol a 95%. ESt: extrato bruto de sementes em tampão citrato-fosfato 0,1 M (pH 6,5). ESt-F1 e ESt-F2: frações proteicas de sementes de *M. rigida*, obtidas, respectivamente, por saturações do extrato bruto em tampão citrato-fosfato 0,1 M (pH 6,5) com sulfato de amônio a 60 % e 60-90 %, seguidas de diálise. Foi aplicado 100 μ L de ESt, ESt-F1 e ESt-F2 sobre o meio de cultivo, por espalhamento. EH100, EH250 e EH500: 100, 250 e 500 μ L, respectivamente, de extrato hidroalcoólico de sementes de *M. rigida* aplicado sobre o meio de cultivo, por espalhamento. Letras diferentes significam diferença estatística considerando $p > 0,05$.

No entanto, as placas de cultivo com os grupos de tratamento foram mantidas sob incubação, para avaliar o crescimento total dos fungos submetidos à presença das preparações. Após mais 10 dias de incubação, os fungos cultivados em meios tratados com 100 μ L do extrato em tampão, com 100 μ L das frações proteicas (ESt, ESt-F1 e ESt-F2) ou com 100 μ L de extrato etanólico (EH100) apresentaram crescimento total na placa, indicando que o seu efeito fungistático não foi permanente. No entanto, os fungos que foram cultivados em meios tratados com 250 ou 500 μ L do extrato hidroalcoólico (EH250 e EH500, respectivamente) não apresentaram crescimento total na placa, mesmo após mais 25 dias de incubação, indicando que o crescimento micelial foi inibido pelas amostras avaliadas, mesmo havendo disponibilidade de nutrientes no meio.

A extração com solventes orgânicos apresenta, de forma geral, melhor eficiência na obtenção de moléculas produzidas pelo metabolismo secundário das plantas, como compostos fenólicos, terpenos e alcaloides. Esses compostos podem promover inúmeros efeitos biológicos, como antimicrobiano, antiparasitário e inseticida, tornando-os boas alternativas para o controle de fitopatógenos e de pragas agrícolas (Jones; Kinghorn, 2012; Zaynab et al., 2018). Acredita-se que, devido a maior concentração de metabólitos secundários no extrato etanólico, alguns desses compostos podem ter promovido a estabilização do crescimento in vitro dos fungos. O trabalho de Farias et al. (2013) comprovou que há presença de compostos fenólicos, como taninos e flavonoides, no extrato hidroalcoólico de sementes de *M. rigida*.

Trabalhos têm mostrado que certos metabólitos secundários em extratos vegetais têm relação com atividade antifúngica. Chahal et al. (2021) verificaram que a presença de bioativos do metabolismo secundário no extrato etanólico de folhas de *Ageratum conyzoides* promovem um efeito fungicida em fungos do gênero *Fusarium*. Similarmente, o estudo de Schöneberg et al (2018) reporta o efeito fungistático de compostos fenólicos comerciais em espécies de *Fusarium* que atuam como fitopatógenos em cereais.

Os dados coletados no teste antifúngico indicam que o extrato hidroalcoólico de sementes de *M. rigida*, rico em compostos fenólicos (conforme já descrito por Farias et al., 2013), foi capaz de promover um efeito fungistático nas espécies do gênero *Fusarium* testadas. Outras análises são necessárias para determinar quais compostos foram responsáveis por desencadear tal efeito.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

M. rigida é uma espécie vegetal endêmica do semiárido brasileiro que foi amplamente explorada pelas indústrias de sabão e verniz, devido ao alto teor de óleos fixos em suas sementes. Além disso, há relatos do uso dessa planta na medicina popular, principalmente para o tratamento de diabetes. No entanto, não há trabalhos que relatem a presença de lectinas em tecidos de *M. rigida*.

Todas as preparações proteicas obtidas de folhas e de sementes de *M. rigida* apresentaram elevados títulos de AH. Os extratos e frações proteicas de sementes apresentaram elevada AHE; por isso, foram selecionadas para maior caracterização. Nenhuma das preparações de sementes teve a AH inibida por carboidratos simples. Todas as preparações de sementes foram capazes de aglutinar eritrócitos, mesmo em temperaturas consideradas extremas para a maioria das proteínas (a 100 °C). Além disso, as preparações revelaram estabilidade ao apresentarem AH em ampla faixa de pH, com títulos de AH ótima em faixa de pH próximo da neutralidade.

