

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

**Potencial antifúngico de proteínas recombinantes de cacau no controle de
Hemileia vastatrix, agente causador da ferrugem do cafeeiro**

Luana Maria Pacheco Schittino
Magister Scientiae

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2025**

LUANA MARIA PACHECO SCHITTINO

**Potencial antifúngico de proteínas recombinantes de cacau no controle de
Hemileia vastatrix, agente causador da ferrugem do cafeeiro**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biotecnologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Tiago A. de O. Mendes

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2025**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

S337p
2025

Schittino, Luana Maria Pacheco, 1999-

Potencial antifúngico de proteínas recombinantes de cacau no controle de *Hemileia vastatrix*, agente causador da ferrugem do cafeeiro / Luana Maria Pacheco Schittino. – Viçosa, MG, 2025.

1 dissertação eletrônica (48 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Tiago Antônio de Oliveira Mendes.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, 2025.

Referências bibliográficas: f. 44-48.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2025.485>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Proteínas recombinantes. 2. *Hemileia vastatrix* - Controle biológico. 3. Antimicóticos. 4. *Coffea arabica*. 5. *Theobroma cacao*. I. Mendes, Tiago Antônio de Oliveira, 1986-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada. III. Título.

CDD 22. ed. 572.69

LUANA MARIA PACHECO SCHITTINO

**Potencial antifúngico de proteínas recombinantes de cacau no controle de
Hemileia vastatrix, agente causador da ferrugem do cafeeiro**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biotecnologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 14 de julho de 2025.

Assentimento:

Luana Maria Pacheco Schittino
Autora

Tiago Antonio de Oliveira Mendes
Orientador

Essa dissertação foi assinada digitalmente pela autora em 06/08/2025 às 20:19:51 e pelo orientador em 06/08/2025 às 21:58:09. As assinaturas têm validade legal, conforme o disposto na Medida Provisória 2.200-2/2001 e na Resolução nº 37/2012 do CONARQ. Para conferir a autenticidade, acesse <https://siadoc.ufv.br/validar-documento>. No campo 'Código de registro', informe o código **1TZU.ZMI3.5V6R** e clique no botão 'Validar documento'.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

À minha mãe, Maristela, que nunca mediu esforços para que eu chegasse até aqui.

Ao meu pai, Carlos, mesmo que distante neste momento.

Ao Glaucio por todo incentivo, acolhimento e suporte emocional.

Às minhas amigas Gabriele, Livia, Nicole e Sara pelo apoio e refúgio nos momentos de tensão.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

Ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e todos seus servidores pela colaboração e ajuda sempre que necessário.

Aos companheiros de trabalho do LBM por todo conhecimento compartilhado, orientação e ajuda nesses sete anos de convivência, vocês foram essenciais.

Ao professor e orientador, Tiago Antônio de Oliveira Mendes, por todo suporte, ensinamentos e oportunidades de crescimento acadêmico.

À Dra. Fabienne Micheli, ao CIRAD (Centro de Cooperação Internacional em Pesquisa Agrícola para o Desenvolvimento), à Dra. Natasha Lopes e UESC (Universidade Estadual de Santa Cruz), pela colaboração.

Aos membros da banca pela disponibilidade de avaliarem este trabalho e, especialmente, por toda ajuda durante os dois anos de estudo.

Este trabalho foi realizado com o apoio das seguintes agências de pesquisa brasileiras: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

RESUMO

SCHITTINO, Luana Maria Pacheco, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2025. **Potencial antifúngico de proteínas recombinantes de cacau no controle de *Hemileia vastatrix*, agente causador da ferrugem do cafeeiro.** Orientador: Tiago Antonio de Oliveira Mendes.

A produção do café (*Coffea arabica* e *Coffea canephora*) é uma atividade agrícola de grande importância no Brasil e no mundo. A ferrugem do café, causada pelo fungo *Hemileia vastatrix*, é uma das principais ameaças às lavouras. Esse patógeno reduz a produtividade, impacta a qualidade e quantidade dos grãos e acarreta em grandes prejuízos econômicos. Os custos de controle e manejo são altos e, muitas vezes, ineficazes. A disseminação da ferrugem nas culturas cafeeiras destaca a necessidade de alternativas de controle mais eficazes e sustentáveis. Proteínas relacionadas à patogênese (PR) têm surgido como ferramentas promissoras no combate a doenças fúngicas em plantas, especialmente as famílias PR-10 e PR-4, que apresentam atividades ribonuclease, DNase e antifúngica. Estudos com as proteínas TcPR-10 e TcPR-4b em cacau (*Theobroma cacao*) demonstraram sua eficácia contra *Moniliophthora perniciosa*, fungo causador da vassoura-de-bruxa. Com base nesses resultados e na relevância econômica da ferrugem do café, este estudo propõe avaliar a atividade antifúngica das proteínas TcPR-10, em sua forma selvagem e modificada geneticamente, e TcPR-4b contra *H. vastatrix*. A metodologia inclui a otimização da expressão e purificação dessas proteínas, seguido de testes *in vivo* em plantas suscetíveis de café. Para avaliação, foram realizados oito tratamentos, entre eles controles de infecção, controles de interferência de soluções tampão e composição contendo as proteínas propriamente ditas. Ao fim de aproximadamente 45 dias, foi possível observar a evolução da infecção em cada um dos tratamentos e concluir que a aplicação das proteínas purificadas, em solução tampão fosfato de sódio (PBS), pode contribuir para o do período de incubação da doença e também do período latente. Outros testes poderão ser realizados para definir melhores condições de aplicação das proteínas, bem como avaliação dos efeitos de uma segunda dose de tratamento.

Palavras-chave: *Hemileia vastatrix*; proteína; infecção; *Coffea arabica*; *Theobroma cacao*

ABSTRACT

SCHITTINO, Luana Maria Pacheco, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2025. **Antifungal potential of recombinant cocoa proteins in the control of *Hemileia vastatrix*, the causative agent of coffee rust.** Adviser: Tiago Antonio de Oliveira Mendes.

Coffee (*Coffea Arabica* e *Coffea canephora*) production is an agricultural activity of great importance in Brazil and worldwide. Coffee rust, caused by the fungus *Hemileia vastatrix*, is the main threat to crops. This pathogen reduces productivity, impacts the quality and quantity of beans, and causes major economic losses. Control and management costs are high and often ineffective. Preventing rust in coffee crops highlights the need for more effective and sustainable control alternatives. Pathogenesis-related (PR) proteins have emerged as promising tools in the fight against fungal diseases in plants. Particularly the PR-10 and PR-4 families, which have ribonuclease, DNase, and antifungal activities. Studies with the TcPR-10 and TcPR-4b proteins in cocoa (*Theobroma cacao*) have demonstrated their efficacy against *Moniliophthora perniciosa*, the fungus that causes witches' broom. Based on these results and the economic relevance of coffee rust, this study aims to evaluate the antifungal activity of TcPR-10 proteins in their wild-type and genetically modified forms and TcPR-4b against *H. vastatrix*. The methodology includes the optimization of the expression and purification of these proteins, followed by in vivo tests on susceptible coffee plants. For the evaluation, eight treatments were performed, including infection controls, interference controls of resolved solutions and composition containing the proteins themselves. After approximately 45 days, it was possible to observe the evolution of the infection in each of the treatments and conclude that the application of the purified proteins in sodium phosphate solution (PBS) can contribute to the delay in the appearance of symptoms or to stop the infection. Other tests can be performed to define even more appropriate conditions for the application of the proteins, as well as to evaluate the effects of preventing infection when using a second dose of treatment.

Keywords: *Hemileia vastatrix*; protein; infection; *Coffea arabica*; *Theobroma cacao*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. OBJETIVOS	8
3.1. Objetivo geral	8
3.2. Objetivos específicos	8
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
4.1. Importância econômica do café e o impacto de pragas e doenças	8
4.2. <i>Hemileia vastatrix</i>	10
4.3. Estratégias no controle da ferrugem do café	12
4.4. Uso de Proteínas no Controle de Fungos	13
4.5. Potencial antifúngico das proteínas TcPR-10 e TcPR-4b	14
4.6. Políticas e Regulamentação do uso de OGM em culturas alimentares	15
5. METODOLOGIA	16
5.1. Métodos de Bioquímica e Biologia Molecular	16
5.2. Construções	16
5.3. Organismos	17
5.4. Expressão heteróloga das proteínas TcPR10 selvagem, TcPR10 mutante e TcPR-4b em bactérias	17
5.5. Purificação das proteínas em Äkta	18
5.6. Confirmação por SDS-PAGE, Western Blotting e Dot Blotting	18
5.7. Preparo das proteínas purificadas em tampão contendo 8 M ureia	19
5.8. <i>Desalting</i> das proteínas purificadas	19
5.9. Montagem do experimento <i>in vivo</i> em variedade de café susceptível a <i>Hemileia vastatrix</i>	19
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
7. CONCLUSÃO	43
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

1. INTRODUÇÃO

A cultura cafeeira é uma das principais atividades agrícolas no mundo e, no Brasil, é responsável por grande parte da economia (CONAB, 2024). Entretanto, assim como acontece em outras culturas, cultivares de café enfrentam diversos desafios de incidência de pragas e doenças, sendo a ferrugem do café, causada pelo fungo *Hemileia vastatrix*, provavelmente a mais importante entre elas. A infecção pelo fungo reduz a produtividade, afetando negativamente a qualidade e quantidade dos grãos produzidos. Seu controle possui custo elevado e manejo complexo, que muitas vezes não evitam completamente os danos econômicos e ambientais causados (CIFC, 2024). O fungo *H. vastatrix* é um patógeno autóico e biotrófico obrigatório. A disseminação da ferrugem em regiões cafeeiras, somada à dificuldade de manejo eficaz, demanda o desenvolvimento de novas estratégias para controle dessa doença.

Pesquisas recentes têm investigado proteínas relacionadas à patogênese (PR) como ferramentas com grande potencial no combate a doenças fúngicas em plantas. Essas proteínas desempenham papéis importantes na resposta da planta contra patógenos. Entre as famílias de proteínas PR, as classes PR-10 (ribonucleases) e PR-4 (quitinases) são importantes por conta de suas atividades ribonuclease, DNase e antifúngicas. No cultivo de cacau (*Theobroma cacao*), o fungo causador da vassoura-de-bruxa, *Moniliophthora perniciosa*, provoca também danos de grande relevância econômica. Estudos anteriores com as proteínas TcPR-10 e TcPR-4b mostraram que ambas possuem atividades relevantes, como a degradação do RNA do patógeno e indução da produção de espécies reativas de oxigênio pela planta, que comprometem o desenvolvimento do fungo. TcPR-10 possui atividade ribonuclease e capacidade de internalização em células fúngicas. Já TcPR-4b possui atividades RNase e DNase, e atua como um potencial modulador de defesa celular, associando suas funções ao controle de infecções fúngicas (PUNGARTNIK, 2009; MENEZES, 2012; MENEZES, 2014).

