

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: CAMPO PROMISSOR EM PESQUISA 3

JOSÉ MAX BARBOSA DE OLIVEIRA JUNIOR
LENIZE BATISTA CALVÃO
(ORGANIZADORES)



CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: CAMPO PROMISSOR EM PESQUISA 3

JOSÉ MAX BARBOSA DE OLIVEIRA JUNIOR
LENIZE BATISTA CALVÃO
(ORGANIZADORES)



2020 by Atena Editora

Copyright © Atena Editora

Copyright do Texto © 2020 Os autores

Copyright da Edição © 2020 Atena Editora

Editora Chefe: Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

Diagramação: Geraldo Alves

Edição de Arte: Lorena Prestes

Revisão: Os Autores



Todo o conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição *Creative Commons*. Atribuição 4.0 Internacional (CC BY 4.0).

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores. Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

Conselho Editorial

Ciências Humanas e Sociais Aplicadas

Profª Drª Adriana Demite Stephani – Universidade Federal do Tocantins
Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas
Prof. Dr. Alexandre Jose Schumacher – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso
Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Antonio Gasparetto Júnior – Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília
Prof. Dr. Carlos Antonio de Souza Moraes – Universidade Federal Fluminense
Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Cristina Gaio – Universidade de Lisboa
Profª Drª Denise Rocha – Universidade Federal do Ceará
Prof. Dr. Deyvison de Lima Oliveira – Universidade Federal de Rondônia
Prof. Dr. Edvaldo Antunes de Farias – Universidade Estácio de Sá
Prof. Dr. Eloi Martins Senhora – Universidade Federal de Roraima
Prof. Dr. Fabiano Tadeu Grazioli – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Profª Drª Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionele delle Figlie di Maria Ausiliatrice
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense
Profª Drª Keyla Christina Almeida Portela – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso
Profª Drª Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Marcelo Pereira da Silva – Universidade Federal do Maranhão
Profª Drª Miranilde Oliveira Neves – Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará
Profª Drª Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Rita de Cássia da Silva Oliveira – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Sandra Regina Gardacho Pietrobon – Universidade Estadual do Centro-Oeste
Profª Drª Sheila Marta Carregosa Rocha – Universidade do Estado da Bahia
Prof. Dr. Rui Maia Diamantino – Universidade Salvador
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. William Cleber Domingues Silva – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

Ciências Agrárias e Multidisciplinar

Prof. Dr. Alexandre Igor Azevedo Pereira – Instituto Federal Goiano
Prof. Dr. Antonio Pasqualetto – Pontifícia Universidade Católica de Goiás
Profª Drª Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná

Profª Drª Diocléa Almeida Seabra Silva – Universidade Federal Rural da Amazônia
Prof. Dr. Écio Souza Diniz – Universidade Federal de Viçosa
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Fágner Cavalcante Patrocínio dos Santos – Universidade Federal do Ceará
Profª Drª Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Prof. Dr. Júlio César Ribeiro – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Profª Drª Lina Raquel Santos Araújo – Universidade Estadual do Ceará
Prof. Dr. Pedro Manuel Villa – Universidade Federal de Viçosa
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará
Profª Drª Talita de Santos Matos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof. Dr. Tiago da Silva Teófilo – Universidade Federal Rural do Semi-Árido
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas

Ciências Biológicas e da Saúde

Prof. Dr. André Ribeiro da Silva – Universidade de Brasília
Profª Drª Anelise Levay Murari – Universidade Federal de Pelotas
Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás
Prof. Dr. Edson da Silva – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
Profª Drª Eleuza Rodrigues Machado – Faculdade Anhanguera de Brasília
Profª Drª Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina
Prof. Dr. Ferlando Lima Santos – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria
Prof. Dr. Igor Luiz Vieira de Lima Santos – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Profª Drª Magnólia de Araújo Campos – Universidade Federal de Campina Grande
Profª Drª Mylena Andréa Oliveira Torres – Universidade Ceuma
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federaci do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Paulo Inada – Universidade Estadual de Maringá
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande

Ciências Exatas e da Terra e Engenharias

Prof. Dr. Adélio Alcino Sampaio Castro Machado – Universidade do Porto
Prof. Dr. Alexandre Leite dos Santos Silva – Universidade Federal do Piauí
Prof. Dr. Carlos Eduardo Sanches de Andrade – Universidade Federal de Goiás
Profª Drª Carmen Lúcia Voigt – Universidade Norte do Paraná
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Fabrício Menezes Ramos – Instituto Federal do Pará
Prof. Dr. Juliano Carlo Rufino de Freitas – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. Marcelo Marques – Universidade Estadual de Maringá
Profª Drª Neiva Maria de Almeida – Universidade Federal da Paraíba
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista

Conselho Técnico Científico

Prof. Msc. Abrãao Carvalho Nogueira – Universidade Federal do Espírito Santo
Prof. Msc. Adalberto Zorzo – Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza
Prof. Dr. Adailson Wagner Sousa de Vasconcelos – Ordem dos Advogados do Brasil/Seccional Paraíba
Prof. Msc. André Flávio Gonçalves Silva – Universidade Federal do Maranhão
Profª Drª Andreza Lopes – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento Acadêmico
Profª Msc. Bianca Camargo Martins – UniCesumar
Prof. Msc. Carlos Antônio dos Santos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof. Msc. Cláudia de Araújo Marques – Faculdade de Música do Espírito Santo
Prof. Msc. Daniel da Silva Miranda – Universidade Federal do Pará
Profª Msc. Dayane de Melo Barros – Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Edwaldo Costa – Marinha do Brasil
 Prof. Msc. Eliel Constantino da Silva – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita
 Prof. Msc. Gevair Campos – Instituto Mineiro de Agropecuária
 Prof. Msc. Guilherme Renato Gomes – Universidade Norte do Paraná
 Prof^a Msc. Jaqueline Oliveira Rezende – Universidade Federal de Uberlândia
 Prof. Msc. José Messias Ribeiro Júnior – Instituto Federal de Educação Tecnológica de Pernambuco
 Prof. Msc. Leonardo Tullio – Universidade Estadual de Ponta Grossa
 Prof^a Msc. Lilian Coelho de Freitas – Instituto Federal do Pará
 Prof^a Msc. Liliani Aparecida Sereno Fontes de Medeiros – Consórcio CEDERJ
 Prof^a Dr^a Lívia do Carmo Silva – Universidade Federal de Goiás
 Prof. Msc. Luis Henrique Almeida Castro – Universidade Federal da Grande Dourados
 Prof. Msc. Luan Vinicius Bernardelli – Universidade Estadual de Maringá
 Prof. Msc. Rafael Henrique Silva – Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados
 Prof^a Msc. Renata Luciane Polsaque Young Blood – UniSecal
 Prof^a Msc. Solange Aparecida de Souza Monteiro – Instituto Federal de São Paulo
 Prof. Dr. Welleson Feitosa Gazel – Universidade Paulista

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)**

C569 Ciências biológicas [recurso eletrônico] : campo promissor em pesquisa 3 / Organizadores José Max Barbosa de Oliveira Junior, Lenize Batista Calvão. – Ponta Grossa, PR: Atena Editora, 2020. – (Ciências Biológicas. Campo Promissor em Pesquisa; v. 3)

Formato: PDF
 Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader
 Modo de acesso: World Wide Web
 Inclui bibliografia
 ISBN 978-85-7247-925-7
 DOI 10.22533/at.ed.257201601

1. Ciências biológicas – Pesquisa – Brasil. I. Oliveira Júnior, José Max Barbosa de. II. Calvão, Lenize Batista. III. Série.

CDD 570

Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422

Atena Editora
 Ponta Grossa – Paraná - Brasil
www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br

APRESENTAÇÃO

O E-book “**Ciências Biológicas: Campo Promissor em Pesquisa 3**” é composto por 32 capítulos. Nesse volume, são abordados distintos tópicos nas áreas de biotecnologia, citologia, genética, saúde humana, educação, importância de condições ambientais que as espécies estão inseridas, bem como, potenciais espécies invasoras que podem ser nocivas ao meio ambiente. No cenário atual de mudanças ambientais correntes e avanços tecnológicos é extremamente importante o uso adequado de técnicas em cada área. Interações entre espécies são difíceis de serem mensuradas na natureza. Mutualismo é um tipo de relação simbiótica essencial, em que ambos os organismos se beneficiam na relação. Estudos que abordam essa temática são muito relevantes para compreensão da relação de dependência ou não que os organismos estabelecem para se manterem em um determinado ambiente.

O E-book também traz capítulos que abordam estratégias didáticas para alunos da educação básica e da graduação. O ensino de ciências precisa ser cada vez mais divulgado e exige interatividade e criatividade para seu sucesso em sala de aula, o uso de modelos confeccionados ou a própria produção de material manual pode auxiliar no aprendizado dos jovens.

O tema sobre saúde humana se encontra em pauta trazendo o uso de células tronco para recuperação do tecido lesionado por queimadura, esse é um avanço que pode ser continuamente avaliado. Outro fator essencial associado a saúde humana é a manipulação de produtos altamente comercializáveis, como açaí na região amazônica, o qual sugere a pasteurização como tratamento térmico pelas indústrias produtoras.

As aplicações de técnicas adequadas de biotecnologia que envolvem transgenia, genética com a busca de marcadores e melhoramento genético e parasitologia são extremamente importantes para uso de produtos eficazes em diversas áreas. Adicionalmente, análises citogenéticas, histoquímicas e toxicológicas fornecem informações que são relevantes e inovadoras para contemporaneidade.

Convidamos os leitores a lerem os capítulos desse livro com muita atenção, e desejamos que cada conteúdo abordado aqui seja útil na vida acadêmica. A linguagem acessível e no idioma português facilita o acesso tanto para grupos de pesquisas como para jovens pesquisadores da área científica.

Excelente leitura!

José Max Barbosa de Oliveira Junior
Lenize Batista Calvão

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
A OCORRÊNCIA DE <i>Eichhornia crassipes</i> , ESPÉCIE PERIGOSA E INVASORA EM UM LAGO OXBOW DA AMAZÔNIA SUL-OCIDENTAL	
João Lucas Correa de Souza Jocilene Braga dos Santos Erlei Cassiano Keppeler	
DOI 10.22533/at.ed.2572016011	
CAPÍTULO 2	12
A UTILIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO NA TERAPIA DE REPARAÇÃO TECIDUAL DE QUEIMADURAS: CÉLULAS ADULTAS PROVENIENTES DO TECIDO ADIPOSEO E DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS	
Leandro Dobrachinski Sílvio Terra Stefanello Caren Rigon Mizdal Darlaine Alves da Silva Vitória Silva Ferreira	
DOI 10.22533/at.ed.2572016012	
CAPÍTULO 3	19
ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE POLPAS DE AÇAÍ COMERCIALIZADAS NO MUNICÍPIO DE BARRA DO BUGRES-MT	
Juliane Pereira de Oliveira Carine Schmitt Gregolin Caloi Carla Andressa Lacerda de Oliveira Rosimeire Oenning da Silva	
DOI 10.22533/at.ed.2572016013	
CAPÍTULO 4	27
ANÁLISE IN SILICO DO GENOMA DA MANDIOCA (<i>Manihot esculenta</i> CRANTZ) PARA O EXTREMO SUL DA BAHIA: IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES E GENES CANDIDATOS PARA ESTUDO DE EXPRESSÃO GÊNICA	
Tamy Alves de Matos Rodrigues Lívia Santos Lima Lemos Breno Meirelles Costa Brito Passos Jeilly Vivianne Ribeiro da Silva Berbert de Carvalho	
DOI 10.22533/at.ed.2572016014	
CAPÍTULO 5	37
AÇÃO DE EXTRATOS E BIOCÓMPOSTOS DE <i>Himatanthus lancifolius</i> (Müll. Arg.) Woodson NO CONTROLE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR E INDUÇÃO DE APOPTOSE EM CÉLULAS CULTIVADAS DE MELANOMA MURINO B16-F10	
Lucimar Pereira de França Silvana Gaiba Elias Jorge Muniz Seif Flávia Costa Santos Ana Carolina Moraes Fernandes Luiz Alberto Mattos Silva Jerônimo Pereira de França Lydia Masako Ferreira	