A cromatografia de ESt-F1 em quitina resultou em um pool de material não adsorvido (sem AH) e um pool de material adsorvido, eluído com ácido acético 1 M. Após eluição e diálise, o pool cromatográfico revelou AH e teor proteico, com uma AHE elevada. Os demais processos cromatográficos revelaram que as proteínas presentes nas frações, possivelmente, tiveram uma forte interação com os suportes utilizados (quitina, Sephadex G-75 e goma guar), ou precipitaram em contato com os mesmos, não sendo obtidos pools proteicos.

Os dados sugerem que *M. rigida* possui, em suas sementes, lectinas termoestáveis e estáveis a variação de pH, com alta afinidade a glicoconjugados da membrana de eritrócitos do sistema ABO e à quitina.

Quando as preparações de sementes foram avaliadas quanto ao potencial antifúngico, o extrato hidroalcoólico promoveu inibição significativa do crescimento micelial in vitro de *F. falciforme* e *F. sulawesiense*. O efeito fungistático nas amostras hidroalcoólicas e a ausência deste nas preparações em tampão citrato-fosfato sugerem que os compostos responsáveis por tal efeito são provenientes do metabolismo secundário de *M. rigida*, com destaque para os compostos fenólicos, como os taninos e flavonoides.

Os dados obtidos nesse estudo revelam que bioprodutos provenientes do metabolismo primário e secundário de *M. rigida* possuem efeitos biológicos que podem ser mais bem explorados do ponto de vista biotecnológico, contribuindo assim para o desenvolvimento de novos produtos biotecnológicos e para a valorização da espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agra, M. F.; *et al.* Synopsis of the Plants Known as Medicinal and Poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 114-140, 2007.
- Agrianual - Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo: FNP Consultoria e Agro Informativos, 2015, 496p.
- Alves, J. J. A.; Nascimento, S. S. Levantamento Fitogeográfico das Plantas Medicinais Nativas do Cariri Paraibano. **Rev. Geogr. Acadêmica**, v. 4, n. 2, p. 73-85, 2010.
- Anuário Brasileiro de Horti & Fruti 2022. Santa Cruz do Sul, 2022. SSN 2178-0897.
- Araújo, E. B. G.; *et al.* Crescimento inicial e tolerância de cultivares de meloeiro à salinidade da água. **Revista Ambiente e Água**, v.11, n. 2, 2016.
- Araújo, M. B. M.; *et al.* Fusarium rot of melon is caused by several *Fusarium* species. **Plant Pathology**, v. 70, p. 712-721, 2020.
- Aublet, J. B. C. F. Histoire des Plantes de la Guiane Française, 1775.
- Bani, M.; *et al.* Physical and Chemical Barriers in Root Tissues Contribute to Quantitative Resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* in Pea. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, 2018.
- Batista, D.; *et al.* *Licania rigida* leaf extract: Protective effect on oxidative stress, associated with cytotoxic, mutagenic and preclinical aspects. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 85. n.7 p.276-290, 2022.
- Bezerra, J. N. S. Estudo fitoquímico de *Licania rigida* Benth (Chrysobalanaceae). 2011. 158f. (Tese de Doutorado, Química) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.
- Bianchini, A.; *et al.* DON occurrence in grains: a north american perspective. **Cereal Foods World**, v. 60, n. 1, p. 32-56, 2015.
- Bischof, J. C.; He, X. Thermal stability of proteins. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1066 p. 12-33, 2005.
- Braca, A.; Morelli, I.; *et al.* Chemical and biological studies on *Licania* genus. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 28, p. 35-67, 2003.
- Boyd, W. C.; Reguera, R.M. Hemagglutinating substances for human cells in various plants. **The Journal of Immunology**, v. 62, p. 333-339, 1949.
- Butu, M.; Rodino, S.; Butu, A. Biopesticide formulations – current challenges and future perspectives. *Biopesticides: Advances in Bio-Inoculantes*. v. 2, cap. 3, p. 19-29, 2022.
- Cavada, B. S.; Bari, A. U.; Pinto-Júnior, V. R.; *et al.* Purification and partial characterization of a new lectin from *Parkia panurensis* Benth. ex H.C. Hopkins seeds (Leguminosae family; Mimosoideae subfamily) and evaluation of its biological effects. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 145, n. 15, p. 845 – 855, 2020.

