



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM**  
**BIOCIÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA**

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DA FOLHA E DO LENHO DE *Manilkara zapota***  
**(L.) P. ROYEN, ANÁLISE QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO EXTRATO**  
**PROTEICO FOLIAR**

**LETÍCIA LANES FERREIRA**

**Campos dos Goytacazes - Rio de Janeiro**

**Fevereiro de 2020**

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DA FOLHA E DO LENHO DE *Manilkara zapota*  
(L.) P. ROYEN, ANÁLISE QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO EXTRATO  
PROTEICO FOLIAR**

**LETÍCIA LANES FERREIRA**

Dissertação a ser apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Maura Da Cunha

Co-orientador: Dr. Gabriel Bonan Taveira

**Campos dos Goytacazes- Rio de Janeiro**

Fevereiro de 2020





“ A falsa ciência cria os ateus , a verdadeira, faz o  
homem prostrar-se diante da divindade”

(Voltaire)

## ***Dedicatória***

*Dedico esse trabalho ao meu pai Isaias Ramos Ferreira, meu herói, fonte da minha inspiração em tudo que faço, o motivo pelo qual cheguei até aqui e que me faz querer continuar. Aquele que me ensinou amor ágape (desinteressado, puro, genuíno e invencível). Aquele que me ensinou o valor de um Professor, o respeito que ele merece e o poder do conhecimento que ele o pode transmitir. Dedico este trabalho também ao meu marido, Everton Alves Cunha que tem sido a minha força e meu anjo da guarda nos últimos cinco anos, me auxiliando de todas as formas possíveis em minhas conquistas.*

## **Agradecimentos**

A Deus, Único e Criador, Pai que me sustenta, me acalma, que enche meu coração de alegria que toma conta de mim, da minha família e amigos, que me dá sabedoria para seguir. Ao meu marido, Everton, por ser o primeiro a me apoiar, a incentivar os meus sonhos, a me mostrar que as coisas são possíveis, por estar ao meu lado e sempre cuidar de mim. Aos meus pais, Isaias e Amarilza, por me ensinarem valores e sentimentos, por serem meu refúgio e conforto nas horas difíceis. Aos meus irmãos, Shaiannye Allan, por sempre me darem alegria e força em todo o tempo. À minha amiga Vanessa, por me apoiar, cuidar e me acompanhar na minha jornada, por dividir comigo as situações do meio acadêmico, por rir e chorar junto comigo, me consolar nos momentos ruins e por me fazer rir quando não há mais saída, rs. À minha amiga Renata que tem cuidado de mim e me dado muita força durante a pós-graduação. À minha orientadora, Dra. Maura Da Cunha, pela compreensão, carinho e paciência. Ao meu co-orientador Gabriel B. Taveira, pelo conhecimento transmitido, pela paciência e compreensão e auxílio. Por sempre acreditar em mim, e por ser minha grande inspiração nessa jornada acadêmica. Aos meus amigos, família e grupo de anatomia vegetal da UENF: Camilla, Neilor, Gabriel, Dhiego, Saulo, Marcos, Glazi, Priscila, Marcela, Guilherme, Larae aos demais mauretes. À Professora, Valdirene, pelo carinho e conhecimento que tem me transmitido. Aos membros da banca Dr. Luciana Belarmino da Silva, Dra. Letícia de Oliveira da Rocha, Prof. Dra. Valdirene Moreira Gomes. Aos professores, técnicos e funcionários do LBCT e LFBM. E a todas as pessoas que estiveram comigo durante esse processo, me apoiando, incentivando e colaborando para que este trabalho se tornasse possível. Muito obrigada!

## Sumário

Lista de figuras.....	3
Lista de tabelas.....	4
Resumo.....	5
Abstract .....	6
1. Introdução .....	7
2. Importância econômica e ecológica de plantas com ampla distribuição tropical .....	9
2.1 Anatomia da folha e do lenho .....	10
2.1.2 Estrutura secretora e laticífero .....	11
2.1.3 Mecanismo de defesa de plantas.....	13
2.1.4. Família Sapotaceae e a espécie <i>Manilkara zapota</i> .....	16
3. Objetivos.....	20
3.1 Objetivo Geral .....	20
3.1.2 Objetivos específicos.....	20
4. Material e Métodos.....	20
4.1 Material Biológico .....	20
4.1.2 Coleta do material botânico.....	20
4.1.3 Microrganismos.....	21
4.1.4 Dissociação epidérmica .....	22
4.1.5 Testes Histoquímicos.....	22
4.1.6 Preparo da amostra da folha para microscopia óptica .....	24
4.1.7 Análise da micromorfologia foliar .....	25
4.1.6 Processamento do Lenho .....	25
4.1.9 Extração proteica.....	26
4.2 Eletroforese em gel de tricina sob condições desnaturantes .....	27
4.2.1 Coloração e descoloração do gel.....	28
4.2.2 Análise da Inibição do Crescimento das Células de Leveduras .....	28

4.2.3 Permeabilização de Membranas de Leveduras.....	29
4.2.5 Análises Estatística .....	29
5. Resultados .....	29
5.1. Anatomia da folha e lenho .....	30
5.1.2 Perfil eletroforético do extrato bruto de folhas de <i>Manilkara zapota</i> .....	39
5.1.2 Ensaio de Inibição do Crescimento .....	39
5.1.3 Efeito de EB sobre a Permeabilização de Membranas de Leveduras .....	40
6. Discussão .....	41
6.1 Anatomia da folha e do lenho .....	41
6. 2 Perfil Proteico e ensaio de inibição de crescimento .....	46
6.3 Conclusão.....	48
6.4 Referencias bibliográficas.....	49

## Lista de Figuras

Figura 1: Ilustração dos diferentes tipos de laticíferos.....	12
Figura 2: Distribuição da espécie <i>Manilkara zapota</i> no Brasil.....	18
Figura 3: Espécie <i>Manilkara zapota</i> no ambiente de coleta.....	19
Figura 4: Indivíduo de <i>Manilkara zapota</i> .....	21
Figura 5: Superfície foliar de <i>Manilkara zapota</i> (Sapotaceae).....	31
Figura 6: Anatomia da folha de <i>Manilkara zapota</i> (Sapotaceae).....	33
Figura 7: Histoquímica da folha de <i>Manilkara zapota</i> (Sapotaceae).....	35
Figura 8: Anatomia do lenho de <i>M. zapota</i> (Sapotaceae).....	38
Figura 9: (A) Eletroforese em gel de tricina na presença de SDS do extrato bruto das folhas de <i>M. zapota</i> tratado com $\beta$ -mercaptoetanol.....	39
Figura 10: Gráficos de inibição do crescimento das células das leveduras <i>C. albicans</i> e <i>C. tropicalis</i> , na ausência do EB (controle) e na presença de 100, 200 e 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do EP.....	40
Figura 11: Células de <i>C. albicans</i> e <i>C. tropicalis</i> após ensaio de permeabilização da membrana, visualizadas por microscopia de fluorescência utilizando a sonda fluorescente Sytox green.....	41

## Lista de tabelas

Tabela 1: Relação de reagentes e moléculas de interesse.....24

Tabela 2: Relação de reagentes e moléculas de interesse identificadas.....37

## Resumo

O sapotizeiro (*Manilkara zapota* (L.) P. Royen) é uma espécie frutífera muito conhecida da família Sapotaceae, comumente encontrada nas regiões tropicais. O sapotizeiro é cultivado para produção de frutos comestíveis e do látex. Devido à ação biológica atribuída a extratos da folha e da casca de *Manilkara zapota* na medicina popular, e a escassez de informações sobre a espécie na literatura, este trabalho objetivou a caracterização da estrutura e histoquímica da folha, lenho e de laticíferos presentes nesses órgãos e analisar a atividade antifúngica do extrato foliar, rico em proteínas, contra leveduras do gênero *Candida*. A espécie *Manilkara zapota* foi analisada através de microscopia óptica e eletrônica de varredura para relatar as características anatômicas e ultraestruturas da folha. Para análise bioquímica, foi obtido o extrato rico em proteínas das folhas de *Manilkara zapota*, este foi submetido à técnica de eletroforese em SDS PAGE tricina para a visualização do perfil proteico. O extrato proteico das folhas também foi testado quanto a sua propriedade de inibir o crescimento das leveduras *C. albicans* e *C. tropicalis*, bem como, a propriedade de permeabilização de suas membranas citoplasmáticas. A microscopia de varredura evidenciou a presença de cera epicuticular e hifas fúngicas, em ambas a epidermes e tricomas. A microscopia óptica evidenciou a lâmina foliar de *Manilkara zapota*, apresentando epiderme adaxial bisseriada e presença de cristais prismáticos, parede periclinal externa sinuosa, parênquima paliçádico e lacunoso multisseriados. As folhas são do tipo hipostomática com estômatos anomocíticos. O feixe vascular é do tipo convexo à superfície adaxial. Os laticíferos são do tipo articulados não anastomosados. O lenho de *Manilkara zapota* apresenta camadas de crescimento indistintas, porosidade difusa, vasos solitários e múltiplos, placa de perfuração simples, pontuações intravasculares, parênquima axial do tipo apotraqueal, raios unisseriados e bisseriados, com células procumbentes e quadradas. Através eletroforese do extrato foliar duas bandas proteicas foram visualizadas, uma de 14 kDa e outra acima de 26 kDa. O extrato proteico foi capaz de causar uma inibição significativa no crescimento das leveduras testadas nas concentrações de 200 e 300  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , entretanto através do uso da sonda Sytox green não foi possível observar a permeabilização das membranas fúngicas. Os resultados obtidos neste trabalho geram subsídios para taxonomia e filogenética da espécie, e disponibilizam o conhecimento sobre proteínas de caráter antifúngico e sua possível aplicação biotecnológica.

**Palavras-chave:** Anatomia, folha, lenho, micromorfologia, laticíferos, extrato proteico, *Candida* spp.

### Abstract

Sapodilla (*Manilkara zapota* (L.) P. Royen) is a well-known fruit of the Sapotaceae family, commonly found in tropical regions. Sapodilla is grown for the production of edible fruits and latex. Request for biological action attributed to extracts of leaf and bark of *Manilkara zapota* in folk medicine, and the scarcity of information about the species in the literature, this work aimed at characterizing the structure and histochemistry of leaf, wood and dairy products present in the organs and analysis of the antifungal activity of leaf extract, rich in proteins, against yeasts of the genus *Candida*. The species *Manilkara zapota* was analyzed through optical microscopy and scanning electron to report the anatomical characteristics and ultrastructures of the leaf. For biochemical analysis, the extract rich in proteins of the leaves of *Manilkara zapota* was found, which was submitted to the electrophoresis technique in SDS PAGE tricina to visualize the protein profile. The protein extract of the leaves was also tested for its property of inhibiting the growth of the yeasts *C. albicans* and *C. tropicalis*, as well as the property of permeabilization of their cytoplasmic membranes. Scanning microscopy showed the presence of epicuticular wax and fungal hyphae in both epidermis and trichomes. An optical microscopy showed a leaf blade of *Manilkara zapota*, reinforced bisexual adaxial epidermis and the presence of prismatic crystals, sinuous external periclinal wall, palisade parenchyma and multiseriate lacunae. The leaves are hypostomatic with anomocytic stomata. The vascular bundle is of the type convex to the adaxial surface. Dairy products are of the articulated, non-anastomosed type. The *Manilkara zapota* wood has indistinct growth layers, diffuse porosity, solitary and multiple vessels, single perforation plate, intravascular punctuation, apotracheal axial parenchyma, uniseriate and bisected rays, with procumbent and square cells. Through electrophoresis of the leaf extract, two protein bands were visualized, one of 14 kDa and the other above 26 kDa. The protein extract was able to cause a significant inhibition in the growth of the yeasts tested in the concentrations of 200 and 300  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , however through the use of the probe Sytox green it was not possible to observe the permeabilization of the fungal membranes. The results obtained in this work generate subsidies for taxonomy and phylogenetics of the species, and provide knowledge about proteins of antifungal character and their possible biotechnological application.

Keywords: Anatomy, leaf, wood, micromorphology, dairy products, protein extract, *Candida* spp.

## 1. Introdução

As plantas tropicais nativas das Américas têm sido utilizadas a mais de 10 mil anos como alimento ou medicamento (Simões *et al.*, 2017). Durante as grandes navegações portuguesas e espanholas foram levadas espécies das Américas para a Europa difundindo o conhecimento etnobotânico dos ameríndios (Bracht *et al.*, 2011). Atualmente, as principais fontes de alimento nos continentes são espécies domesticadas a partir da cultura desses povos. O uso das muitas substâncias bioativas presentes nessas espécies, por esses povos antigos, também gerou informações ao longo dos séculos utilizadas na medicina alternativa (Simões *et al.*, 2017).

As diversas substâncias bioativas presentes no látex e nos extratos foliares podem conferir atividade biológica contra patógenos inibindo seu crescimento. De forma semelhante as espécies da família Sapotaceae se demonstram promissoras quanto à atividade biológica de seus extratos, tanto da madeira quanto de folhas (Fenner *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2007; Kothari *et al.*, 2011).

A caracterização da anatomia foliar, do lenho e de suas estruturas secretoras pode auxiliar na classificação taxonômica de uma espécie devido à presença ou ausência, de estruturas secretoras, sua morfologia e sua localização nos órgãos de plantas (Castro *et al.*, 1997; Castro & Demarco, 2008). Os laticíferos são estruturas secretoras formadas por uma ou mais células alongadas que formam redes de canais (Ascensão, 2007; Hagel *et al.*, 2008). Essas células especializadas produzem e secretam o látex, uma substância de aspecto leitoso rico em proteínas que tem como função principal atuar na defesa das plantas (Ramos *et al.*, 2019).

Esse fluido é liberado quando a planta sofre injúria, bloqueando a entrada de patógenos (Ramos *et al.*, 2019). Este fato pode ser também considerado uma defesa mecânica, ou uma defesa contra herbivoria devido a presença de substâncias resinosas e borracha ou mesmo combatendo o crescimento de micro-organismos através de uma gama de substâncias, tais como compostos fenólicos, terpenos, proteínas, alcaloides (Ramos *et al.*, 2007; Freitas *et al.*, 2015; Ramos *et al.*, 2019). Substâncias como mucilagem, lipídeos e carboidratos também podem estar presente na composição do látex, inclusive os lipídeos

são os compostos secretados mais apreciados da família Sapotaceae (Monteiro *et al.*, 2007; Ramos *et al.*, 2020).

A família Sapotaceae é formada por plantas lenhosas com distribuição Pantropical das quais 231 espécies são encontradas no Brasil. Essas espécies de grande porte são valorizadas comercialmente devido à produção de madeira de boa qualidade e produção de frutos. Dentre os caracteres morfológicos diagnósticos da família, destaca-se a presença de laticíferos, cujo látex de espécies da América do Sul foi extensivamente utilizado para produção de goma de mascar (Chicle). Um exemplo de uma espécie da família Sapotaceae valorizada comercialmente é a *Manilkara zapota* (Alves-Araújo & Alves, 2010; Souza & Lorenzi, 2012; Carneiro *et al.*, 2013; Mônico *et al.*, 2017).

A espécie *Manilkara zapota*, também conhecida como sapotizeiro é de grande porte, nativa do Sul do México e da América Central, difundida nas regiões tropicais da América do Sul, América do Norte e Ásia (Silva Junior *et al.*, 2014). O fruto do sapotizeiro é aplicado na indústria alimentícia, sendo consumido ao natural ou em forma de geleias, sorvetes, refrescos e xaropes. Este fruto é rico em açúcar e não possui ácido, porém quando verde, apresenta tanino adstringente, que desaparece naturalmente quando completamente maduro. Apesar da predominância dos laticíferos, outras estruturas e compostos ergásticos foram reportados para diferentes gêneros da família Sapotaceae (Heaton, 1997). Várias partes desta planta são usadas na medicina popular no tratamento de infecções, dor, febre, gripe, diarreia e por apresentar propriedades diuréticas (Milind, 2015). Estudos científicos confirmam algumas dessas atividades, como antidiarreica, anti-inflamatória e antimicrobiana (Ganguly *et al.*, 2013). De acordo com Fayek e colaboradores (2012), entre essas atividades poucas tem sido analisada quimicamente.

Os laticíferos de *Manilkara zapota* estão presente em todos os órgãos da planta, fluindo intensamente principalmente nas folhas e pecíolo, atuando contra diversos patógenos devido a presença de proteínas e metabólitos de que fazem parte dos diferentes mecanismos de defesa vegetal (Ramos *et al.*, 2020).

Os mecanismos utilizados pelas plantas podem ser induzidos ou constitutivos (Simões *et al.*, 2017). O mecanismo de defesa constitutiva é formado por estruturas e compostos bioquímicos que estão sempre presentes nas plantas durante o seu desenvolvimento, podendo ser estrutural ou químico (Menezes, 2009; São João & Raga, 2016).

A defesa estrutural envolve estruturas presente no vegetal que o protege contra patógenos e herbívoros, impedindo que estes entrem ou se espalhem pela planta, conferindo ainda defesa contra variações ambientais (Menezes, 2009). Já o mecanismo químico de defesa ocorre por meio da presença de toxinas, com por exemplo, proteínas, peptídeos, metabólitos secundários presente nas plantas (Menezes, 2009).

Na defesa induzida há o reconhecimento de eliciadores que funcionam como sinalizadores, levando o vegetal a ter sua produção de moléculas e compostos de defesa aumentada para combater o agente causador de danos (Castro & Fontes, 2005; Menezes, 2009).

Como visto até agora as plantas dispõe de vários mecanismos e moléculas que trabalham de forma articulada frente aos estresses bióticos e abióticos, o sinergismo entre alguns produtos antimicrobianos sintetizados pelas plantas, também pode ser efetivo no sucesso da ação antimicrobiana (Stermitz *et al.*, 2000).

Assim, devido à composição e valorização dos extratos foliares na etnobotânica, a presença de estruturas secretoras e importância econômica da espécie, o presente estudo apresentou os seguintes questionamentos: Qual a função dos laticíferos na folha e no lenho de *Manilkara zapota*? Sua estrutura e composição auxiliam na defesa desta planta? Quais proteínas podemos encontrar no extrato foliar rico em proteínas? A composição proteica do extrato da folha pode apresentar a atividade antifúngica sobre leveduras do gênero *Candida*? Podemos considerá-la para a caracterização de futuros compostos bioativos?