Alba Lucilvânia Fonseca Chaves

DOI 10.22533/at.ed.2572016015

CAPÍTULO 6 49

ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DE COMPOSTOS FTALIMÍDICOS

João Ricardhis Saturnino de Oliveira
Vera Cristina Oliveira de Carvalho
Vera Lúcia de Menezes Lima

DOI 10.22533/at.ed.2572016016

CAPÍTULO 7 59

AValiação de técnicas quantitativas e qualitativas no diagnóstico de parasitologia

Elizandra Landolpho Costa Pedrosa
Ana Luiza do Rosário Palma
Simone Aparecida Biazzi de Lapena
Ana Gabriela Rodrigues
Andrezza Vaz Miao
Angelica Kimiko Kawasaka
Bruna Patrícia Menezes da Silva
Michele de Oliveira Maciel de Holanda

DOI 10.22533/at.ed.2572016017

CAPÍTULO 8 67

AValiação do potencial anti-inflamatório do extrato hidroalcoólico da casca da Luehea divaricata

Jadiel de Abreu Pimenta Lins
Antonio Carlos Romão Borges
Aruanã Joaquim M. Costa R. Pinheiro
Lídio Gonçalves Lima Neto
Marilene Oliveira da Rocha Borges

DOI 10.22533/at.ed.2572016018

CAPÍTULO 9 100

CHEMICAL MANAGEMENT OF *Bidens pilosa* (L.) and *Euphorbia heterophylla* (L.) AND SEED GERMINATION IN GENETICALLY MODIFIED SOYBEAN

André Luiz de Souza Lacerda
Edgar Gomes Ferreira de Beauclair
Daniel Andrade de Siqueira Franco
Luis D. Honma
Marcus Barifouse Matallo

DOI 10.22533/at.ed.2572016019

CAPÍTULO 10 114

CITOQUÍMICA E VIABILIDADE POLÍNICA DE *Theobroma speciosum* Willd. ex Spreng (*Malvaceae*)

Uéilton Alves de Oliveira
Alex Souza Rodrigues
Elisa dos Santos Cardoso
Eliane Cristina Moreno de Pedri
Juliana de Freitas Encinas Dardengo
Patrícia Ana de Souza Fagundes

Rosimeire Barboza Bispo
Ana Aparecida Bandini Rossi

DOI 10.22533/at.ed.25720160110

CAPÍTULO 11 124

COMO ISOLAR PROTEÍNAS APOPLÁSTICAS: UMA ESTRATÉGIA DE PESQUISA DA INTERAÇÃO PLANTA-PATÓGENO

Ivina Barbosa de Oliveira
Carlos Priminho Pirovani
Karina Peres Gramacho
Juliano Oliveira Santana

DOI 10.22533/at.ed.25720160111

CAPÍTULO 12 145

DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE INDIVÍDUOS DE *Theobroma speciosum* Willd. ex Spreng (*Malvaceae*) EM PARQUE URBANO FLORESTAL

Juliana de Freitas Encinas Dardengo
Uéilton Alves de Oliveira
Tatiane Lemos Varella
Greiciele Farias da Silveira
Maicon Douglas Arenas de Souza
Kelli Évelin Muller Zortea
Ana Aparecida Bandini Rossi

DOI 10.22533/at.ed.25720160112

CAPÍTULO 13 157

EFEITO DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE A GERMINAÇÃO DE CONÍDIOS E CRESCIMENTO MICELIAL DE FUNGO DA ANTRACNOSE – *Colletotrichum acutatum*

Gabriela Gonçalves Nunes
Guilherme Feitosa do Nascimento
Lélia Cristina Tenório Leoi Romeiro

DOI 10.22533/at.ed.25720160113

CAPÍTULO 14 169

ESTRUTURA GENÉTICA DE MANDIOCAS CULTIVADAS NA AMAZÔNIA NORTE MATO-GROSSENSE

Auana Vicente Tiago
Ana Aparecida Bandini Rossi
Eliane Cristina Moreno de Pedri
Fernando Saragosa Rossi
Vinicius Delgado da Rocha
Joameson Antunes Lima
Eulalia Soler Sobreira Hoogerheide
Larissa Lemes dos Santos
Elisa dos Santos Cardoso
Sérgio Alessandro Machado Souza

DOI 10.22533/at.ed.25720160114

CAPÍTULO 15 180

ESTUDO MORFOLÓGICO E HISTOQUÍMICO DE *Adiantum latifolium* Lam. (PTERIDACEAE, PTERIDOPHYTA) OCORRENTE NO CAMPUS DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ – UESC – ILHÉUS – BA

Matheus Bomfim da Cruz
Alba Lucilvânia Fonseca Chaves
Aline Oliveira da Conceição
Letícia de Almeida Oliveira
Juliana Silva Villela
Jerônimo Pereira de França
Lucimar Pereira de França

DOI 10.22533/at.ed.25720160115

CAPÍTULO 16 191

ESTUDO DE MORFOLOGIA E HISTOQUÍMICA DA ESPÉCIE *Microgramma vacciniifolia* (Langsd. & Fisch.) Copel, *Polypodiaceae* - *pteridófita* - CORRENTE NO CAMPUS DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ(UESC)

Juliana Silva Villela
Alba Lucilvânia Fonseca Chaves
Letícia de Almeida Oliveira
Matheus Bomfim da Cruz
Aline Oliveira da Conceição
Jerônimo Pereira de França
Lucimar Pereira de França

DOI 10.22533/at.ed.25720160116

CAPÍTULO 17 202

ASPECTOS HISTOLÓGICOS DE SUSPENSÕES CELULARES DE DENDEZEIRO *Elaeis guineensis* Jacq.

Marlúcia Souza Pádua Vilela
Raissa Silveira Santos
Jéssica de Castro e Carvalho
Vanessa Cristina Stein
Luciano Vilela Paiva

DOI 10.22533/at.ed.25720160117

CAPÍTULO 18 218

HISTOQUÍMICA, ATIVIDADE CITOTÓXICA E MELANOGÊNICA DAS FLORES DE *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers EM CÉLULAS DE MELANOMA MURINO B16-F10 EXPOSTA À RADIAÇÃO UVA E UVC

Elias Jorge Muniz Seif
Alba Lucilvânia Fonseca Chaves
Silvana Gaiba
Bruna Bomfim dos Santos
Ana Carolina Morais Fernandes
Luiz Alberto Mattos Silva
Lydia Masako Ferreira
Jerônimo Pereira de França
Lucimar Pereira de França

DOI 10.22533/at.ed.25720160118

CAPÍTULO 19	231
IMPLEMENTAÇÃO DO ENSAIO TOXICOLÓGICO UTILIZANDO <i>Artemia salina</i> : DETERMINAÇÃO DA LC ₅₀ DO PINHÃO E DA GOIABA SERRANA	
Gabriele da Silva Santos Marcel Piovezan	
DOI 10.22533/at.ed.25720160119	
CAPÍTULO 20	241
INVESTIGAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DA DIABETES MELLITUS NO BRASIL	
Isabela Santos Lima Beatriz Júlia Pimenta Nathália Muricy Costa Viviane Francisco dos Santos Bruna Cristina Campos Pereira Jéssica dos Santos Fernandes Maristela Lúcia Soares Campos Eloisa Araújo de Souza Ketlin Lorraine Barbosa Silva Izabel Mendes de Souza Iara Macário Silverio Marianne Lucena da Silva	
DOI 10.22533/at.ed.25720160120	
CAPÍTULO 21	250
MORFOLOGIA DA TRAQUEIA E RAMIFICAÇÃO BRONQUICA DE <i>Megaceryle torquata</i> (LINNAEUS, 1766) (ORDEM CORACIIFORME, FAMÍLIA <i>Alcedinidae</i>), MARTIM-PESCADOR-GRANDE	
Thaysa Costa Hurtado Gerlane de Medeiros Costa Áurea Regina Alves Ignácio Manoel dos Santos Filho	
DOI 10.22533/at.ed.25720160121	
CAPÍTULO 22	258
MUTUALISMO ENTRE A MACROALGA <i>Chara vulgaris</i> Linnaeus 1753 e a MACRÓFITA AQUÁTICA <i>Lemna cf. valdiviana</i> Phil, NA ÉPOCA DA ENCHENTE, MÂNCIO LIMA, ACRE	
Jocilene Braga dos Santos João Lucas Correa de Souza Erlei Cassiano Keppeler	
DOI 10.22533/at.ed.25720160122	
CAPÍTULO 23	266
PRODUTOS NATURAIS APLICADOS COMO FOTOSSENSIBILIZADORES NA TERAPIA FOTODINÂMICA: UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
Beatriz Santana Rocha Cláudia Sampaio de Andrade Lima Ricardo Yara	
DOI 10.22533/at.ed.25720160123	

CAPÍTULO 24 279

O USO DE MODELOS NO PROCESSO ENSINO/APRENDIZAGEM APLICADOS À PARASITOLOGIA E ENTOMOLOGIA

Sílvia Maria Santos Carvalho
Kaique Santos Reis
Raquel dos Santos Damasceno
Juliana Almeida da Silva

DOI 10.22533/at.ed.25720160124

CAPÍTULO 25 285

PRODUÇÃO DE MATERIAL DIDÁTICO HISTOLÓGICO PARA OS CURSOS DE GRADUAÇÃO DA ÁREA DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ

Krisnayne Santos Ribeiro
Hudson Sá Sodré
Rhuan Victor Pereira Morais
Ana Luísa Silva Costa
Iuri Prates Souza
Aparecida do Carmo Zerbo Tremacoldi
Tania Barth

DOI 10.22533/at.ed.25720160125

CAPÍTULO 26 292

SINDROMES HIPERTENSIVAS NA GRAVIDEZ

Ana Patrícia Fonseca Coelho Galvão
Benedita Célia Leão Gomes
Joelma de Jesus Oliveira
Keile de Kassia de Oliveira Mendes

DOI 10.22533/at.ed.25720160126

CAPÍTULO 27 299

TOXICOLOGIA ORAL AGUDA DE *Bacillus thuringiensis* EM RATOS WISTAR

Shana Letícia Felice Wiest
Harry Luiz Pilz Júnior
Natascha Horn
Diouneia Lisiane Berlitz
Lídia Mariana Fiuza

DOI 10.22533/at.ed.25720160127

CAPÍTULO 28 312

UTILIZAÇÃO DE METODOLOGIAS ALTERNATIVAS NA PRÁTICA DE ENSINO DE BIOQUÍMICA: UMA EXPERIÊNCIA NO ENSINO SUPERIOR

Lázaro de Sousa Fideles
Maria Lucianny Lima Barbosa
João Vitor da Silva Alves
Maria de Fátima Faustino Araújo
Amanda Alves Feitosa
Luciene Ferreira de Lima
Cleidivan Afonso de Brito
Claudio Silva Teixeira
Gilberto Santos Cerqueira
João Antônio Leal de Miranda

DOI 10.22533/at.ed.25720160128

CAPÍTULO 29	323
A RELEVÂNCIA DA IMAGINOLOGIA TORÁCICA NA INVESTIGAÇÃO DE METÁSTASE EM CADELAS COM NEOPLASIAS MAMÁRIAS	
Vera Lúcia Teodoro dos Santos	
Rosângela Silqueira Hickson Rios	
Vinicius dos Reis Silva	
Larissa Cristine Lopes Soares	
DOI 10.22533/at.ed.25720160129	
CAPÍTULO 30	334
EFEITOS GENOTÓXICOS EM TÉTRADES DE <i>Tradescantia pallida</i> INDUZIDOS POR POLUENTES ATMOSFÉRICOS NA CIDADE DE JOINVILLE, SANTA CATARINA, BRASIL	
Bruna Tays Hartelt	
Valéria Cristina Rufo Vetorazzi	
DOI 10.22533/at.ed.25720160130	
CAPÍTULO 31	353
GENOTIPAGEM DO CYP2C9 PARA ENSAIOS FARMACOGENÉTICOS A PARTIR DE AMOSTRAS DE SALIVA: ESTUDO PILOTO	
Bruna Bolani	
Gabriela de Moraes Oliveira	
Giovana Maria Weckwerth	
Lohayne Berlato Ferrari	
Núbia Vieira Alves	
Thiago José Dionísio	
Flávio Augusto Cardoso de Faria	
Carlos Ferreira dos Santos	
Adriana Maria Calvo	
DOI 10.22533/at.ed.25720160131	
SOBRE OS ORGANIZADORES	364
ÍNDICE REMISSIVO	365