- Carvalho, A. S.; *et al.* Purification, characterization and antibacterial potential of a lectin isolated from *Apuleia leiocarpa* seeds. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 75, p. 402-408, 2015.
- Castilho, R. O.; Kaplan, M. A. C. Chemical constituents of *Licania tomentosa* Benth. (Chrysobalanaceae). **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 66-69, 2008.
- Coelho, J. S.; *et al.* Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae. **Chemosphere**, v.77, n.7, p.934-938, 2009.
- Coninck, T.; Van Damme, E. M. Review: The multiple roles of plant lectins, **Plant Science**, v. 313, 2021.
- Costa, N. Z.; *et al.* Exposição aos agrotóxicos e o desenvolvimento de malformações congênitas: revisão de escopo. **Texto e Contexto – Enfermagem**, v. 30, 2021.
- Cummings, R. D.; *et al.* L-Types lectins. **Essentials of Glycobiology**, ed. 4, cap. 32, 2022.
- Dalbó, J.; Filgueiras, L. A.; Mendes, A. N. Effects of pesticides on rural workers: haematological parameters and symptomalogical reports. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 24, n. 7, 2019.
- Davis, P. J.; Williams, S. C. Protein modification by thermal processing. **Allergy**, v. 53 n. 46, p. 102-105, 1998.
- Deng, L. *et al.* Effect of tannic acid on blood components and functions. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 184, n. 110505, 2019.
- Dianese, A. C. Manejo de doenças causadas por *Fusarium* spp. no maracujazeiro. **Agrosoft Brasil**, 2008.
- Diniz, F. O.; *et al.* Biometria e morfologia da semente e plântula de oiticica. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 10, n. 2, p. 183-187, 2015.
- Doehlemann, G.; *et al.* Plant Pathogenic Fungi. **Microbiology Spectrum**, v. 5, n. 1, 2017.
- Dumetz, A. C.; *et al.* Effects of pH on protein–protein interactions and implications for protein phase behavior. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1784, p. 600 – 610, 2008.
- Farias, D. F.; *et al.* Antibacterial, antioxidant, and anticholinesterase activities of plant seed extracts from Brazilian semiarid region. **Biomed Research International**, v. 2013, 2013.
- Farias, M. F. A. M. S.; *et al.* Purification, characterization, and immunomodulatory activity of a lectin from the seeds of horse chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.). **Current Research in Biotechnology**, v. 4, p. 203-210, 2022.
- Fei, W.; Liu, Y. Biotrophic Fungal Pathogens: A Critical Overview. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 195, p. 1-16, 2023.
- Fonseca, V. J. A.; BRAGA, L. A.; *et al.* A review on the antimicrobial properties of lectins. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 195, p. 163-178, 2022.
- Freitas, M. A.; *et al.* Evaluation of the antifungal activity of the *Licania rigida* leaf ethanolic extract against biofilms formed by *Candida* sp. isolates in acrylic resin discs. **Antibiotics**, v. 250, 2019.

Friedrich, K.; *et al.* Situação regulatória internacional de agrotóxicos com uso autorizado no Brasil: potencial de danos sobre a saúde e impactos ambientais. **Cadernos em Saúde Pública**, v. 37 n. 4, 2021.

Fucic, A.; *et al.* Reproductive health risks associated with occupational and environmental exposure to pesticides. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v.18, 2021.

Gomes, C. D. L.; *et al.* Bioactivity of plant extracts from Caatinga on cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae). **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 26, n. 7, p. 541-546, 2022.

Gonzales, J. Brazil sets record for highly hazardous pesticide consumption: **Mongabay News & Inspiration from Nature's frontline**, 2020. Disponível em: <<https://news.mongabay.com/2020/03/brazil-sets-record-for-highly-hazardous-pesticide-consumption-report/>>. Acesso em: 02 abril 2022.

Gordon, T. R. *Fusarium oxysporum* and the *Fusarium* Wilt Syndrome. Annual Review of Phytopathology, v. 55, p. 23-39, 2017.

Governo Federal do Brasil. Brasil abre 2022 com recordes de exportações e corrente de comércio. Disponível em: < <https://www.gov.br/pt-br/noticias/financas/impostos-e-gestao-publica/2022/02/>>. Acesso em: 15 fev. 2022

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção de melão**. Brasil, IBGE, 2019.