## **2. Importância econômica e ecológica de plantas com ampla distribuição tropical**

As plantas tropicais são muito apreciadas em seu uso na produção de alimentos e fármacos. Assim, devido à boa qualidade da madeira, valor nutricional ou fitoterápico, muitas espécies de plantas tropicais foram domesticadas, disseminadas, cultivadas e comercializadas em várias partes do globo (Repetto, 1988). Entre estas, *Persea americana* Mill. (abacate), *Ipomea batatas* L. Lam. (batata-doce), *Ilex paraguariensis* A.St.-hil (mate), *Theobroma cacao* L. (cacau), *Zea mays* L. (milho) são exemplos de espécies tropicais selecionadas pelos ameríndios em tempos remotos e hoje fazem parte da alimentação da população em escala mundial. Algumas espécies foram utilizadas na indústria de fármacos, e são conhecidas e comercializadas. Entre estas, saparrilha (*Smilax* spp.), guaiáco (*Guaiacum officinale* L.), de origem caribenha, usadas na Europa contra sífilis (Simões *et al.*, 2017); substâncias bioativas obtidas de cascas de cinchona (*Cinchona calisaya* Wedd.)

usada como antimalárico; e pilocarpus (*Pilocarpus jaborandi* Holme) usada no tratamento de glaucoma (Bracht *et al.*, 2011; Simões *et al.*, 2017). Outro exemplo, é a espécie em estudo, *Manilkara zapota* (L.) P. Royen, conhecida popularmente como sapotizeiro, espécie frutífera mais conhecida da família Sapotaceae. Várias partes desta planta são usadas na medicina popular no tratamento de inflamações, dor, febre, gripe, diarreia e por apresentar propriedades diuréticas (Milind, 2015). Estudos científicos confirmam algumas dessas atividades, como antidiarreica e anti-inflamatória (Ganguly *et al.*, 2013)

Muitas substâncias bioativas foram e têm sido descobertas graças aos conhecimentos etnofarmacológicos (Miranda *et al.*, 2003; Filho *et al.*, 2009). Em função disso pode-se concluir que a humanidade possui uma grande dívida com as espécies tropicais das Américas e com os seus povos (Simões *et al.*, 2017). A caracterização dos aspectos anatômicos e histoquímicos de *Manilkara zapota*, aliada a informações de outras áreas, contribuirá com a descrição de caracteres úteis na diagnose da espécie e a caracterização dos sítios de secreção e/ou acúmulo dos metabólitos presentes na folha, bem como identificar a presença de metabólitos e componentes antimicrobianos nos tecidos da espécie em questão.

## **2.1 Anatomia da folha e do lenho**

Através da anatomia dos órgãos vegetativos é possível determinar relações entre as funções e as diversas estruturas que compõe esses órgãos, elucidando assim os mecanismos de adaptação e alteração que permite as plantas se desenvolverem em ambientes diferenciados e resistirem às mudanças ambientais, bem como conhecer a fisiologia das espécies de plantas estudadas (Evert, 2013). A anatomia de folha e do lenho tem sido importante, auxiliando classificar e distinguir espécies, bem como fonte de informações para análises filogenéticas (Moraes *et al.*, 2012). Além disso, a anatomia destes órgãos pode fornecer informações sobre as condições ambientais do seu habitat, tais como regime hídrico, intensidade luminosa (Somavilla & Ribeiro, 2011, Campbell *et al.*, 2018; Pireda *et al.*, 2019). Além de ser de grande importância para desvendar funções de estruturas secretoras ligadas a defesa da planta (Miguel *et al.*, 2009) e sobre sua composição através da histoquímica (Santos *et al.*, 2009; Rocha *et al.*, 2020) para fornecer dados para novos bioativos para indústria farmacêutica.

Alguns trabalhos já demonstraram características anatômicas importantes da folha de *Manilkara zapota* como a presença de esclereides e laticíferos acompanhando a nervura

central (Nair & Chanda, 2008; Pinho & Santos, 2017; Moura *et al.*, 2019; Rodriguez-Garcia *et al.*, 2019). Porém, *Manilkara zapota* ainda não possui uma descrição morfoanatômica e ultraestrutural completa e existe uma carência de dados sobre a composição química, metabólitos, histolocalização e composição de seu látex (Rodriguez-Garcia *et al.*, 2019). Nesse sentido, este presente trabalho pretende avaliar a estrutura e histoquímica da folha de *Manilkara zapota* e caracterizar o lenho fornecendo informações para uma melhor diagnose da espécie.

O levantamento de dados sobre a anatomia do lenho, também pode ser instrumento fundamental para a classificação das espécies da família Sapotaceae (Armstrong, 2010). No Brasil, Sapotaceae desperta grande interesse pela importância econômica de suas madeiras, frequentemente utilizadas na construção civil, em estruturas de telhado, assoalhos e esquadrias, assim como na fabricação de dormentes, entre outras (Mainieri & Chimelo, 1989). O reconhecimento desta família, por meio de características anatômicas e relativamente simples. Entretanto, devido à homogeneidade no nível genérico, é muito difícil distinguir os diversos gêneros e espécies. Além de complexo, existem lacunas de caracterização de espécies desta família inclusive de *Manilkara zapota*. Assim, além de fornecer informações para estudos filogenéticos e taxonômicos do gênero, o presente trabalho pode auxiliar com informações sobre a qualidade da madeira e potencial energético das espécies do gênero (Svendsen, 2004). Dentre os caracteres morfológicos diagnósticos da família Sapotaceae, destaca-se a presença de laticíferos, cujo látex de espécies da América do Sul foi extensivamente utilizado para produção de goma de mascar (Pinho & Santos, 2017). De acordo com Mustard (1982), no floema secundário de *Manilkara zapota* alguns raios são compostos inteiramente de laticíferos nos ramos esses raios se dilatam e formam laticíferos secundários próximos a periderme.

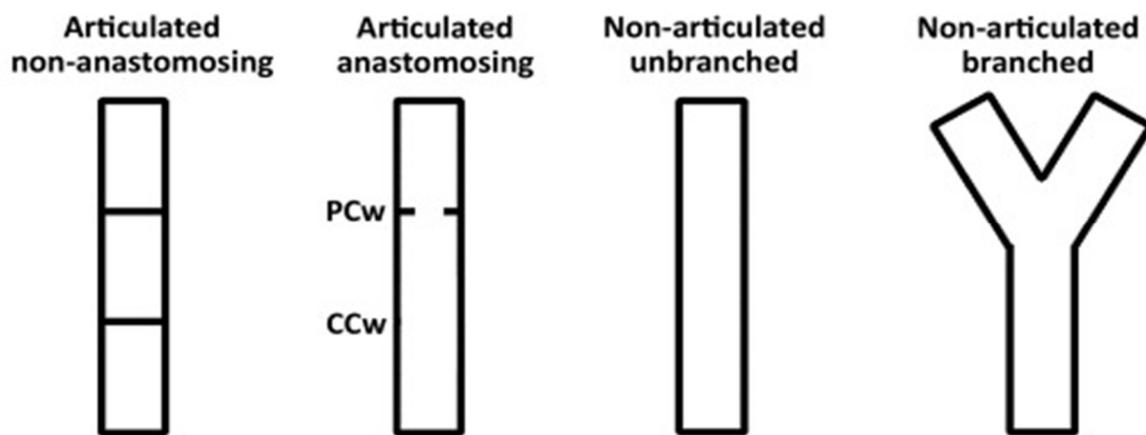
### **2.1.2 Estrutura secretora e laticífero**

Assim como a anatomia da folha e do lenho, a análise das estruturas secretoras fornece dados relevantes para a descrição anatômica da planta e sua classificação taxonômica (Mahlberg, 1993; Castro *et al.*, 1997). Através de análises destas estruturas é possível também conhecer a natureza química das substâncias secretadas e relacioná-las com seu papel mecânico ou fisiológico na planta (Fahn, 1979; Castro *et al.*, 1997; Da Cunha *et al.*, 1998). As estruturas secretoras podem ser encontradas em diferentes órgãos da planta, ou apenas em um órgão vegetal ou ainda apresentar várias estruturas em um

mesmo indivíduo (Fahn, 1979; Castro, 1997; Ascensão, 2007). Estas estruturas podem ser classificadas quanto a sua localização nos órgãos das plantas, podendo ou não secretar as mesmas substâncias (Machado & Fernandes, 2011).

As estruturas secretoras encontradas na família Sapotaceae são os tricomas, os idioblastos (cristalíferos e oleíferos, células de óleo) e os laticíferos articulados (Monteiro *et al.*, 2007). Além disso, a ocorrência de cristais solitários ou agrupados e de areia cristalífera é considerada características diagnósticas da família (Metcalfé & Chalk, 1972; Monteiro *et al.*, 2007).

Os laticíferos podem ser formados por segmentos de células fundidas formando uma rede de tubos ou uma longa e única célula, que contém látex (Fahn, 1979). De acordo com a anatomia, os laticíferos podem ser classificados em dois tipos: articulados e não articulados (Fig. 1). Os articulados, como encontrados nas Sapotaceae, são formados por uma sequência de células conectadas (Kekwick, 2001; Ramos *et al.*, 2019). Os laticíferos articulados podem ser ainda classificados como não anastomosados, apresentando cadeias de células finais com paredes intactas e laticíferos articulados anastomosados, apresentando cadeias de células conectadas lateralmente formando uma rede, cujas paredes terminais podem ser totalmente ou parcialmente dissolvidas (Fig. 1) (Ascensão, 2007; Hagel *et al.*, 2008; Ramos *et al.*, 2019).



**Figura 1:** Ilustração dos diferentes tipos de laticíferos. Presença de paredes terminais nos laticíferos articulados não anastomosados. Laticífero articulado anastomosado com parede terminal parcialmente dissolvida (PCw) e totalmente dissolvida (CCw). Laticíferos não articulados com apenas uma parede celular, não ramificado e ramificado respectivamente. Adaptado de Ramos *et al.*, (2019).

### 2.1.3 Mecanismo de defesa de plantas

As plantas constituem o mais amplo grupo de vida autotrófica sobre a Terra. Por serem ricas em material orgânico representam fonte de nutrientes para muitos organismos, tais como fungos, bactérias, vírus, nematoides, insetos, moluscos e alguns vertebrados como aves e mamíferos, inclusive o homem, que se alimentam delas e que podem gerar danos durante este processo (Castro & Fontes, 2005; Aoyama & Labinas 2012). Devido a esses danos, elas desenvolveram várias formas de defesa que podem ser classificadas como induzidas ou constitutivas (Maor & Shirasu, 2005; Reignault & Sanchole, 2005; São João & Raga, 2016; Simões *et al.*, 2017).

A defesa do tipo mecânica envolve estruturas que protege as plantas contra patógenos e herbívoros, impedindo que estes entrem ou se espalhem pela planta, conferindo ainda defesa contra variações ambientais (Menezes, 2009). Estruturas como cutícula espessa, presença de hipoderme, parede celular, cera epicuticular e tricomas, além de proteger de ataques patogênicos, dificulta a herbivoria e reduz o estresse abiótico refletindo a radiação, evitando o superaquecimento das folhas e perda de água (Aoyama & Labinas 2012; São João & Raga, (2016); Pessoa *et al.*, 2019; Pireda *et al.*, 2019).

Algumas espécies contêm cristais prismáticos e sílica nos tecidos vegetais e produzem látex, como é o caso de *Manilkara zapota*, espécie de análise desse trabalho (Monteiro *et al.*, 2007; Pinho & Santos, 2017). Estes atuam mecanicamente contra herbivoria uma vez que os cristais, grãos de sílica e a borracha do látex torna o tecido vegetal não palatável e de difícil digestão (Aoyama & Labinas 2012).

O látex quando liberado por injúria, torna-se denso e pegajoso devido a presença de borracha e resinas, produzindo uma ação colante, imobilizando insetos fitófagos e prendendo suas mandíbulas, evitando também a entrada de microrganismos na área exposta, no látex também há presença compostos que atuam na defesa química (Konno, 2011)

A defesa constitutiva química das plantas é realizada pela presença de toxinas que podem fazer parte da constituição química de algumas estruturas ou ainda estocadas em estruturas como laticíferos, ductos de resina, tricomas glandulares e liberadas pós ataques por herbívoros, proliferação de patógenos ou por sensibilidade a movimentações sob os tecidos da planta (Menezes, 2009). Alguns desses compostos, oferecem proteção contra herbivoria, dificultando a digestão ou matando o herbívoro, além de evitar ou reduzir a proliferação de patógenos, também permitindo aos vegetais enfrentar condições de estresse

abiótico exercidas pelo meio ambiente (Pireda *et al.*, 2019). Entre os compostos que constituem a defesa química, estão os metabolitos secundários, como terpenos, saponinas, cardenolídeos, cianeto, morfina, alcaloides, compostos fenólicos, lipídeos, mucilagem. Quitinases e peptídeos antimicrobianos (AMPs) como tioninas, defensinas, inibidores de protease e proteínas transportadoras de lipídeos (LTP) também fazem parte dessa defesa (Menezes, 2009; Fayek *et al.*, 2012). As saponinas são conhecidas por permeabilizar as membranas celulares, já os cardenolídeos inibem a atividade da bomba de Na/K-ATPase e o cianeto é liberado na decomposição de glicosídeos cianogênicos, estocados nos tecidos de algumas espécies vegetais, inibindo a respiração celular de predadores (Menezes, 2009; de Paula Pedroza *et al.*, 2015). A morfina encontrada na *Papaver somniferum*, atua no sistema nervoso central de herbívoros funcionando como defesa. Já as defensinas de plantas, um conhecido AMP, pode causar a permeabilização de membranas, agindo através da interação com lipídeos específicos localizados na membrana do patógeno. Além de agir diretamente sobre o patógeno as defensinas também podem estimular o sistema imune da planta (Menezes, 2009).

Alguns desses compostos podem ser prejudiciais à própria planta, por isso algumas dessas substâncias de defesa são estocadas na forma inativa, ou em compartimentos reservados, sendo liberado frente ao ataque (Menezes, 2009). Deste modo a defesa constitutiva acarreta gastos, já que há produção contínua de compostos independentemente do ataque por patógenos, e ainda a planta necessita investir em mecanismos para se proteger de seus próprios compostos tóxicos, como estratégia para economia de recursos e energia, os vegetais investiram na defesa induzida (Menezes, 2009).

Na defesa induzida há o reconhecimento de eliciadores produzidos pelos agentes bióticos. Estes são moléculas ou partes do agente invasor (herbívoros ou patógenos) que funcionam como sinalizadores, produzindo alterações fenotípicas no vegetal através da transdução de sinal culminando na ativação de genes específicos, resultando em produtos que irão alterar as vias metabólicas levando a uma resposta de hipersensibilidade (Castro & Fontes, 2005; Menezes, 2009).

Uma das primeiras resposta fisiológicas é a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) sinalizando a defesa, alterações de pH intracelular que levam a um rápido fluxo de íons, liberação o óxido nítrico (NO), fortalecimento da parede celular na região da infecção, síntese de produtos antimicrobianos como fitoalexinas, e proteínas relacionadas à patogênese (PRs) principalmente as peroxidases, quitinases,  $\beta$ -1,3-glucanases, lectinas,

inibidores de proteinase, proteínas inativadoras de ribossomos (PIR) e vários peptídeos antimicrobianos (Cohn *et al.*, 2001; Carlini & Grossi-de-Sá, 2002; Fernando *et al.*, 2009).

A infecção previa por patógenos e a resposta a hipersensibilidade pode resultar em uma resistência sistêmica no vegetal (SAR), que protegerá a planta contra futuros ataques (Menezes, 2009). Essa resistência induz um aumento na produção de algumas proteínas (PRs), NO, ROS, peróxido de hidrogênio, flavonoides, saponinas, melaninas, taninos, alcaloides e muitos outros compostos (Cohn *et al.*, 2001; Menezes, 2009).

A resposta de sensibilidade a eliciadores pode levar também a formação de barreiras mecânicas que atuarão na defesa (Castro & Fontes 2005; Menezes, 2009). Uma das respostas mecânica induzidas pela infecção fúngica local é o reforço da parede celular pela deposição de lignina, tornando-a mais espessa impedindo a invasão do patógeno. Como resposta invasão de patógenos nos feixes vasculares, pode ocorrer oclusão do xilema ou floema, estas oclusões podem ser derivadas do acúmulo de géis, gomas ou formação de tiloses diminuindo a dispersão de fungos e esporos (Menezes, 2009).

Outra rota de defesa que atua contra estresse biótico e abiótico, desencadeando resposta ao ataque de herbívoros e outras condições estressantes, são os hormônios vegetais (dos Santos Soares & Machado, 2007)

Os hormônios vegetais como os jasmonatos funcionam como molécula sinalizadora ativando a transcrição de genes de defesa culminando na produção de compostos tóxicos e proteínas como inibidores de proteases (dos Santos Soares & Machado, 2007; Wasternack *et al.*, 2007). Alguns hormônios também estão envolvidos na sinalização frente a estresses abióticos (de Magalhães Júnior, 2010).

Dentre as situações de estresse abiótico enfrentada pelas plantas, está a disponibilidade de água e luz, temperatura, salinidade, frio e geada causando danos severos. Como resposta as plantas desenvolveram uma gama de mecanismos que permite uma resposta eficiente assegurando sua sobrevivência (Nicot *et al.*, 2005; de Magalhães Júnior, 2010). Um desses mecanismos é a atuação do hormônio ácido abscísico relacionado na sinalização, ativação e alteração da expressão genica frente aos estresses abióticos, porém outros genes podem ser regulados por outros fatores (de Magalhães Júnior, 2010). Desse modo, as plantas têm desenvolvido uma variedade de defesas contra choques térmicos, seca, salinidade e frio para as quais elas respondem com mudanças qualitativas e quantitativas com relação a transcrição de genes e proteínas (Nicot *et al.*, 2005; de Magalhães Júnior, 2010). Dentre as proteínas produzidas pela resposta genica estão as

aquaporinas, enzimas envolvidas na biossíntese de várias substâncias de proteção osmótica, proteínas protetoras de macromoléculas, chaperonas, proteases e enzimas que atuam na desintoxicação do citoplasma (Nicot *et al.*, 2005; de Magalhães Júnior, 2010).