Devido à eficácia dessas proteínas em estudos prévios contra o patógeno do cacau, e da importância econômica da ferrugem do café, a hipótese de que TcPR-10 e TcPR-4b podem possuir atividade antifúngica contra *H. vastatrix* é relevante.

Portanto, este estudo visa avaliar o efeito das proteínas TcPR-10 e TcPR-4b contra *H. vastatrix*, contribuindo para o desenvolvimento de novas tecnologias de controle fitopatológico, além de promover base para aplicações futuras no melhoramento de plantas ou no desenvolvimento de biofungicidas.

2. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Testar a atividade antifúngica de proteínas de cacau relacionadas à patogênese (TcPR10 selvagem, TcPR10 mutante e TcPR-4b) contra o fungo *Hemileia vastatrix*, causador da ferrugem do café, promovendo base para produção de novos biofungicidas.

3.2. Objetivos específicos

- Realizar testes de expressão das proteínas TcPR10 selvagem, TcPR10 mutante e TcPR-4b;
- Produzir as proteínas;
- Purificar as proteínas;
- Validar a expressão e purificação das proteínas por SDS-PAGE, Dot-Blot e Western Blot;
- Realizar *desalting*, para retirar componentes tóxicos para planta, do tampão veículo;
- Avaliar atividade antifúngica das proteínas contra *Hemileia vastatrix* em plantas de café susceptíveis.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. Importância econômica do café e o impacto de pragas e doenças

Diz a lenda que, por volta dos anos 800, um pastor da Etiópia observou que suas ovelhas ficavam mais agitadas e enérgicas quando ingeriam um fruto avermelhado, o do café. A curiosidade sobre a planta e seus frutos foi assim despertada e diferentes formas de sua ingestão passaram a ser exploradas desde então (AGROSABER, 2021).

A importância da cultura cafeeira é notória mundialmente, sendo não somente uma parcela frequente de consumo na vida das pessoas, como responsável por parte significativa da economia de vários países e sustento de milhares de famílias. Segundo dados da Organização Internacional do Café, no decorrer do último ano cafeeiro (2023/24), as exportações mundiais de grãos verdes ultrapassaram pela segunda vez o marco de 110 milhões de sacas, sendo o café robusta (*Coffea canephora*) um grande responsável pelo aumento na produção e exportação (OIC, 2024).

A importância do café no Brasil começou em meados de 1700, quando as primeiras mudas foram trazidas até Belém, no Pará, por generais vindos da Guiana Francesa. A cultura

rapidamente se espalhou por vários estados brasileiros e, por muitos anos, o café foi a base econômica do país (CONSELHO NACIONAL DO CAFÉ, 2023).

Ainda hoje, o Brasil encontra-se no topo da produção e exportação do grão, e em segundo lugar entre as nações que mais o consomem como bebida, além de gerar mais de 8 milhões de empregos diretos e indiretos no país. Nos primeiros nove meses (janeiro – setembro) de 2024, o país exportou, em média, 36,6 milhões de sacas (60 kg) de café, um aumento de aproximadamente 39,6% em relação ao mesmo período do ano anterior, gerando uma receita acumulada de 8,3 bilhões de dólares, segundo o Ministério de Desenvolvimento, Indústria, Comércio e Serviços – MDIC (CONAB, 2024).

Os cultivares presentes no Brasil são compostos de *Coffea arábica* L. e *Coffea canephora* (mais conhecido pelas variedades Conilon e Robusta), sendo a primeira de maior qualidade e predominante, principalmente, nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Bahia e Rio de Janeiro, enquanto a segunda é mais utilizada em misturas e predominante, principalmente, nos estados do Espírito Santo e Rondônia, mas também presente em Minas Gerais e Bahia (Figura 1) (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA, 2022).



Figura 1. Distribuição de cultivares de café por estados no Brasil de acordo com informações do Ministério da Agricultura e Pecuária. Fonte: Acervo pessoal.

Por ser um cultivar de tamanha importância, pragas e doenças que o atingem causam grandes impactos, principalmente econômicos. Além da perda da qualidade e quantidade de

grãos para consumo e exportação, o investimento em manejo de pragas e doenças é maior e, consequentemente, o custo de produção também, impactando diretamente no preço de mercado e rentabilidade da cadeia produtiva.

Entre as principais pragas estão a broca-do-café (*Hypothenemus hampei*), o bicho-mineiro (*Perileucoptera coffeella*), o ácaro vermelho (*Oligonychus ilicis*), cigarrinhas vetores de bactérias, e cochonilhas (MARCOLAN, A. L.; ESPINDULA, M. C., 2015). Entre as principais doenças do cafeeiro estão a ferrugem, causada pelo fungo *Hemileia vastatrix*, cercosporiose, causada pelo fungo *Cercospora coffeicola*, mancha aureolada, causada por *Pseudomonas seryngae* pv. *garcae*, fusariose, causada por *Fusarium* spp., nematoide-das-galhas, causada por *Meloidogyne* spp. (JÚNIOR, J. R. V.; FONSECA, A. S. DA; FREIRE, T. C, 2020).

4.2. *Hemileia vastatrix*

O fungo *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. ocorre mundialmente e foi identificado pela primeira vez no Brasil em meados dos anos 70, como sendo o causador da doença mais importante da cultura. No país, a raça predominante é a raça II, mas já foram identificadas mais de 45 raças em todo o mundo. Quando infectados, os prejuízos na produção dos cafeeiros podem passar de 50%, causando perdas de até 2 bilhões de dólares anualmente (AGROFIT, 2024; CIFC, 2024).

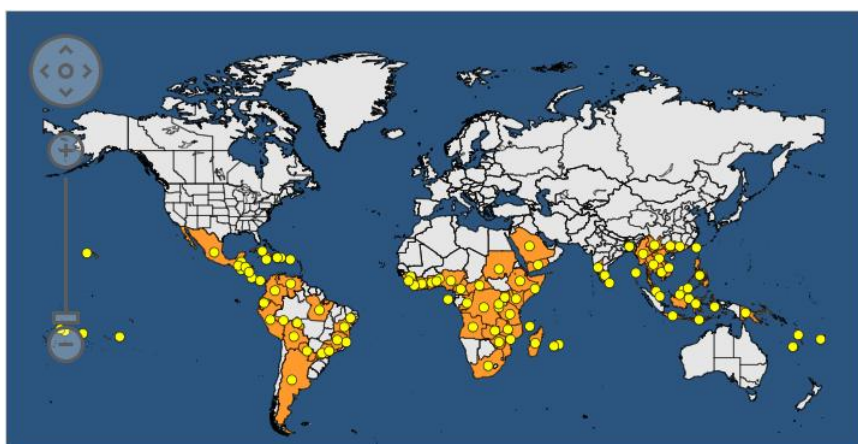


Figura 2. Distribuição do fungo *Hemileia vastatrix* no mundo. Os principais locais produtores de café encontram-se destacados em laranja. Círculos amarelos indicam presença do fungo no país/estado. Fonte: EPPO Global Database.

No geral, os fungos possuem ciclos de vida complexos podendo incluir até 5 estágios, como pínio (ou espermogônio, mais comum em fungos heteróicos), écio (estruturas que produzem esporos), urédio (produção de urediniósporos, responsável pela disseminação

secundária), télio (armazenam esporos de repouso para germinação posterior) e basídio (completa o ciclo infectando o hospedeiro primário). Entretanto, *H. vastatrix* possui o ciclo de vida incompleto, apresentando-se apenas nos estágios urédio, télio e basídio (KUSHALAPPA, 1989). Pertence à família Chaconiaceae (classe: Pucciniomycotina, ordem: Pucciniales), é autóico, ou seja, completa todo seu ciclo de vida apenas em cafeeiro.

A infecção do fungo acontece na face abaxial da folha, através do estômato. O uredósporo penetra na folha, onde há o desenvolvimento de micélios e haustórios (estruturas capazes de absorver nutrientes), formação de novos uredósporos e eventualmente produção de teliósporos e basidiósporos (de funcionalidade ainda não completamente esclarecida para o caso), acontece a reinfecção, queda prematura de folhas e o ciclo se repete (CARVALHO, 2019).

Os esporos são carregados principalmente através de umidade/água até os estômatos, na parte inferior das folhas, onde ocorrem os primeiros sintomas após cerca de 30 dias: manchas arredondadas de cor amarelo-alaranjado (Figura 3). Quando em temperaturas amenas, em torno de 21-23°C, alta umidade e baixa luminosidade, a infecção acontece rapidamente (cerca de 48 horas). Em estágios mais avançados da doença, é possível observar também manchas amareladas na face superior da folha. A infecção avança até que ocorra necrose e queda das folhas da planta, diminuindo a fotossíntese e prejudicando, entre outras coisas, a formação de frutos (AGROFIT, 2024; NUNES, 2006; MARCOLAN, 2015; RHINEY, 2021).



Figura 3. Sintomatologia de infecção por *Hemileia vastatrix*. Fonte: EPAMIG, Ferrugem-do-cafeeiro, imagem por Vicente Luiz de Carvalho.

4.3. Estratégias no controle da ferrugem do café

A prevenção por manejo cultural é bastante presente. A poda periódica das plantas se faz necessária, reduzindo assim o acúmulo de folhas velhas e tecidos mortos, além de contribuir para o crescimento vigoroso de novos brotos e aumento da aeração na lavoura, o que diminui a chance de propagação do fungo (devido à baixa umidade proporcionada) (FILHO, 2019).

Ainda hoje, a utilização de cultivares resistentes ao fungo é a opção mais viável e eficiente para o controle da ferrugem do café (SILVA, 2022). Visto que, a produção de uma variedade resistente é menos afetada pela contaminação por *Hemileia vastatrix*.

A mistura de componentes que apresentam efeito fungicida, a chamada “calda viçosa”, também é utilizada em alguns cultivares (AGROFIT, 2024). Além disso, o controle químico também é uma estratégia consolidada para impedir os danos causados pela ferrugem do café. Para tal, é necessária aplicação dos produtos na época correta, de preferência antes do período chuvoso, que é o mais favorável para infecção (SAGARPA, 2013). Os fungicidas mais utilizados são os que possuem cobre em sua base. Estes são usados para prevenção da doença

e podem ser aplicados tanto em solo quanto nas folhas, de forma a cobrir e proteger a planta contra infecção (MIRANDA, 2013), entretanto, por serem fungicidas de proteção, podem não ser eficazes em casos de grande infestação.

É notório que, apesar de existirem variedades resistentes e formas de diminuir a infecção pelo fungo, a falta de eficiência dos mesmos e os desafios como variabilidade genética do fungo (CARVALHO, *et. al*, 2019), identificação tardia da doença, dificuldade de acesso para tratamento devido à localização predominantemente montanhosa dos cultivares (SERA, 2022), entre outros, ainda são grandes quando comparados aos benefícios que trazem.

4.4. Uso de Proteínas no Controle de Fungos

As plantas possuem defesas naturais para combater diversos patógenos, como parede celular espessa, metabólitos secundários e diversos outros tipos de mecanismos. Também possuem “memória”, que ativa uma resposta imunológica quando padrões específicos de patógenos são reconhecidos por receptores (como proteínas quinases). Além disso, moléculas liberadas por patógenos, conhecidas como efetores, também podem desencadear ou suprimir uma resposta imunológica nas plantas (SILVA, 2022).