ECHA – European Chemicals Agency. **Information on biocides**. Finlândia, ECHA, 2023.

Jones, W.P.; Kinghorn, A.D. Extraction of Plant Secondary Metabolites. In: Sarker, S.; Nahar, L. (eds) Natural Products Isolation. **Methods in Molecular Biology**, vol 864, 2012.

Konozy, E. H.; *et al.* Plant lectins: A new antimicrobial frontier. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 155, 2022.

Konozy, E. H.; *et al.* Plant lectins as potent Anti-coronaviruses, Anti-inflammatory, antinociceptive and antiulcer agents. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 29, n. 6, 2022.

Khursheed, A.; *et al.* Plant based natural products as potential ecofriendly and safer biopesticides: A comprehensive overview of their advantages over conventional pesticides, limitations and regulatory aspects, **Microbial Pathogenesis**, v. 173, 2022,

Lainhart, W. *Fusarium* spp., a Genus of Common Plant Pathogens That Can Cause Devasting, Opportunistic Human Disease. **Clinical Microbiology**, v. 140, n. 1, 2018.

Lazarotto, M. Identificação e Caracterização de *Fusarium* spp. e *Pestalotiopsis* spp. associados a *Carya illinoensis* no Rio Grande do Sul. 2013. 156f. (Tese de Doutorado, Engenharia Florestal: Silvicultura) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.

Lima, C. E. P.; *et al.* Productivity and quality of melon cultivated in a protected environment under different soil managements. **Horticultura Brasileira**, v. 35, p. 576-582, 2017.

Lisboa, M. C.; *et al.* Oleochemistry potential from Brazil northeastern exotic plants. **Biochimie**, v. 178, p. 96-104, 2020.

- Lucas, J. A. Fungi, Food Crops, and Biosecurity: Advances and Challenges. **Advances in Food Security and Sustainability**, v. 2, p. 1-40, 2017.
- Luz, J. R. D.; *et al.* *Licania rigida* Benth leaf extracts: Assessment of toxicity and potential anticoagulant effect. *South African Journal of Botany*. v. 139, p. 217-225, 2021.
- Macêdo, J. B. M. Capacidade antioxidante in vitro e avaliação da toxicidade aguda in vivo de extratos de folhas de *Licania rigida* Benth., *Licania tomentosa* (Benth.) Fritsch e *Couepia impressa* Prance (Chrysobalanaceae). 2011. 105f. (Dissertação de Mestrado, Ciências Farmacêutica) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2011.
- Mahadevakumar, S.; Sridhar, K. R. Diversity of Pathogenic Fungi in Agricultural Crops. **Plant, Soil and Microbes in Tropical Ecosystems**, cap. 6, p. 101-149, 2021.
- Maia, G. N. Caatinga: Árvores e arbustos e suas utilidades. São Paulo: D & Z., 2004. 413p.
- Makela, O.; Makela P. Some new blood group specific phytagglutinins; a preliminary report. **Annales Medicinæ Experimentalis et Biologiae Fenniae**, v. 34, n. 4. p.402–404, 1956.
- Marques, J. S.; Costa-E-Silva, M. B. O Gênero *Licania* Aubl. (Chrysobalanaceae) para Pernambuco. **57º Congresso Nacional de Botânica**, Gramado, Anais. Gramado: Sociedade Botânica do Brasil, 2006.
- Martino, R.; *et al.* Onset and progression factors in Parkinson's disease: a systematic review. *Neurotoxicology*, v. 61, p. 132–141, 2017.
- Massola-Júnior, N. S. Capítulo 8: Fungos Fitopatogênicos. *Manual da Fitopatologia*. v. 1, ed. 5, 2018.
- Matich, E. K.; *et al.* Association between pesticide exposure and colorectal cancer risk and incidence: a systematic review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 219, 2021.
- Mattos, L. C. Structural diversity and biological importance of ABO, H, Lewis and secretor histo-blood group carbohydrates. **Brazilian Journal of Hematology and Hemotherapy**, v. 38, n.4, p. 331-340, 2016.
- Medeiros, M. L. S.; *et al.* Nematicidal activity of a water soluble lectin from seeds of *Moringa oleifera*. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 108, p.782-789, 2018.
- Melo, A. A.; Swarowsky. A. Application technology of biopesticides. **Biopesticides**, cap. 4, p. 31-36, 2022.
- Melo, T. K. Comportamento de cultivares de meloeiro e melancia em cenários de mudanças climáticas no semiárido brasileiro. 2019. 60F. (Tese de mestrado, Manejo de Solo e Água) – Universidade Federal Rural do Semi-árido, Mossoró, 2019.
- Morais, L. V. F. Atividade antimicrobiana e antioxidante de *Licania rigida* e *Tumera ulmifolia*. 2015. 64f. (Dissertação de Mestrado, Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2015.
- Morais, L. V. F.; *et al.* Phenolic Composition, Toxicity Potential, and Antimicrobial Activity of *Licania rigida* Benth (Chrysobalanaceae) Leaf Extracts. **Journal of Medical Food**, v. 25, n. 1, 2022.