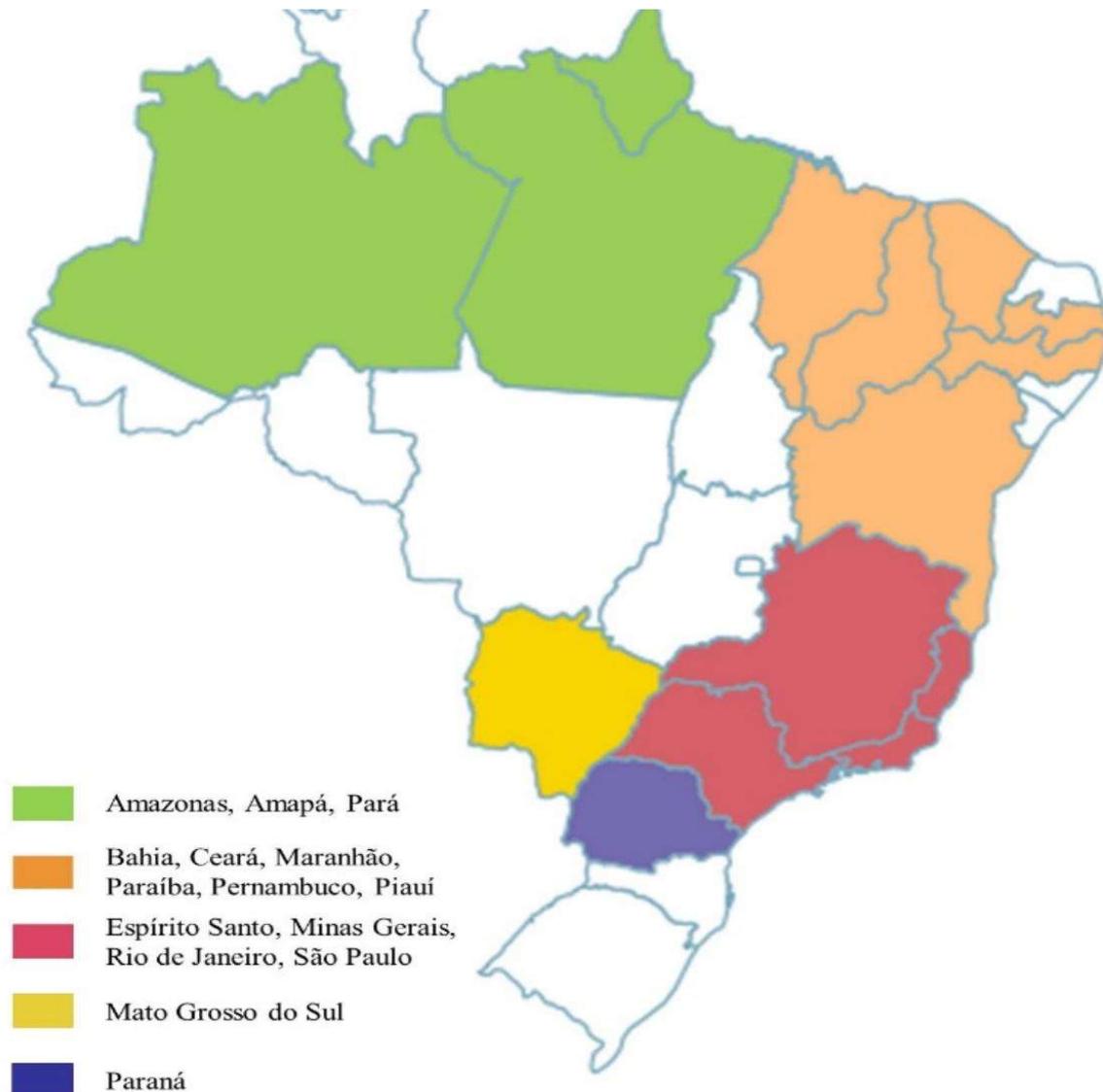
Como visto até agora as plantas dispõe de vários mecanismos e moléculas que trabalham de forma articulada frente aos estresses bióticos e abióticos, nota-se também um efeito sinérgico entre alguns produtos antimicrobianos sintetizados pelas plantas que aparentemente pode ser efetivo no sucesso da ação antimicrobiana (Stermitz *et al.*, 2000). Assim, toxicidade de alguns compostos pode ser potencialmente maior numa ação conjunta do que na ação individual destes (Stermitz *et al.*, 2000). Alguns trabalhos por exemplo demonstram a ação sinérgica entre o ácido salicílico, NO, ROS na morte celular durante a defesa antimicrobiana (Cohn *et al.*, 2001). As próprias proteínas PRs também agem em sinergismo e existem relatos de fitoalexinas que foram nove vezes mais tóxicas agindo com um outro composto do que quando testadas isoladamente (Cohn *et al.*, 2001; Hummelbrunner & Isman, 2001). Os peptídeos antimicrobianos (proteínas de defesa) também agem em sinergismo, ensaios *in vitro* têm demonstrado que snakin-1, um peptídeo constitutivo atua sinergisticamente com a defensina de batata PTH1 contra *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus* (Segura *et al.*, 1999). Estes são um exemplo evidente de sinergia entre os componentes de defesa de uma planta (Stermitz *et al.*, 2000). As experiências adquiridas nos trabalhos de Stermitz e colaboradores (2000) deixam bem claro que dois componentes de defesa de plantas medicinais podem atuar sinergicamente aumentando a atividade antimicrobiana de outro composto sobre patógenos. A clara importância da sinergia na ação nos mecanismos de defesa das plantas pode explicar muitas das vezes as tentativas fracassadas de isolar um único composto ativo de plantas medicinais, que demonstre atividade eficiente contra patógenos (Stermitz *et al.*, 2000).

#### **2.1.4. Família Sapotaceae e a espécie *Manilkara zapota***

A família Sapotaceae é representada por plantas lenhosas distribuídas em região pantropical com cerca de 1.250 espécies distribuídas em 58 gêneros (Carneiro *et al.*, 2013). No Brasil são registrados 13 gêneros e 231 espécies distribuídas nos domínios fitogeográficos: Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica (Mônico, 2017; Almeida Júnior, 2015). Esta família abrange espécies arbóreas e arbustivas, com folhas simples,

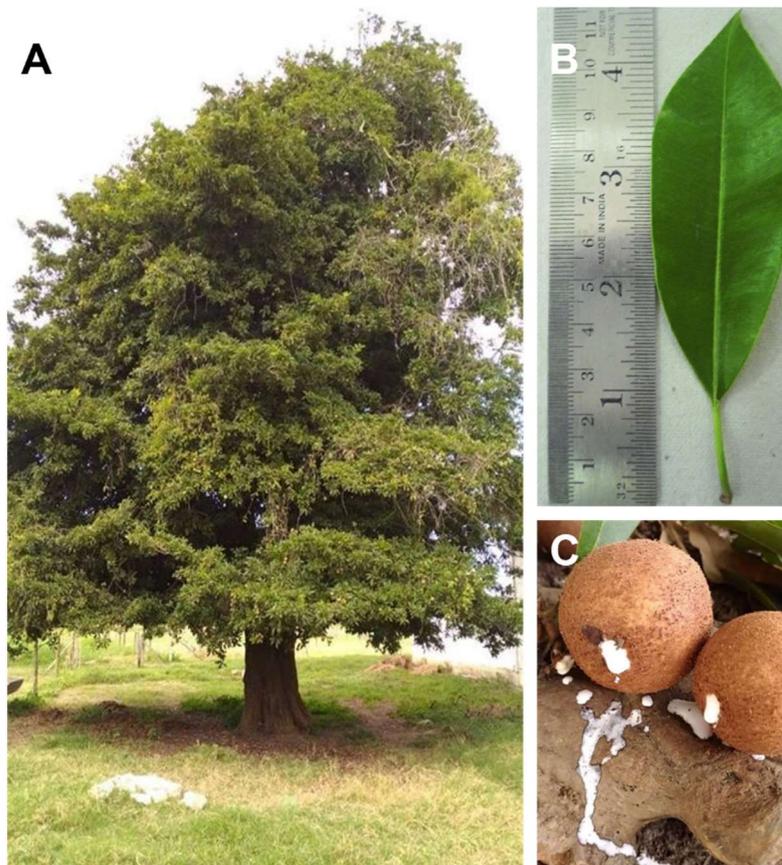
pinada, laticíferos bem desenvolvidos e o fruto do tipo baga (Fabris & Peixoto, 2013; Moura *et al.*, 2019). Sapotaceae possui importância comercial devido às propriedades de sua madeira, látex e na produção de fármacos (Marqui, 2007). Entre os gêneros utilizados na medicina popular estão: *Pouteria*, *Mimusops*, *Manilkara*, *Gambeya*, *Argania*, *Ormosia*, *Sideroxylum*, *Calocarpum*, *Butyrospermum*, *Madhuka*, *Planchonella*, *Chrysophyllum* e *Manilkara* (Marqui, 2007; Alves-Araújo & Alves, 2010; Souza & Lorenzi, 2012).

A espécie *Manilkara zapota* conhecida popularmente como sapotizeiro é uma espécie tropical de grande porte que pode atingir até 45 metros de altura em meio à mata e 10 metros em áreas abertas, apresenta tronco curto de cor cinza-claro a marrom-escuro e diâmetro variando de 1,25 a 3,50 metros, sua copa é densa formada por folhas simples, alternadas, coriáceas, inteiras, elíptico-ovaladas, verde-escura (Heaton, 1997). A espécie é nativa da costa de Yucatán no sul do México e da América Central, porém foi disseminado pelas regiões tropicais da América do Sul, América do Norte e Ásia (Rodriguez-Garcia *et al.*, 2019) No Brasil, teve uma excelente adaptação sendo encontrada na floresta Amazônica, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica, compondo a Floresta de Terra Firme, Floresta Estacional Perenifólia, Floresta Estacional Semidecidual e Floresta Ombrófila (Fig. 2) (Silva Júnior *et al.*, 2014).



**Figura 2:** Distribuição da espécie *Manilkara zapota* no Brasil. Norte (Amazonas, Amapá, Pará); Nordeste (Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí); Centro-Oeste (Mato Grosso do Sul); Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo); Sul (Paraná); Domínios Fitogeográficos: Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica. Fonte: Almeida Júnior, 2015.

Muito comercializado, o fruto do saptizeiro é do tipo baga é apreciado devido à polpa suculenta e gelatinosa de sabor doce, quando verde o fruto produz muito látex (Fig. 3) (Silva Junior *et al.*, 2014). Além da madeira de boa qualidade e frutos, a espécie *Manilkara zapota* também é conhecida pelo uso de seu látex branco na produção de goma de mascar e na medicina alternativa devido a seus compostos bioativos (Pinho & Santos, 2017; Rodriguez-Garcia *et al.*, 2019).



**Figura 3:** Espécie *Manilkara zapota* no ambiente de coleta.

Árvore (A); folha (B); látex e fruto (C), da espécie *Manilkara zapota*.

Fonte: Acervo pessoal; Nagari *et al.* 2012.

Seus extratos são utilizados na medicina Maia contra disenteria, distúrbios circulatórios e colesterol alto (Rodriguez-Garcia *et al.*, 2019). Na literatura há relatos de vários órgãos vegetativos da planta sendo usadas na medicina alternativas contra inflamações, dores, febres, tosses, diarreia, e doenças renais (Moura *et al.*, 2019).

De acordo com Rodriguez-Garcia *et al.* (2019), *M. zapota* apresentou atividade antioxidante que pode estar relacionada à presença de polifenóis e flavonoides. O extrato foliar aquoso dessa espécie também inibiu bactérias patogênicas humanas Gram positivas e negativas como *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*, apresentando também atividade antihiperlipidêmica. Além disso, o extrato metanoico de *M. zapota* apresentou atividade antimicrobiana contra diferentes cepas patogênicas, além de *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* (Nair & Chanda, 2008). Os fungos fitopatogênicos *Colletotrichum capsici* e *Mycosphaerella fijiensis* também foram inibidos pelos extratos de *M. zapota* (Rodriguez-Garcia *et al.*, 2019). Estes efeitos podem estar atribuídos à presença de compostos

fenólicos, terpenos, saponinas e lipídeos que compõe a defesa da planta (Fayek *et al.*, 2012).

### **3. Objetivos**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Caracterizar a anatomia da folha e do lenho de *Manilkara zapota*, assim como verificar a atividade antifúngica dos extratos foliares com espécies do gênero *Candida*.

#### **3.1.2 Objetivos específicos**

- Caracterizar a anatomia da folha e do lenho de *Manilkara zapota*
- Analisar as estruturas secretoras da folha e do lenho de *Manilkara zapota*.
- Caracterizar a composição química da folha e de estruturas secretoras através da histoquímica;
- Caracterizar a massa molecular peptídeos e ou proteínas com atividade antimicrobiana extraídos a partir do extrato foliar de *Manilkara.zapota*;
- Avaliar o efeito antimicrobiano do extrato foliar de *Manilkara zapota* sobre as leveduras *Candida albicans* e *Candida tropicalis*;
- Avaliar o efeito da fração proteica do extrato foliar de *Manilkara zapota* sobre a permeabilização de membranas.

### **4. Material e Métodos**

#### **4.1 Material Biológico**

##### **4.1.2 Coleta do material botânico**

O indivíduo selecionado (Nº de registro do Herbario 5592) se encontra no campus da Universidade Estadual Do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, nas mediações do Hospital Veterinário (21°45'38.48'S e 41°17'.07.28'O), em uma área de campo aberto, na cidade de Campos dos Goytacases, RJ , Brasil. O campus possui árvores esparsadas e é utilizado como área de pastagem, com temperatura média anual variando entre 20.6° e 26.7°C. Para análises morfoanatomicas, foram coletadas amostras de cinco folhas completamente expandida e cinco amostras do lenho a 1,30 metro do peito ( Fig.4).



**Figura 4:** Indivíduo de *Manilkara zapota* (A). Retirada do corpo de prova (B). Corpo de prova (C).

#### 4.1.3 Microrganismos

As espécies de leveduras *Candida albicans* (CE022) e *C. tropicalis* (CE017) e foram cultivados e conservados no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos (LFBM) do Centro de Biociências e Biotecnologia (CBB) da UENF, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil.

As leveduras foram mantidas em ágar Sabouraud (1% de peptona, 2% de glicose e 1,7% de agár-agár) (Merck) e conservadas no LFBM, do CBB da UENF, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil.

#### 4.1.4 Dissociação epidérmica

Para o estudo da epiderme, fragmentos da lâmina foliar foram dissociados pelo método de Franklin, modificado por Berlyn *et al.*, (1976). Os fragmentos foram emersos em solução de ácido acético glacial e peróxido de hidrogênio a 20% v/v, na proporção de 1:1 ml. Em seguida, o material foi levado à estufa a 60 °C por 24h. Após as 24 horas, os cortes foram dissociados com auxílio de pincel e palitos, corados com Safranina, lavadas com água destilada, montados em lâminas com glicerina a 50% v/v. As lâminas semipermanentes foram analisadas em microscópio óptico de campo claro (Axioplan, ZEISS, EUA), com captura de imagem por câmera (Power Shot A640, CANON, EUA) acoplada. As imagens foram utilizadas para a descrição qualitativa.

#### 4.1.5 Testes Histoquímicos

Parte do material botânico coletado foi reservado para cortes a fresco obtidos à mão livre, sendo submetidos a várias técnicas de coloração para análises das substâncias químicas presente no material. Para o reconhecimento de algumas substâncias de interesse foram utilizadas as seguintes técnicas de coloração:

**1) Compostos pécticos e mucopolissacarídeos** – Os cortes foram submetidos a uma solução aquosa de vermelho de rutênio 0,02% por 8 minutos (Chamberleim, 1932, adaptado). A presença destes compostos foi indicada pela coloração vermelha.

**2) Lipídios** – Foram feitos testes com o Sudan III e IV 0,03%, onde o material foi submetido aos corantes por 5 minutos (Pearse, 1980, adaptado). A detecção acontece por um processo físico em que ocorre partilha entre os lipídios e o solvente do lisocromo (etanol 70%), tendo as moléculas do lisocromo maior afinidade para os lipídios do que para o solvente, revelando assim a marcação de cor laranja e vermelha respectivamente.

**3) Alcaloides** – Os cortes foram submetidos ao reagente de Dragendorff de 5 a 10 minutos e em seguida lavados em nitrito de sódio a 5% e logo após em água. Os alcaloides coram de castanho-avermelhado (Svendsen e Verpoorte, 1983).

**4) Fenóis** – Os cortes também foram submetidos ao reagente Hoepfner-Vorsatz recém preparado (para cada 50 ml de solução deve-se adicionar 1ml nitrito de sódio à 10%, 10 ml a de ureia 20%, 10 ml de ácido acético a 10% e após 3 minutos 20 ml de hidróxido de sódio). Nessa reação de oxidação, derivados nitrosos são formados ao se adicionar uma base evidenciando os compostos fenólicos que adquirem uma cor amarelada à marrom (Reeve 1951).

**5) Terpenoides** – Os cortes também foram submetidos ao reagente de NADI (recém-preparado), e mantidos durante uma hora no escuro (David & Carde, 1964). O reagente de Nadi é uma mistura de dois componentes incolores, o  $\alpha$ -naftol e o cloridrato de dimetilparafileno diamina, que origina por oxidação o azul de indofenol, composto fortemente lipossolúvel que altera a cor por variação do pH, permitindo uma coloração diferencial azulada para terpenoides.

**6) Amido** – Os cortes serão submetidos a solução de Lugol (solução de iodo a 0,5% adicionada a Iodeto de Potássio a 1%) durante 5 a 10 min (Jensen, 1962). Esse sal iônico provoca a ruptura das ligações de hidrogênio e a consequente separação das várias unidades de glucose que constituem a macromolécula de amido, permitindo que o iodo se acumule na molécula de amido.

**7) Proteínas** – Os cortes foram submetidos ao azul Brillhante de Coomassie 0,25% (Fischer, 1968, adaptado). Esse corante existe sob duas formas (vermelha e azul). Por ligação do corante à proteína na forma vermelha é convertida na azul, provocando um desvio na banda de absorção máxima de 465 para 595 nm.

**8) Schiff (PAS)** – Os cortes foram submetidos ao ácido periódico que segundo Paulete & Beçak (1976) quando atua nos polissacarídeos, oxida-os, dando lugar a formação de aldeídos, os quais podem ser detectados pelo reativo de Schiff. A tabela 1 apresenta os reagentes com respectivos compostos detectados por eles .

As lâminas semipermanentes foram montadas com glicerina e lamínula e analisadas em microscópio óptico de campo claro (Axioplan, ZEISS, EUA), com captura de imagem por câmera (Power Shot A640, CANON, EUA) acoplada.

Reagentes	Substâncias identificadas	Tempo da reação	Coloração
Vermelho de Rutênio (Chamberleim 1932)	Pectina	10 min	Rosa
Sudan III e IV (Pearse 1980, adaptado)	Lipídeos	5min	Laranja e vermelho
Dragendorff (Svendsen & Verpoorte 1983).	Alcaloides	10 min	Castanho-avermelhado
Hoephner-Vorsatz (Reeve 1951)	Compostos fenólicos	3 min	Marrom claro
NADI (David & Carde 1964)	Terpenos	10 min	Azul
Reagente Schiff (Maia 1979).	Ácido periódico	10 min	Amarelo
Lugol (Jensen, 1962)	Amido	10 min	Roxo
Azul de Coomassie (Fischer, 1968)	Proteínas	10 min	Azul

**Tabela 1:** Relação de reagentes e moléculas de interesse. Fonte: Adaptado de Manual Básico de Métodos em Morfologia Vegetal (Kraus & Arduin, 1997).

#### 4.1.6 Preparo da amostra da folha para microscopia óptica.

Fragmentos da lâmina foliar da região mediana, borda, pecíolo, ápice e base das folhas, foram fixados em solução fixadora de Karnovsky (1965), adaptado por Da Cunha *et al.* (1988), contendo formaldeído 4% v/v, glutaraldeído 2,5% v/v e tampão cacodilato de sódio 0,05 M em pH 7,2. Posteriormente, foram lavados neste mesmo tampão e pós-fixados em uma solução aquosa de tetróxido de Ósmio 1%, no mesmo tampão por 2h. Após nova lavagem no mesmo tampão, os fragmentos foram desidratados em uma série crescente de acetona nas porcentagens 30% v/v, 40% v/v, 50% v/v, 70% v/v, 90% v/v e três vezes em 100% v/v s, em seguida infiltrados com resina epóxi (Epon®) e por fim, as amostras embebidas em resina pura foram colocadas em formas e levadas a estufa a 60 °C por 48h para a polimerização e obtenção de blocos. Em um ultramicrotomo (Reicheit Ultracut S) parte das amostras foram retirados cortes semifinos entre 0,60 e 0,70 µm de espessura com o auxílio de faca de diamante. Essas secções foram coradas com azul de Toluidina 1% por 1 min, seladas com Entellan® (Merck). As lâminas semipermanentes foram analisadas em microscópio óptico de campo claro e submetidas a técnica de luz polarizada para evidenciar

a presença de cristais (Axioplan, ZEISS, EUA), com captura de imagem por câmera (Power Shot A640, CANON, EUA) acoplada.