COMO ISOLAR PROTEÍNAS APOPLÁSTICAS: UMA ESTRATÉGIA DE PESQUISA DA INTERAÇÃO PLANTA-PATÓGENO

Data de aceite: 12/12/2019

Data de submissão: 28/10/2019

Ivina Barbosa de Oliveira

Universidade Estadual de Santa Cruz,
Departamento de Ciências Biológicas, Ilhéus-
Bahia

Link para o Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/1876790483636590>

Carlos Priminho Pirovani

Universidade Estadual de Santa Cruz,
Departamento de Ciências Biológicas, Ilhéus-
Bahia

Link para o Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/9615448923708075>

Karina Peres Gramacho

Centro de Pesquisa do Cacau, Ceplac/Cepec
Itabuna- Bahia

Link para o Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/2851798514812201>

Juliano Oliveira Santana

Universidade Estadual de Santa Cruz,
Departamento de Ciências Biológicas, Ilhéus,
Bahia

Link para o Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/0727141351971158>

RESUMO: O apoplasto é um compartimento vegetal que compreende os espaços intercelulares e a parede celular. Este espaço possui grande importância para a planta desde

a defesa contra estresses bióticos e abióticos a transporte de hormônios e água. O fluido apoplástico (FA), o líquido do apoplasto, possui substâncias essenciais para o desenvolvimento do vegetal. A obtenção do FA é desafiadora, porém sua investigação poderá ajudar a compreender as respostas de defesas da planta e por outro lado, as respostas do patógeno em sobrepor estas defesas na interação planta-patógeno. Para tanto, faz-se necessário o uso de protocolos específicos que evitem acúmulo de contaminantes e favoreça rendimentos consideráveis para seu estudo. Sendo assim, neste capítulo descrevemos uma metodologia para obtenção de FA de folhas de cacau livre de contaminação citoplasmática por meio de infiltração a vácuo seguida de centrifugação e, extração de proteínas a partir do FA, por meio de SDS-denso e fenol.

PALAVRAS-CHAVE: Folha, proteômica, cacau, espaço intercelular

HOW TO ISOLATE APOPLASTIC PROTEINS: A RESEARCH STRATEGY OF THE PLANT- PATHOGEN INTERACTION

ABSTRACT: The apoplast is a vegetal compartment that comprises the intercellular spaces and the cell wall. This space is of great importance to the plant from defense against biotic and abiotic stresses to transport

of hormones and water. Apoplastic fluid (FA) has essential substances for plant development. Obtaining FA is challenging, but your research may help to understand plant defense responses and pathogen responses to override these defenses in plant-pathogen interaction. Therefore, it is necessary to use specific protocols that avoid contaminant accumulation and favour considerable yields for its study. Thus, in this chapter we describe a methodology for obtaining FA from cocoa leaves without cytoplasmic contamination by vacuum infiltration followed by centrifugation and protein extraction from FA by dense SDS-phenol.

KEYWORDS: Leaf, proteomics, cocoa, intercellular space.

1 | INTRODUÇÃO

O apoplasto é um compartimento de extrema importância para o vegetal, que compreende os espaços extracelulares, incluindo a parede celular (DIETZ, 1997; DANI et al., 2005; SADAVA, et al., 2009; AGRAWAL et al., 2010). Este compartimento desempenha diferentes funções desde transporte de hormônios relacionados ao desenvolvimento e crescimento a reconhecimento de invasores patogênicos, por meio de proteínas presentes neste espaço (AGRAWAL et al., 2010; DELANOIS et al., 2014). O apoplasto está envolvido em diversas respostas do ambiente, como na sinalização e reconhecimento de patógenos, assim faz deste espaço um sistema dinâmico, sendo essencial na indução de uma cascata de respostas contra importantes fitopatógenos (ZHANG et al., 2009; LI et al., 2016).

O líquido que circunda o apoplasto é rico em substâncias como açúcares, água, íons, proteínas dentre outras, formando o fluido apoplástico (FA) e sua obtenção ainda é desafiadora. Para extrair e investigar o conteúdo apoplástico exige evitar a contaminação citoplasmática, ou seja, um protocolo ideal para que a contaminação com produtos intracelulares, devido o rompimento foliar parcial, seja insignificante. Sendo assim, as proteínas apoplásticas ainda são poucos caracterizadas (LEE et al., 2004; DELANOIS et al., 2014). Além do mais, a concentração de proteínas no apoplasto é inferior a presente intracelularmente e, conseqüentemente torna o processo de identificação ainda mais desafiador (QUIRINO et al., 2010).

O protocolo de infiltração-centrifugação para folhas de cacau (*Theobroma cacao*) foi testado e otimizado por Pirovani et al. (2008). É uma metodologia, de uma forma geral, simples, porém exige boas condições experimentais para o sucesso da obtenção de FA com contaminação citoplasmática insignificante.

Theobroma cacao é uma planta lenhosa que originou-se na América do Sul (MOTAMAYOR et al., 2002; WICKRAMASURIYA; DUNWELL, 2018) e pode ser dividida em três grandes grupos de acordo com características morfológicas, genéticas e localização geográfica (FERREIRA et al., 2014).

Suas amêndoas são a principal matéria-prima para a produção do chocolate e, com isso possui grande importância econômica e social, principalmente, para o sul da Bahia, onde esta cultura teve seu ápice no final do século XIX (COSTA; SOARES, 2016). Em contrapartida, a produção das amêndoas de cacau sofreu um declínio drástico com a chegada do fungo *Moniliophthora perniciosa*, agente causal da vassoura-de-bruxa (ROCHA, 2008; CALDAS; PERZ, 2013).

Entendendo a importância e o papel do apoplasto para planta e conhecendo as dificuldades em obter conteúdo de um espaço subcelular, este trabalho tem como finalidade entender como é feita a investigação do conteúdo apoplástico, mais precisamente como obter proteínas presentes neste espaço. Sendo assim, propomos de forma simples e reproduzível, uma metodologia testada e validada para folhas maduras de cacau.

2 | O APOPLASTO

O termo apoplasto foi criado pelo cientista alemão Ernst Münch em 1930 para descrever o compartimento de transporte de água no interior do vegetal (SAKURAI, 1998). Mais tarde, descobriu-se que o apoplasto, além de transportar água, desempenha um importante papel na fisiologia e desenvolvimento do vegetal por conter produtos relacionados ao desenvolvimento e à tolerância a estresses ambientais (AGRAWAL et. al., 2010).

De uma forma geral, a planta pode ser dividida basicamente em um compartimento intracelular ou simplasto e extracelular ou apoplasto (De ALMEIDA, 2001) que constitui os espaços intercelulares e a parede celular (Figura 01) (DIETZ, 1997; DANI et. al., 2005; SADAVA, et. al., 2009; AGRAWAL et. al., 2010).

O apoplasto desempenha um papel importante e crítico na interação da planta com o ambiente, pois a planta libera produtos essenciais neste compartimento como proteínas, enzimas, metabólitos e outras substâncias constituindo assim, o fluido apoplástico (FA) (ZHANG et. al., 2009; AGRAWAL et. al., 2010).

O FA flui constantemente no apoplasto facilitando o transporte de substâncias, as quais podem ser constitutivamente expressas ou induzidas, como algumas proteínas que são produzidas somente como parte da imunidade inata da planta (AGRAWAL et al., 2010; DELANOIS et. al., 2014). As proteínas extracelulares podem estar solúveis no FA ou ligadas à matriz celular da planta (RAMANJULU et al., 1999; SOARES et al., 2007).

Assim, o apoplasto está envolvido em outras funções importantes para o vegetal como regulação de crescimento, manutenção da parede celular, rota de transporte, homeostase, adesão célula a célula, trocas gasosas e em processos envolvidos na defesa a estresse biótico e abiótico e contra a dessecação (SAKURAI, 1998;

SATTELMACHER, 2001; DELANOIS et al., 2014). Diante disto, a importância do apoplasto para a planta pode ser comparada com a importância do interior do nosso corpo, que consiste em sangue, linfa e fluido de tecido tornando um compartimento essencial para o funcionamento das células (SACURAI, 1998).

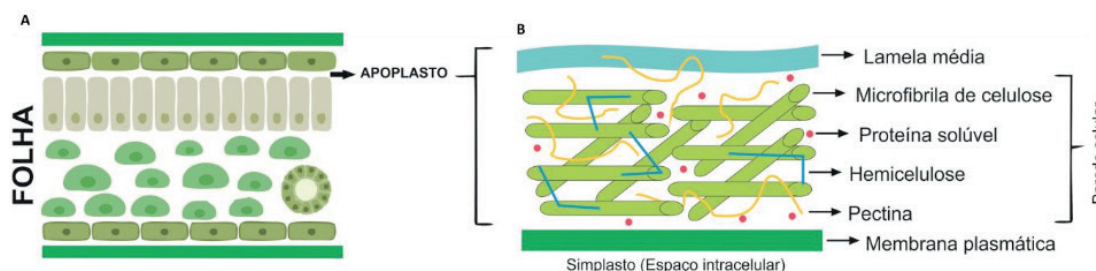


Figura 01: **Representação esquemática do apoplasto.** A: Folha vegetal destacando os espaços intercelulares ou apoplasto. B: O apoplasto compreende o espaço externo à membrana plasmática até a lamela média.

3 | APOPLASTO E O RECONHECIMENTO DE PATÓGENOS

As plantas estão expostas a vários fatores bióticos na natureza, como a diversas classes de microrganismos fitopatogênicos, tais como, nematoides, fungos, bactérias e insetos. Assim, em função da incapacidade de locomoção, as plantas evoluíram mecanismos de defesa para driblar e evitar a entrada de invasores, contornando situações desfavoráveis e, com isso, garantindo a sua sobrevivência (AGRIOS, 1997; PIETERSE et al., 2005; MELLO; SILVA-FILHO, 2002; MENOSSI et al., 2008). Apesar das plantas serem incapazes de esconder ou escapar de ataques de patógenos e não possuem um sistema de defesa imune como os animais, elas podem reconhecer a presença de patógenos e preparar respostas de defesa que garanta o crescimento vegetativo diminuindo os danos causados pelo invasor (OSBOURN, 2001; NÜRNBERGER et al., 2004; CHISHOLM et al., 2006; DALIO, 2013).

O patógeno ao conseguir penetrar nos tecidos da planta estará sujeito ao reconhecimento na membrana plasmática (NÜRNBERGER et al., 2004) e para o seu estabelecimento é preciso atravessar o apoplasto local onde, importantes reações e processos regulatórios ocorrem de forma natural ou são induzidas devido ao reconhecimento do patógeno (MARTÍNEZ-GONZÁLEZ et al., 2018). Esse reconhecimento ocorre por meio de sensores apoplásticos chamados de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), que são proteínas transmembranas conservadas com domínio extracelular rica em leucina (LRRs) ou motivo de lisina (Lysm) e um domínio de quinase intracelular (JASHNI et al., 2015; MARTÍNEZ-GONZÁLEZ et al., 2018). As PRRs se localizam geralmente na superfície da membrana celular e reconhecem os padrões moleculares associados ao patógeno (MAMPs ou

PAMPs), conhecidos como elicitores, tais como a quitina, um componente da parede celular dos fungos ou flagelina bacteriana. Após esse reconhecimento inicial, leva à imunidade desencadeada pelo MAMP (PTI) acionando as defesas basais da planta (BOLLER; FELIX, 2009; DELAUNOIS et al., 2014; JASHNI et al., 2015; MARTÍNEZ-GONZÁLEZ et al., 2018), como mudanças na composição da parede celular e acúmulo de compostos antimicrobianos (DOEHLEMANN; HEMETSBERGER, 2013). Algumas moléculas provenientes da própria planta também podem ser reconhecidas pelas PRRs desencadeando respostas imunes, as chamadas de padrões moleculares associados a danos (DAMPs), como moléculas liberadas devido a danos na parede celular. Patógenos mais adaptados podem inibir a interação MAMP-PRR, secretando proteínas efetoras e suprimindo ou comprometendo o MTI e com isso, facilitando suscetibilidade desencadeada por efetores (ETS). Por outro lado, essas moléculas efetoras também podem estimular a imunidade desencadeada por efector (ETI) em plantas que possuem proteínas de resistência (R) resultando no segundo nível de defesa da planta (Figura 02) (DALIO, 2013; DOEHLEMANN; HEMETSBERGER, 2013; DELAUNOIS et al., 2014; JASHNI *et al.*, 2015; BOLLER; FELIX, 2009).