- Moura, M.C.; *et al.* Multi-effect of the water-soluble *Moringa oleifera* lectin against *Serratia marcescens* and *Bacillus* sp.: antibacterial, antibiofilm and anti-adhesive properties. **Journal of Applied Microbiology**, v. 123, n. 4, p. 861-874, 2017.
- Nogueira, G. A.; *et al.* Aggressivity of different fusarium species causing fruit rot in melons in Brazil. **Plant Disease**, v. 107, n. 3, p. 886-892, 2023.
- Oliveira, A. P. S.; *et al.* Evaluation of the insecticidal activity of *Moringa oleifera* seed extract and lectin (WSMoL) against *Sitophilus zeamais*. **Journal of Stored Products Research**, v. 87, 2020.
- Oliveira, F. A. G.; *et al.* Síntese, caracterização e avaliação de biodiesel de óleo de oiticica (*Licania rigida* Benth) e isolamento do éster metílico do ácido licânico. **Química: ciência, tecnologia e sociedade**, v. 1, n. 1, p. 31-41, 2012.
- Oliveira, M. S.; Campos, M. A. S.; Silva, F. S. B. Arbuscular mycorrhizal fungi and vermicompost to maximize the production of foliar biomolecules in *Passiflora alata* Curtis seedlings. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95 n.3, p. 522–528, 2015.
- Oliveira, V. P.; Espescht, A. C. R.; Peluzio, M. C. G. Flavonoides e doenças cardiovasculares: ação antioxidante. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 16(4), p. 234-238, 2006.
- Park, S.; *et al.* Residue analysis of multi-class pesticides in watermelon by LC-MS/MS. **Journal of Separation Science**, v. 33, p. 493-501, 2010.
- Patel, R.; *et al.* A review of recent advances in plant-pathogen detection systems. **Heliyon**, v. 8, n. 12, 2022.
- Patriota, L. L. S.; *et al.* *Microgramma vacciniifolia* frond lectin (MvFL) exhibits antitumor activity against sarcoma 180 in mice. **Phytomedicine Plus**, v. 2, 2021.
- Paumgarten, F. J. R. Pesticides and public health in Brazil. **Current Opinion in Toxicology**, v. 22, p. 07-11, 2020.
- Pawlowski, M. L.; HARTMAN, G. L. Infection mechanisms and colonization patterns of fungi associated with soybean. **Fungal Pathogenicity**, cap. 2, 2016.
- Pellegrina, H. S. Trade, productivity, and the spatial organization of agriculture: Evidence from Brazil. **Journal of Development Economics**, v. 156, 2022.
- Perincherry, L.; *et al.* Fusarium-Produced Mycotoxins in Plant-Pathogen Interactions. **Toxins (Basel)**, v. 11, n. 664, 2019.
- Pereira, R. J; Cardoso, M G. Metabólicos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v.3, n. 4: p 146-152, 2012.
- Pessoa, I. P.; *et al.* Polyphenol composition, antioxidant activity and cytotoxicity of seeds from two underexploited wild *Licania* species: *L. rigida* and *L. tomentosa*. **Molecules**, v. 21, 1755, 2016.
- Peterson, G. L. Review of the folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. **Analytical Biochemistry**, v. 100. n. 2, p. 201-220, 1979.