#### **4.1.7 Análise da micromorfologia foliar**

Parte do material foi submetido à fervura em clorofórmio para retirada de cera epicuticular. Para análises de micromorfologia, após as etapas de fixação e desidratação, as amostras foram submetidas à secagem em ponto crítico de CO<sub>2</sub> líquido, com o auxílio do aparelho Bal-Tec Critical Point Dryer CPD 030 (Baltec, Switzerland). Em seguida, os fragmentos secos foram aderidos com fita adesiva de carbono em suportes próprios e cobertos com uma fina camada de ouro de 20 nm (Bal-Tec Sputer Coater SCD 050, Baltec, Switzerland). As imagens foram obtidas no microscópio eletrônico de varredura (EVO 40, ZEISS, Germany) a uma voltagem de 15 KV.

#### **4.1.6 Processamento do Lenho**

As amostras do lenho foram submetidas inicialmente por um processo de químico com solução amolecedora composta de água destilada, etanol 96% e detergente neutro. Posteriormente ao processo de amolecimento, o material foi seccionado em um micrótomo de deslize (SM2010 R, LEICA, Alemanha) nos planos transversal e longitudinal radial e tangencial, obtendo-se cortes a uma espessura média de 15 µm. Em seguida, os cortes passam pelos seguintes processamentos: clarificação com uso de hipoclorito de sódio a 50% e água acidulada 0,1%; desidratação em série etílica ascendente por 40 minutos (etanol 10% a etanol 100%); coloração com azul de Astra e safranina hidroalcoólica seguido por imersão em xilol P.A. As lâminas permanentes foram confeccionadas com resina sintética Entellan® e depositadas no acervo da xiloteca (HUENFw).

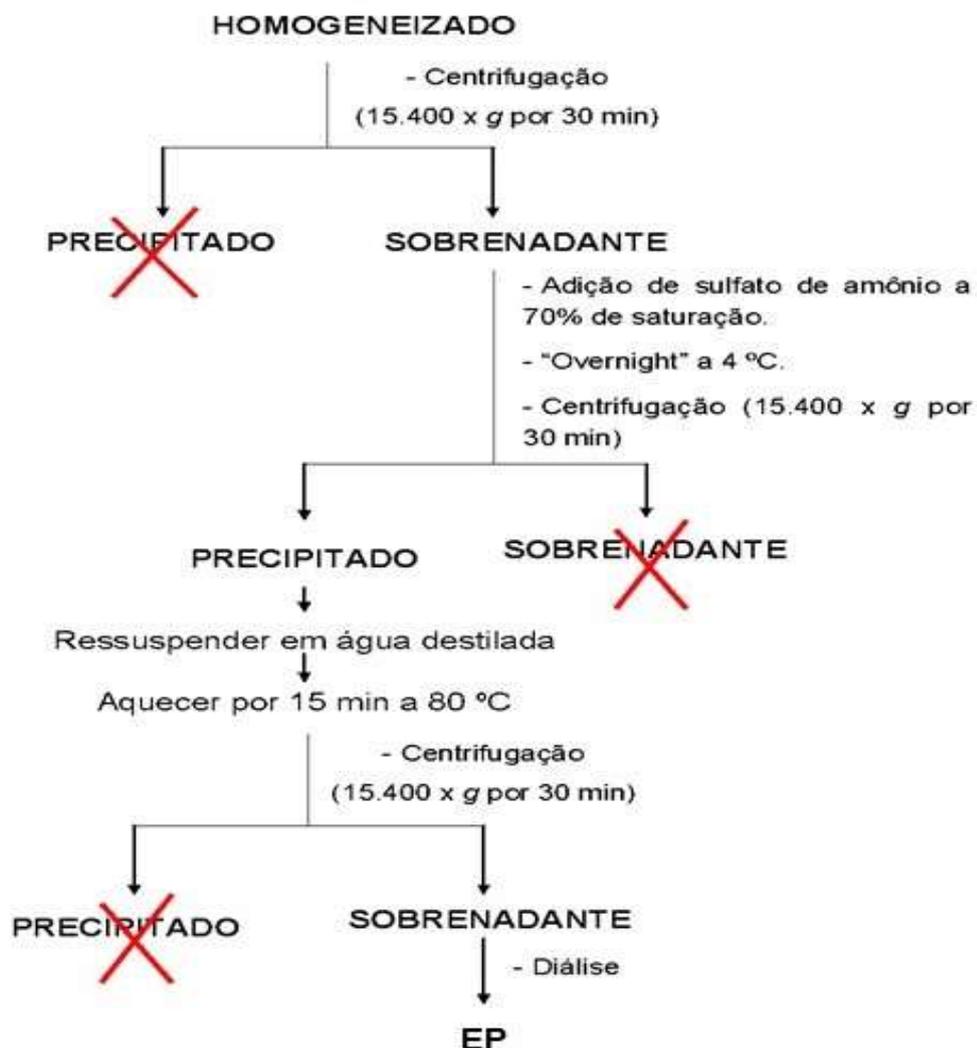
Para as análises quantitativas foram confeccionadas 15 lâminas da espécie selecionada. Todas as descrições, contagens e mensurações celulares do lenho obedecerão às normas do IAWA. As lâminas semipermanentes e permanentes foram analisadas em microscópio óptico de campo claro (Axionplan, ZEISS, EUA), com captura de imagem por câmera (Power Shot A640, CANON, EUA) acoplada ao microscópio. As imagens foram utilizadas para as descrições qualitativas e análise quantitativa, efetuadas com o software Image-Pro Plus.

Para análise dos atributos morfofuncionais do lenho foram mensurados a frequência, comprimento, diâmetro, área do círculo e a espessura da parede dos elementos de vaso, o tamanho das pontoações intervasculares e raiovasculares; o comprimento, diâmetro, lúmen,

a espessura da parede e as pontuações das fibras, e a frequência, comprimento e largura dos raios. Foram realizadas 25 medições para cada parâmetro, para identificar os caracteres anatômicos do lenho.

#### **4.1.9 Extração proteica**

Oitenta gramas de folhas de *M. zapota*, foram maceradas com o auxílio de graal, pistilo e nitrogênio líquido até a obtenção de uma farinha de fina granulação. Após a obtenção da farinha, foi feita a extração das proteínas segundo metodologia descrita por Taveira *et al.* (2014) com modificações. Inicialmente as proteínas foram extraídas em tampão fosfato ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10 mM;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  15 mM; KCl 0,1 M; EDTA 1,5% e pH 5,4) na proporção 1:5 (farinha: tampão) por três horas sob agitação constante a 4° C. O homogeneizado foi submetido a uma centrifugação a 15.400 x g por 30 min a 4° C. O precipitado foi descartado e ao sobrenadante adicionado sulfato de amônio a 70% de saturação. O material obtido foi mantido por 16h a 4°C. Posteriormente foi centrifugado novamente a 15.400 x g por 30 min a 4° C, o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspenso separadamente em água destilada e aquecido a 80°C por 15 min. Após aquecimento, foi submetido a uma nova centrifugação a 15.400 x g por 30 min a 4° C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante dialisado contra água destilada, liofilizado e denominado extrato proteico (EP) (Esquema 1).



**Esquema 1:** Extração com sulfato de amônio do homogeneizado obtido a partir da farinha das folhas de *Manilkara zapota* (Taveira *et al*, 2014).

#### 4.2 Eletroforese em gel de tricina sob condições desnaturantes

A eletroforese em gel de tricina foi feita segundo método de Schagger e Von Jagow (1987). Foram usadas placas de vidro de 8 x 10 cm e de 7 x 10 cm e espaçadores de 0,75 mm. O EB obtido após a extração de folhas de *M. zapota* foi concentrado por liofilização, ressuspensão em tampão de amostra (Tris 0,125 M; SDS 2,5%; azul de bromofenol 0,25%; β- mercaptoetanol 5% e sacarose 15%), aquecidas por 5 min a 100 °C e centrifugadas a 16.000 x g por 2 min. Após este procedimento, 20g do EP foi aplicado ao gel de concentração. A eletroforese foi feita a uma voltagem constante de 22 V por um período de

aproximadamente 16 h. Foram usados os seguintes marcadores de massa molecular: Triosefosfato isomerase do músculo coelho (26.600 Da), Mioglobina de coração de cavalo (17.00 Da),  $\alpha$ -lactalbumina de leite bovino (14.200 Da), Aprotinina do pulmão bovino (6.500 Da), Cadeia B de insulina bovina, oxidada (3.496 Da), Bradicinina (1.060 Da).

As determinações quantitativas de proteínas foram feitas através do método do ácido bicinconínico, descrito por Smith *et al.* (1985), com modificações. A albumina sérica bovina foi utilizada como proteína padrão.

#### **4.2.1 Coloração e descoloração do gel**

Após o término da corrida, o gel foi cuidadosamente retirado das placas de vidro e colocado numa solução corante (*Coomassie Blue R* 0,05%; ácido acético 70% e metanol 40%). Depois de corado, o gel foi transferido para uma solução descorante (metanol 40% e ácido acético 7%) até a visualização das bandas de proteína.

#### **4.2.2 Análise da Inibição do Crescimento das Células de Leveduras**

Alíquotas das espécies de leveduras *C. albicans* e *C. tropicalis* foram retiradas de uma placa de Petri que possuía colônias crescidas e colocadas em novas placas, contendo ágar Sabouraud, fazendo-se estriações sobre o meio para a obtenção de um crescimento celular homogêneo. Esta nova placa foi então deixada na estufa a 30 °C por 24 h e em seguida usada para a obtenção das células utilizadas no ensaio. Com o auxílio de uma alça de sementeira, uma alíquota celular foi retirada e adicionada à 10 mL de meio líquido (caldo Sabouraud, 1% de peptona, 2% de glicose) (Merck) para que se pudesse fazer a quantificação das mesmas numa câmara de Neubauer (Optik Labor), com auxílio de um microscópio óptico (Axioplan.A2, Zeiss).

Inicialmente, as células das leveduras *C. albicans* e *C. tropicalis* ( $1 \times 10^4$  cel.mL<sup>-1</sup>) foram incubadas em caldo Sabouraud contendo 100, 200, 300  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> do Extrato proteico (EP) de folhas de *Manilkara zapota*, tendo sido o volume final de ensaio ajustado para 200  $\mu$ L. O ensaio foi realizado em placas de cultura de células (96 poços) (Nunc) a 30 °C, por um período de 24 h. A estimativa do crescimento celular foi determinado pela densidade óptica, no tempo final de 24 h, em um leitor de microplacas, num comprimento de onda de 620 nm. Células de controle foram cultivadas na ausência do extrato proteico. Todo o procedimento foi realizado sob condições de assepsia, em capela de fluxo laminar, segundo método adaptado de Broekaert *et al.* (1990). Os experimentos foram realizados em triplicata.

### 4.2.3 Permeabilização de Membranas de Leveduras

As células das leveduras *C. albicans* e *C. tropicalis* ( $1 \times 10^4$  cel.mL<sup>-1</sup>) foram incubadas em caldo Sabouraud contendo 300 µg.mL<sup>-1</sup> do EP, tendo sido o volume final de ensaio ajustado para 200 µL. O ensaio foi realizado em placas de cultura de células (96 poços) a 30 °C, por um período de 24 h.

A permeabilização da membrana das células das leveduras tratadas com o EP foi avaliada através da utilização do corante fluorescente Sytox green, segundo metodologia descrita por Thevissen *et al.* (1999). Imediatamente após as 24 h de incubação com o EP, alíquotas de 96 µL foram incubadas, ao abrigo da luz e sob agitação constante de 500 rpm por 15 min, com o corante fluorescente Sytox green a uma concentração final de 0,2 µM, de acordo com instruções fornecidas pelo fabricante. As células de controle foram incubadas apenas com o corante Sytox green, nas mesmas condições. Em seguida, as células foram analisadas em microscópio óptico (Axionplan, ZEISS, Germany), acoplado a uma câmera Moticam Pro 282B, Hong Kong e as imagens foram analisadas pelo software Axiovision, versão 4.0 (Zeiss). O microscópio estava equipado com um conjunto de filtros fluorescentes para detecção da fluorescência (excitação com comprimento de onda entre 450 - 490 nm e emissão de 500 nm). Os resultados representam experimentos em triplicata.

### 4.2.5 Análises Estatística

Dados do ensaio de inibição do crescimento de leveduras, foram avaliados usando ANOVA. As diferenças médias foram consideradas significativas quando  $P < 0.05$ . Todas as análises estatísticas foram realizadas com software GraphPad Prism (versão 6.0 para Windows).

## 5. Resultados

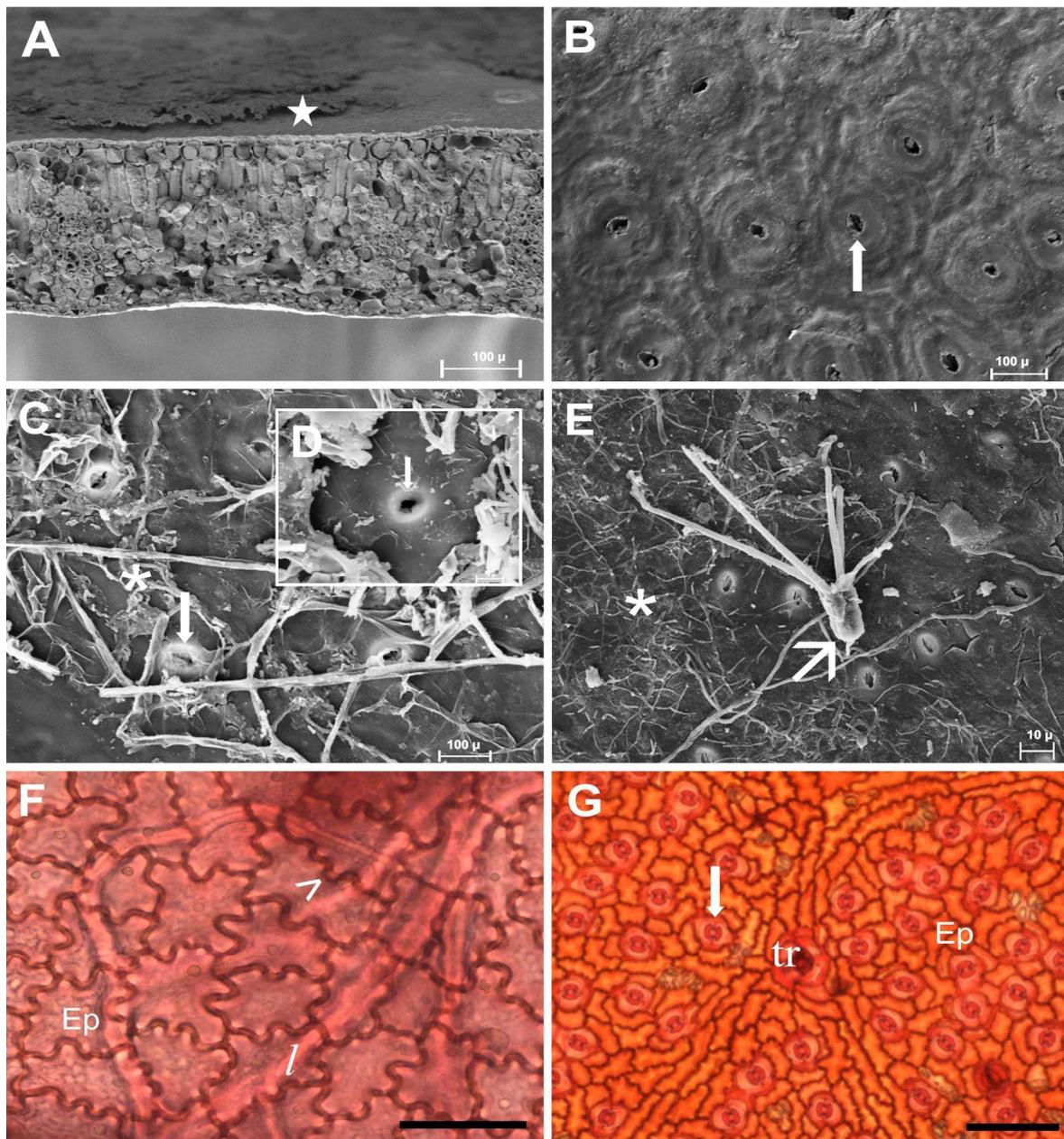
As folhas de *M. zapota.*, coletadas nos entornos do Hospital Veterinário do Campus da Universidade Darcy Ribeiro (21°45'38.48'S e 41°17'.07.28'O) em uma área de campo aberto, Campos dos Goytacazes – RJ, foram avaliadas a partir de técnicas usuais para microscopia óptica e eletrônica de varredura. As técnicas utilizadas possibilitaram analisar os atributos anatômicos da lâmina foliar, tais como: presença/ausência de estruturas secretoras internas ou externas, relevo cuticular da superfície epidérmica, arquitetura da parede periclinal externa, traçado da parede anticlinal epidérmica, presença/ausência dos estômatos, localização e tipo de estômatos, organização do mesofilo, presença/ausência e

tipo de tricomas, classificação e localização de laticíferos no mesofilo e tipo de sistema vascular.

Para análise dos atributos morfofuncionais do lenho foi utilizada microscopia óptica de campo claro foram mensurados a frequência, comprimento, diâmetro, área do círculo e a espessura da parede dos elementos de vaso, o tamanho das pontoações intervasculares e raiovasculares; o comprimento, diâmetro, lúmen, a espessura da parede e as pontoações das fibras, e a frequência, comprimento e largura dos raios. Todas as descrições, contagens e mensurações celulares do lenho obedeceram às normas do IAWA.