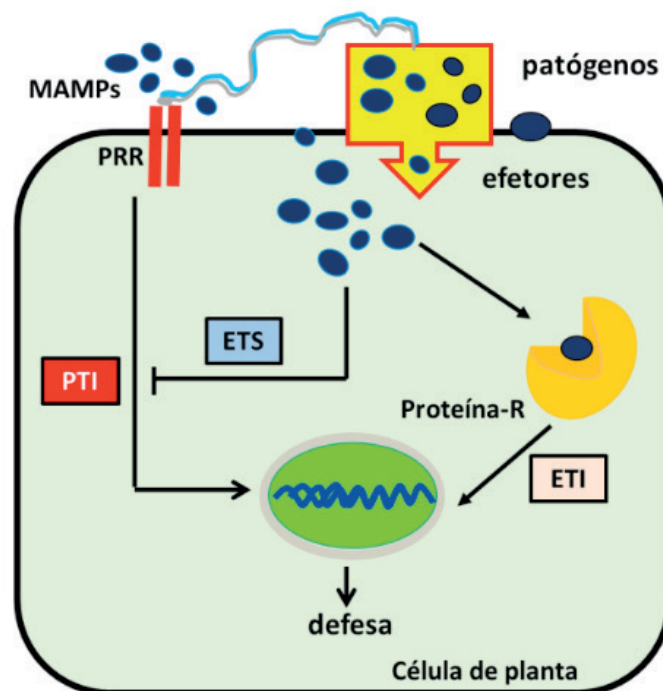


Figura 02: **Reconhecimento do patógeno por meio de sensores apoplásticos do vegetal.** PRRs: Receptores de Reconhecimento de Padrões; MAMPs: Padrões Moleculares Associados ao Patógeno; PTI: Imunidade Desencadeada pelo PAMP; ETS: Suscetibilidade Desencadeada por Efetores; ETI: Imunidade Desencadeada por Efector. Adaptado de Kazan e Lyons (2014).

4 | PROTEÍNAS APOPLÁSTICAS

As proteínas presentes no apoplasto são difíceis de ser isoladas, pois é necessário evitar a contaminação com compostos citoplasmáticos e a ruptura da parede celular. Sendo assim, ainda são proteínas pouco caracterizadas em comparação com as

intracelulares (DELANOIS et al., 2014). A abordagem proteômica entra como uma ferramenta chave para caracterizar as proteínas presentes no FA e fornece maior entendimento nos processos de percepção e regulação que ocorrem na interação entre planta-patógeno (AGRAWAL et al., 2010; DELANOIS et al., 2014).

A proteômica possibilita, além de caracterizar proteínas numa amostra, obter informações sobre processos ou respostas celulares envolvidas em determinado fenômeno ou condição biológica, incluindo a identificação simultânea de um grande número de proteínas e, conseqüentemente de novos genes e vias metabólicas, as quais são importantes para o entendimento da interação planta-patógeno, por exemplo (GUIMARÃES; RICARDO, 2015).

Para isolar o FA várias metodologias foram desenvolvidas: perfusão a vácuo em discos de folhas de mamona, girassol e repolho (BERNSTEIN, 1971); aplicação de pressão em folhas de algodão utilizando uma câmara de pressão umidificada (HARTUNG et al., 1987); o método de eluição em ervilha (LONG; WIDDERS, 1990); método de infiltração-centrifugação em folhas de tabaco por Klement, em 1965 (RATHMELL; SEQUEIRA, 1974). Este último tem sido utilizado em alguns trabalhos, como em folhas de *Medicago truncatula* (SOARES et al., 2007), *Nicotiana tabacum* (DELANNOY et al., 2008) e em *Populus deltoides* (PECHANOVA et al., 2010).

A infiltração é realizada a vácuo com uma solução apropriada, por isso o método é também conhecido como VIC (infiltração a vácuo). É importante realizá-lo em boas condições experimentais para evitar acúmulos de interferentes intracelulares e/ou não proteicos, como a força centrífuga baixa que resulta em contaminação insignificante e o tipo de solução de infiltração que melhore a solubilização das proteínas. Além disso, o correto manuseio e armazenamento pós recuperação do fluido, são procedimentos essenciais e adaptáveis para os diferentes tecidos e espécies de plantas (MARTÍNEZ-GONZÁLEZ et al., 2018). Como foi testado por Lohausa et al. (2001) em diferentes espécies de planta (*Vicia faba*, *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum*, *Hordeum vulgare*, *Spinacia oleracea*, *Beta vulgaris* e *Zea mays*) e concluído que as condições de infiltração e centrifugação devem ser adaptadas para cada espécie, como o tipo de solução e o tempo utilizado para a infiltração e também a força de centrifugação, para evitar a contaminação citoplasmática (LOHAUSA et al., 2001).

É importante destacar que normalmente muitas proteínas que são secretadas para o espaço extracelular por meio do sistema Retículo Endoplasmático-Golgi, possuem peptídeo sinal (PS). Porém, sabe-se que muitas proteínas não dependem de um PS para ser transportadas na via secretora. Esse transporte é conhecido como secreção proteica não convencional (UPS: *Unconventional Protein Secretion*) (DING et al., 2012). Acredita-se que mais de 50% de proteínas sem PS são secretadas e possivelmente muitas delas que estão relacionadas a defesa/estresse no vegetal,

possuem atividade tanto intracelulares quanto extracelulares. Portanto, trabalhos que visam a extração de proteínas do apoplasto podem apresentar uma falsa contaminação citoplasmática (AGRAWAL et al., 2010). Diante disto, a extração de FA exige protocolos otimizados e cuidados metodológicos para cada espécie vegetal a ser estudada. Além disso, torna-se muito importante conciliar a técnica da biologia molecular com a bioinformática por meio da predição de localização das proteínas para verificar a credibilidade dos resultados obtidos pós extração.

5 | *Theobroma cacao* X *Moniliophthora perniciosa*

Theobroma cacao é uma planta lenhosa tropical que se originou na América do Sul (MOTAMAYOR et al., 2002; WICKRAMASURIYA; DUNWELL, 2018). É uma espécie preferencialmente alógama (ALMEIDA; VALLE, 2007; FERREIRA et al., 2013) classificada na família Malvaceae (ALVERSON et al., 1999).

A cultura do cacau possui grande importância econômica e social para o Brasil e para o mundo. As amêndoas de cacau são utilizadas para a produção do chocolate e uma gama de produtos, como o cacau em pó, manteiga de cacau, licor de chocolate, sorvetes e produtos de panificação (FERREIRA et al, 2013; BEG et al., 2017; WICKRAMASURIYA; DUNWELL, 2008). O cacau também possui aplicações cosméticas e farmacêuticas (BEG et al., 2017). Além disso, na República Dominicana, bebidas de chocolate são utilizadas no tratamento de dores de garganta, anemia e doenças gastrointestinais; no Panamá alguns índios acreditam que a utilização de bebidas de chocolate evita a incidência de doenças cardíacas e de câncer (BEG et al., 2017). Além disso, sua casca é uma fonte rica de vitamina D. Por isso, a ingestão de chocolate (principalmente amargo) é recomendada de forma balanceada (BEG et al., 2017; GOYA et al, 2016; WICKRAMASURIYA; DUNWELL, 2018).

No Brasil, o cultivo de cacau impulsionou no século XVII, tendo o ápice no século XX quando liderou a produção mundial. No sul da Bahia, local de uma importante faixa de Mata Atlântica, o cacauzeiro encontrou condições climáticas e solos ideais para a expansão do cultivo. O plantio de cacau no sul Bahia ocorre em um sistema denominado Cabruca, cultivo de cacau implantado no sub-bosque de forma descontínua e circundado por vegetação natural possibilitando o sombreamento por diferentes árvores da Mata Atlântica original (ROCHA, 2008; LOBÃO et al. 2004).

No final do século XIX, a cacauicultura foi considerada uma importante atividade econômica que proporcionou o desenvolvimento e riqueza para região e o crescimento do Estado baiano por mais de um século (COSTA; SOARES, 2016).

Embora o estado da Bahia seja ainda considerado o maior produtor de cacau do Brasil, essa cultura enfrentou diversos ciclos críticos desde a década de 1930 quando o país passou por uma série de crise econômica (CALDAS; PERZ, 2013).

Apesar do sul da Bahia ter liderado o cultivo de cacau nos anos de 1976 a 1987 (BENJAMIN, 2016), sua produção caiu drasticamente quando iniciou a principal crise enfrentada pelo cacau no estado com a chegada da vassoura-de-bruxa (VB), registrada pela primeira vez em 1989 no município de Uruçuca. A doença, causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa*, acarretou uma queda chegando a causar perdas de até 90% na produção de amêndoas e também ameaçando a estabilidade ecológica devido à substituição de cacauais por pastagens e, conseqüentemente perda de árvores nativas presentes no sistema cabruca (ROCHA, 2008; CALDAS; PERZ, 2013).

A chegada da VB ao sul da Bahia caracterizou-se por uma rápida disseminação, já que o fungo encontrou condições ambientais favoráveis tornando-se responsável pela maior doença ocorrida na cacauicultura do estado (PURDY, et al. 1996; OLIVEIRA; LUZ, 2005; ROCHA, 2008). Em pouco tempo, a doença se espalhou para região causando importantes danos, como detectado no município de Uruçuca que enfrentou uma queda em 1990 equivalente a 75% de área cultivada e 70% de produção. Danos estes, que contribuíram para transformar o Brasil de exportador para importador de cacau (MEINHARDT et al., 2008; CALDAS; PERZ, 2013).

M. perniciosa possui um potencial destrutivo, atacando o equilíbrio hormonal do cacau e causando sintomas como hipertrofia e hiperplasia. O início da infecção se dá pelos basidiósporos que são produzidos pelos basidiocarpos, que possuem forma de cogumelos rosados (Fig. 3A). Os basidiósporos dispersam pela ação do vento, principalmente em períodos com umidade alta. Em contato com tecidos da planta, principalmente tecidos jovens, os basidiósporos penetram por aberturas naturais, como os estômatos e inicia o processo de infecção e instalação da doença (MEINHARDT et al., 2008). Caracterizado como hemibiotrófico, o fungo *M. perniciosa* possui duas fases em seu ciclo de vida. A fase inicial (biotrófica) apresenta a formação de hifas monocarióticas com ausência de grampos de conexão e crescimento no apoplasto (Fig. 3B) do hospedeiro, conseqüentemente causando alterações como hipertrofia e hiperplasia, perda de dominância apical e formação de hastes anormais com aparência de “vassoura verde” (Figura 3C). A segunda fase, chamada de necrotrófica ou saprofítica, é caracterizada por micélio dicariótico e hifas com grampos de conexão o qual invade o meio intracelular levando a morte dos tecidos e formando uma estrutura denominada de “vassoura seca” (Figura 3D), onde se alimenta da matéria orgânica morta (EVANS, 1980; MEINHARDT et al., 2008).