Algumas proteínas presentes nas plantas são conhecidas por suas propriedades antifúngicas. Elas podem ser produzidas em condições normais, mas também em condições de estresse biótico ou abiótico das plantas. As defensinas atuam na defesa inata de animais e plantas, se ligam à membrana celular do fungo e provocam sua desestabilização (THOMMA, 2002). As quitinases (famílias PR-3 e PR-4) são responsáveis por hidrolisarem quitina, presente na parede celular de fungos, além de liberarem fragmentos de quitina capazes de ativarem resposta imune nas plantas (KASPRZEWSKA, 2003). As glucanases (família PR-2) hidrolisam glucanos da parede celular de fungos, causando lise e aumentando atividade antifúngica quando em conjunto com quitinases (ANAND, 2009). Thaumatinas (família PR-5) são proteínas osmóticas que se ligam à parede celular do fungo, criando poros e inibindo seu crescimento (LIU, 2010). Lipoxigenases (LOX) são responsáveis por oxidar lipídios das membranas e geram compostos tóxicos para fungos. Proteínas com atividade ribonucleases (família PR-10) são intracelulares, sua produção em plantas está relacionada principalmente à presença de estresse biótico ou abiótico, e atuam degradando RNA do patógeno, causando sua morte (PUNGARTNIK, 2009; MENEZES, 2012).

4.5. Potencial antifúngico das proteínas TcPR-10 e TcPR-4b

De acordo com estudos prévios de Pungartnik, 2009 e Menezes e colaboradores, 2012 e 2014, TcPR-10 selvagem é uma proteína relacionada à patogênese com ação antifúngica e atividade ribonuclease. Estes estudos demonstraram que ela é capaz de degradar RNA de patógenos, comprometendo a síntese proteica e reduzindo significativamente a sobrevivência de fungos como *Moniliophthora perniciosa* e *Saccharomyces cerevisiae*. A internalização da TcPR-10 pelas células fúngicas ocorre de maneira dependente de energia e temperatura, induzindo alterações na permeabilidade da membrana que resultam em danos celulares. Essa especificidade para fungos, sem efeitos adversos em células vegetais, torna a TcPR-10 selvagem uma ferramenta promissora para o controle biológico de patógenos.

Entretanto, TcPR-10 selvagem apresentou um motivo P-loop conservado muito semelhante a regiões potencialmente alergênicas. Para reduzir seu potencial alergênico, especialmente em relação ao motivo supracitado, modificações pontuais (T10P, I30V e H45S) foram realizadas. Essas alterações mantiveram a atividade antifúngica e de ribonuclease da proteína, embora com uma leve redução na taxa de degradação de RNA. A proteína mutante mostrou eficácia similar à selvagem contra *M. perniciosa*, causador da vassoura-de-bruxa em cacau, mas com uma vantagem importante: em testes *in vivo*, apresentou menor capacidade de induzir respostas imunológicas adversas, como produção de IgE e inflamação pulmonar. Isso a torna uma alternativa mais segura e tão eficaz quanto a selvagem para aplicações biotecnológicas (PUNGARTNIK, 2009; MENEZES, 2012).

Em estudos similares realizados pelo mesmo grupo de pesquisa (MENEZES, 2014), a proteína TcPR-4b chamou atenção e se distingue por combinar atividades RNase e DNase dependentes de íons bivalentes (Ca^{2+} e Mg^{2+}), mas não exibe atividade quitinase. Sua ação antifúngica contra *M. perniciosa* está associada, principalmente, à geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), que causam danos oxidativos ao patógeno, além de degradar RNA fúngico e induzir mecanismos de morte celular programada (PCD).

As proteínas TcPR-10 selvagem, TcPR-10 mutante e TcPR-4b representam abordagens complementares no controle de patógenos fúngicos, combinando eficácia biológica com aplicações biotecnológicas seguras.

4.6. Políticas e Regulamentação do uso de OGM em culturas alimentares

No Brasil, segundo o artigo 3º da Lei nº 11.105 de 24 de março de 2005, a definição de OGM é dada como “organismo geneticamente modificado - OGM: organismo cujo material genético – ADN/ARN tenha sido modificado por qualquer técnica de engenharia genética”. Cabe ao CTNBio, órgão competente vinculado ao Ministério da Ciência e Tecnologia, deliberar favoravelmente ou não acerca de formulações e implementação de novos OGMs, bem como acompanhar pesquisas e avanços em áreas como biotecnologia e afins, visando a garantia da qualidade e proteção à saúde.

São permitidos os usos de OGM e seus derivados, ou seja, produtos produzidos por eles, desde que apresentem eficácia em seu propósito e não demonstrem qualquer tipo de ameaça à saúde e integridade, principalmente humana.

Já a Lei nº 14.785, de 27 de dezembro de 2023, regulamenta sobre pesquisa, produção, comercialização e uso de agrotóxicos. No inciso XXVI do artigo 2º, define-se agrotóxicos como “produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e no beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens ou na proteção de florestas plantadas, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos”.

Da mesma forma como a anterior, após análise de risco, segurança e registro conforme exigências, o uso de produtos para controle de pragas e doenças em cultivares diversos é autorizado desde que não proponha ameaça à saúde humana.

A nível mundial, o Protocolo de Cartagena, que entrou em vigor em 11 de setembro de 2003, após conferência realizada pela Convenção sobre Diversidade Biológica (CDB), orienta acerca do transporte, manipulação e uso de OGM em mais de 170 países visando, principalmente, proteger a biodiversidade, equilíbrio ecológico e saúde (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2014).

A regulamentação e transporte entre fronteiras de alguns produtos químicos perigosos e agrotóxicos é regida, principalmente, pela Convenção de Roterdã, que tem participação de mais de 50 países desde que entrou em vigor, em 2004. Os representantes da Convenção no Brasil são IBAMA, Ministério do Meio Ambiente e Ministérios das Relações Exteriores (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2018).

5 METODOLOGIA

5.1. Métodos de Bioquímica e Biologia Molecular

Os experimentos realizados que não possuem seus métodos detalhadamente descritos nesta seção estão de acordo com os protocolos propostos pelo livro *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (SAMBROOK, 1989), tais como géis de eletroforese, SDS-PAGE, Western Blotting, preparo de meios de cultivo, entre outros.

5.2. Construções

As construções utilizadas neste estudo foram obtidas por Menezes et. al, 2012. As sequências das proteínas de cacau anteriormente citadas (TcPR10 selvagem, TcPR10 mutante e TcPR-4b) foram clonadas em vetor pET-28a nos sítios *NdeI* e *Sall*, para as duas primeiras, e *NdeI* e *BamHI* para a última, a fim de se preservar cauda His-tag na porção N-terminal, colaborando para posterior purificação das moléculas.

As sequências-alvo do estudo são:

TcPR10 selvagem (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/ES439858.1/>):

```
>ATGGGTGTCACCATATACGCAAGAGTTCACCTGCTCAGTTGCCCCAGCCAGGATGTTCA
AGGCCTTGATCCTTGATTCCGACAACCTTATCCCCAACTCATGCCTAAATCCATCAAGAAC
GTGGAGTTGATTCAATGGAGATGGCGGTGTTGGAAGCATCAAGCAAACCAACTTCCCTGAAGG
AAGTCACTTCAAGTATTTGAAGAATAGAACCGATGCCCTTGATGTAGACAACCTGTGTCTGCA
AGTATACTACAATTGAGGGTGATGTAATTGGTGACAAGCTTGAATCAATCTCGTACGAGTTG
AAGTTCGAGGCCTCAGGCGCAGGATGCGTTTGCAAGATGACTAGCCACTACCACACTAAAGG
TGACTTTGTTCTCAAGGAAGAGGAAATCAAGGCTGGCAAAGACCAGGCCGTGGAATGTACA
AAGTCGTGGAGGAATACCTCTTGGCCAATCCCAATGTCTACGCTTAA
```

TcPR10 mutante:

```
>ATGGGTGTCACCATATACGCAAGAGTTCACCTGCTCAGTTGCCCCAGCCAGGATGTTCA
AGGCCTTGATCCTTGATTCCGACAACCTTGCCCCAACTCATGCCTAAATCCATCAAGAAC
GTGGAGTTGATTAGTGGAGATGGCGGTGTTGGAAGCATCAAGCAAACCAACTTCCCTGAAGG
AAGTCACTTCAAGTATTTGAAGAATAGAACCGATGCCCTTGATGTAGACAACCTGTGTCTGCA
AGTATACTACAATTGAGGGTGATGTAATTGGTGACAAGCTTGAATCAATCTCGTACGAGTTG
AAGTTCGAGGCCTCAGGCGCAGGATGCGTTTGCAAGATGACTAGCCACTACCACACTAAAGG
```

TGACTTTGTTCTCAAGGAAGAGGAAATCAAGGCTGGCAAAGACCAGGCCGTGGAATGTACA
AAGTCGTGGAGGAATACCTCTTGGCCAATCCCAATGTCTACGCTTAA

Em amarelo estão demarcados os locais onde houve mutações em TcPR10 sel para obtenção de TcPR10 mut. As alterações aconteceram nos aminoácidos da posição 10 (uma treonina por uma prolina), posição 30 (uma isoleucina por uma valina) e posição 45 (uma histidina por uma serina).

TcPR-4b (CocoaGenDB):

>ATGAAAATGGAGAGATTCTGCATTCTGTTGTTAGCTTGTCTGGTGGCTTCTGCTGCTGCCC
AAAGCGCTTCCAATGTGAGAGCTACTTACCATTTATATAACCCTGAGCAGAATAACTGGGAC
TTGACCGCTGTAAGTGCTTTCTGCGCCACCTGGGATGCCAATAAGCCTCTGGAATGGCGCCG
CAAATATGGATGGACGGCCTTTTGTGGTCCAGCTGGTCCTCGAGGGCAAGCTGCTTGCGGCA
GGTGCTTAAGGGTCACGAACACCGGGACCGGAGCTCAGGCAACGGTGAGAATCGTTGATCAG
TGCAGCAACGGAGGCCTAGATTTGGATGTCAATGTGTTTAGACAACCTTGACACAAATGGGAA
CGGCATTGCACAAGGCCACCTAATTGTGAACTATGACTTTGTGGATTGTGGTGACTAA

Os vetores clonados foram transformados em diferentes cepas de *Escherichia coli* (DE3), como BL21 e Rosetta.

5.3. Organismos

Foram utilizadas cepas de *Escherichia coli* (DE3) BL21 transformadas para produção das proteínas TcPR10 (selvagem e mutante), bem como *Escherichia coli* (DE3) Rosetta™ transformada para produção da proteína TcPR-4b.