### **5.1. Anatomia da folha e lenho**

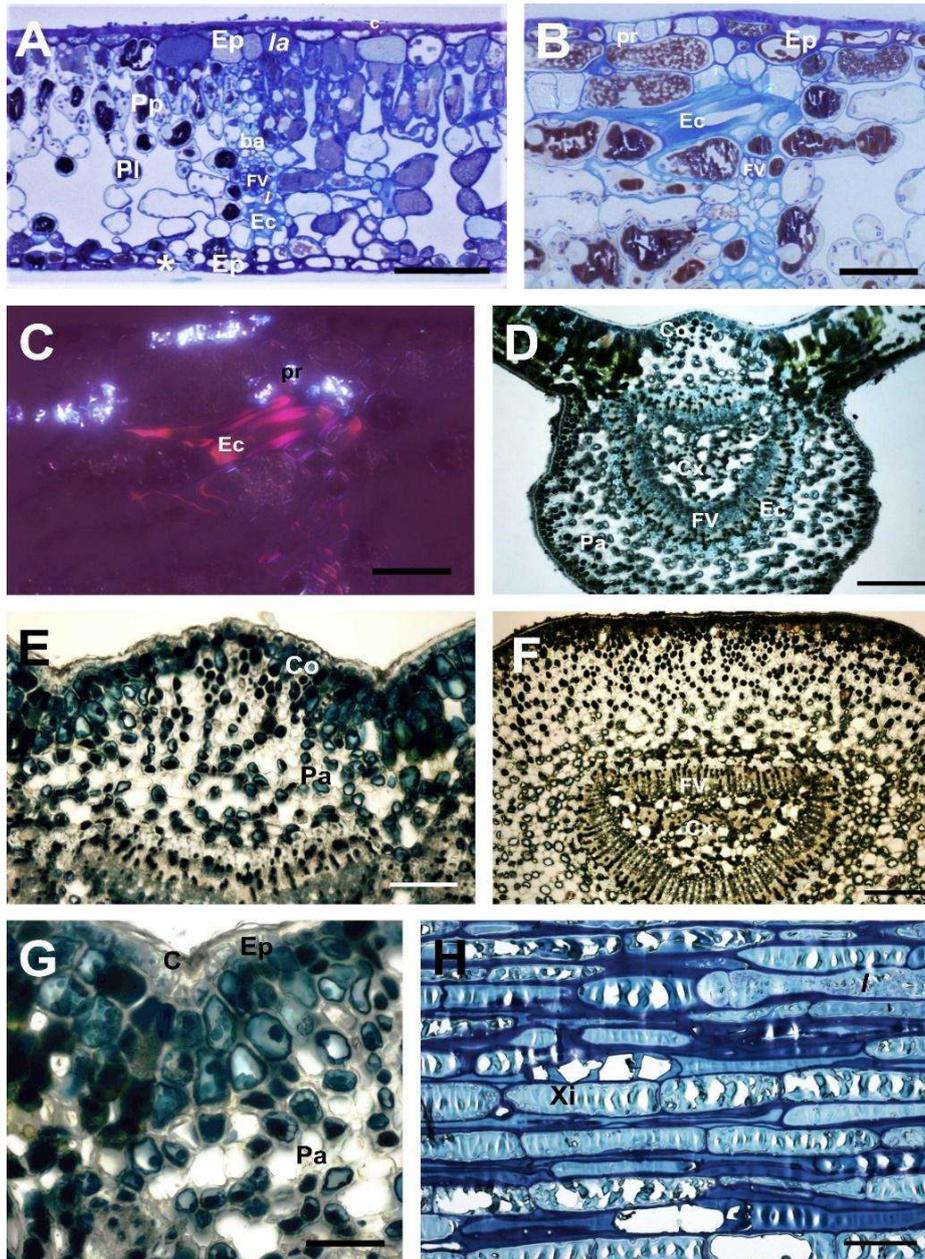
As folhas de *M. zapota* possuem uma densa camada de cera epicuticular rugosa nas faces adaxial e abaxial, com presença de hifas fúngicas (Fig. 5: A-E). Foi possível identificar a presença de tricomas estrelados na face abaxial, na região do terço médio (Fig. 5: E). As folhas de *M. zapota* são hipoestomática, com presença de estômatos na face abaxial sendo cobertos por uma camada de cera (Fig. 5: B-E). Os estômatos não apresentaram ornamentação (Fig. 5: C). Análises de dissociação revelaram que os estômatos são anomocíticos, a epiderme na face abaxial possui presença de cristais de oxalato de cálcio e vestígios de tricomas (Fig. 5: G). A dissociação da epiderme revelou que a parede periclinal externa possui sinuosidades nas faces adaxial e abaxial, bem como foi possível visualizar a presença de laticíferos na face adaxial e cicatrizes de tricomas na face abaxial (Fig. 5: F e G).



**Figura 5:** Superfície foliar de *Manilkara zapota* (Sapotaceae). Microscopia eletrônica de varredura (A-E). Microscopia óptica (F e G). A – Cera em crosta (estrela) sobre epiderme adaxial; B – Presença dos estômatos na face abaxial (seta) protegidos por camada de cera epicuticular em forma de crosta rugosa; C– Epiderme abaxial tratada com clorofórmio para retirada de cera. Presença de hifas fúngicas (\*) e estômatos (seta); D – Inserção mostra estômato rodeado por hifas fúngicas; E – Presença de tricoma tector do tipo estrelado (seta branca) no terço médio da face abaxial; F – Face adaxial evidenciando células com paredes sinuosas (>) e laticíferos (l) do tipo anastomosados com bifurcação em forma de “Y”. G – Folha do tipo hipostomática com estômatos paracíticos (seta), células epidérmicas com parede periclinal sinuosa, cicatrizes de tricomas (tr) e presença de cristais de oxalato de cálcio (pr); Imagens: F e G foram coradas em Safranina. Barras: A, 20 μm; B e D, 10 μm; C, 3 μm; E, F e G, 100 μm.

As análises de microscopia óptica revelaram cutícula espessa nas faces adaxial e abaxial da lâmina foliar, na nervura central do terço médio e no pecíolo (Fig. 6: A e B, D e G). O mesofilo da lâmina foliar apresentou os mesmos aspectos anatômicos nas seções referentes ao ápice, ao terço médio e à borda (Fig. 6: A). A epiderme na face adaxial é bisseriada contendo uma camada hipodérmica. A camada mais externa apresenta células achatadas, recoberta pela cutícula adaxial, cristais prismáticos com parede anticlinal justaposta e tamanho menor que a camada hipodérmica. A hipoderme é composta por células globosas, de formato irregular, com parede anticlinal justapostas, e possui secreção e cristais prismáticos (Fig. 6: A-C). Seguido da hipoderme encontra-se o parênquima paliçádico, o qual é composto por células alongadas, justapostas formando duas a três camadas de células (Fig. 6: A e B). O parênquima lacunoso é composto de três a cinco camadas de células bem espaçadas entre si, de formato arredondado a irregular, contendo grandes espaços intercelulares (Fig. 6: A). A epiderme abaxial é formada por células de formato arredondado a retangular, com paredes anticlinalis justapostas e estômatos no mesmo nível das células epidérmicas, formando cavidades estomáticas em direção ao parênquima lacunoso (Fig. 6: A). No mesofilo, também foi possível observar a presença de feixes vasculares sustentados por bainha parenquimática e células esclerenquimáticas (Fig. 6: A). Também foi possível identificar a presença de laticíferos por todo o mesofilo e pecíolo, associados aos feixes vasculares (Fig. 6: A, F e H).

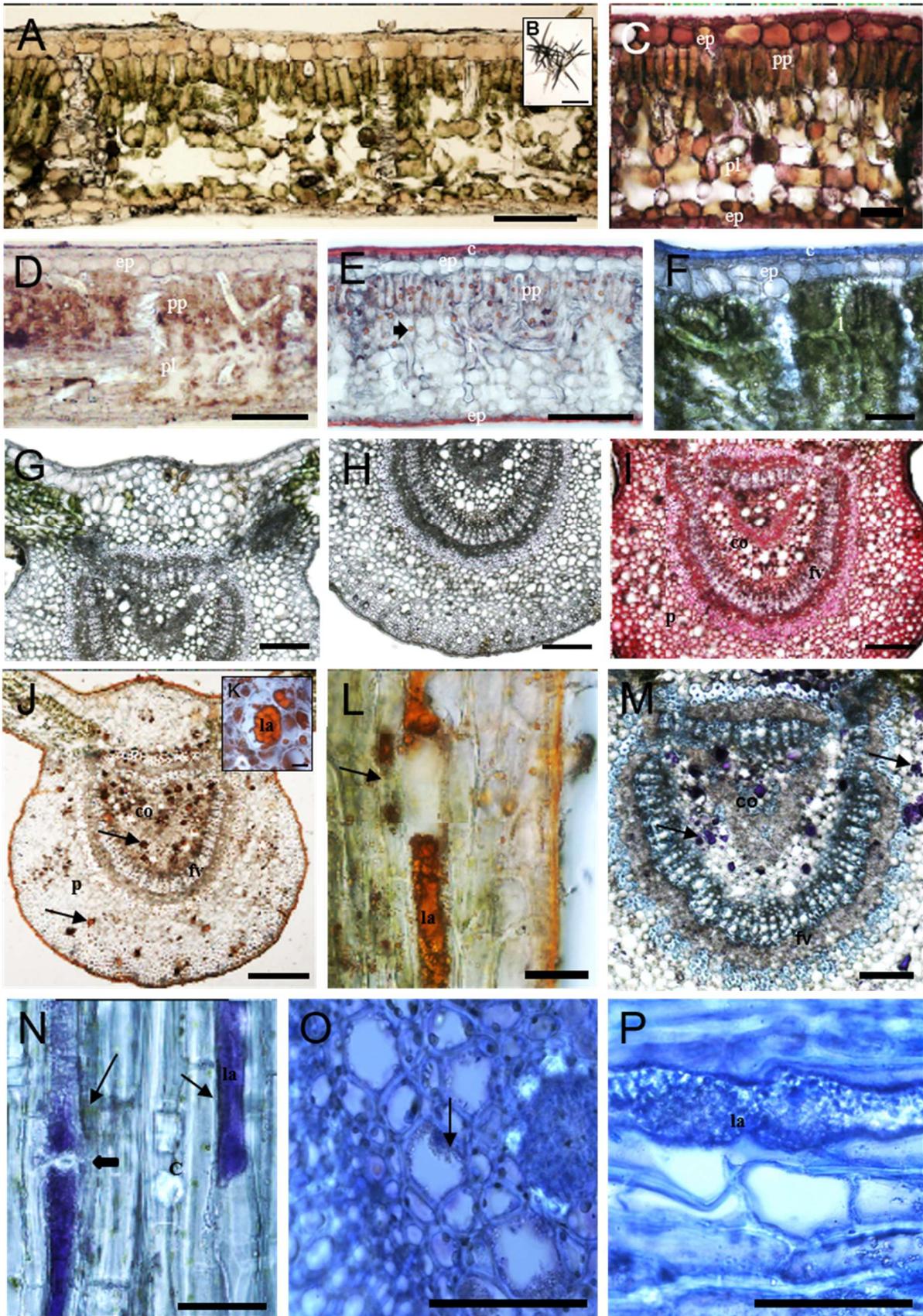
A nervura central é composta por epiderme unisseriada seguida de células colenquimatosas na superfície abaxial e adaxial, células parenquimáticas, e laticíferos (Fig. 6: D, E e G). O feixe vascular é contínuo, com formato convexo à superfície adaxial, sustentado externa e internamente por células esclerenquimáticas (Fig. 6: D). A base e o pecíolo apresentam os mesmos atributos anatômicos de disposição do feixe vascular, da epiderme, do córtex e do parênquima de preenchimento (Fig. 6: F). Em corte longitudinal do feixe vascular peciolar foi possível identificar a presença de laticíferos entre as células do xilema (Fig. 6: H).



**Figura 6:** Anatomia da folha de *Manilkara zapota* (Sapotaceae). Microscopia óptica. A – Corte transversal do terço médio evidenciando a cutícula, o mesmo padrão foi observado nas secções referentes ao ápice e à borda (c); epiderme (Ep), látex (la) parênquima paliçádico (Pp), parênquima lacunoso (Pl), bainha (ba), feixe vascular (Fv), laticífero (l), esclerênquima (ec) e estômato (\*); B – Secção do terço médio evidenciando a presença de cristais de oxalato e cálcio (pr) próximo ao esclerênquima (ec) e feixe vascular (Fv); C – Natureza dos cristais (pr) em microscopia óptica sob luz polarizada; D – Corte transversal da nervura central evidenciando o colênquima (Co) feixes vasculares (FV), córtex (Cx) e parênquima de preenchimento (Pa); E – Detalhe da nervura central evidenciando colênquima (Co), parênquima de preenchimento (Pa) e esclerênquima (ec); F – Secção transversal do pecíolo; G- Detalhe da epiderme da nervura central evidenciando a cutícula

(c), epiderme (Ep) e o parênquima (Pa); H– Corte longitudinal do pecíolo evidenciando laticífero (L) e xilema (Xi). Barras: 100  $\mu$ m.

Secções transversais à mão livre da lâmina foliar mostraram a presença de tricomas do tipo estrelado, os quais dificilmente são observados aderidos à epiderme (Fig. 7: B). Os tricomas parecem se soltar facilmente durante o processamento de rotina para microscopia do material. A epiderme nas faces abaxial e adaxial é coberta por cutícula lipofílica evidenciada por Sudan IV, com coloração avermelhada, e NADI, com coloração azul (Fig. 7: E e F). Também foi identificada na cutícula a presença de pectina com o reagente cromogênico vermelho de Rutênio (Fig. 7: C). O reagente azul brilhante de Coomassie evidenciou com coloração azul brilhante a presença de proteínas nas células laticíferas em secção longitudinal do pecíolo (Fig. 7: O e P). Nas células do parênquima paliçádico e lacunoso houve marcação positiva para compostos fenólicos através do reagente de Hoephner-Vorsatz, a mucilagem foi evidenciada por vermelho de Rutênio e gotas lipídicas foram marcadas com Sudan IV (Fig. 7: C-E). É possível identificar a presença de laticíferos por todo o mesofilo (Fig. 7: E). No parênquima de preenchimento e córtex da nervura central do terço médio, foi possível evidenciar a presença de substâncias pécticas (Fig. 7: I). Os testes com Sudan III, Azul de Coomassie e reagente de NADI, evidenciaram a presença de laticíferos com conteúdo lipoproteico e terpênicos, respectivamente (Fig. 7: J, K e M). Em cortes longitudinais do pecíolo observa-se a mesma composição do látex em laticíferos próximos ao feixe vascular na região parenquimática e ainda a presença de cristais prismáticos (Fig. 7: L e N).



**Figura 7:** Histoquímica da folha de *Manilkara zapota* (Sapotaceae). Secções transversais da lâmina foliar (A-F), do terço médio (G, I-K) e do pecíolo (H, M, O e P), e longitudinais do pecíolo

(L e N) de *M. zapota*. A – Terço médio controle; B – Inserção evidencia os tricomas estrelados; C – Secção transversal corada com vermelho de Rutênio evidenciando compostos pécnicos na epiderme (ep), no parênquima paliçádico (pp) e no parênquima lacunoso (pl); D – Secção transversal corada com reagente Hoepfner-Vorsatz evidenciando os compostos fenólicos no parênquima paliçádico (pp) e lacunoso (pl). Laticífero bifurcado em forma de Y (l); E – Secção transversal corada com Sudan IV evidenciando o caráter lipídico da cutícula nas faces adaxial e abaxial, presença de gotas lipídicas nas células do parênquima paliçádico (seta), laticífero não marcado com distribuição intrusiva no mesofilo; F – Reação positiva evidenciada NADI na cutícula (c) e laticíferos não marcados no mesofilo (l); G – Nervura central controle; H – Pecíolo controle; I – Reação positiva para vermelho de Rutênio na nervura central; J – Secção transversal da nervura central corada com Sudan III evidenciando os laticíferos (setas) no córtex (co) e no parênquima de preenchimento (p); K – Detalhe dos laticíferos preenchidos por látex de composição lipídica (la); L – Vista longitudinal de laticífero (la) no pecíolo; M – Reação positiva para reagente de NADI evidenciando conteúdo dos laticíferos (seta) no córtex (co) e no parênquima de preenchimento (p); N – Vista longitudinal dos laticíferos (seta fina) no pecíolo corado com reagente de NADI, presença de cristais prismáticos (c) no parênquima de preenchimento, parede do laticífero parcialmente dissolvida (setas grossa); O – Reação positiva para azul brilhante de Coomassie no conteúdo do laticífero (seta fina) em corte transversal; P – Vista longitudinal do laticífero preenchido por látex (la). Barras: A, C- J, L e M: 100µm; N: 50µm; B, K e O e P: 25µm.

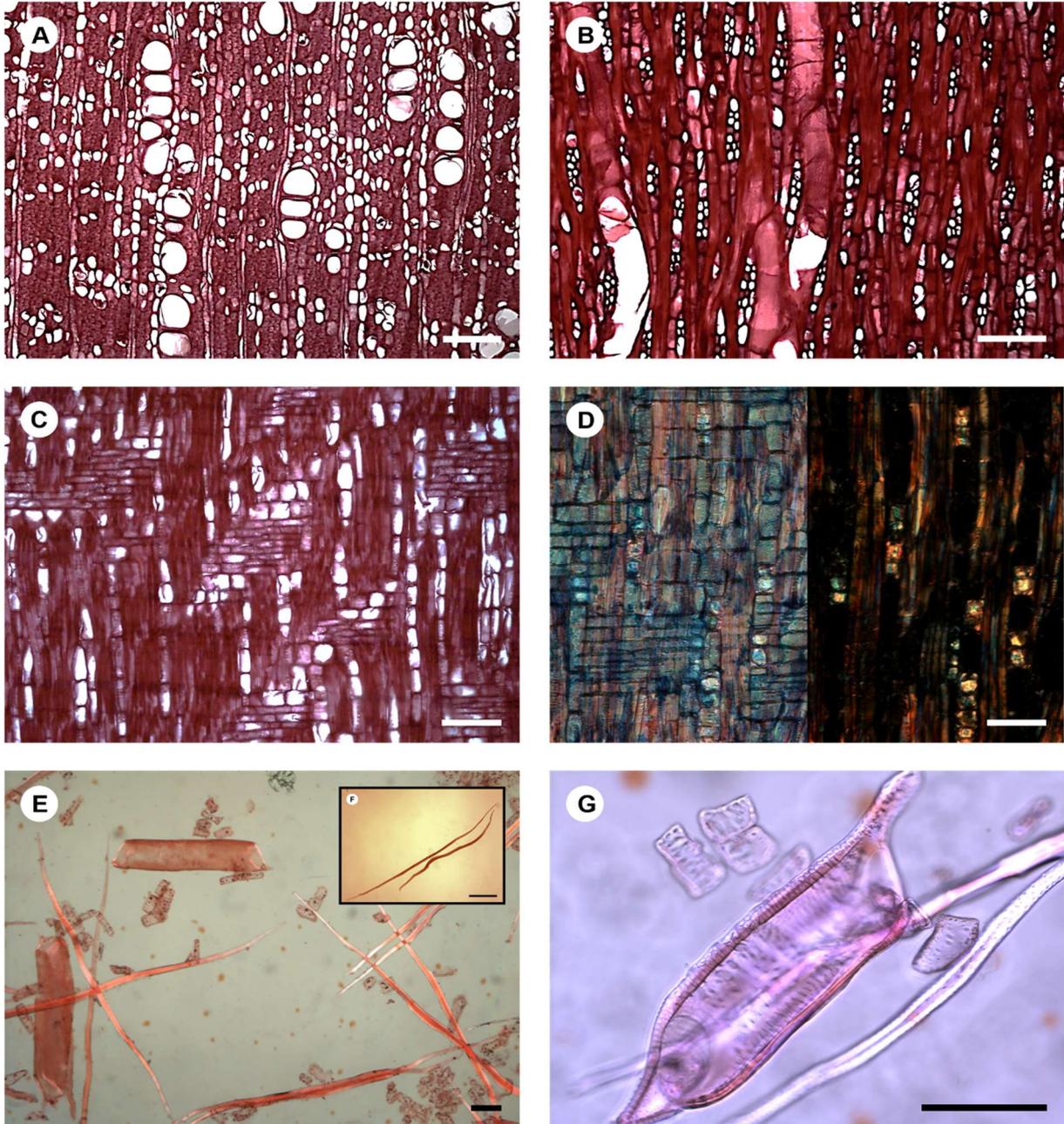
Os demais reagentes não apresentaram marcação demonstrando reação negativa. A tabela de relação de reagentes e moléculas de interesse exibe a presença dos compostos químicos evidenciados pelos testes histoquímicos nos tecidos analisados (Tabela 2).