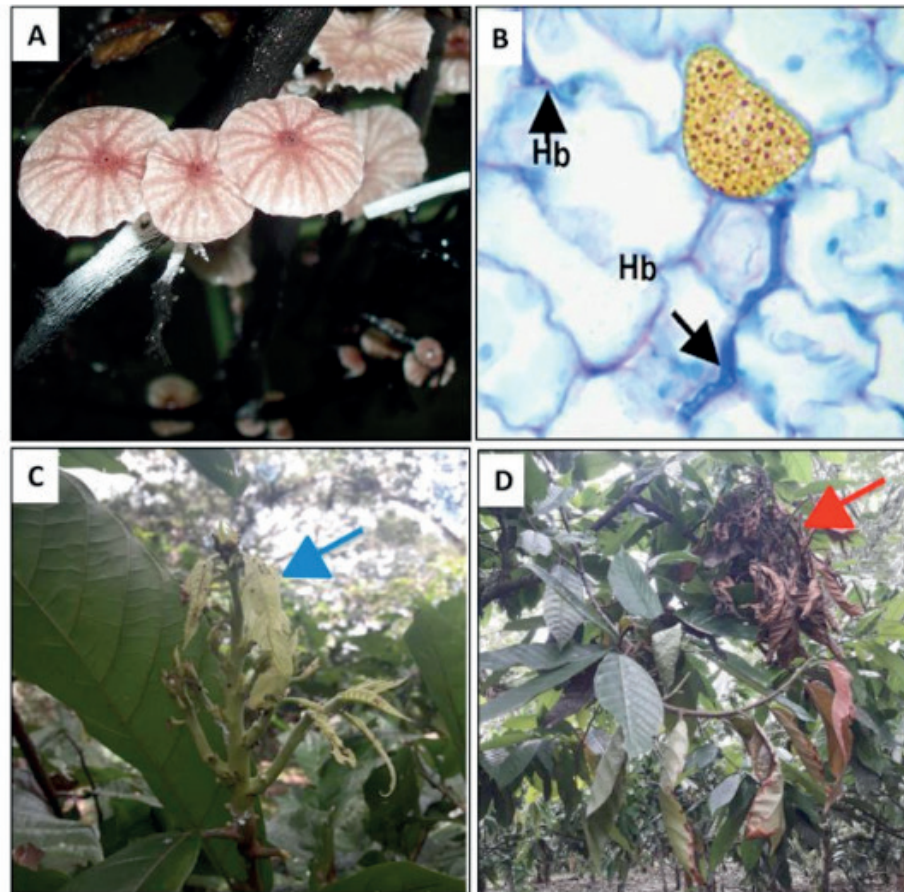


Figura 03: **Fases de desenvolvimento do fungo *Moniliophthora perniciosa***. A: Basidiocarpos (Acervo do autor). B: Hb: Hifa biotrófica no apoplasto de meristema de cacauero representando a fase biotrófica (Adaptado de Ceita et al., 2007). C: Seta azul: estágio de vassoura verde da doença representando a fase biotrófica (Acervo do autor). D: Seta vermelha: necrose dos tecidos (vassoura-de-bruxa-seca) representando a fase necrotrófica (Acervo do autor).

6 | APOPLASTO DE *Theobroma cacao*

O apoplasto é o local interno onde ocorre o contato inicial entre planta e patógenos, sendo determinante para a colonização ou não de seu hospedeiro (SPERSCHNEIDER et al., 2018). O fungo *M. perniciosa* ramifica no apoplasto de *T. cacao* no primeiro estágio da doença, ou vassoura verde, caracterizando a fase biotrófica ou parasítica (PURDY; SCHMIDT, 1996). Isso acarreta alterações bioquímicas, como o aumento de alcaloides, compostos fenólicos e taninos para tentar eliminar o fungo (SCARPARI et al., 2005). O fungo *M. perniciosa* permanece em sua fase parasítica no apoplasto por cerca de 40 a 60 dias (CEITA et al., 2007), sendo assim, pode-se considerar este espaço como um campo de batalha molecular devido às interações entre cacau- *M. perniciosa* e, portanto, a fase biotrófica do fungo é um período determinante para o avanço ou não da instalação da doença (PIROVANI et al., 2008).

Para um maior entendimento da interação *M. perniciosa*- *T. cacao*, muitos estudos têm sido realizados, os quais envolvem a fase biotrófica da doença. Por

outro lado, o conhecimento sobre o apoplasto do cacau continua escasso. O primeiro mapa proteômico de *M. pernicioso* foi realizado em resposta ao FA de cacau. Dois isolados do fungo (553, menos agressivo e 565, mais agressivo) e duas variedades de cacau contrastantes para doença VB (Catongo, genótipo susceptível e TSH1188, genótipo resistente) foram utilizados. As análises mostraram que constituintes do FA induziram o remodelamento proteico de *M. pernicioso* de acordo com o seu grau de agressividade (CAMILLO, 2013). Pirovani (2008), em sua tese de doutorado, avaliou a germinação de esporos do fungo *M. pernicioso* na presença do FA de cacau de dois genótipos contrastantes para doença VB (Catongo e TSH1188) de plantas controle (inoculados em água) e de plantas infectadas pelo fungo às 72 horas após a inoculação. A inibição da germinação para o fluido das plantas da variedade Catongo controle foi de 23% e das plantas elicidadas foi de 1%. Por outro lado, para o fluido da variedade resistente (TSH1188) houve uma inibição de 13% e 50% da germinação em plantas controle e elicidadas, respectivamente, indicando acúmulo de compostos de defesa presentes no apoplasto do genótipo resistente sob interação com o patógeno (PIROVANI, 2008).

7 | EXTRAÇÃO DE FLUIDO APOPLÁSTICO DE FOLHAS DE *Theobroma cacao*

A extração de FA de folhas de cacau por meio do método VIC é feita através do protocolo otimizado por Pirovani et al. (2008). Folhas maduras de cacau devem ser coletadas, mantidas em câmara fria em caixa térmica para evitar a dessecação e diminuir o estresse e assim, manter suas condições fisiológicas e, logo após serem utilizadas para a extração do FA.

As folhas deverão ser lavadas com água destilada e as nervuras centrais retiradas com ajuda de um bisturi ou outro material cortante para facilitar a infiltração. Após isto, as folhas então deverão ser reunidas com as partes cortadas voltadas para cima imersas em um becker contendo fosfato de potássio 10 mmol L^{-1} de pH 5,5 ajustado com ácido ascórbico para evitar oxidação e levadas a um dessecador para infiltração à vácuo, onde o ar do interior da folha será retirado e substituído pela solução de infiltração e, com isso facilitará a solubilização das proteínas.

O vácuo aplicado deverá ser de -100 kPa (1 bar) durante 3 minutos, alternando com 2 minutos de pressão atmosférica. Esse procedimento precisará ser repetido 9 vezes, aproximadamente 27 minutos, ou até a emissão total das bolhas.

Após a infiltração total das folhas, um aparato de suporte coletor deverá ser montado e o FA recolhido após centrifugação. Para preparar o suporte coletor, cada parte da folha terá de ser enrolada em um anteparo cilíndrico de borracha de 0,8 cm de diâmetro x 9 cm de comprimento, presas com uma fita adesiva plástica e inseridas em um tubo falcon de 15 mL com a parte cortada voltada para baixo (Fig.

04). Vários aparatos poderão ser feitos; é preciso sempre mantê-los imersos em gelo logo após cada montagem.

Durante a construção do suporte coletor, um botão de plástico de 20 mm de diâmetro deverá ser encaixado dentro de cada tubo para impedir o deslocamento do anteparo de borracha para o fundo do mesmo (ver Fig. 04). Após montados, os tubos deverão ser levados à centrífuga para coleta do FA. A força centrífuga ideal a ser utilizada em folhas de cacau é de 3.000 a 3.500 g por 25 minutos, a 4°C, pois com esta força centrífuga a contaminação intracelular é considerada insignificante e, portanto ideal para uso.

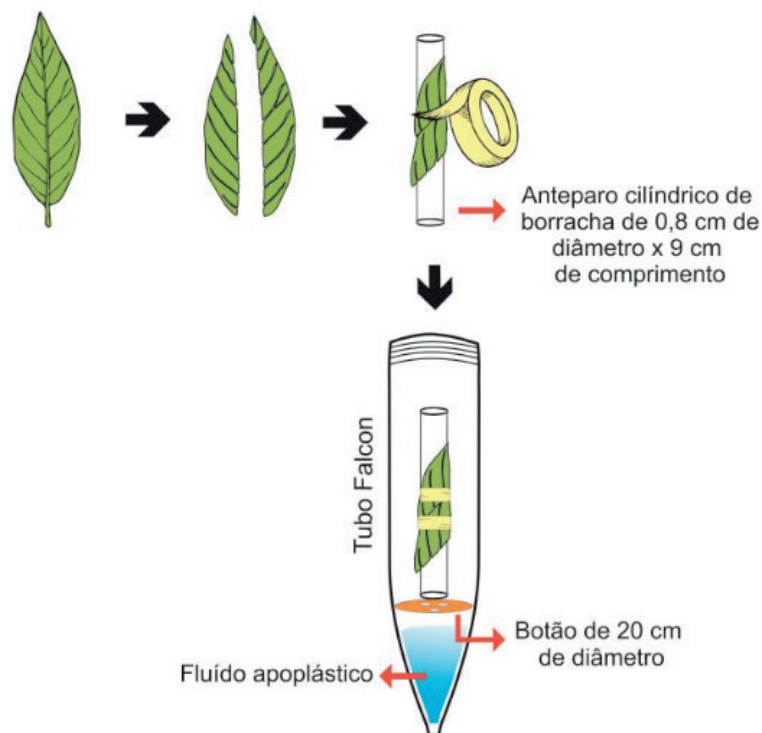


Figura 04: **Aparato coletor do FA.** Montagem do suporte coletor para centrifugação e coleta do FA.

Diferentes forças centrífugas (1.000 g a 4.500 g) foram utilizadas para testar o volume do FA coletado, o rendimento proteico e os níveis de contaminação intracelular, os quais foram demonstrados por Pirovani et al. (2008) um aumento linear à medida que a força centrífuga aumentava, concluindo assim, que a força ideal para folhas de cacau foi de 3000 a 3.500 g.

Além disso, é preciso a obtenção de um bom rendimento de FA que seja suficiente para as etapas seguintes (Tabela 01). Após a coleta, o FA poderá ser utilizado para extração proteica em análise proteômica ou diretamente para análise de atividade enzimática e bioensaio de germinação de esporos fúngicos (Fig. 05); estas duas últimas análises, o FA deverá ser coletado com a substituição do tampão fosfato de potássio por água destilada, para não interferir nos resultados finais.

Quantidade de folha (g)	Força Centrífuga (xg)	Quantidade de FA (mL)	Quantidade de proteínas (µg/µL)
500	3500	100	4

Tabela 1: Influência da força centrífuga na quantidade de FA e proteínas presentes no FA. Valores aproximados.

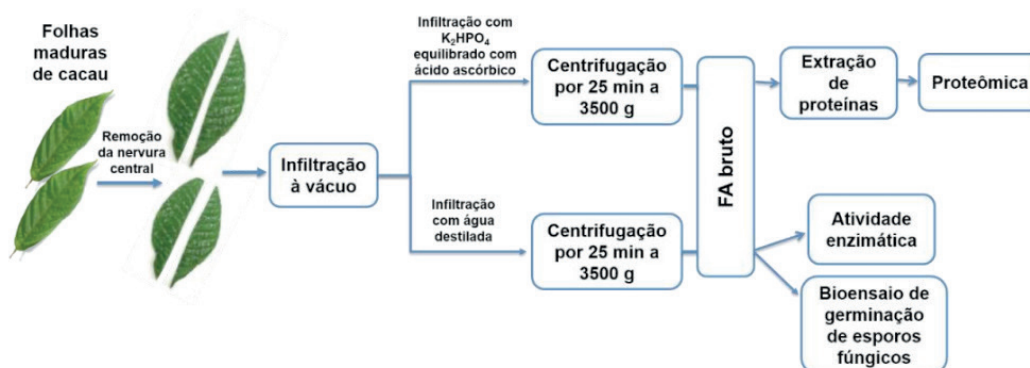


Figura 05: Diagrama resumindo a extração de FA e o uso em análises.

7.1 Extração proteica do fluido apoplástico de *T. cacao*

Alíquotas com um volume de 15 mL de FA foliar de cacau deverão ser concentradas por liofilização e ressuspendidas em 0,8 mL de tampão de extração SDS-Denso (sacarose 30 %, SDS 2 %, Tris-HCL 100 mmol L⁻¹ pH 8,0, 2-mercaptoetanol 5 %). As amostras precisarão ser submetidas à sonicação (3 pulsos de 8 s cada, com 10 s de intervalo entre pulsos) com amplitude de 50 % no processador ultrassônico (Gex 130, 130 W) para facilitar na solubilização dos polissacarídeos e assim, melhorar a qualidade e o rendimento proteico. Logo após a sonicação, as amostras deverão ser incubadas no gelo por 10 min. Logo em seguida, 0,8 mL de fenol saturado, pH 8,0, deverão ser adicionado nas amostras e mantidas por 30 min de incubação sob agitação à temperatura ambiente. As amostras deverão ser centrifugadas a 5.000 g por 10 min a 4 °C. A adição do fenol propiciará a separação das proteínas de outros conteúdos interferentes. As proteínas concentrarão na fase fenólica (fase superior) e deverá ser extraída novamente com igual volume de tampão SDS-Denso. As fases fenólicas de duas extrações deverão ser agrupadas e incubadas por 14 h com 5 vezes o volume de acetato de amônio a 100 mmol L⁻¹ em metanol a -20 °C para precipitação das proteínas.