5.4. Expressão heteróloga das proteínas TcPR10 selvagem, TcPR10 mutante e TcPR-4b em bactérias

As colônias transformantes de cada tipo de *E. coli*, contendo as construções que expressam as proteínas de cacau, foram submetidas a testes de expressão para verificação de solubilidade e indução por IPTG.

Para TcPR10 selvagem e TcPR10 mutante, estoques criopreservados foram ativados em placas de Petri contendo meio LB ágar com antibióticos Cloranfenicol (34 µg/mL) e Canamicina (50 µg/mL), inoculados em meio LB com os mesmos antibióticos e deixados em

agitação a 37°C e 180 rpm até que fosse atingida DO₆₀₀ 0,5 – 0,7. As culturas foram induzidas com 0,8M de IPTG e incubadas por 15h, a 18°C e 180 rpm.

Para TcPR-4b, o estoque criopreservado foi inoculado da mesma forma e antibióticos citados anteriormente para as demais proteínas, entretanto, a incubação ocorreu até que fosse atingida DO₆₀₀ 0,7 – 1,0. O inóculo foi induzido com 0,4M de IPTG e também incubado por 15h, a 18°C e 180 rpm.

Após o tempo de expressão, as culturas foram centrifugadas a $11.000 \times g$, por 20 min a 4 ° C, e os pellets ressuspensos em tampão de lise contendo 20 mM fosfato de sódio dibásico, 500 mM cloreto de sódio, 20 mM imidazol, 0,2 mg/mL lisozima e 10% glicerol.

O conteúdo ressuspensionado foi sonificado (Sonics Vibra Cell™) em gelo, com amplitude de 60%, 30s pulso *on* e 20s pulso *off* por 4 minutos. O conteúdo foi novamente centrifugado, os sobrenadantes foram coletados e os pellets ressuspensos em tampão contendo 20 mM fosfato de sódio dibásico, 500 mM cloreto de sódio, 20 mM imidazol e 8 M ureia.

Ambas frações, solúvel e insolúvel, foram submetidas a SDS-PAGE e Western Blotting para confirmar a localização e tamanho das proteínas, e posteriormente purificadas.

5.5. Purificação das proteínas em Äkta

As frações que apresentaram proteínas foram preparadas (diluídas e filtradas em membrana 0,22 µm) e purificadas em equipamento do tipo FPLC Äkta™ *Start Purifier* (GE Healthcare), utilizando coluna de afinidade His Trap FF 5 mL. Foram eluídas frações de 1 mL em solução tampão contendo 20 mM fosfato de sódio dibásico, 500 mM cloreto de sódio, 500 mM imidazol, para o caso de proteínas purificadas de forma solúvel, e o mesmo tampão, com adição de 8 M ureia, para o caso de proteína purificada de forma insolúvel.

5.6. Confirmação por SDS-PAGE, Western Blotting e Dot Blotting

A purificação das proteínas foi avaliada por SDS-PAGE corado com Comassie Blue R-250 e confirmada por Western Blotting e Dot Blotting, utilizando 10 µL de cada fração eluída das proteínas em membrana de nitrocelulose, bloqueada com BSA 3% em PBS-T e revelada com DAB (3,3'-diaminobenzidina).

5.7. Preparo das proteínas purificadas em tampão contendo 8 M ureia

As proteínas que se apresentaram como insolúveis, mesmo após tentativas de aumentar a solubilidade (diminuir temperatura de expressão, diminuir concentração de IPTG na indução, aumentar tempo de lise por sonicação, etc), foram diluídas até que se reduzissem as concentrações dos componentes para as condições padronizadas de aproximadamente 300 mM de ureia, 20 mM de imidazol e 2 µg de proteína, para fins de testes do efeito destes componentes na infecção do fungo.

5.8. *Desalting* das proteínas purificadas

Para proteínas presentes nas frações insolúveis contendo solução tampão com 8 M ureia após a purificação, foi realizado um *desalting* utilizando colunas de ultrafiltração do tipo Vivaspin® 20. Este tipo de coluna tem design semelhante ao de um tubo de centrífuga de 50 mL, sendo dividido em uma parte de filtração composta de reservatório com capacidade para 20 mL + membrana de PES (polietersulfona) para filtração, capaz de reter moléculas com, neste caso, mais de 10 kDa. Além de uma segunda parte composta pelo coletor.

As amostras de proteínas purificadas, contidas em tampão ureia 8 M, foram colocadas em coluna de ultrafiltração Vivaspin® 20, centrifugadas a 3000 x g por aproximadamente 20 minutos, conforme indicação do fabricante (VIVAPRODUCTS, 2022), e “lavadas” com PBS pelo menos 5 vezes, para troca de tampão e concentração da amostra.

As amostras de proteínas purificadas contidas em tampão sem ureia foram também colocadas em coluna Vivaspin® 20, centrifugadas conforme indicação do fabricante (VIVAPRODUCTS, 2022) e “lavadas” com PBS pelo menos 3 vezes, para troca de tampão e concentração da amostra.

5.9. Montagem do experimento *in vivo* em variedade de café susceptível a *Hemileia vastatrix*

A avaliação *in vivo* da atividade antifúngica das proteínas de cacau TcPR10 selvagem, TcPR10 mutante e TcPR-4b foi realizada através da aspersão de solução tampão, contendo 300 mM de ureia ou PBS, acrescida de 2 µg das proteínas, conforme o tratamento (tabela 1), na

parte subaxial de discos foliares de variedades de café Caturra, que são susceptíveis a *Hemileia vastatrix*.

Foram montados 24 Gerbox com 16 discos foliares cada, 3 para cada tratamento, conforme descrito na tabela a seguir.

Tabela 1. Descrição dos diferentes tratamentos para montagem do experimento *in vivo*.

TRATAMENTO	PROTEÍNA (2 MG)	DEMAIS COMPONENTES
CONTROLE 1	-	Água + <i>H. vastatrix</i>
CONTROLE 2	-	PBS + <i>H. vastatrix</i>
CONTROLE 3	-	300 mM ureia + <i>H. vastatrix</i>
TRATAMENTO 1	TcPR10 selvagem	PBS + <i>H. vastatrix</i>
TRATAMENTO 2	TcPR10 mutante	PBS + <i>H. vastatrix</i>
TRATAMENTO 3	TcPR-4b	PBS + <i>H. vastatrix</i>
TRATAMENTO 4	TcPR10 selvagem	300 mM ureia + <i>H. vastatrix</i>
TRATAMENTO 5	TcPR10 mutante	300 mM ureia + <i>H. vastatrix</i>

Os esporos do fungo *H. vastatrix* foram espalhados por cada Gerbox, contendo 16 discos de cerca de 2 cm de folhas jovens totalmente expandidas, com auxílio de um pincel e cada uma delas recebeu, por *spray*, aspersão de 1 mL de solução de cada tratamento (tabela 1). No dia seguinte, o excesso de esporos foi retirado com algodão umedecido com água destilada. As caixas foram então mantidas por 48h em temperatura amena (21 – 23°C) no escuro (Figura 4). Após 48h, as Gerbox foram condicionadas por aproximadamente 30 dias em temperatura amena, mas em fotoperíodo de 12h claro/12h escuro.

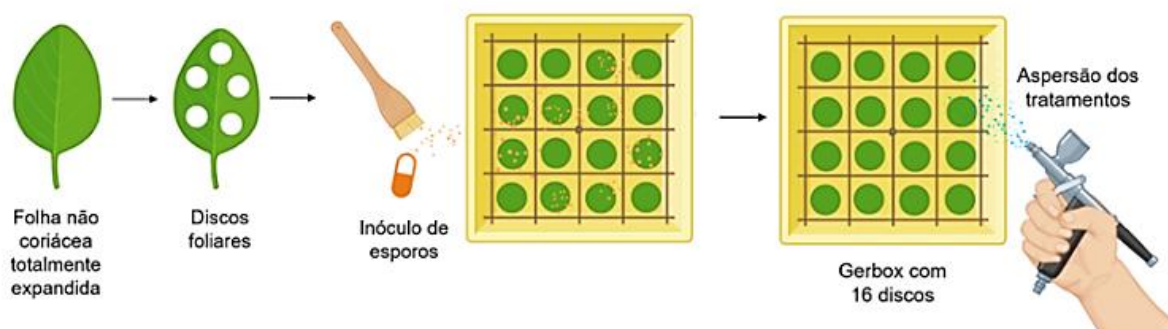


Figura 4. Esquema de desenho experimental. Fonte: Acervo pessoal.

A avaliação da atividade antifúngica das proteínas foi realizada por meio da observação periódica da presença de sintomas nos discos, durante 60 dias de tratamento, além da análise de índice de infecção pelo fungo utilizando escala de Tamayo.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Expressão, purificação e confirmação das proteínas por SDS-PAGE, Dot-Blotting e Western Blotting

Após o crescimento das culturas em meio LB com suplementação de antibióticos, foi realizado um primeiro teste de expressão e solubilidade utilizando protocolo do Laboratório de Biotecnologia Molecular, já padronizado pelo grupo de estudos do Laboratório de Biologia Sintética e Modelagem de Sistemas Biológicos, coordenado pelo Professor Doutor Tiago Mendes. As condições utilizadas foram: crescimento a 37°C sob agitação de 180 rpm até que se atingisse $DO_{600} \sim 0,6$, seguida da adição de 1mM de IPTG e 3h de incubação a 37°C e 180 rpm. O conteúdo final da expressão de proteínas foi pelletizado, ressuspendido, sonificado e separado entre fração solúvel e insolúvel, para cada uma das 3 proteínas (TcPR10 sel, TcPR10 mut e TcPR-4b), em diferentes cepas de *E. coli* transformadas previamente pelo grupo de estudos colaborador.