Reagentes	Substâncias identificadas	Látex	Lâmina Foliar	Pecíolo
Vermelho de Rutênio (Chamberleim, 1932)	Pectina	-	+	+
Sudan IV e III (Pearse 1980, adaptado)	Lipídeos	+	+	+
Hoephner-Vorsatz (Reeve 1951)	Compostos fenólicos	-	+	-
Dragendorff (Svendsen & Verpoorte 1983)	Alcaloides	-	-	-
NADI (David & Carde, 1964)	Terpenos	+	+	+
Reagente Schiff (Maia, 1979).	Ácido periódico	-	-	-
Lugol (Jensen, 1962)	Amido	-	-	-
Azul de Coomassie (Fischer, 1968)	Proteínas	+	+	+

**Tabela 2:** Relação de reagentes e moléculas de interesse identificadas.

O lenho de *M. zapota* é caracterizado por apresentar camadas de crescimento indistintas, porosidade difusa, com vasos solitários e múltiplos, em arranjos radiais de 2 a 8 (Fig. 8: A). Os elementos de vasos apresentam seção circular a oval com comprimento médio de 672  $\mu\text{m}$  (longos), diâmetro tangencial médio de 118  $\mu\text{m}$  (médios), diâmetro radial 108,7  $\mu\text{m}$ , paredes com cerca de 2  $\mu\text{m}$  de espessura e placas de perfuração simples, presença de apêndices em ambas as extremidades, pontoações intervasculares com cerca de 1,7  $\mu\text{m}$  (Fig. 8: A, E e G). As fibras são grandes (1282  $\mu\text{m}$ ), libriformes, não septadas, com pontoações simples de 1,4  $\mu\text{m}$ , diâmetro médio de 16  $\mu\text{m}$ , lúmen de 1,5  $\mu\text{m}$ , e paredes delgadas a espessas (Fig. 8: E e F). O parênquima axial é do tipo apotraqueal difuso em agregados tendendo a formar linhas com uma célula de largura, e seriado, com cerca de 2-5 por série. Além disso é possível observar a presença de parênquima paratraqueal escasso (Fig. 8: A e B). Os raios possuem cerca de 17 mm, são unisseriados e bisseriados,

compostas por células procumbentes no centro, 2-4 fileiras de células eretas e quadradas nas margens, altura média de 478  $\mu\text{m}$  e largura média de 40  $\mu\text{m}$  Fig. 8: C e D). Nota-se a presença de cristais prismáticos nas células do raio (Fig. 8: D). não foram observados laticíferos nos três planos de cortes.

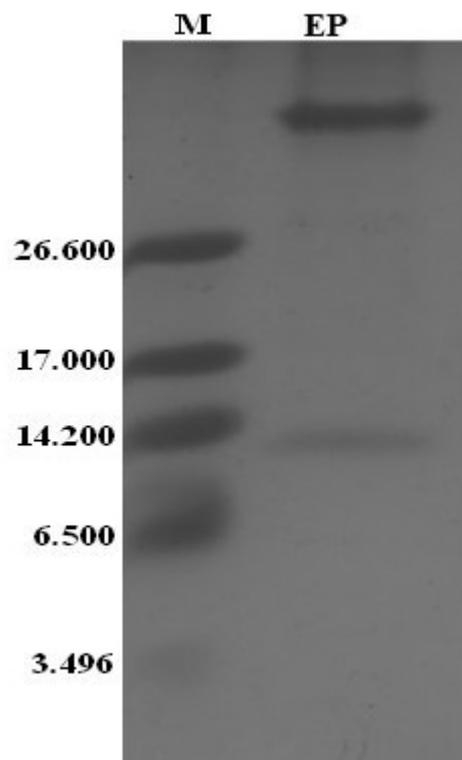


**Figura 8:** Anatomia do lenho de *M. zapota* (Sapotaceae). A – Corte em plano transversal; B – Corte no plano longitudinal tangencial; C – Corte no plano longitudinal radial; D – Detalhe de corte longitudinal radial evidenciando cristais prismáticos; E – Macerado evidenciando elementos de vaso e fibras; F – Inserção mostrando as fibras; G – Macerado mostrando elemento de vaso com

apêndices em ambas as extremidades e detalhes das pontuações. Microscopia óptica. Barras: A-F: 100  $\mu\text{m}$ , G: 50  $\mu\text{m}$ .

### 5.1.2 Perfil eletroforético do extrato bruto de folhas de *Manilkara zapota*

A figura 9 mostra o perfil eletroforético do extrato bruto obtido após a extração de proteínas das folhas de *M. zapota*, onde é possível observar a presença de duas proteínas majoritárias, uma proteína de aproximadamente 14 kDa e uma outra proteína de alta massa molecular acima de 26 kDa.

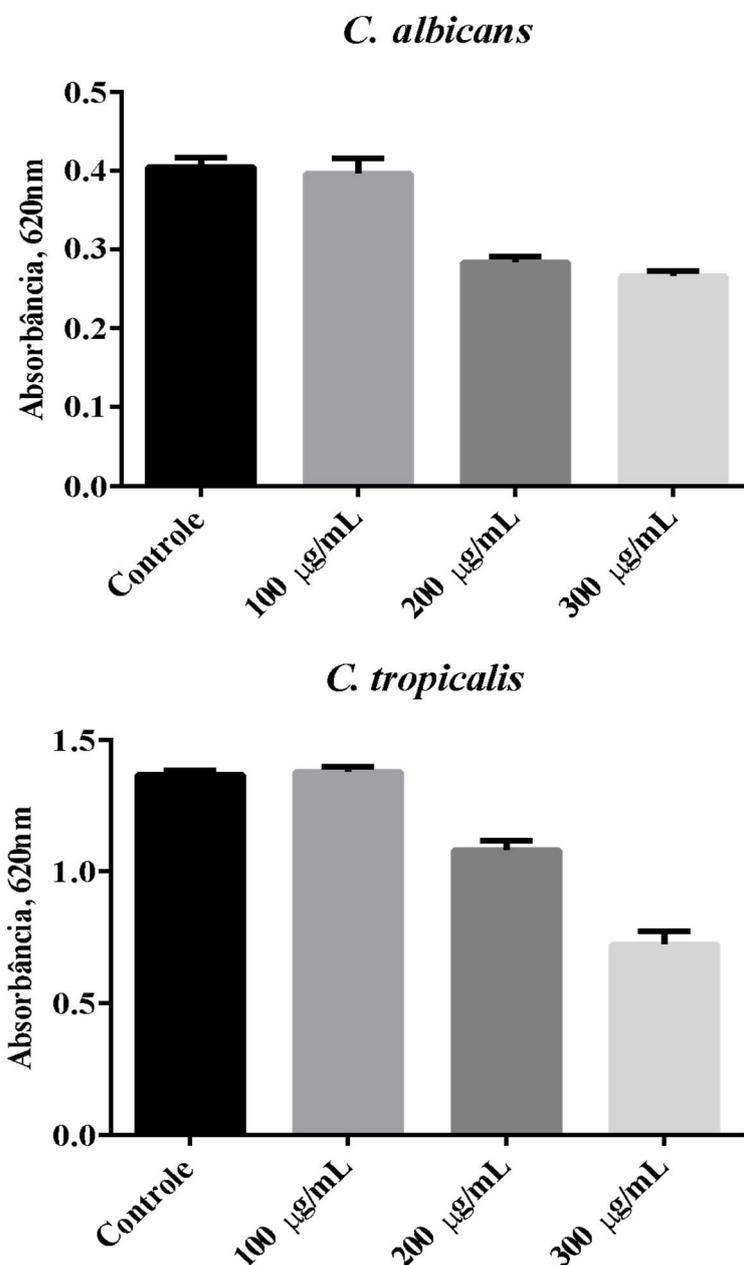


**Figura 9:** (A) Eletroforese em gel de tricina na presença de SDS do extrato bruto das folhas de *M. zapota* tratado com  $\beta$ -mercaptoetanol. (M) marcador de massa molecular (Da), (EP) 20  $\mu\text{g}$  do extrato proteico.

### 5.1.2 Ensaio de Inibição do Crescimento

A atividade antimicrobiana do extrato bruto (EB) de folhas de *M. zapota* foi testado sobre as espécies de leveduras *C. albicans* e *C. tropicalis*, utilizando-se as concentrações de 100, 200 e 300  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (Fig. 10). Os resultados obtidos mostram que o EB foi capaz de causar uma inibição de 30 e 34% nas concentrações de 200 e 300  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente sobre o crescimento de *C. albicans*. Sobre o crescimento da levedura *C. tropicalis* o EB foi

capaz de causar uma redução no crescimento de 21 e 47% nas concentrações de 200 e 300  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectivamente. Nenhuma inibição do crescimento foi observada na concentração de 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  para ambas as leveduras testadas.

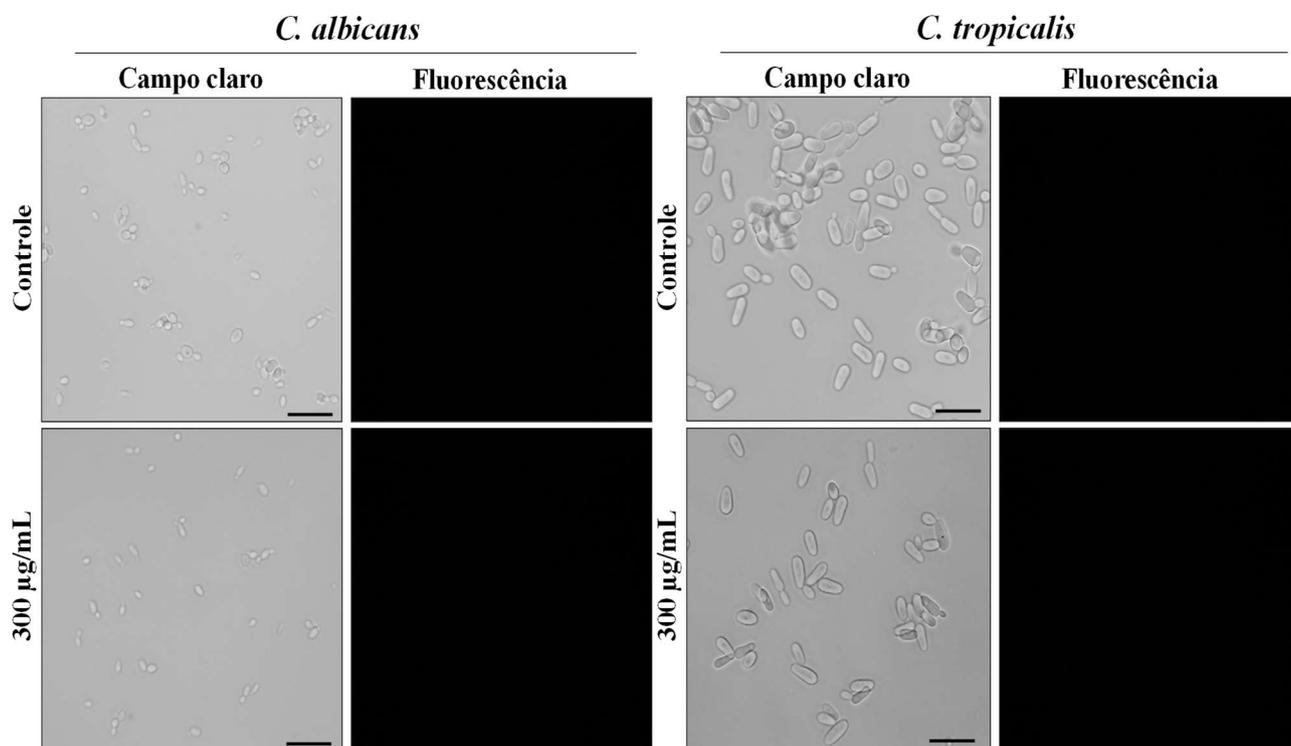


**Figura 10:** Gráficos de inibição do crescimento das células das leveduras *C. albicans* e *C. tropicalis*, na ausência do EB (controle) e na presença de 100, 200 e 300  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  do EP.

### 5.1.3 Efeito de EB sobre a Permeabilização de Membranas de Leveduras

Todas as duas espécies de leveduras utilizadas no ensaio de inibição do crescimento foram ensaiadas para a verificação da permeabilização da membrana plasmática na

presença e na ausência do EP ( $300 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) (Fig. 11). Nas condições testadas o EP não foi capaz causar a permeabilização da membrana plasmática das células de *C. albicans* e *C. tropicalis*, entretanto podemos observar uma diminuição do número de celular no tratamento para ambas as espécies, corroborando os dados obtidos pela densidade óptica.



**Figura 11:** Células de *C. albicans* e *C. tropicalis* após ensaio de permeabilização da membrana, visualizadas por microscopia de fluorescência utilizando a sonda fluorescente Sytox green. As células foram tratadas com EP durante 24 h e em seguida, analisadas quanto a permeabilização da membrana. As células controles foram tratadas apenas com sonda Sytox green. Barras de  $20 \mu\text{m}$ .

## 6. Discussão

### 6.1 Anatomia da folha e do lenho

As características morfoanatômicas como lâmina foliar bifacial, número variável de estratos do tecido paliçádico, tecido lacunoso com grandes espaços intercelulares, sem ornamentação de cutícula, epiderme composta de células com paredes anticlinais retas ou sinuosas, estômatos anomocíticos e paracíticos ao nível epiderme, e fibras esclerenquimatosas no mesofilo foram descritas por Solereder & Scott 1908, Metcalfe &

Chalk, 1950, Pennington, 1990, Monteiro *et al.*, 2007, Carneiro *et al.*, 2012 e Lima *et al.*, 2019. Essas características foram observadas na lâmina foliar de *M. zapota* neste estudo. Alguns destes autores ainda destaca presença de laticíferos, tricomas e cristais prismáticos como caráter anatômico marcante no reconhecimento de qualquer espécie para a família Sapotaceae (Solereder & Scott 1908, Metcalfe & Chalk 1950, Monteiro *et al.*, 2007, Carneiro *et al.*, 2012). A grande quantidade de cera epicuticular em crosta presente em *M. zapota* foi em parte retirada para melhor visualização da epiderme, técnica também utilizada para diagnosticar a micromorfologia foliar espécies do gênero *Psychotria* (Rubiaceae) (Moraes *et al.*, 2012).

Os resultados da anatomia da folha de *M. zapota* estão de acordo com o esperado para o gênero *Manilkara*. Além de uma cutícula espessa, *M. zapota* apresentou cera em crosta sob a epiderme abaxial e adaxial e hifas fúngicas colonizando toda a superfície da lâmina foliar, o que é comum para a família Sapotaceae (Furtado *et al.*, 2018). A cera em grande quantidade corrobora com as informações de Esaú (1974), cuja função é atribuída como um fator que evita a perda de água, atribuindo essa característica a plantas xeromórficas. Esta condição anatômica em *M. zapota* pode estar diretamente ligada à perda de água visto que a espécie é comum de regiões Caatinga, Cerrado além de ser encontrada em ambientes florestais como Amazônia e Mata Atlântica (Silva Júnior *et al.*, 2014). Como o indivíduo estudado se encontra em área descampada sob intensa radiação a grande quantidade de cera epicuticular, o maior espessamento da cutícula e epiderme, pode estar relacionado com a proteção a altas irradiâncias, refletindo a luz, através do aumento superfície de reflexão, evitando o aquecimento do protoplasma e a perda de água (Pireda *et al.*, 2019).

A presença de tricomas é um caráter comum da família Sapotaceae (Monteiro *et al.*, 2007). Tricomas malpighiáceos em forma de “Y” foram encontrados em *Diploon cuspidatum* (Hoehne) Cronquist (Lima *et al.*, 2019), em e espécies do gênero *Pouteria* Aubl. tal como *Pouteria guianensis* Aubl. (Monteiro *et al.*, 2007), e tricomas biramificados em espécies do gênero *Manilkara* (Fabris & Peixoto, 2013). Em trabalhos anteriores tricomas unicelulares foram encontrados em *M. zapota* por Nagari *et al.* 2012 e por Moura *et al.*, 2019. Metcalfe & Chalk (1950) sugeriram a presença de mais de um tipo de tricoma para a família. No presente trabalho, foram observadas a presença de cicatrizes de tricomas na face abaxial e ainda tricomas do tipo estrelado, com ramificações, ainda não citado na literatura para o gênero. Pennington (1990) cita para a família que os tricomas podem ser

\decíduos, apresentando diferentes densidades nas faces adaxial e abaxial da folha, com braços de diferentes tamanhos. Este fato corrobora com as características observadas na face abaxial de *M. zapota* aparentemente decíduos, já que foram observados na maioria das vezes soltos, e em pouca quantidade na face abaxial, além de muitas cicatrizes. De acordo com Shields (1950), a densidade de tricomas pode variar de acordo com as características ambientais, evitando a perda excessiva de água, ou ainda que tricomas mortos formem camadas protetoras evitando a evapotranspiração excessiva. Em ambientes sob alta intensidade luminosa os tricomas também podem atuar refletindo radiação evitando o aquecimento da folha e ainda protegendo contra herbivoria (Pessoa *et al.*, 2019). Com relação aos estômatos, estes estão no mesmo nível da epiderme em *M. zapota*, características comuns em Sapotaceae descritas por Solereder (1908), reportando que essa característica está relacionada a projeção da cutícula sobre as células estomáticas.

Em *M. zapota*, a epiderme na face adaxial mostrou-se bisseriada em todas as regiões foliares (ápice, borda e base), sendo a mais externa justaposta com células e achatadas, e a mais interna composta por células pilosas e justapostas, com presença de secreção. Esse resultado é diferente de *Diploon cuspidatum* (Hoehnea) Cronquist (Lima *et al.*, 2019), que apresenta uma camada de células. A epiderme com duas camadas foi observada também para outras espécies do gênero (Almeida Jr. *et al.*, 2013). Também foi observado grandes cristais do tipo oxalato de cálcio nas células da epiderme e próximas ao feixe vascular. Estes cristais foram descritos por Solereder (1908), Metcalfe e Chalk (1950) e Monteiro *et al.* (2007), evidenciando que a presença de cristais prismáticos ou de areia, agrupados ou solitários nas células é uma excelente característica de diagnose para família. Além disso, esses cristais podem desempenhar funções inúmeras tais como de balanço iônico celular, regulação osmótica, defesa vegetal contra herbivoria, suporte mecânico tissular, detoxificação de alumínio e metais pesados, captação e reflexão da energia solar (Silva *et al.*, 2014). Os grandes cristais prismáticos em *M. zapota*, também estão dispersos na nervura central e no pecíolo nas camadas subepidérmicas, semelhante a *D. cuspidatum* (Lima *et al.*, 2019).

O mesofilo em *M. zapota* é dorsiventral constituído de parênquima paliçádico multisseriado, corroborando com o observado em *D. cuspidatum*. Porém, diferentemente de *M. zapota*, uma das camadas é composta por células alongadas lateralmente (Lima *et al.*, 2019). O número de camadas do parênquima paliçádico pode estar relacionado pela intensidade luminosa, humidade e habitat (Muniz *et al.*, 2018). Porém, em Sapotaceae esse

número pode ser fixo, espécies podem apresentar uma ou mais camadas apenas voltadas para a epiderme adaxial e parênquima lacunoso com grandes espaços intercelulares (Monteiro, 2007; Almeida-Jr *et al.*, 2013). Neste trabalho, foi observado parênquima lacunoso com grandes espaços intercelulares e células alongadas justapostas, formando até três camadas.