Para recuperar as proteínas precipitadas, as amostras deverão ser centrifugadas a 20.000 g por 5 min. a 4 °C. O precipitado proteico deverá ser lavado três vezes

com acetato de amônio a 100 mmol L^{-1} em metanol e duas vezes com acetona 100%. Por fim, o precipitado deverá ser seco à temperatura ambiente e ressuspenso em aproximadamente $600 \mu\text{L}$ de tampão de reidratação (ureia 7 mol L^{-1} , tiourea 2 mol L^{-1} , CHAPS 2 % e azul de bromofenol 0,002 %) e estocado a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ até o uso (WANG et al., 2003 com modificações de PIROVANI et al., 2008).

As proteínas podem ser quantificadas pelo método 2D-Quant Kit (GeHealthCare), conforme as recomendações do fabricante, utilizando BSA (soro de albumina bovina) como padrão. Após a obtenção de uma quantidade ideal de proteínas, elas deverão ser resolvidas em eletroforese 1D e 2D.

7.1.1 SDS-PAGE 1D

As proteínas de FA deverão ser separadas pelo peso molecular por meio de uma corrida eletroforética em SDS-PAGE (Gel de Poliacrilamida na presença de Dodecilssulfato de Sódio) para a visualização das bandas e comprovação da eficiência da etapa de extração.

Uma massa de cerca de $20 \mu\text{g}$ de proteína de FA de cacau deverão ser tratadas com β -Mercaptoetanol para quebrar as pontes dissulfeto e eliminar a estrutura tridimensional dos polipeptídeos. Após o tratamento, as proteínas deverão ser submetidas a uma corrente elétrica para separação eletroforética em um gel de $8 \times 10 \text{ cm}$ a 12,5 % de acrilamida. Juntamente com as proteínas, um marcador de peso molecular deverá ser adicionado (cerca de $10 \mu\text{L}$). Este marcador possui proteínas com pesos moleculares de vários polipeptídeos conhecidos, onde deverá ser utilizado como padrão para comparar com as subunidades visualizadas das proteínas de interesse.

Após cerca de 3h de corrida, o gel deverá ser inserido em tampão de fixação (40 % etanol, 10 % ácido acético) durante 1h, corado durante 24 h em Coomassie coloidal G-250 a 0,08 % (NEUHOFF et al., 1988) e, por fim, descorado em água destilada autoclavada por aproximadamente 2 dias. Após descorado, a imagem do gel deverá ser obtida por meio de um digitalizador próprio, como o ImageScanner II (Amersham, GE Healthcare). As bandas visualizadas (Fig. 06) correspondem a diversas proteínas de acordo com seu peso molecular, onde as proteínas de menores pesos migrarão mais rapidamente e as maiores mais lentamente, devido a maior dificuldade em atravessar a malha do gel.

No exemplo da figura 06, ao comparar as proteínas de FA e de extrato total (ET) de folhas de cacau infectadas e não infectadas, é possível observar bandas diferenciais e banda (seta preta) representando a subunidade da ribulose-1,5-bifosfato carboxilase (Rubisco), uma proteína citoplasmática abundante em extratos foliares. Isto demonstra a eficiência do protocolo otimizado por Pirovani et al. (2008)

e utilizado desde a extração de FA à extração proteica.

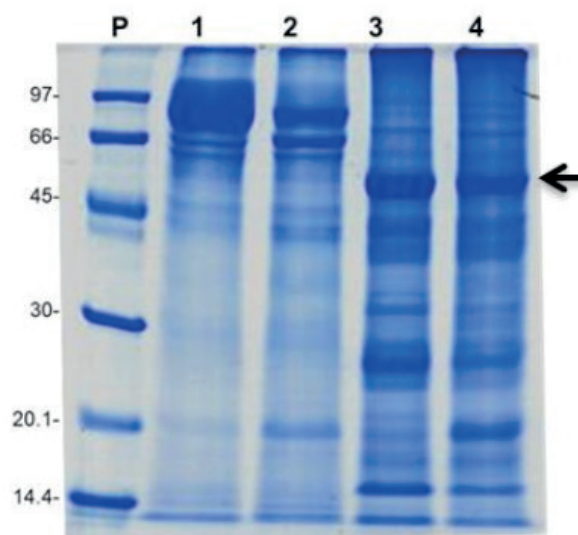


Figura 06: **SDS-PAGE**. 1: Proteínas de FA de cacau saudável; 2: Proteínas de FA de cacau infectado por *M. perniciososa* (estágio de vassoura verde); 3: Proteínas do ET de folhas de cacau saudáveis; 4: Proteínas do ET de folhas de cacau infectadas por *M. perniciososa* (estágio de vassoura verde). P: Marcador de peso molecular: Low Molecular Weight Marker de 14-97 kDa (GE Healthcare). Seta preta: banda proeminente de aproximadamente 55 KDa representando a subunidade da ribulose-1,5-bifosfato carboxilase (Rubisco) características em extratos foliares. Adaptado de Pirovani et al., (2008).

7.1.2 Eletroforese Bidimensional

Após comprovação da eficiência de extração proteica, as proteínas de FA precisarão ser resolvidas em gel bidimensional (SDS-PAGE 2-D). Para tanto, as proteínas deverão ser focalizadas, onde há separação de acordo com os seus pontos isoelétricos (pI) num gradiente de pH imobilizado e, logo após separadas de acordo com seus pesos moleculares.

Um tampão de reidratação 2-DE (ureia 7 mol L⁻¹, tiourea 2 mol L⁻¹, CHAPS 2 % e azul de bromofenol 0,002 %) contendo Ditiotretol (DTT) com concentração 50 mmol L⁻¹ e 0,5% de anfólito deverá ser adicionado em cerca de 350 µg de proteína de FA de cacau e o volume final deverá ser ajustado para 250 µL utilizando tampão de reidratação 2-DE. As amostras deverão ser pipetadas em triplicata em suportes (*strip holder*) para tiras de gel (*strips*) com gradiente de pH imobilizado. Em seguida, as três *strip holder* deverão ser levadas para focalização isoelétrica em *Ettan IPGphor III* (GE Healthcare) com as seguintes condições de corrida: 12 h a 20 °C de reidratação, 500 V por 1 h, 1000 V por 1: 04 h, 8000 V por 2:30 h e 8000 V por 40 min. Após a focalização, as *strips* deverão ser tratadas com 7 mL de tampão de equilíbrio (ureia 6 mol L⁻¹, SDS 2 %, glicerol 30 %, Tris-HCl 0,05 mol L⁻¹, pH 8.8 e azul de bromofenol a 0,002 %) contendo 10 mg mL⁻¹ de DTT e mantidas sob agitação leve por 15 min. Em seguida, esse procedimento deverá ser repetido mais duas vezes, onde as *strips*

precisarão ser tratadas por 15 min com tampão de equilíbrio contendo 25 mg mL⁻¹ de iodoacetamida e lavadas por 15 min com tampão de corrida (Tris 25 mmol L⁻¹ pH 8.3, glicina 0,19 mol L⁻¹, SDS 0,1 %).

Após os tratamentos, as *strips* deverão ser dispostas na parte superior de géis de poliacrilamida a 12,5 % para segunda separação de acordo com os pesos moleculares das proteínas (Figura 07). Juntamente com as *strips*, cerca de 10 µL de marcador de peso molecular Low Molecular Weight Marker de 14-97 kDa (GE Healthcare) deverá ser adicionado num pedaço de papel filtro e selado com 1 % de agarose (TRIS Base a 25 mmol L⁻¹, glicina a 192 mmol L⁻¹, SDS a 0,1 %, agarose a 0,5 % e *bromophenol blue* a 0,002 %) para a corrida eletroforética. Deverão ser aplicadas as seguintes condições de corrida: 15 mA/gel por 15 min, 40 mA/gel por 30 min e 50 mA/gel por 4 h.

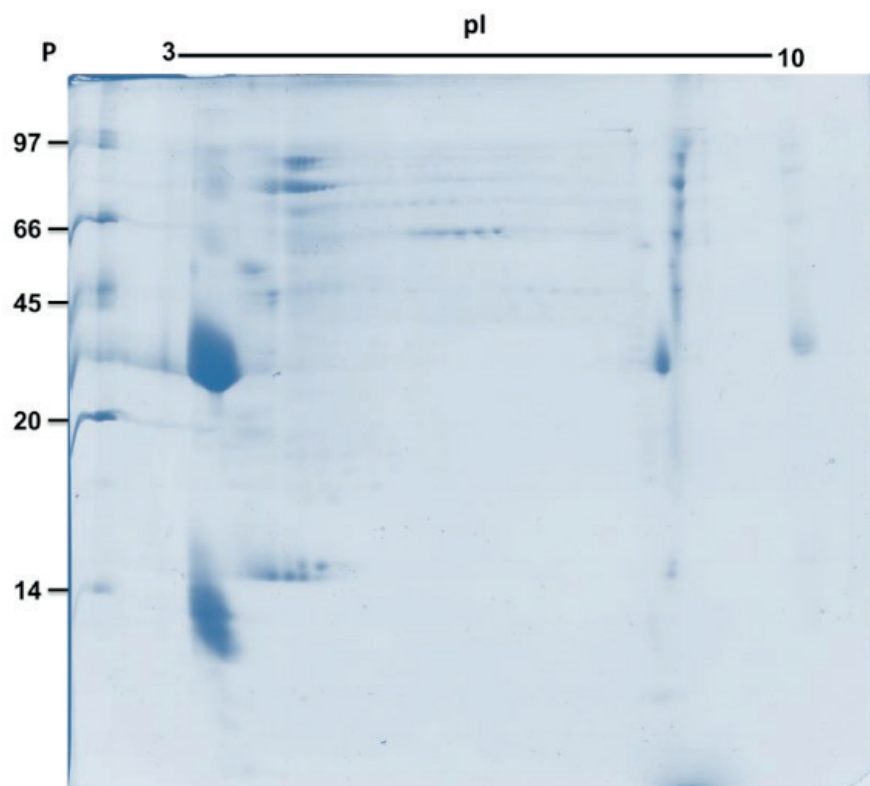


Figura 07: **Perfil proteico bidimensional de FA cacau.** A: Proteínas de FA do genótipo Catongo de cacau em condições de campo. Ponto isoelétrico (pI) de 3-10 Não linear. P: Marcador de peso molecular 14-220 KDa. Acervo do autor.

Após concluir a corrida eletroforética, os géis deverão ser transferidos para o tampão de fixação (40 % etanol, 10 % ácido acético) durante 1 h e em corados em Coomassie coloidal (sulfato de amônio 8 %, ácido fosfórico 0.8 %, azul de coomassie G-250 0.08 % e metanol 20 %) (NEUHOFF et al., 1988) por 7 dias sob agitação suave. Depois de obter os géis corados, eles deverão ser descorados, por aproximadamente o mesmo período, com sucessivas lavagens utilizando água destilada autoclavada e

conservá-los em ácido acético a 7 %.

Assim como os géis 1D, as imagens dos géis 2D deverão ser digitalizadas. Em seguida, as imagens deverão ser levadas para um analisador como *software Image Master 2D Platinum 7.0 (GE healthcare)*, onde serão detectados a quantidade dos *spots* (pontos pretos), as massas moleculares e os pontos isoelétricos de cada *spot*. Além disso, este *software* permite uma análise comparativa de níveis de expressão entre materiais genéticos contrastantes para ajudar selecionar os *spots* que serão tratados e identificados, além de outras ferramentas que ajudam a melhorar a qualidade da imagem.

No exemplo da figura 07, pode ser observado uma boa separação das proteínas demonstrado pela ampla distribuição dos *spots* em uma faixa de pH 3 a 10 e peso molecular de 14 a 97 KDa.