- Peumans, W. J.; van Damme, E. J. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, v. 109, n. 2, p. 347-352, 1995.
- Queiroga, V. P.; et al. Composição química e mineral de amêndoas de oiticica em três tempos de armazenamento. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 8, n. 2, p. 173-177, 2013.
- Ristaino, J. B. Tracking historic migrations of the Irish potato famine pathogen, *Phytophthora infestans*. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 1369-1377, 2002.
- Rizzo, C.; Caruso, C.; Vasto, S. Possible role of ABO system in age-related diseases and longevity: a narrative review. **Immunity & Ageing**, v. 11, n. 16, 2014.
- Santos, G. R.; et al. Impact of growing seasons and pesticides used on the occurrence and severity of the gummy stem blight in melon cultivation in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, v. 161, p. 171-184, 2021.
- Santos, R. F.; et al. Lack of na Intron in Cytochrome *b* and Overexpression of Sterol 14 α -Demethylase Indicate a Potential Risk for QoI and DMI Resistance Development in *Neophytophthora* spp. on Grapes. **Phytopathology**, v. 111, p. 1726-1734, 2021.
- Santos, R. F.; et al. Multiple resistance of *Plasmopara viticola* to QoI and CAA fungicides in Brazil. **Plant Pathology**, v. 69, p. 1708-1720, 2020.
- Sharon, N.; LIS, H. A century of lectin research. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 12, p. 488-491, 1987.
- Silva, F. G.; Alves, M. Chrysobalanaceae no Nordeste Oriental do Brasil. **Rodriguésia**, v. 70, 2020.
- Silva, J. F. S.; et al. Exposure to pesticides and prostate cancer: systematic review of the literature. **Reviews on Environmental Health**, v. 31, p. 311-327, 2016.
- Silva, P. M.; et al. The juicy sarcotesta of *Punica granatum* contains a lectin that affects growth, survival as well as adherence and invasive capacities of human pathogenic bacteria. **Journal of Functional Foods**, v. 27, p. 695-702, 2016.
- Silva, P. M.; et al. *Punica granatum* sarcotesta lectin (PgTeL) impairs growth, structure, viability, aggregation, and biofilm formation ability of *Staphylococcus aureus* clinical isolates. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 123 p. 600-608, 2019.
- Soares, A. G.; Fonseca, M. J. O.; Barboza, H. T. G. Comunicado Técnico 227. Produção Agrícola Orgânica: Recomendações Pós-Colheita para Agricultores e Comerciantes. Embrapa, 2017.
- Sothers, C. A.; Prance, G. T.; Chase, M. W. Towards a monophyletic *Licania*: a new generic classification of the polyphyletic Neotropical genus *Licania* (Chrysobalanaceae). **Kew Bulletin**, v. 71, n. 58, 2016.
- Stanganelli, I.; et al. The association between pesticide use and cutaneous melanoma: a systematic review and meta-analysis, **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 34, p. 691-708, 2020.

- Swamy, M. J.; Mondal, S. Subunit association, and thermal and chemical unfolding of Cucurbitaceae phloem exudate lectins. A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 233, n. 123434, 2023
- Sun, X.; *et al.* Combined effects of pH and thermal treatments on IgE-binding capacity and conformational structures of lectin from black kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food Chemistry**, v. 329, n. 127183, 2020.
- Taylor, A.; *et al.* Basal rot of narcissus: understanding pathogenicity in *Fusarium oxysporum f sp narcissi*. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2019.
- Terao, D.; *et al.* Manejo Integrado de Doenças do Meloeiro. **Proteção Integrada da Planta**, cap.18, 2008.
- Vanomark, G. M. M. S.; *et al.* Energy balance partitioning and evapotranspiration from irrigated Muskmelon under Semi-Arid Conditions. **Brangatia**, v. 77, n. 1, 2018.
- Zago, A. M.; *et al.* Pesticide exposure and risk of cardiovascular disease: a systematic review. **Global Public Health**, v. 0, p. 1-23, 2020.
- Zambolim, L. Capítulo 14: Resistência de fungos a fungicidas. O essencial da fitopatologia: controle de doenças em plantas. CDD 22. ed. 639.2, 2014.
- Zaynab, M.; *et al.* Role of secondary metabolites in plant defense against pathogens. **Microbial Pathogenesis**, v. 124, p. 198-202, 2018.
- Zhang, L.; *et al.* Exposure to glyphosate-based herbicides and risk for non-hodgkin lymphoma: a meta-analysis and supporting evidence. **Mutation Research**, v. 781, p. 186–206, 2019.