A forma e o arranjo do sistema vascular do pecíolo e do terço médio foram considerados úteis na sistemática das plantas (Metcalf & Chalk, 1950). Metcalf & Chalk (1950) descreveram oito formas para o pecíolo de Sapotaceae. Destes, *M. zapota* foi classificado como plano-convexo à superfície adaxial, sustentado por células esclerenquimáticas externa e internamente. O feixe vascular do pecíolo também é plano-convexo. Algumas espécies do gênero *Manilkara*, de acordo com Almeida Jr. *et al* (2013), possuem pecíolo com cutícula espessa e epiderme unisseriada, laticíferos na região medular e no parênquima de preenchimento, como ocorre no pecíolo e nervura central de *M. zapota*. De acordo com Monteiro *et al.* (2007), em outros gêneros de Sapotaceae, também possuem essas características, porém, a disposição dos feixes vasculares pode ser diferenciada entre as espécies como foi evidenciado em *Manilkara* Adans e *Pouteria* Aubl.

Com relação aos laticíferos em Sapotaceae, estes acompanham os feixes vasculares, sendo encontrados no terço mediano na nervura central e no pecíolo, nas regiões corticais e medulares, são do tipo articulados não anastomosados. São preenchidos por substâncias resinosas, borracha, cristais de oxalato de cálcio e amido, lipídeos e fazem parte da defesa constitutiva mecânica e química da planta (Solender & Scott 1908, Metcalf & Chalk, 1950, Metcalf & Chalk, 1983, Monteiro *et al.*, 2007, Konno, 2011, Aoyama & Labinas 2012). Os laticíferos atuam de forma mecânica já que a borracha impalatável e de difícil digestão (Aoyama & Labinas 2012). O látex quando é exsudado por injúria logo se torna denso e pegajoso devido a presença de borracha e resinas. Além disso, produz uma ação colante, que além de evitar a entrada de patógenos através do ferimento, também pode imobilizar insetos fitófagos e outros pequenos organismos tanto prendendo suas mandíbulas quando suas patas. No látex, também há presença de inúmeros compostos que atuam na defesa química tais como metabolitos secundários e proteínas (Konno, 2011). Considerada como característica diagnóstica para a família, a presença dos laticíferos em *M. zapota* está de acordo com a literatura. Esta estrutura está presente no mesófilo, na nervura central e pecíolo, ocorrendo tanto na medula quanto no córtex,

acompanhando o feixe vascular e próximo a epiderme (Moura *et al.*, 2019). Estes aparentam não formar anastomoses, formando bifurcações em forma de “Y”.

O conteúdo laticífero de *M. zapota* foi analisado histoquimicamente evidenciando a presença de proteínas, lipídeos e terpenos, no parênquima clorofiliano também foi evidenciado a presença de compostos fenólicos, o que é corroborado pela presença de compostos fenólicos em frutos de *M. zapota* e nas folhas de *Manilkara hexandra*, exercendo atividade antioxidante (Baky *et al.*, 2016). A presença de compostos fenólicos nas folhas também pode estar associada a proteção contra danos causados pela radiação UV-B visto que o indivíduo está sob grande exposição solar (Pireda *et al.*, 2019). Na lâmina foliar de *Sideroxylon obtusifolium*, lipídeos foram encontrados, estando presente também na cutícula e no parênquima clorofiliano (Silva & Potiguara, 2008). A presença de lipídeos na cutícula, de gotas lipídicas no parênquima, e no látex pode estar relacionado a prevenção da perda excessiva de água e na resistência a doenças, além de estar presente na composição das membranas das células (Menezes *et al.*, 2003). A presença de compostos fenólicos também está relacionada com a atividade biológica atribuída a *M. zapota* na literatura etnobotânica, conferindo a espécie atividade antioxidante, antihiperlipidêmica e hipocolesterolêmica. A presença de compostos de caráter lipídico pode também estar relacionada com a atividade hipocolesterolêmica (Fayek *et al.*, 2012).

O lenho de *M. zapota* apresentou características que corroboram com o esperado para a família Sapotaceae e o gênero *Manilkara*. De acordo com Melfi (2006), o lenho de *M. zapota* é caracterizado por apresentar camadas de crescimento indistintas, porosidade difusa, com vasos solitários e múltiplos, em arranjos radiais. Melfi (2006) também evidenciou que o diâmetro tangencial médio dos vasos varia entre 50 µm e 160 µm, já os números encontrados aqui (118 µm) estão acima do observado por Melfi (2006). O comprimento médio de 672 µm aqui evidenciado se encontra dentro da categoria estabelecida pela IAWA Comitê (1989). As pontuações intervaseculares com cerca de 1,7 estão abaixo da média em comparação ao trabalho de Melfi (2006), já as fibras possuem pontuações simples paredes delgadas a espessas como apontado por este autor. O mesmo autor corrobora com resultados obtidos como, parênquima axial do tipo apotraqueal difuso em agregados tendendo a formar linhas com uma célula de largura, e seriado, com cerca de 2-5 por série; presença de raios unisseriados e bisseriados, compostas por células procumbentes no centro, 2-4 fileiras de células eretas e quadradas nas margens; presença de cristais prismáticos nas células do raio e a ausência de laticíferos nos três planos de cortes .

De acordo com Monteiro *et al.*, (2007) em caules de Sapotaceae os laticíferos ocorrem no floema e de acordo com Mustard (1982), no floema secundário de *M. zapota* alguns raios são compostos inteiramente de laticíferos, eles se dilatam nos ramos e formam laticíferos secundários na região da periderme. O que pode justificar a não observação de laticíferos nos raios do lenho de *M. zapota*.

Melfi (2006) não observou a presença de parênquima paratraqueal escasso, como observado neste estudo. Caracteres como fibras grandes e libriformes evidenciadas neste trabalho foram observadas por Honda, 1971 para a família Sapotaceae.

## 6. 2 Perfil Proteico e ensaio de inibição de crescimento

Somado ao estilo de vida sedentário, a pressão evolucionária dos agentes infecciosos fez com que as plantas desenvolvessem sofisticados mecanismos de defesa. Dentre os muitos componentes desses mecanismos, encontram-se as proteínas, as quais atuam tanto na planta (fortalecendo, reparando ou alterando a parede celular e modificando as propriedades da matriz extracelular) quanto no organismo agressor (inibindo, direta ou indiretamente, o seu crescimento/desenvolvimento) (Mithöfer e Boland, 2012).

Nos últimos anos, vários trabalhos têm mostrado o potencial antimicrobiano de *M. zapota* através de ensaios de inibição do crescimento de fungos e bactérias patogênicas ao homem, utilizando principalmente extratos de suas folhas e casca (Nair & Chanda 2008; Osman *et al.*, 2011; Kaneria & Chanda (2012); Islam *et al.*, 2013; Mewara *et al.*, 2017).

Inicialmente, foi feita uma extração protéica das folhas de *M. zapota* conforme metodologia padronizada por Taveira *et al.*, (2014). Este extrato proteico foi submetido a uma eletroforese em gel de tricina onde notou-se a presença de duas proteínas (fig. 9). Estas proteínas foram testadas contra as leveduras *C. albicans* e *C. tropicalis*, apresentando atividade inibitória nas concentrações de 200 e 300  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (fig 10). Em 2017, Mewara e colaboradores avaliaram a atividade antimicrobiana de três extratos diferentes (aquoso, acetato de etila e éter de petróleo) de folhas de *M. zapota* contra fungos e leveduras patogênicas. Os três extratos apresentaram diferentes graus de atividade contra os organismos investigados, entretanto apenas os extratos de éter de petróleo e acetato de etila foram eficazes contra a levedura *C. albicans* utilizando uma concentração de 500  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ . Mesmo utilizando uma concentração mais alta, a inibição observada por Mewara e colaboradores para esta levedura foi menor a que nós observamos neste trabalho. Adicionalmente, este mesmo grupo de pesquisadores atribuiu à inibição do crescimento da

levedura a compostos do metabolismo secundário, tais como alcalóides, flavonóides, terpenos, glicosídeos e lipídeos. De forma semelhante, Chanda e Kaneria, 2011 utilizaram cinco diferentes solventes para a extração de possíveis compostos bioativos de folhas de *M. zapota*. Todos os extratos foram avaliados quanto sua atividade antimicrobiana sobre bactérias gram positivas e negativas e as leveduras *Candida albicans*, *Candida epicola*, *Candida glabrata* e *Candida neoformans*, de maneira geral os extratos foram mais ativos contra as bactérias e apenas a *C. albicans* e *C. epicola* tiveram 61 % de inibição do crescimento. No entanto, é importante destacar que esses pesquisadores utilizaram a concentração de 2000 µg.mL<sup>-1</sup>, dez vezes mais a concentração por nós utilizada neste trabalho, e mais uma vez a inibição foi atribuída a metabólitos secundários. Em conjunto esses resultados nos permitem sugerir que o extrato proteico das folhas de *M. zapota* possui um maior potencial antimicrobiano aos metabólitos secundários extraídos das folhas desta mesma espécie, embora não tenhamos utilizado o amplo espectro de microrganismos como realizado pelos pesquisadores supracitados.

Diversas proteínas já foram isoladas de plantas e apresentaram alguma atividade antimicrobiana *in vitro*. Dentre estas podemos citar as quitinases, as LTPs, as tioninas, as albuminas 2S e os inibidores de proteases (Cruz *et al.*, 2010; Diz *et al.*, 2011; Ribeiro *et al.*, 2012; Taveira *et al.*, 2014). Mas, maneira geral, a atividade observada em extratos proteicos pode ser explicada devido à quantidade e diversidade de proteínas e/ou peptídeos antimicrobianos presentes nestes extratos, que provavelmente estão atuando em sinergismo e esta combinação pode acarretar num aumento da permeabilização da membrana plasmática de alguns microrganismos, além de induzir inúmeras alterações morfológicas em suas células (Matsuzaki *et al.*, 2009). Com o objetivo de verificar se o mecanismo de ação do extrato proteico de folhas de *M. zapota* sobre as leveduras testadas envolve a permeabilização de membranas, após o ensaio de inibição do crescimento a células de leveduras foram incubadas com a sonda Sytox green, um corante que possui alta afinidade por ácidos nucléicos e penetra as células apenas quando sua membrana plasmática está comprometida (Thevissen & Terras, 1999). Neste trabalho não foi possível observar a fluorescência para Sytox green, indicando a ausência de permeabilização da membrana plasmática, nas condições testadas. Apesar de muitos trabalhos mostrarem que proteínas e peptídeos antimicrobianos demonstram de forma geral um papel direto na permeabilização da membrana (Dathe *et al.*, 2002), é importante ressaltar que a permeabilização de

membranas e a inibição do crescimento de microrganismos não são eventos obrigatoriamente relacionados. Algumas proteínas podem apresentar atividade antimicrobiana e ter a capacidade de causar a permeabilização, entretanto outras podem não causar permeabilização e ter atividade antimicrobiana (Koshlukova *et al.*, 1999; Vylkova *et al.*, 2007). Desse modo, dependendo da proteína e do microrganismo testado, os efeitos causados pelas proteínas antimicrobianas podem ser variados, chegando a ter múltiplos alvos extra e intracelular (Franco *et al.*, 2011). Entretanto, mais análises necessitam ser feitas para relacionar o mecanismo de ação com a atividade antimicrobiana do extrato proteico de folhas de *M. zapota*.

### 6.3 Conclusão:

- A partir dos dados aqui obtidos foi possível analisar a organização da folha de *Manilkara zapota*, evidenciando a presença de mais de um tipo de tricomas, a grande quantidade de cera epicuticular, laticíferos bifurcados em “Y”. Essas características ainda não foram citadas na literatura para a espécie.
- Também concluímos que, em *Manilkara zapota*, os laticíferos presentes nas folhas podem auxiliar protegendo esses órgãos contra ataques de insetos e patógenos de forma química e mecânica e ainda contra estresses abióticos. Isso se deve à presença de borracha, proteínas, lipídeos e terpenos que são descritos na literatura como agentes herbicida e antimicrobiano.
- A presença de laticíferos articulados não anastomosados, a organização da epiderme e a disposição do feixe vascular na nervura e pecíolo, bem como o caráter histoquímico, foram corroborados com o esperado para família Sapotaceae e o gênero *Manilkara*. Para a anatomia da madeira são necessárias ainda análises que possam disponibilizar sua descrição mais completa, já que não foram observados laticíferos nos raios do xilema.
- A análise bioquímica do extrato proteico foliar evidenciou duas proteínas, uma de 14 kD e outra com massa molecular acima de 26 kDa citadas pela primeira vez para *M. zapota*. Tais proteínas mostraram atividade antifúngica sobre leveduras do gênero *Candida*, porém, mais análises que relacionem e esclareçam o mecanismo de ação com a atividade antimicrobiana do extrato proteico de folhas de *M. zapota* necessitam serem feitas.

Assim concluímos que os resultados deste trabalho geram subsídios para taxonomia e filogenética da espécie, e disponibilizaram o conhecimento sobre proteínas de caráter antifúngico para uma possível aplicação biotecnológica.

#### 6.4 Referências bibliográficas

- Almeida Jr., E. B. (2015).** Manilkara in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB87918>>
- Almeida-Jr, E. B., Araújo, J. S., Santos-Filho, F. S., Zickel, C. S. (2013).** Leaf morphology and anatomy of Manilkara Adans. (Sapotaceae) from northeastern Brazil. *Plant systematics and evolution*, 299,1-9.
- Alves-Araújo, A., Alves, M. (2010).** Flora da usina São José, Igarassu, Pernambuco: Sapotacea. *Rodriguésia*, 61, 303-318.
- Aoyama, E. M., & Labinas, A. M. (2012).** Características estruturais das plantas contra a herbivoria por insetos. *Enciclopédia Biosfera*, 8(15), 365-386.
- Armstrong, K. (2010).** Systematics and biogeography of the pantropical genus Manilkara Adans. (Sapotaceae). Royal Botanic Garden and University of Edinburgh. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 181,1-20.
- Ascensão, L. (2007).** Estruturas Secretoras em plantas. Uma abordagem Morfo-Anatômica. *Potencialidades e Aplicações das Plantas Aromáticas Mediciniais*. Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências de Lisboa Centro de biotecnologia vegetal, Lisboa Portugal, 19-28.
- Baky, M. H., Kamal, A. M., Elgindi, M. R., & Haggag, E. G. (2016).** A review on phenolic compounds from family Sapotaceae. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 5(2), 280.
- Berlyn, G. P., Miksche, J. P., & Sass, J. E. (1976).** Botanical microtechnique and cytochemistry. Iowa State University Press.
- Bracht, F., Conceição, G. C., Dos Santos, C. F. M. (2011).** A América conquista o mundo: uma história da disseminação das especiarias americanas a partir das viagens marítima do século XVI. *Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos*, 2,11-16.

- Broekaert, W. F. (1990).** An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. *Microbiology*, West Sussex, 69,55-60.
- Campbell, G., Mielke, M. S., Rabelo, G. R., & Da Cunha, M. (2018).** Key anatomical attributes for occurrence of *Psychotria schlechtendaliana* (Müll. Arg.) Müll. Arg.(Rubiaceae) in different successional stages of a tropical moist forest. *Flora*, 246, 33-41.
- Carlini, C. R., & Grossi-de-Sá, M. F. (2002).** Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon*, 40(11), 1515-1539.
- Carneiro, C. E., Almeida Jr, E. B., & Alves-Araujo, A. (2012).** Sapotaceae. Forzza, RC et al.
- Carneiro, C. E., Kutschenko, D. C., Valente, A. S. M., Barros, F. S. M., Messina, T. (2013).** Sapotaceae. In: Martinelli G & Moraes MA (eds.) Livro vermelho da flora do Brasil. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 956-967.
- Castro, M. D. M., Leitão-Filho, H. D. F., Monteiro, W. R. (1997).** Utilização de estruturas secretoras na identificação dos gêneros de Asteraceae de uma vegetação de cerrado. *Brazilian Journal of Botany*, 20,163-174.
- Castro, M. S., & Fontes, W. (2005).** Plant defense and antimicrobial peptides. *Protein and Peptide letters*, 12(1), 11-16.
- Demarco, D., & Castro, M. D.(2008).** Compostos fenólicos produzidos por estruturas secretoras em plantas: uma breve revisão. *Comunicações de produtos naturais* .
- Chamberlain, C. J. (1932).** *Methods in Plant Histology*. 5<sup>a</sup> ed. The University of Chicago Press, Chicago, USA, 416.
- Chanda, S., & Kaneria, M. (2011).** Indian nutraceutical plant leaves as a potential source of natural antimicrobial agents. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*, 2, 1251-1259.
- Cohn, J., Sessa, G., & Martin, G. B. (2001).** Innate immunity in plants. *Current opinion in immunology*, 13(1), 55-62.

- Cruz, L. P., Ribeiro, S. F. F., Carvalho, A. O., Vasconcelos, I. M., Rodrigues, R., Da Cunha, M., Gomes V. M. (2010)** Isolation and partial characterization of a novel lipid transfer protein (LTP) and antifungal activity of peptides from chilli pepper seeds. *Protein Pept Lett.* 17,311-8.
- Da Cunha, M., Costa, C. G., Machado, Raul, D., Miguens, F. C. (1998).** Distribution and Differentiation of the Laticifer System in *Chamaesyce thymifolia* (L.) Millsp.(Euphorbiaceae). *Acta Botanica Neerlandica*, Blackwell Science Ltda, Oxford, 47(2), 209-218.
- Dathe, M., Meyer J., Beyermann, M., Maul, B., Hoischen, C., Bienert. M. (2002)** General aspects of peptide selectivity towards lipid bilayers and cell membranes studied by variation of the structural parameters of amphipathic helical model peptides. *Biochim Biophys Acta.*1558,171-86
- David, R., Carde, J. P. (1964).** Coloration différentielle des inclusions lipidique et terpeniques des pseudophylles du Pin maritime au moyen du reactif Nadi. *C.R. Acad. Sci. Paris, Sér. D* 258, 1338-1340.
- de Magalhães Júnior, A. M. (2010).** Ácido abscísico e o estresse abiótico.
- de Paula PedrozaI, H., Ferreira, M. G., de Carvalho, J. G., Melo, K. D. A., Keller, K. M., & Soto-Blanco, M. M. M. B. (2015).** Concentrações de oleandrina nas folhas de *Nerium oleander* de diferentes cores da floração. *Ciência Rural*, 45(5), 864-866.
- Diz, M. S., Carvalho, A. O., Ribeiro S. F. F., Da Cunha, M., Beltramini, L., Rodrigues, R., Nascimento, V. V., Machado, O. L. T., Gomes, V. M. (2011).** Characterisation, immunolocalisation and antifungal activity of a lipid transfer protein from chilli pepper (*Capsicum annuum*) seeds with novel  $\alpha$ -amylase inhibitory properties. *Physiol Plantarum*,142,233-46.
- dos Santos Soares, A. M., & Machado, O. L. T. (2007).** Defesa de plantas: sinalização química e espécies reativas de oxigênio. *Revista Trópica–Ciências Agrárias e Biológicas*, 1(1), 10.
- Esau, K. (1974).** Anatomia de plantas com sementes. São Paulo: Edgard Blücher.