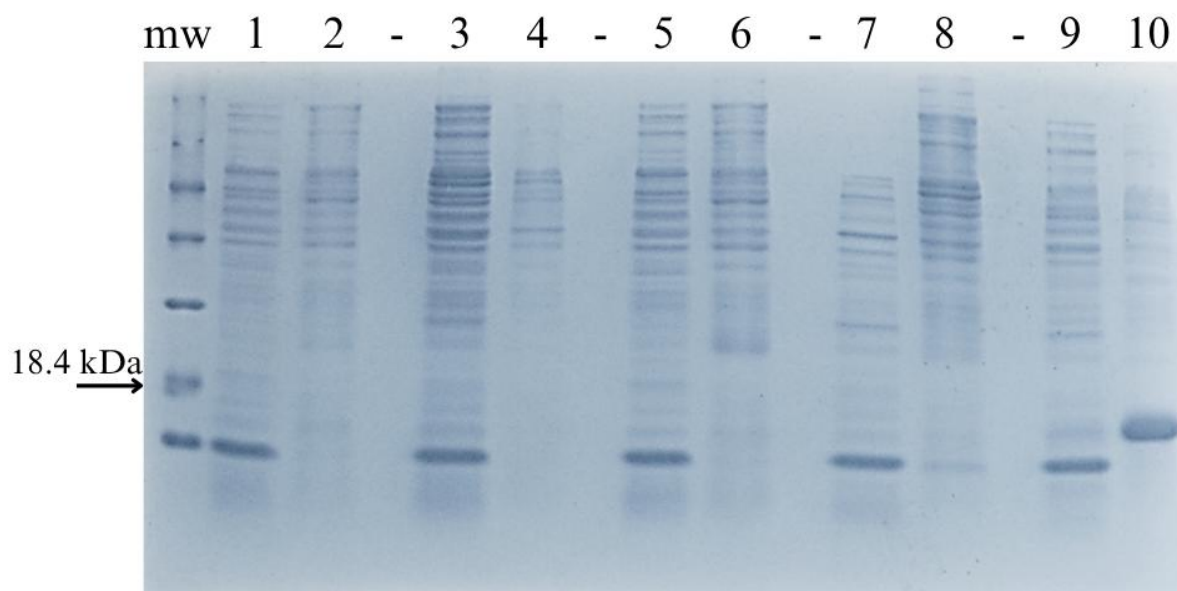


Figura 5. SDS-PAGE do teste de expressão das frações solúvel e insolúvel de cada proteína. Mw: marcador de peso molecular (Pierce™ Unstained Protein MW Marker 26610, ThermoFisher). 1 e 2: Fração solúvel e insolúvel TcPR10 mut em *E. coli* BL21, respectivamente. 3 e 4: Fração solúvel e insolúvel TcPR10 mut em *E. coli* pLysS. 5 e 6: Fração solúvel e insolúvel TcPR10 sel em *E. coli* BL21. 7 e 8: Fração solúvel e insolúvel TcPR10

sel em *E. coli* pLysS. 9 e 10: Fração solúvel e insolúvel TcPR-4b em *E. coli* Rosetta. Onde se vê o sinal “-”: canaletas vazias.

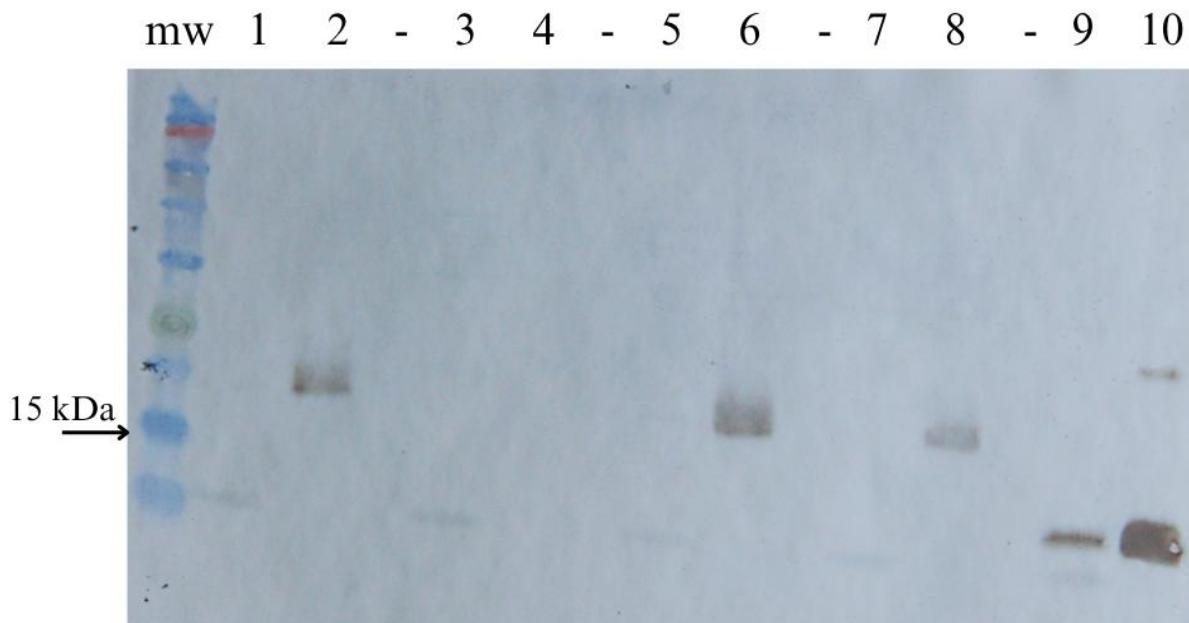


Figura 6. Western Blotting do teste de expressão das frações solúvel e insolúvel de cada proteína. Mw: marcador de peso molecular (TrueColor High Range Protein Marker S2600, Sinapse). 1 e 2: Fração solúvel e insolúvel TcPR10 mut em *E. coli* BL21, respectivamente. 3 e 4: Fração solúvel e insolúvel TcPR10 mut em *E. coli* pLysS. 5 e 6: Fração solúvel e insolúvel TcPR10 sel em *E. coli* BL21. 7 e 8: Fração solúvel e insolúvel TcPR10 sel em *E. coli* pLysS. 9 e 10: Fração solúvel e insolúvel TcPR-4b em *E. coli* Rosetta. Onde se vê o sinal “-”: canaletas vazias.

Este primeiro teste de solubilidade foi realizado em volumes de expressão de aproximadamente 30 mL de meio LB suplementado com antibióticos. Para as proteínas TcPR10 mut e TcPR10 sel, apesar dos padrões de expressão do SDS-PAGE serem semelhantes, o resultado da expressão pelas cepas de *E. coli* BL21 no Western Blotting foi melhor do que nas cepas de *E. coli* pLysS. Mesmo que o manual do fabricante (PROMEGA CORPORATION, 2025) indique que a eficiência de expressão da cepa *E. coli* pLysS não costuma ser afetada após a indução por IPTG, o fato de possuir o plasmídeo pLysS faz com que o organismo produza a lisozima T7, que pode reduzir a expressão de genes sob controle do promotor T7, como é o caso das proteínas clonadas em pET-28a.

Em relação à solubilidade, é visível que todas três proteínas, independente da cepa utilizada, apresentaram maior concentração de expressão nas frações insolúveis. Por conta disso, um segundo teste de solubilidade foi realizado utilizando uma adaptação da metodologia

(descrito no subtópico 5.4). Entre as principais modificações, encontram-se a diminuição da temperatura, menor concentração final de IPTG e maior tempo de incubação. Estas mudanças, combinadas, formam uma boa estratégia para guiar a expressão e concentração das proteínas para a fração solúvel (FRANCIS, PAGE, 2010). Mani e colaboradores (2024) demonstraram também, através de desenho experimental de Behnken e testes de bancada, que a alteração nos fatores supracitados influenciou na expressão solúvel de proteínas, como a imunotoxina anti-HER2.

Dessa forma, foi realizado um novo teste de expressão, indução e solubilidade das proteínas, apenas nas cepas que indicaram maior produção no teste anterior (*E. coli* BL21 e *E. coli* Rosetta).

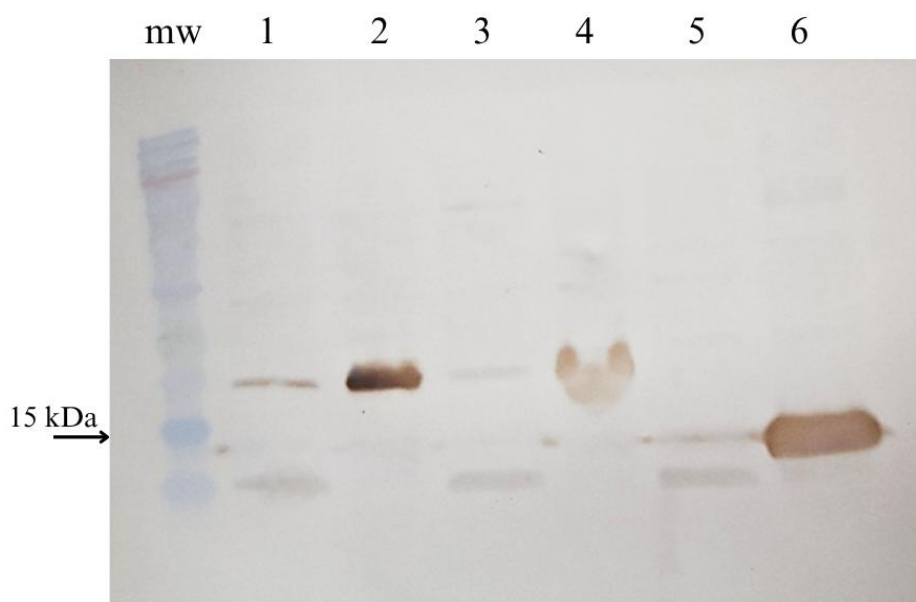


Figura 7. Western Blotting do teste de expressão das frações solúvel e insolúvel de cada proteína. Mw: marcador de peso molecular (TrueColor High Range Protein Marker S2600, Sinapse). 1 e 2: Fração solúvel e insolúvel TcPR10 mut em *E. coli* BL21, respectivamente. 3 e 4: Fração solúvel e insolúvel TcPR10 sel em *E. coli* BL21. 5 e 6: Fração solúvel e insolúvel TcPR-4b em *E. coli* Rosetta.

É possível observar que a expressão aumentou significativamente para as três proteínas. Entretanto, a maior parte da produção continua nas frações insolúveis. A expressão foi refeita nas condições adaptadas e escala. Tanto as frações solúveis quanto as frações insolúveis de cada proteína foram purificadas, a fim de avaliar se o rendimento na solúvel seria suficiente para realizar os testes posteriores. Cada uma das proteínas foram eluídas em diversas frações de 1 mL que foram quantificadas por metodologia de Bradford (1976), TcPR10 sel e TcPR10 mut apresentaram maior quantificação nas frações insolúveis enquanto que TcPR-4b apresentou

quantificação satisfatória na fração solúvel. Além disso, as frações foram testadas por Dot-Blotting e em conjunto com a quantificação prévia, foram eliminadas as que não contivessem quantidade significativa de proteína.

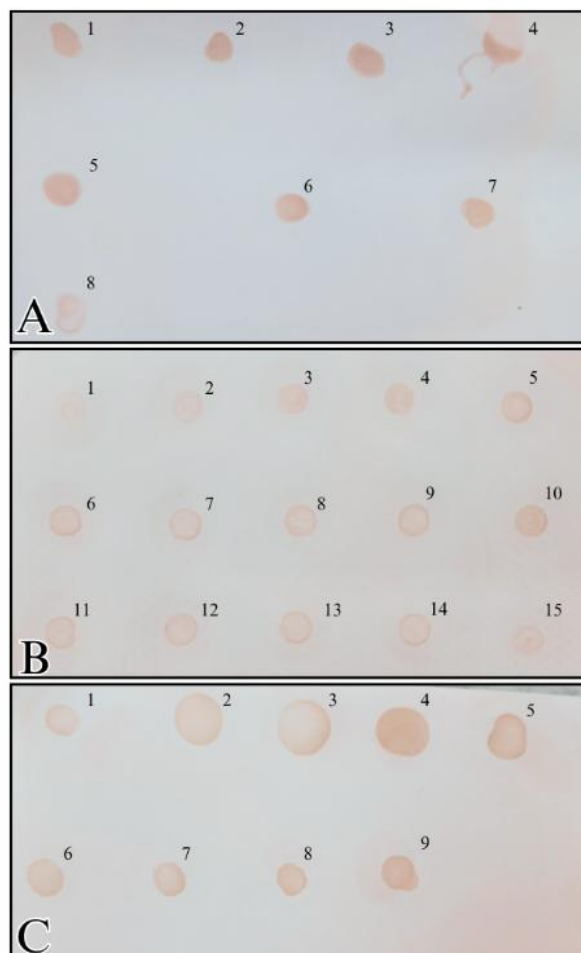


Figura 8. Dot-Blotting da purificação da porção insolúvel de cada proteína TcPR10 e solúvel da TcPR-4b em que cada ponto se refere à uma fração eluída ao final da purificação. A: TcPR10 selvagem. B: TcPR10 mutante. C: TcPR-4b.