7.1.3 Identificação das proteínas de FA de cacau

Para obter o mapa proteômico do FA de cacau por meio da identificação por espectrometria de massas, os *spots* de interesse deverão ser excisados com auxílio de um bisturi e tratados por meio da digestão trípica. A princípio, os pedaços de géis deverão ser tratados com 200 μL de NH_4HCO_3 a 25 mmol L^{-1} , contendo acetonitrila 50% pH 8, por 24 h para descorar o gel. O sobrenadante deverá ser descartado e os fragmentos dos géis deverão ser lavados com 200 μL de água Milli-Q. O sobrenadante deverá ser novamente descartado seguindo da desidratação do gel por meio da adição de 100 μL de acetonitrila a 100 % por 5 min em temperatura ambiente e deverão ser levados para o secador centrífugo por, aproximadamente 20 min ou até completa secagem dos géis. Em seguida, os fragmentos dos géis deverão ser reidratados com a adição de 4 μL de tripsina Gold (Promega) a 25 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ e incubados por 10 min a 4° C. Uma solução de NH_4HCO_3 a 25 mmol L^{-1} deverá ser adicionado até cobrir os fragmentos e incubados novamente, por 16 h à 37° C para a ação da tripsina. Em seguida, o sobrenadante deverá ser transferido para novos tubos de Eppendorf e realizado duas lavagens com 50 μL de acetonitrila a 50% contendo ácido fórmico a 5 %, sob agitação em vortex durante 30 min. Os sobrenadantes referentes às duas lavagens deverão ser reunidos aos novos tubos. Por fim, as amostras deverão ser concentradas atingindo um volume de 15 a 20 μL em um secador centrífugo. As amostras então, deverão ser transferidas para “Vials” (Waters) e analisadas em um cromatógrafo nanoAcquity (Waters, Milford, MA) acoplado ao espectrômetro de massas Q-ToF micro (Waters) para a identificação dos peptídeos (VILLELA-DIAS et al., 2014).

Os espectros gerados após análise no espectrômetro de massas, deverão ser analisados por meio do *software ProteinLynx Global Server 4.2 (WATERS)* e

comparados com bancos de dados para busca da identidade das proteínas.

8 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste capítulo foi demonstrado a importância do apoplasto para planta e como investigar o conteúdo do mesmo, a partir do protocolo otimizado por Pirovani et al. (2008). Protocolo este, ideal para folhas de cacau, porém pode ser adaptável para outras espécies vegetais. Também foi demonstrado possíveis análises a partir do FA, como a análise proteômica. A obtenção das proteínas apoplásticas, ainda é desafiadora e, portanto, pouco caracterizadas, pois exige amostra livre de contaminação de materiais intracelulares. Assim, é preciso entender a importância do tempo e da força de centrifugação no momento de extração, sendo este um dos principais requisitos para minimizar a contaminação citoplasmática. Por fim, a metodologia discutida neste trabalho, possibilita a compreensão do conteúdo apoplástico de cacau e pode favorecer um maior entendimento sobre as respostas moleculares do cacau frente a estresses bióticos e/ou abióticos e em condições normais.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, G. K.; JWA, N.S.; LEBRUN, M.H.; JOB, D.; RAKWAL, R. **Plant secretome: unlocking secrets of the secreted proteins.** *Proteomics*, v.10, p.799-827, 2010.
- AGRIOS, G. N. *Plant pathology*. New York: Academic Press, p. 635, 2005.
- ALMEIDA, A-A. F. and VALLE, R. R. **Ecophysiology of the cacao tree.** *Braz. J. Plant Physiol.*, 19(4):425-448, 2007.
- ALVERSON, W. S., WHITLOCK, B. A., NYFFELER, R., BAYER, C. and BAUM, D. A. **Phylogeny of the core Malvales: evidence from ndhF sequence data.** *Am. J. Botany*. 86:1474-1486, 1999.
- BEG, M. S., AHMAD, S., JAN, K. and BASHIR, K. **Status, supply chain and processing of cocoa- A review.** *Trends in Food Science & Technology*, 66, 108-116, 2017.
- BENJAMIN, C. S., LUZ, E. D. M. N., SANTOS, W. O. e PIRES, J. L. **Cacao families and parents selected as resistant to natural infection of *Moniliophthora perniciosa*.** *Crop Breed. Appl. Biotechnol. SciElo*, vol.16 no.2 Viçosa Apr./June 2016.
- BERNSTEIN, L. **Method for determining solutes in the cell walls of leaves.** *Plant Physiology*, 47(3), 361-365, 1971.
- BOLLER, T., & FELIX, G. **A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors.** *Annual review of plant biology*, 60, 379-406, 2009.
- CALDAS, M. M. & PERZ, S. **Agro-terrorism? The causes and consequences of the appearance of witch's broom disease in cocoa plantations of southern Bahia, Brazil.** *Geoforum*, 47, 147-157, 2013.

- CAMILLO, L. R. **Análise do perfil proteômico de *Moniliophthora perniciosa* em resposta ao fluido apoplástico de cacau e caracterização de uma ascorbato peroxidase de *Theobroma cacao*.** (Tese de doutorado da Universidade Estadual de Santa Cruz, 2013).
- CEITA, G. O., MACÊDO, J. N. A., SANTOS, T. B., ALEMANNI, L., DA SILVA GESTEIRA, A., MICHELI, F., ... & MAZZAFERA, P. **Involvement of calcium oxalate degradation during programmed cell death in *Theobroma cacao* tissues triggered by the hemibiotrophic fungus *Moniliophthora perniciosa*.** *Plant Science*, v. 173: 106-117, 2007.
- CHISHOLM, S. T., COAKER, G., DAY, B. and STASKAWICZ, B. J. **Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response.** *Cell*. 124(4): 803-814, 2006.
- COSTA, F. M., SOARES, N. S. (Org.). **Cacau, riqueza de pobres.** Ilhéus, BA: *Editus*, p. 286, 2016.
- DALIO, R. J. D. **Deciphering mechanisms of pathogenicity and resistance induction in the interaction between *Phytophthora* spp. and European beech (*Fagus sylvatica* L.).** *Ph.D. Thesis. Technische Universitaet Muenchen (TUM), Freising, Germany, 2013.*
- DANI, V., WILLIAM, J., DURANTI, M. and CROY, R. **Changes in the tobacco leaf apoplast proteome in response to salt stress.** *Proteomics*. 5, 737–745, 2005.
- De ALMEIDA, S. M., Do AMARAL, D., DEL-BEM, D. O. J., SANTOS, L. E., E. B., SILVA, S., JOSÉ, R. and MICHELI, F. **Genome-wide identification and characterization of cacao WRKY transcription factors and analysis of their expression in response to witches' broom disease.** *PloS One*, 12 (10): 23 p., 2017.
- DELAUNOIS, B., COLBY, T., BELLOY, N., CONREUX, A., HARZEN, A., BAILLIEUL, F., CLÉMENT, C., SCHMIDT, J., JEANDET, P. and CORDELIER, S. **Large-scale proteomic analysis of the grapevine leaf apoplastic fluid reveals mainly stress-related proteins and cell wall modifying enzymes.** *BMC Plant Biol*. 13: 24, 2013.
- DELAUNOIS, B., JEANDET, P., CLÉMENT, C., BAILLIEUL, F., DOREY, S., & CORDELIER, S. **Uncovering plant-pathogen crosstalk through apoplastic proteomic studies.** *Frontiers in plant science*, 5, 249, 2014.
- DIETZ, K. J. **Functions and responses of the leaf apoplast under stress.** *Progress in Botany*. Volume 58, pp 221-254, 1997.
- DING, Y., WANG, J., WANG, J., STIERHOF, Y. D., ROBINSON, D. G., & JIANG, L. **Unconventional protein secretion.** *Trends in plant science*, 17(10), 606-615, 2012.
- DOEHLEMANN, G., & HEMETSBERGER, C. **Apoplastic immunity and its suppression by filamentous plant pathogens.** *New Phytologist*, 198(4), 1001-1016, 2013.
- EVANS, H. C. **Pleomorphism in *Crinipellis perniciosa*, causal agent of witches' broom disease of cocoa.** *Transactions of the British Mycological Society*, 74(3), 515-523, 1980.
- FERREIRA, A. C. R., AHNERT, D., NETO, B. A. M. e MELLO, D. L. N. **Guia de Beneficiamento de Cacau de Qualidade Instituto Cabruca.** Ilhéus, Bahia: 2013.
- FIGUEIREDO, A., MONTEIRO, F., & SEBASTIANA, M. **Subtilisin-like proteases in plant–pathogen recognition and immune priming: a perspective.** *Frontiers in plant science*, 5, 739, 2014.
- GOYA, L., MARTÍN, M. Á., SARRIÁ, B., RAMOS, S., MATEOS, R. and BRAVO, L. **Effect of cocoa and its flavonoids on biomarkers of inflammation: studies of cell culture, animals and humans.** *Nutrients*, 8(4), 212, 2016.

GUERRA-GUIMARÃES, L., TENENTE, R. E. R., PINHEIRO, C. C., CHAVES, I. I., SILVA, M. D. C. M. L., CARDOSO, F. F., and RICARDO, C. P. C. **Proteomic analysis of apoplastic fluid of *Coffea arabica* leaves highlights novel biomarkers for resistance against *Hemileia vastatrix*.** *Frontiers in plant science*, 6, 478, 2015.

HARTUNG, W. J., RADIN, W. and HENDRIX, D. L. **Abscisic acid movement into the apoplasmic solution of water stressed cotton leaves: Role of apoplastic pH.** *Plant Physiol.* 86: 908–913, 1987.

JASHNI, M. K., MEHRABI, R., COLLEMARE, J., MESARICH, C. H., & De WIT, P. J. **The battle in the apoplast: further insights into the roles of proteases and their inhibitors in plant–pathogen interactions.** *Frontiers in plant science*, 6, 584, 2015.

KAZAN, K., & LYONS, R. **Intervention of phytohormone pathways by pathogen effectors.** *The Plant Cell*, 26(6), 2285-2309, 2014.

LEE, S. J., SARAVANAN, R. S., DAMASCENO, C. M., YAMANE, H., KIM, B. D., & ROSE, J. K. **Digging deeper into the plant cell wall proteome.** *Plant physiology and Biochemistry*, 42(12), 979-988, 2004.

LI, Y. B., HAN, L. B., WANG, H. Y., ZHANG, J., SUN, S. T., FENG, D. Q., YANG, C. L., SUN, Y. D., ZHONG, N. Q. and XIA, G. X. **The Thioredoxin GbNRX1 Plays a Crucial Role in Homeostasis of Apoplastic Reactive Oxygen Species in Response to *Verticillium dahliae* Infection in Cotton.** *Plant Physiol.* 170(4): 2392–2406, 2016.

LOBÃO, D. E., SETENTA, W. C. and VALLE, R. R. **Sistema agrossilvicultural cacauero-modelo de agricultura sustentável.** *Agrossilvicultura*, 1(2), 163-173, 2004.

LOHAUSA, G., PENNEWISSB, K., SATTELMACHERB, B., HUSSMANNA, M. and MUEHLING, K. **Is the infiltration-centrifugation technique appropriate for the isolation of apoplastic fluid? A critical evaluation with different plant species.** *Physiologia Plantarum* 111: 457–465, 2001.

LONG, J. M., & WIDDERS, I. E. **Quantification of apoplastic potassium content by elution analysis of leaf lamina tissue from pea (*Pisum sativum* L. cv *Argenteum*).** *Plant physiology*, 94(3), 1040-1047, 1990.

MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, A. P., ARDILA, H. D., MARTÍNEZ-PERALTA, S. T., MELGAREJO-MUÑOZ, L. M., CASTILLEJO-SÁNCHEZ, M. A., & JORRÍN-NOVO, J. V. **What proteomic analysis of the apoplast tells us about plant–pathogen interactions.** *Plant Pathology*, 67(8), 1647-1668, 2018.

MEINHARDT, L. W., RINCONES, J., BAILEY, B. A., AIME, M. C., GRIFFITH, G. W., ZHANG, D., & Pereira, G. A. *et al.* ***Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of cacao: what's new from this old foe?** *Molecular Plant Pathology*, Londres, v. 9, n. 5, p. 577-588, set. 2008.

MELLO, M. O. and SILVA-FILHO, M. C. **Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms.** *Brazilian Journal of Plant Physiology*. vol.14 no.2, Londrina May/Aug., 2002.

MENOSSE, M., SILVA-FILHO, M. C., VINCENTZ, M., VAN-SLUYS, M. A. and SOUZA, G. M. **Sugarcane Functional Genomics: Gene Discovery for Agronomic Trait Development.** *Int J Plant Genomics*, 2008.