- Evert, R. F. (2013).** Anatomia das plantas de Esau. Meristemas, células e tecidos do corpo da planta: sua estrutura, função e desenvolvimento. 3ed. São Paulo: Blucher.
- Fabris, L. C., Peixoto, A. L. (2013).** Sapotaceae in Sandy Coastal Plain, Espírito Santo, Brazil. *Rodriguésia*, 64,265-283.
- Fahn, A. (1979).** Secretory tissues in plants. Academic Press Inc., London.
- Fayek, N. M., Monem, A. R. A., Mossa, M. Y., Meselhy, M. R., & Shazly, A. H. (2012).** Chemical and biological study of *Manilkara zapota* (L.) Van Royen leaves (Sapotaceae) cultivated in Egypt. *Pharmacognosy research*, 4(2), 85.
- Fenner, R., Betti, A. H., Mentz, L. A., Rates, S. M. K. (2006).** Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 42:369-394.
- Fernando, E. S., Bande, M. J., Piollo, R. A., Sopot, D. D., Dolotina, N. E., & Granert, W. G. (2009).** Dipterocarpaceae of Bohol Island, Philippines. *Asia Life Sciences*, 18(1), 121-138.
- Ferreira, R. B., Sara, M., Freitas R., Santos, C. N., Chen, Z., Batista, L. M., Duarte, J., Borges, A., Teixeira, A. R. (2007).** The role of plant defence proteins in fungal pathogenesis. *Molecular Plant Biology*, 8,677-700.
- Filho, C. H. A. M., Gomes, R. L. F., Rocha, M. M., Filho, F. R. F., Lopes, A. C. A. (2009).** Potencial produtivo de progênies de feijão-caupi com arquitetura ereta de planta. *Ciência Rural*, 39,348-354.
- Fischer, D. B. (1968).** Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. *Histochemie*, 16,92-96,
- Freitas, C. D., Silva, M. Z., Bruno-Moreno, F., Monteiro-Moreira, A. C., Moreira, R. A., Ramos, M. V. (2015).** New constitutive latex osmotin-like proteins lacking antifungal activity. *Plant Physiology and Biochemistry*, 96,45-52.
- Furtado, R. G., Sotão, H. M. P., Monteiro, J. S., & Brito, F. M. D. (2018).** First record for Brazil of *Maravalia bolivarensis* Y. Ono (Pucciniales) parasitizing *Manilkara* sp.(Sapotaceae). *Hoehnea*, 45(1), 129-133.

- Ganguly, A., Al Mahmud, Z., Uddin, M. M. N., Rahman, S. A., (2013).** In-vivo anti-inflammatory and anti-pyretic activities of Manilkara zapota leaves in albino Wistar rats. *Asian Pacific journal of tropical disease* 3, 301.
- Hagel, J. M., Yeung, E. C., Facchini, P. J. (2008).** Got Milk? The Secret Life of Laticifers. *Trends in Plants Science*, 13:631-639.
- Heaton, H. J. (1997).** A study of variation in chicozapote (Manilkara zapota). Thesis (Master). University of Califórnia, Riberside.
- Honda, M. (1971).** Contribuição ao estudo anatômico do lenho de cinco Sapotaceae da Amazônia. *Acta Amazonica*, 1(3), 71-83.
- Hummelbrunner, L. A., & Isman, M. B. (2001).** Acute, sublethal, antifeedant, and synergistic effects of monoterpenoid essential oil compounds on the tobacco cutworm, *Spodoptera litura* (Lep., Noctuidae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2), 715-720.
- Iawa Committee. (1989).** IAWA list of microscopic features for hardwood identification. *IAWA Bull. ns*, 10(3), 219-332.
- Islam, M. R., Parvin, M. S., Banu, M. R., Jahan, N., Das, N. (2013).** Triagem antibacteriana e fitoquímica de extratos etanólicos de folhas e cascas de Manilkara zapota. *Revista Internacional de Ciências Farmacêuticas*. 3 (6), 394-7.
- Jensen, W. A. (1962).** Botanical histochemistry: Principles and practice. W. H. Freeman, San Francisco, California, USA, 408.
- Kaneria, M., & Chanda, S. (2012).** Evaluation of antioxidant and antimicrobial properties of Manilkara zapota L.(chiku) leaves by sequential soxhlet extraction method. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(3), 1526-1533.
- Karnovsky, M. J. A. (1965).** formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, 27, 137-138.
- Kekwick, R. G. O. (2001).** Látex e laticíferos. *Encyclopedia of Life Science*. Nature Publishing Group, 1-6.
- Konno, K. (2011).** Látex vegetal e outros exsudatos como sistemas de defesa vegetal: papéis de várias substâncias químicas e proteínas de defesa nele contidas. *Fitochemistry* , 72 (13), 1510-1530.

- Koshlukova, S. E., Lloyd, T. L., Araujo, M. W. e Edgerton, M. (1999).** Salivary histatin 5 induces non-lytic release of ATP from *Candida albicans* leading to cell death. *J. Biol. Chem.* 274, 18872-18879.
- Kothari, V., Seshadri, S., Mehta, P. (2011).** Fractionation of antibacterial extracts of *Syzygium cumini* (Myrtaceae) seeds. *Research in Biotechnology*, 2,53-63.
- Kraus, J.E., Arduin, M. (1997).** Manual básico de métodos em morfologia vegetal vol. 1. Rio de Janeiro: Seropédica p:198.
- Lima, R. G. V. N., Lima, L. F., Ferreira, A. C., Araújo, J. S., Zickel, C. S. (2019).** Leaf Morphoanatomy of *Diploon Cronquist* (Sapotaceae Juss.) *Biota Neotropica*. 19(1)
- Machado, B. F. M. T., Fernandes J. A. (2011).** Óleos essenciais: aspectos gerais e usos em terapias naturais. *Cadernos Acadêmicos*, Tubarão, 3(2),105-127,
- Mahlberg, P. G. (1993).** Laticíferos: uma perspectiva histórica. *The Botanical Review* 59,1-23.
- Maia, V. 1979.** Técnica histológica. Atheneu, São Paulo.
- Mainieri, C., & Chimelo, J. P. (1989).** Fichas de características das madeiras brasileiras. Instituto de Pesquisas Tecnológicas, Divisão de Madeiras.
- Maor, R., & Shirasu, K. (2005).** The arms race continues: battle strategies between plants and fungal pathogens. *Current opinion in microbiology*, 8(4), 399-404.
- Marqui, S. R. D. (2007).** Estudo fitoquímico e busca de substâncias bioativas de *Chrysophyllum flexuosum* (Sapotaceae).
- Matsuzaki, K. (2009).** Control of cell selectivity of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1788(8), 1687-1692.
- Melfi, A. D. C. C. (2006).** Anatomia da madeira em Sapotaceae (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).
- Menezes, H. (2009).** Imunidade inata e específica em plantas. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, 30(2), 195-212.
- Menezes, N. L., Silva, D. da C., Melo-De-Pinna, G. F. de A. (2003).** Folha. In: ApezatoDa- Glória, B.; Carmello-Guerreiro, S.M. *Anatomia Vegetal Viçosa - MG*: Editora UFV. p. 303-311.
- Metcalf, C. R., & Chalk, L. (1950).** Anatomy of the Dicotyledons: leaves, stem, and wood, in relation to taxonomy, with notes on economic uses. *Anatomy of the*

Dicotyledons: leaves, stem, and wood, in relation to taxonomy, with notes on economic uses.

**Metcalf, C.R. & Chalk, L. (1983).** Anatomy of the Dicotyledons. Volume II: Wood Structure and Conclusion of the General Introduction. Second edition. Oxford science publications.

**Metcalf, C.R., Chalk, L. (1972).** Anatomy of dicotyledons. Vol. I. Oxford: Clarendon Press.

**Mewara, D., Tamakuwala, H., & Desai, H. (2017).** Antifungal activity and phytochemical screening from leaf extract of *Manilkara zapota* and *Averrhoa carambola*. *BMR Phytomed*, 3, 1-9

**Miguel, E. D. C., Moraes, D. G. D., & Cunha, M. D. (2009).** Stipular colleters in *Psychotria nuda* (Cham. & Schltdl.) Wawra (Rubiaceae): micromorphology, anatomy and crystals microanalysis. *Acta Botanica Brasilica*, 23(4), 1034-1039.

**Milind, P. (2015).** Preeti. Chickoo: A wonderful gift from nature. *Int. J. Res. Ayurveda Pharm*, 6,544-550.

**Miranda, G. V., Coimbra, R. R., Godoy, C. L., Souza, L. V., Guimarães. L. J. M., Melo A. V., (2003).** Potencial de melhoramento e divergência genética de cultivares de milho-pipoca. *Pesquisa agropecuária brasileira* 38,6 81-688.

**Mithöfer A, Boland W. (2012).** Plant defense against herbivores: chemical aspects. *Annu. Rev. Plant Biol*, 63, 431-50.

**Mônico, A. Z., Silva, L. D. A., Dutra, V. F., Freitas, J., Alves-Araújo, A. (2017).** New records of *Pouteria macrocarpa* (Sapotaceae) from the Brazilian Atlantic forest. *Rodriguésia*, 68, 1493-1498.

**Monteiro, M. H. D. A., Andreato, R. H. P., & Neves, L. J. (2007).** Estruturas secretoras em Sapotaceae. *Pesquisas, Botânica*, 58(1), 253-262.

**Moraes, T. M. D. S., Rabelo, G. R., Alexandrino, C. R., Silva Neto, S. J. D., & Da Cunha, M. (2011).** Comparative leaf anatomy and micromorphology of *Psychotria* species (Rubiaceae) from the Atlantic Rainforest. *Acta Botanica Brasilica*, 25(1), 178-190.

- Moraes, M. A., Martinelli, G., Moraes, M. A.(Orgs.) (2012).** Livro Vermelho da Flora do Brasil. Rio de Janeiro. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 956–967.
- Moura, B. I. D. V., Araújo, B. P. L. D., Sá, R. D., & Randau, K. P. (2019).** Pharmacobotanical study of Manilkara zapota (L.) P. Royen (Sapotaceae). Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 55.
- Muniz, L.F., Bomboa, A.B., Filartigaa, A.L. & Appezzato-Da-Glória, B. (2018).** Can climate and soil conditions change the morpho-anatomy among individuals from different localities? A case study in *Aldama grandiflora* (Asteraceae). Braz. J. Biol. 78(4),706-717.
- Mustard, M. J., & M. J. M. (1982).** Origin and distribution of secondary articulated anastomosing laticifers in Manilkara zapota van Royen (Sapotaceae).
- Nagani, K., Kaneria, M., Chanda, S. (2012).** Pharmacognostic studies on the leaves of Manilkara zapota L. (Sapotaceae). Pharmacognosy Journal. 4. 38–41.
- Nair, R., & Chanda, S. (2008).** Antimicrobial activity of Terminalia catappa, Manilkara zapota and Piper betel leaf extract. Indian journal of pharmaceutical sciences, 70(3), 390.
- Nicot, N., Hausman, J. F., Hoffmann, L., & Evers, D. (2005).** Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. Journal of experimental botany, 56(421), 2907-2914.
- Osman, M. A., Aziz, M. A., Habib, M. R., & Karim, M. R. (2011).** Antimicrobial investigation on Manilkara zapota (L.) P. Royen. Int J Drug Dev Res, 3(1), 185-190.
- Paulete, J. & Beçak W. (1976).** Técnicas de citologia e histologia. Vol. 1 e 2. Livros Técnicos e Científicos. Editora S.A, 574.
- Pearse, A. G. E. (1980).** Histochemistry theoretical and applied, vol. 2, 4th ed. Churchill Livingstone, Edinburgh, UK.
- Pennington, T. D. (1990).** Flora neotropica. Monograph 52. Sapotaceae. New York Botanical Garden for the Organization for Flora Neotropica.

- Pessoa, M. J. G., Guisoni, J. J., Simioni, P. F., Pireda, S., Xavier, V., Silva, I. V. D. (2019).** Leaf structural traits of three species of *Qualea* Mart.(Vochysiaceae) in a cerrado area in the Cerrado-Amazonian Forest transition. *Ciência Florestal*, 29(3), 1082-1089.
- Pinho, J. V. S., Santos, J. U. M. (2017).** Levantamento da Família Sapotaceae Juss. (Ericales) na Volta Grande do Rio Xingu, Pará-Brasil. *Biota Amazônia*, 7,8-16.
- Pireda, S., da Silva Oliveira, D., Borges, N. L., do Amaral Ferreira, G., Barroso, L. M., Simioni, P., Da Cunha, M. (2019).** Acclimatization capacity of leaf traits of species co-occurring in restinga and seasonal semideciduous forest ecosystems. *Environmental and Experimental Botany*, 164, 190-202.
- Ramos, M. V., Freitas, C. D. T., Morais, F. S., Prado, E., Medina, M. C., Demarco, D. (2020).** Plant Latex and Latex-Borne Defense. In: Robert Nawrot. (Org.). *Advances in Botanical Research*. 1ed.: Elsevier,93, 1-25.
- Ramos, M. V., Aguiar, C. V., Melo, V. M. M., Mesquita, R. O., Silvestre, P. P., Oliveira, J. S., Alencar, N. M. N. (2007).** Respostas imunológicas e alergênicas induzidas por frações de látex de *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. *Journal of ethnopharmacology*, 111,115-122.
- Ramos, M. V., Demarco, D., da Costa Souza, I. C., de Freitas, C. D. T. (2019).** Laticíferos, látex e seu papel na defesa das plantas. *Tendências em ciência de plantas*, 24, 553-567.
- Reeve, R. M. (1951).** Histochemical tests for polyphenols in plant tissues. *Stain technology*. Western Regional Research Laboratory, Albany, Califórnia 26(2), 91-96.
- Reignault, P., Sancholle, M. (2005)** Plant–pathogen interactions: will the understanding of common mechanisms lead to the unification of concepts? *Comptes rendus biologiques*, 328,821-833.
- Repetto, R., (1988).** *Ter forest the trees? Government Policies and the Misuse of Forest Resources*. World Resourcers Intitute, Washington, Dc,105.
- Ribeiro, S. F., Taveira, G. B., Carvalho, A. O., Dias, G. B., Da Cunha, M., Santa-Catarina, C., Gomes, V. M. (2012).** Antifungal and other biological activities of two 2S albumin-homologous proteins against pathogenic fungi. *The protein journal*, 31(1), 59-67.

- Rocha, V. L. P., de Souza Fagundes, O., Rocha, V. A. P., Vicente, R. E., Junior, N. G. R., Yamashita, O. M., da Silva, I. V. (2020).** Anatomia comparada, histoquímica e fitoquímica dos órgãos vegetativos de espécies do gênero *Ocimum* L.(Lamiaceae). *Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais*, 11(2), 266-277.
- Rodríguez-García, C. M., Ruiz-Ruiz, J. C., Peraza-Echeverría, L., Peraza-Sánchez, S. R., Torres-Tapia, L. W., Pérez-Brito, D., Ramón-Sierra, J. M. (2019).** Antioxidant, antihypertensive, anti-hyperglycemic, and antimicrobial activity of aqueous extracts from twelve native plants of the Yucatan coast. *PloS one*, 14(3).
- São João, R. E., & Raga, A. (2016).** Mecanismo de defesa das plantas contra o ataque de insetos sugadores. Documento Técnico, Instituto Biológico- APTA ,23, 1-13.
- Schägger, H., von Jagow, G., (1987).** Tricine-sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal biochemistry* 166,368-79.
- Segura, A., Moreno, M., Madueño, F., Molina, A., & García-Olmedo, F. (1999).** Snakin-1, a peptide from potato that is active against plant pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 12(1), 16-23.
- Shields, L. M. (1950).** Leaf xeromorphy as related to physiological and structural influences. *Botanical Review* 19,399-447.
- Silva Junior, J. F. D., Bezerra, J. E. F., Lederman, I. E., & Moura, R. J. M. D. (2014).** O sapotizeiro no Brasil. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36(1), 86-99.
- Silva, R. J. F., Potiguara, R. C. D. V. (2008).** Aplicações taxonômicas da anatomia foliar de espécies amazônicas de *Oenocarpus* Mart.(Arecaceae). *Acta Botanica Brasilica*, 22(4), 999-1014.
- Silva, R. J. F., Aguiar-Dias, A. C. A. D., & Mendonça, M. S. D. (2014).** Rosetas e concreções cristalinas silicificadas em *Piper* (Piperaceae): registros inéditos de macropadrões. *Acta Amazonica*, 44(4), 435-446.
- Simões, C. M. O., Schenkel, E. P., De Mello, J. C. P., Mentz, L. A., Petrovick, P. R. (2017).** Farmacognosia: do produto natural ao medicamento. Porto Alegre. *Artmed*: 92-103.

- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, M. M., Olson, B. J., Klenk, D. C. (1985).** Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 15,76-85.
- Solereider, H., & Scott, D. H. (1908).** Systematic anatomy of the dicotyledons: a handbook for laboratories of pure and applied botany (Vol. 2). Clarendon Press.
- Somavilla, N. S., Ribeiro, D. G. (2011).** Análise comparativa da anatomia foliar de Melastomataceae em ambiente de vereda e cerrado sensu stricto. *Acta Botânica Brasilica* 25, 764-775.
- Souza, V. C., Lorenzi H. (2012).** Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III. 3ª ed. Instituto Plantarum, Nova Odessa, São Paulo, 768.
- Santos, M. C. A., Freitas, S. D. P., Aroucha, E. M. M., Santos, A. L. A. (2009).** Anatomia e histoquímica de folhas e raízes de vinca (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don). *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, 9(1), 24-30.
- Stermitz, F. R., Lorenz, P., Tawara, J. N., Zenewicz, L. A., Lewis, K. (2000).** Sinergia em uma planta medicinal: ação antimicrobiana da berberina potencializada pelo 5'-metoxi-hidocarbon, um inibidor da bomba multidrogas. *Anais da Academia Nacional de Ciências* , 97 (4), 1433-1437.
- Svendsen, A. B., Verpoorte R. (1983).** Chromatography of alkaloids. Elsevier, New York, New York, USA, 531.
- Taveira, G.B., Mathias, L.S., da Motta, O.V., Machado, O.L., Rodrigues, R., Carvalho, A.O., Gomes, V. M. (2014).** Peptídeos semelhantes à tionina das frutas *Capsicum annuum* com alta atividade contra bactérias e leveduras patogênicas humanas. *Peptide Science* , 102 (1), 30-39.
- Thevissen, K. F. R., Terras. W. F. B. (1999).** Permeabilization of fungal membranes by plant defensins inhibits fungal growth. *Applied Environmental Microbiology*, 65,5451-5458.
- Vylkova, S., Nayyar, N., Li, W., Edgerton, M. (2007).** Human  $\beta$ -defensins kill *Candida albicans* in an energy-dependent and salt-sensitive manner without causing membrane disruption. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 154-161.

**Wasternack, C. (2007).** Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals of botany*, 100(4), 681-697.