Todas as frações, com exceção de F1 da TcPR10 mut, por se apresentar com menor concentração, foram aplicadas em SDS-PAGE e confirmadas por Western Blotting. A fração mais concentrada de cada uma das proteínas foi submetida a *desalting* utilizando membrana de ultrafiltração Vivaspin 20.

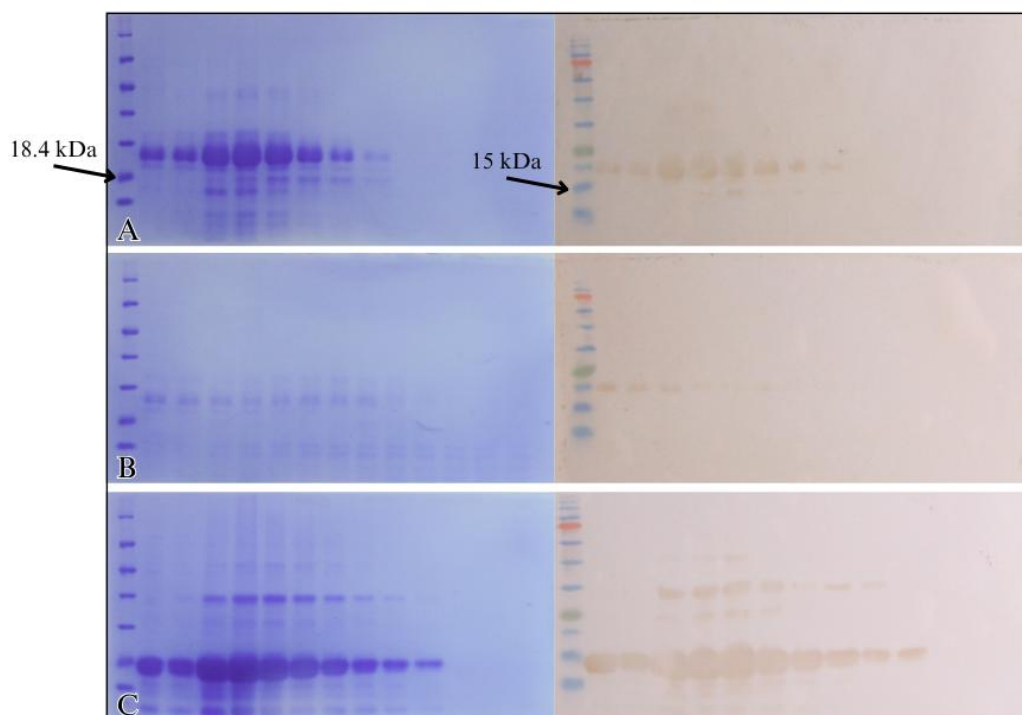


Figura 9. SDS-PAGE e Western Blotting da purificação da porção insolúvel de cada proteína TcPR10 e solúvel da TcPR-4b. A: TcPR10 selvagem. B: TcPR10 mutante. C: TcPR-4b.

6.2 Desalting das proteínas purificadas para tampão contendo PBS

Foi colocado no tubo de filtração toda a fração (1 mL) e adicionado 9 mL de PBS, totalizando 10 mL. Os tubos contendo a fração diluída foram centrifugados a 3000 x g, para que não houvesse risco de rompimento da membrana, por aproximadamente 20 min. Ao final dos 20 minutos, foi observado que a filtração estava incompleta, portanto, mais 20 minutos de centrifugação foram acrescentados a cada etapa.

Este processo foi repetido por pelo menos 5 vezes para TcPR10 sel e TcPR10 mut, que continham ureia em sua purificação final, e pelo menos 3 vezes para TcPR-4b que, por sua vez, não continha ureia em sua porção final.

Tabela 2. Concentração, por Bradford, das frações eluídas antes e após *desalting* usando membrana de ultrafiltração Vivaspin 20.

PROTEÍNA	ANTES DO <i>DESALTING</i>	DEPOIS DO <i>DESALTING</i>
TcPR10 sel	0,92 mg/mL	353 µg/mL
TcPR10 mut	0,33 mg/mL	180 µg/mL
TcPR-4b	1,09 mg/mL	310 µg/mL

Apesar do manual do fabricante (VIVAPRODUCTS, 2022) afirmar que, assim como em outros tipos de filtração utilizando o produto, na etapa de *desalting* deveria acontecer a concentração das amostras, ao final do processo, pôde-se observar uma perda significativa de proteínas.

A membrana do produto é composta de polietersulfona, um polímero conhecido por possuir baixa adsorção de proteínas. Entretanto, como as proteínas estavam anteriormente em solução contendo 8M de ureia, em algum momento da troca de tampão é possível que tenha ocorrido a precipitação das mesmas dentro do tubo de ultrafiltração, por conta da queda brusca na molaridade. Isto dificultaria a recuperação das proteínas em PBS, visto que se apresentavam insolúveis.

Já TcPR-4b não estava contida em tampão de ureia. Entretanto, também havia uma quantidade significativa de imidazol (500 mM) após a eluição e, por isso, seria importante que passasse pelo mesmo processo de *desalting*. O resultado de concentração após a troca de tampão levanta o questionamento acerca da real eficácia do tubo de filtração, além da forma como o procedimento foi realizado. Apesar de amplamente utilizado por conta de seu pH praticamente neutro, PBS pode não ser a melhor alternativa para esta função, ou pode ser necessário adicionar outro componente para auxiliar na migração das proteínas pela membrana de filtração para o tampão final.

6.3 Testes *in vivo* com proteínas e tampão veículo contendo PBS

O experimento foi dividido em duas partes: testes sem e com ureia, que podem ser observados, respectivamente, neste tópico 6.3 e no tópico 6.4. Após a obtenção das proteínas em solução contendo PBS e, baseado em testes antifúngicos realizados com elas por Menezes e colaboradores (2012), chegou-se à conclusão de que a concentração de aproximadamente 2

μg por disco seria suficiente para avaliação do potencial antifúngico das proteínas TcPR contra *Hemileia vastatrix* em exemplares de café Caturra (susceptíveis ao parasita).

Com isso, foram preparadas amostras de 1 mL de solução contendo proteína e PBS para aplicar em cada Gerbox, conforme demonstrado na tabela a seguir.

Tabela 3. Concentração inicial (“[inicial]”) das amostras de proteína e final (“[final]”) da solução utilizada para cada tratamento.

PROTEÍNA	[INICIAL]	[FINAL]
TcPR10 sel	353 $\mu\text{g/mL}$	270 μL proteína + 2,73 mL PBS
TcPR10 mut	180 $\mu\text{g/mL}$	533 μL proteína + 2,47 mL PBS
TcPR-4b	310 $\mu\text{g/mL}$	310 μL proteína + 2,70 mL PBS

A solução final de cada tratamento foi preparada para um volume 3x maior, visto que foram realizados 3 replicatas. Além dos 3 tratamentos demonstrados na tabela 3, foram feitos também dois controles: um aplicando-se água e outro aplicando-se somente PBS.

As folhas de café Caturra foram cortadas e alocadas em um Gerbox contendo água (para garantir umidade), com a parte subaxial voltada para cima. O procedimento foi realizado conforme esquema apresentado no subtópico 5.9, figura 4.

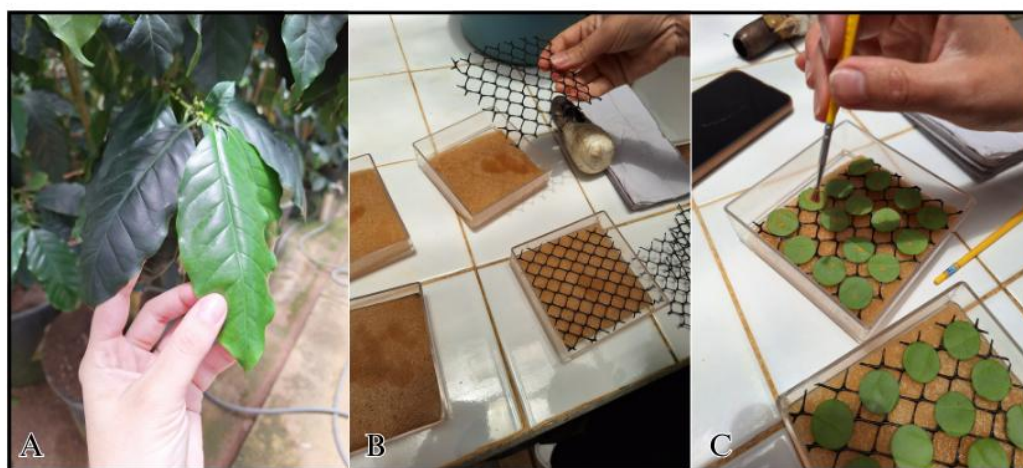


Figura 10. Imagem representativa da montagem dos experimentos. A: Folha jovem, totalmente expandida de café Caturra. B: Montagem dos Gerbox com espuma embebida em água destilada e grade para evitar que as folhas encostem na água e apodreçam. C: Esporos de *Hemileia vastatrix* sendo espalhados com auxílio de um pincel. Fonte: acervo pessoal.

Após a montagem do experimento e passadas as 48h iniciais de infecção, os Gerbox foram mantidas em foto período 12h claro – 12h escuro em temperatura aproximada de 26°C. Fotografias para acompanhamento do andamento experimental foram realizadas com 30, 45 e 60 dias após a infecção (figuras 11 a 15).