MOTAMAYOR, J. C., MOCKAITIS, K., SCHMUTZ, J., HAIMINEN, N., LIVINGSTONE III, D., CORNEJO, O. & SASKI, C. **The genome sequence of the most widely cultivated cacao type and its use to identify candidate genes regulating pod color.** *Genome biology*, 14(6), r53, 2013.

MOTAMAYOR, J. C., RISTERUCCI, A. M., LOPEZ, P. A., ORTIZ, C. F., MORENO, A. and LANAUD, C. **Cacao domestication I: The origin of the cacao cultivated by the Mayas.** *Heredity*. 89:380-386,

2002.

NEUHOFF, V., AROLD, N., TAUBE, D., and EHRHARDT, W. **Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250.** *Electrophoresis* 9, 255–262; 1988.

NÜRNBERGER, T., BRUNNER, F., KEMMERLING, B., & PIATER, L. **Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences.** *Immunological reviews*, 198(1), 249-266, 2004.

OLIVEIRA, M. D., & LUZ, E. D. M. N. **Identificação e manejo das principais doenças do cacauero no Brasil.** *Ilhéus: CEPLAC/CEPEC/SEFIT*, 2005.

OSBOURN, A. E. **Plant mechanisms that give defense against soilborne diseases.** *Australas Plant Pathol*, 30, 99–102, 2001.

PECHANOVA, O., HSU, C. Y., ADAMS, J. P., PECHAN, T., VANDERVELDE, L., DRNEVICH, J. & TSCHAPLINSKI, T. J. **Apoplast proteome reveals that extracellular matrix contributes to multistress response in poplar.** *BMC genomics*, 11(1), 674, 2010.

PIETERSE, C. M.J., VAN PELT, J. A., VAN WEES, S. C. M., TON, J., VERHAGEN, B. W. M., LÉON-KLOOSTERZIEL, K., HASE, S., DE VOS, M., OOSTEN, V. V., POZO, M., SPOEL, S., VAN DER ENT, S., KOORNNEEF, A., CHALFUN-JUNIOR, A., RESENDE, M. L. V. e VAN LOON, L.C. **Indução de resistência sistêmica por rizobactérias e comunicação na rota de sinalização para uma defesa refinada.** *Revista Anual de Patologia de Plantas*, Passo Fundo, v. 13, p. 277-295, 2005.

PIROVANI, C. P. *et al.* **Protein extraction for proteome analysis from cacao leaves and meristems, organs infected by *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of the witches' broom disease.** *Electrophoresis*, v. 29, n. 11, p. 2391–401, 2008.

PURDY, L. H. and SCHMIDT, R. A. **Status of cacao witches' broom: biology, epidemiology, and management.** *Annual Review of Phytopathology*. 34, 573–594, 1996.

QUIRINO, B. F., CANDIDO, E. S., CAMPOS, P. F., FRANCO, O. L., & KRÜGER, R. H. **Proteomic approaches to study plant–pathogen interactions.** *Phytochemistry*, 71(4), 351-362, 2010.

RAMANJULU, S., KAISER, W. and DIETZ, K. J. **Salt and Drought Stress Differentially Affect the Accumulation of Extracellular Proteins in Barley.** *Z. Naturforsch.* 54c, 337-347, 1999.

RATHMELL, W. and SEQUEIRA, L. Soluble Peroxidase in Fluid from the Intercellular Spaces of Tobacco Leaves. *Plant Physiol.* 53, 317-318, 1974.

ROCHA, L. B. **A região cacauera da Bahia – dos coronéis à vassoura-de-bruxa: saga, percepção, representação** / Lurdes Bertol Rocha. Ilhéus: Editus. 255p., 2008.

ROCHA, L. B. **A região cacauera da Bahia – dos coronéis à vassoura-de-bruxa: saga, percepção, representação** / Lurdes Bertol Rocha. Ilhéus: Editus. 255p., 2008.

SADAVA, D.- H., GRAIG – ORIAN, H., GORDON, H. – P., K. – HILLIS, William, DAVID, M. **Vida: A Ciência da Biologia** - 8.ed.: Volume 3: Plantas e Animais, 2009.

SAKURAI, N. **Dynamic Function and Regulation of Apoplast in the Plant Body.** *J. Plant Res.* 111: 133-148, 1998.

SATTELMACHER, B. **The apoplast and its significance for plant mineral nutrition.** *Institute for Plant Nutrition and Soil Science. New Phytologist.* 149: 167–192, 2001.

SCARPARI, L. M., MEINHARDT, L. W., MAZZAFERA, P., POMELLA, A. W.V., SCHIAVINATO, M. A., CASCARDO, J. C. M. and PEREIRA, G. A. G. **Biochemical changes during the development of witches' broom: the most important disease of cocoa in Brazil caused by *Crinipellis pernicios***. *Journal of Experimental Botany*, v. 56, n. 413, p. 865–877, 2005.

SOARES, N. C., FRANCISCO, R., RICARDO C. P. and JACKSON, P. A. **Proteomics of ionically bound and soluble extracellular proteins in *Medicago truncatula* leaves**. *Proteomics*. Jun; 7 (12): 2070-82, 2007.

SPERSCHNEIDER, J., DODDS, P. N., SINGH, K. B., & TAYLOR, J. M. **ApoplastP: prediction of effectors and plant proteins in the apoplast using machine learning**. *New Phytologist*, 217(4), 1764-1778, 2018.

VILLELA-DIAS, C., CAMILLO, L. R., DE OLIVEIRA, G. A., SENA, J. A., SANTIAGO, A. S., DE SOUSA, S. T. and COSTA, M. G. **Nep1-like protein from *Moniliophthora pernicios* induces a rapid proteome and metabolome reprogramming in cells of *Nicotiana benthamiana***. *Physiologia plantarum*, 150(1), 1-17, 2014.

WANG, W., SCALI, M., VIGNANI, R., SPADAFORA, A., SENSI, E., MAZZUCA, S., & CRESTI, M. **Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds**. *Electrophoresis*, 24(14), 2369-2375, 2003.

WICKRAMASURIYA, A. M. and DUNWELL, J. M. **Cacao biotechnology: current status and future prospects**. *Plant Biotechnology Journal*. Jan.; 16; pp 4–17, 2018.

ZHANG, L., TIAN, L. H., ZHAO, J. F., SONG, Y., ZHANG, C. J., & GUO, Y. **Identification of an apoplastic protein involved in the initial phase of salt stress response in rice root by two-dimensional electrophoresis**. *Plant Physiology*, 149(2), 916-928, 2009.

ÍNDICE REMISSIVO

A

Açaí 19, 20, 21, 22, 24, 25
Acca sellowiana 231, 232
Açoita cavalo 67, 74, 76, 78, 88
Adiantoideae 181, 184, 187
Analgesia 50, 52, 53, 54, 57
Anatomia 180, 181, 182, 183, 189, 190, 191, 193, 216, 229, 250, 251, 253, 256, 257
Aprendizagem 279, 280, 281, 283, 284, 285, 286, 287, 289, 290, 291, 312, 313, 314, 316, 317, 319, 320, 321, 322
Atividade anti-inflamatória 77, 78, 81, 94
Avaliação microbiológica 19, 21, 26
Aves 250, 251, 252, 255, 256, 257

B

B16-F10 37, 38, 39, 43, 44, 45, 46, 218, 219, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228
Bioinformática 27, 29, 130
Biologia 1, 2, 10, 37, 61, 74, 98, 114, 117, 123, 130, 143, 145, 149, 155, 172, 190, 202, 218, 250, 251, 252, 257, 265, 269, 284, 299, 310, 319
Biopesticidas 299, 300, 309
Bioquímica 1, 5, 7, 49, 217, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 319, 320, 321, 322
Biotechnology 100, 144, 177, 178, 189, 214, 215, 217, 275, 310, 311
Branchipus stagnalis 231, 232

C

Cacauí 115, 116, 146, 155
Câncer 38, 39, 45, 47, 130, 218, 219, 228, 268, 275, 278, 323, 324, 331, 335
Células embriogênicas 203, 204, 210, 212
Células-tronco 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18
Cicatrização 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 76
Citotoxicidade 37, 38, 44, 45, 46, 67, 70, 80, 86, 93, 94, 219, 232, 272
Colletotrichum acutatum 157, 158, 161, 164, 167
Complicações perinatais 292, 294, 296
Constituintes químicos 99, 181, 191
Cultura de tecidos 203, 214, 215

D

Diagnóstico 53, 59, 60, 61, 63, 65, 66, 167, 185, 198, 244, 247, 248, 293, 296, 323, 324, 327, 331, 332, 352
Dinamização 279
Dispersão 1, 2, 7, 44, 45, 74, 152, 153, 171, 348
Dor 49, 50, 52, 53, 54, 55, 56, 77, 355

E

Ecotoxicidade 231
Educação 245, 247, 279, 280, 281, 282, 284, 289, 314, 321, 322, 323
Elaeis guineenses 215
Ensino-aprendizagem 284, 286, 290, 291, 313, 314, 319, 320, 321
Exame parasitológico de fezes 59, 60
Extensão universitária 282
Extrato de planta 38, 239

F

Fertilidade 115, 121
Ftalimidas 49, 50, 51, 52, 53, 55, 56, 57

G

Gastrointestinal 61, 299, 300, 302, 308, 355, 357
Genoma 27, 173
Gestação 292, 293, 294, 295, 297, 298

H

Herbicidas 100, 101, 102, 103, 104
Himatanthus lancifolius 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48
Histologia 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 333

L

Ludicidade 279, 281, 283
Luehea divaricata 67, 68, 70, 74, 75, 76, 77, 78, 92, 93, 94, 95, 97, 98, 99
Luz solar 258, 264, 268

M

Macrófita 1, 2, 9, 258, 263, 264
Mamíferos 255, 256, 263, 299, 301, 307, 309
Mandiocultura 27, 29
Manihot esculenta 27, 28, 29, 30, 31, 32, 34, 35, 36, 170, 171, 177, 178, 179
Maquetes 312, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322
Material didático 285, 286, 287, 288
Melanoma 37, 38, 39, 40, 43, 44, 45, 46, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 268, 274, 278
Melhoramento genético 31, 34, 114, 115, 116, 120, 121, 146, 147
Microgramma 191, 192, 193, 196, 197, 198, 199, 200, 201
Microssatélites 27, 29, 31, 32, 33, 145, 147, 150, 151, 152, 154, 170, 171, 174
Modelos analógicos 279, 280, 281, 283
Monitoria 312, 314, 316, 317, 319, 320, 321
Morango 157, 158, 159, 161, 167, 168

O

Óleo essencial 74, 157, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 186

P

Parasitologia 59, 60, 66, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 299

Plantas medicinais 37, 46, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 76, 93, 95, 96, 97, 98, 99, 167, 189, 219, 276

Polpa de frutas 19

Q

Qualidade 1, 4, 5, 15, 16, 19, 20, 22, 23, 25, 61, 72, 73, 135, 139, 141, 146, 151, 158, 160, 161, 174, 204, 276, 294, 312, 316, 321, 334, 335, 336, 347, 348, 349, 350, 364

Queimaduras 12, 13, 14, 15, 16, 17, 37, 218

R

Recém-nascido 292, 293, 295, 296, 297, 298

Recursos genéticos 117, 122, 147, 169, 170, 171, 215

Reservatório 255, 258, 260, 261

S

Samambaias 181, 191, 192, 193

Saúde 14, 22, 25, 27, 37, 52, 59, 60, 66, 68, 69, 71, 72, 73, 74, 96, 98, 190, 218, 242, 243, 244, 245, 247, 248, 279, 281, 282, 284, 285, 287, 288, 292, 293, 294, 295, 297, 298, 301, 312, 313, 317, 321, 332, 335, 349, 350, 351, 355, 357, 362

Seeds 11, 100, 102, 104, 215

Simbiose 258, 260, 263, 265

Síndromes hipertensivas 292, 293, 294, 295, 297, 298

Sistema respiratório 76, 250, 251, 252, 253, 255, 256

T

Tecido adiposo 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18

Teles pires 250, 251, 252

Toxicidade 44, 45, 46, 93, 94, 167, 224, 231, 232, 236, 237, 238, 239, 240, 299, 301, 304, 309, 310, 355

Transgenic soybean 100

V

Vegetais 9, 44, 59, 69, 71, 73, 74, 79, 95, 97, 122, 140, 159, 168, 190, 192, 203, 205, 209, 240, 270, 271, 273, 336, 347, 349

 **Atena**
Editora

2 0 2 0