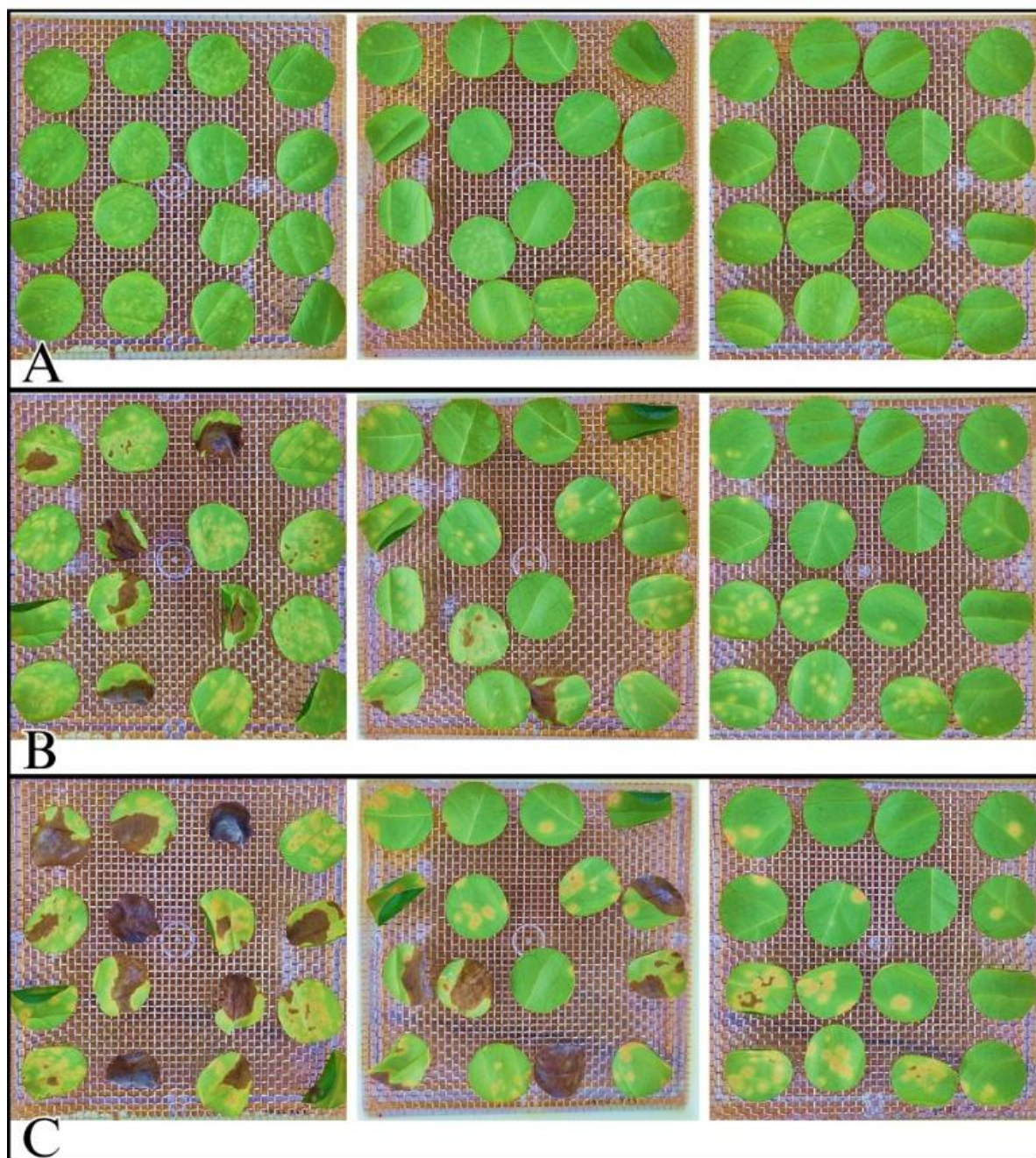


Figura 11. Replicatas do controle positivo de infecção contendo fungo *H. vastatrix* e água. A: fotografias após 30 dias de infecção. B: fotografias após 45 dias de infecção. C: fotografias após 60 dias de infecção.

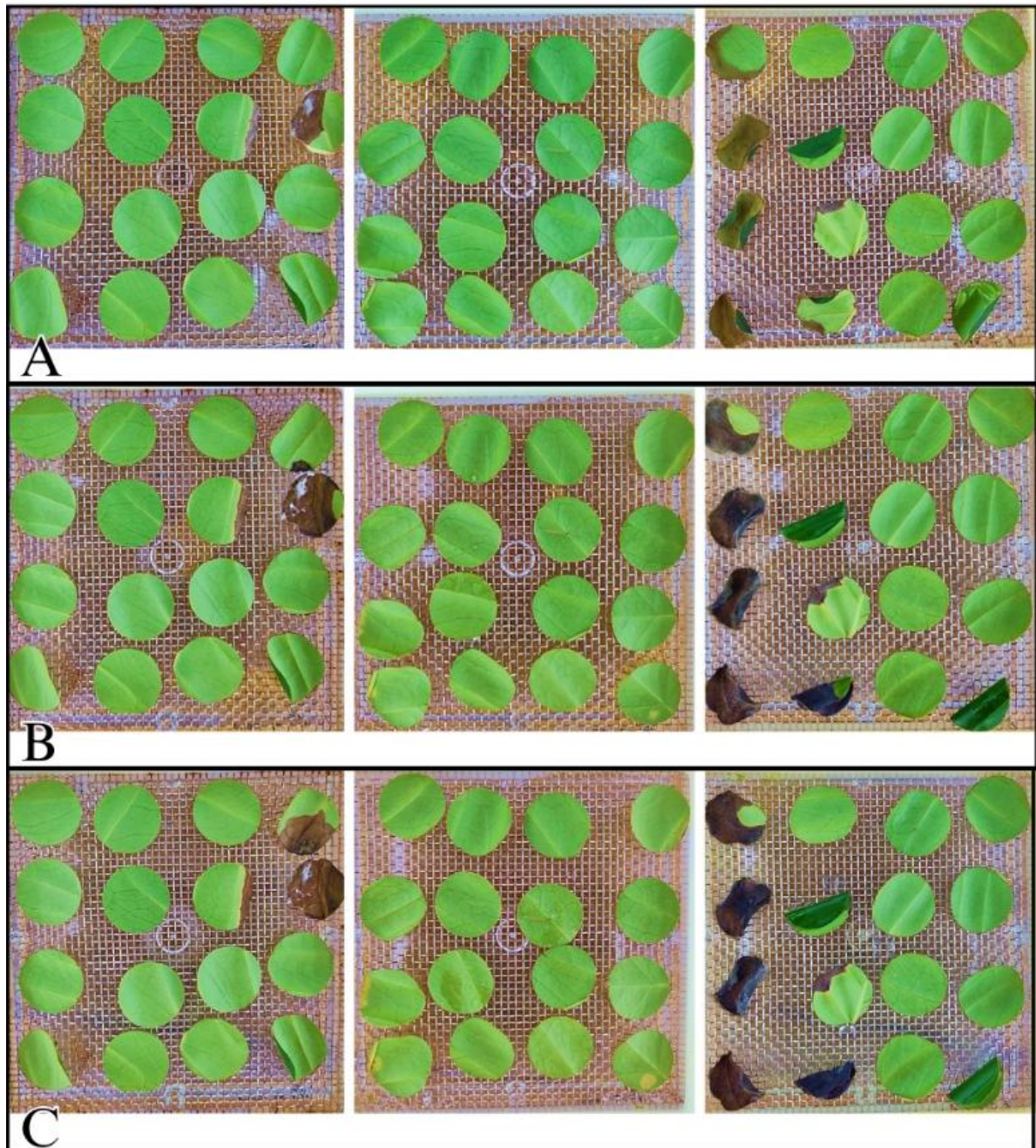


Figura 12. Replicatas do controle positivo de infecção contendo fungo *H. vastatrix* e PBS. A: fotografias após 30 dias de infecção. B: fotografias após 45 dias de infecção. C: fotografias após 60 dias de infecção.

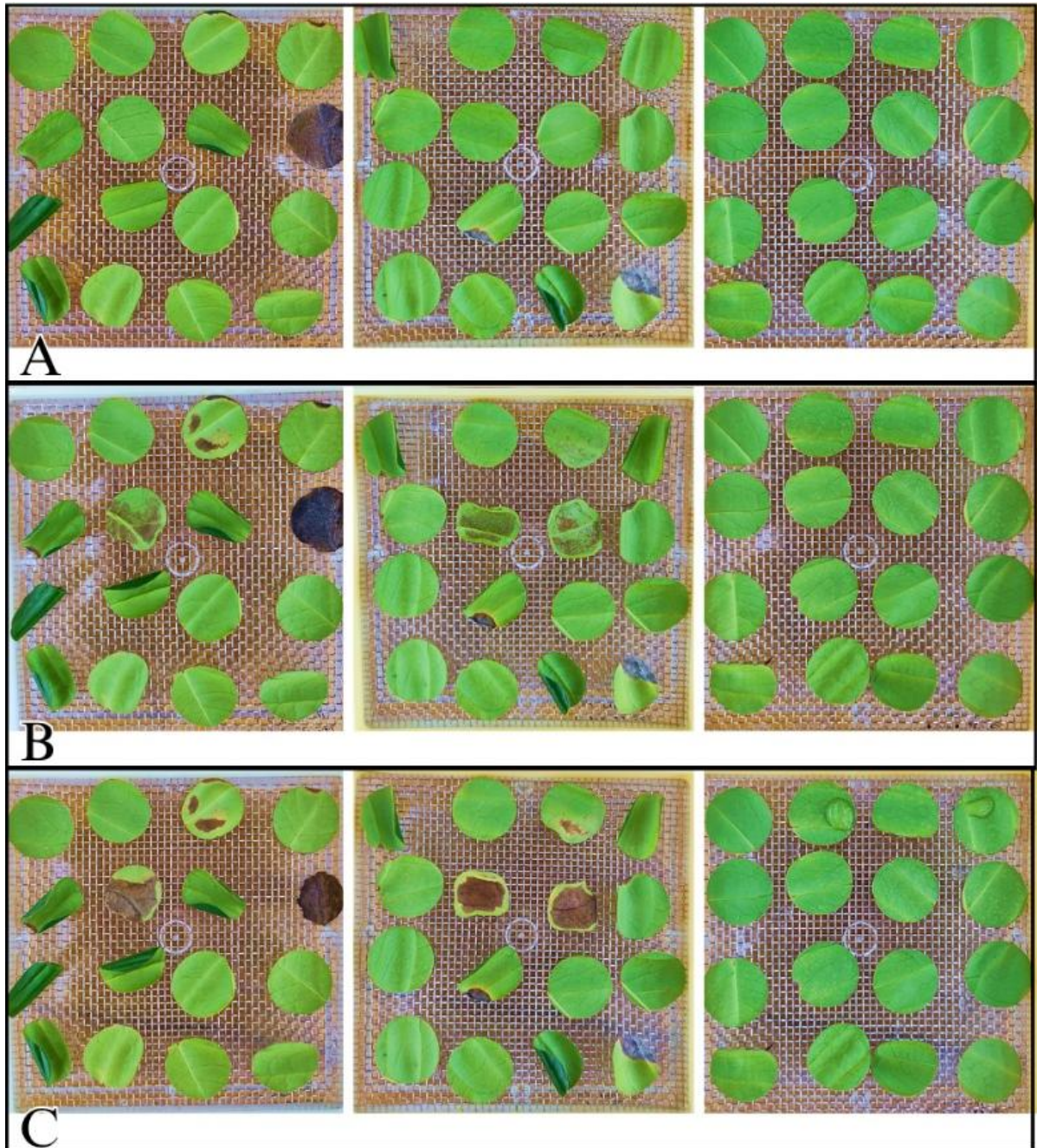


Figura 13. Replicatas do tratamento 1 contendo fungo *H. vastatrix* e proteína TcPR10 sel em solução de PBS. A: fotografias após 30 dias de infecção. B: fotografias após 45 dias de infecção. C: fotografias após 60 dias de infecção.

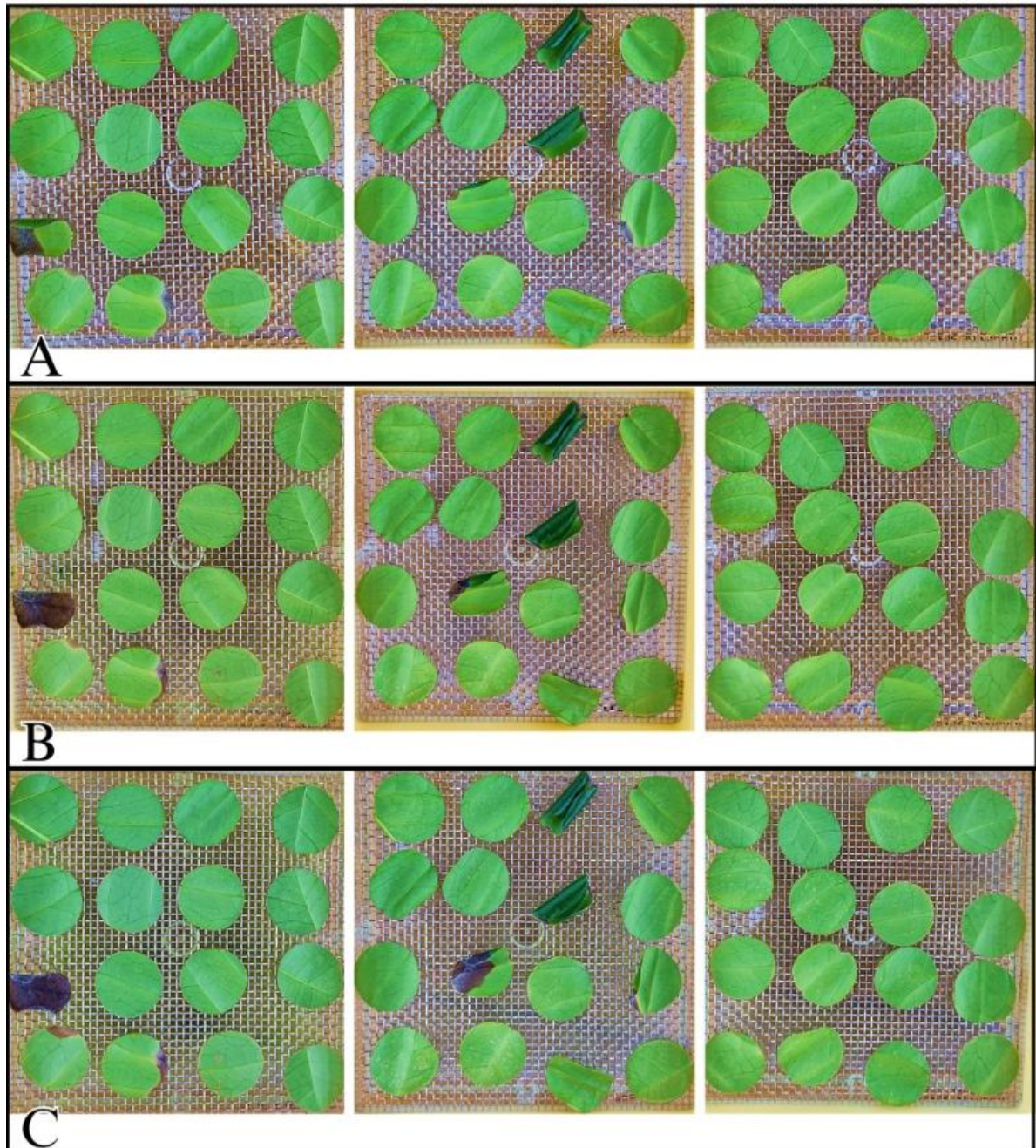


Figura 14. Replicatas do tratamento 2 contendo fungo *H. vastatrix* e proteína TcPR10 mut em solução de PBS. A: fotografias após 30 dias de infecção. B: fotografias após 45 dias de infecção. C: fotografias após 60 dias de infecção.

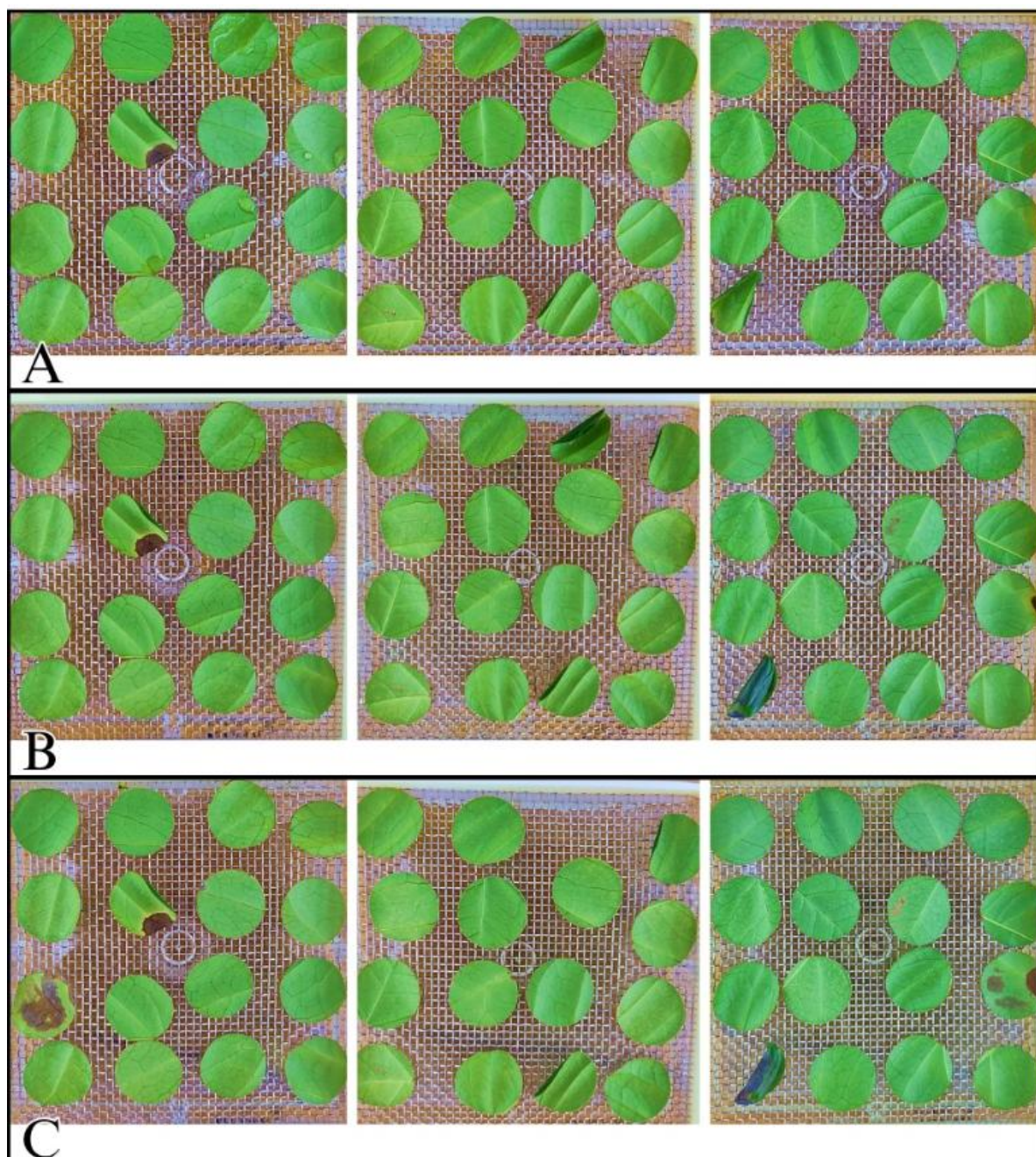


Figura 15. Replicatas do tratamento 3 contendo fungo *H. vastatrix* e proteína TcPR-4b em solução de PBS. A: fotografias após 30 dias de infecção. B: fotografias após 45 dias de infecção. C: fotografias após 60 dias de infecção.

O índice de severidade da infecção por *H. vastatrix* foi medido visualmente de acordo com a escala de Tamayo (1988), referência em diversas pesquisas que envolvem experimentos com o fungo causador da ferrugem do cafeeiro. A escala é composta por 6 estágios de infecção, desde nenhuma apresentação de sintomas até a fase de esporulação visível, elencando para cada uma delas as notas de 1 a 6, em que 1 indica a planta saudável e 6 o maior estágio de severidade

de infecção. Um exemplo pode ser observado na figura 16, imagem retirada de Capucho *et al.* (2005).



Figura 16. Escala visual para avaliação da ferrugem do cafeeiro em folhas destacadas. Imagem retirada de Capucho *et al.* (2005), baseada na escala proposta por Tamayo (1988).

Após conferir nota (1-6) para cada unidade experimental, foi calculada a média aritmética dos valores para cada um dos tratamentos, nas três datas de observação (30, 45 e 60 dias após infecção).

Além disso, foi realizada a avaliação visual da necrose nos discos de planta nas mesmas datas para cada tratamento. A taxa foi calculada a partir da presença ou ausência de algum ponto de necrose (por menor que seja), em cada disco de cada Gerbox. Foi realizada média aritmética e aplicada porcentagem em relação ao total de discos em cada data, chegando-se assim ao valor representativo de cada tratamento.

Tabela 4. Índice de severidade de cada tratamento: avaliação realizada visualmente com base na escala de Tamayo (1988). Os valores indicam a média das três replicatas para cada um dos dias de observação. Taxa de necrose de cada tratamento: avaliação realizada visualmente com base em presença ou ausência de pontos de necrose. Os valores indicam a média das três replicatas, em porcentagem, para cada um dos dias de observação.

TRATAMENTO	Índice de severidade (Tamayo) ^a			Taxa de necrose (%) ^b		
	30 DIAS	45 DIAS	60 DIAS	30 DIAS	45 DIAS	60 DIAS

Controle 1 (água)	1,67	3,13	4,52	0	22,92	50
Controle 2 (PBS)	1,04	1,19	1,40	16,67	18,75	33,33
Tratamento 1	1,041	1,15	1,17	16,67	22,92	22,92
Tratamento 2	1,06	1,17	1,23	12,5	14,58	16,67
Tratamento 3	1,02	1,087	1,19	2,08	6,25	10,42

^a Índice de severidade, foram aplicadas notas de 1 a 6 de acordo com o nível de infecção com base nas imagens de referência da escala de Tamayo.

^b Taxa de necrose foi calculada com base na presença (1) ou ausência (0) de morte celular de cada disco, dividido pela quantidade total de discos de cada Gerbox (16).

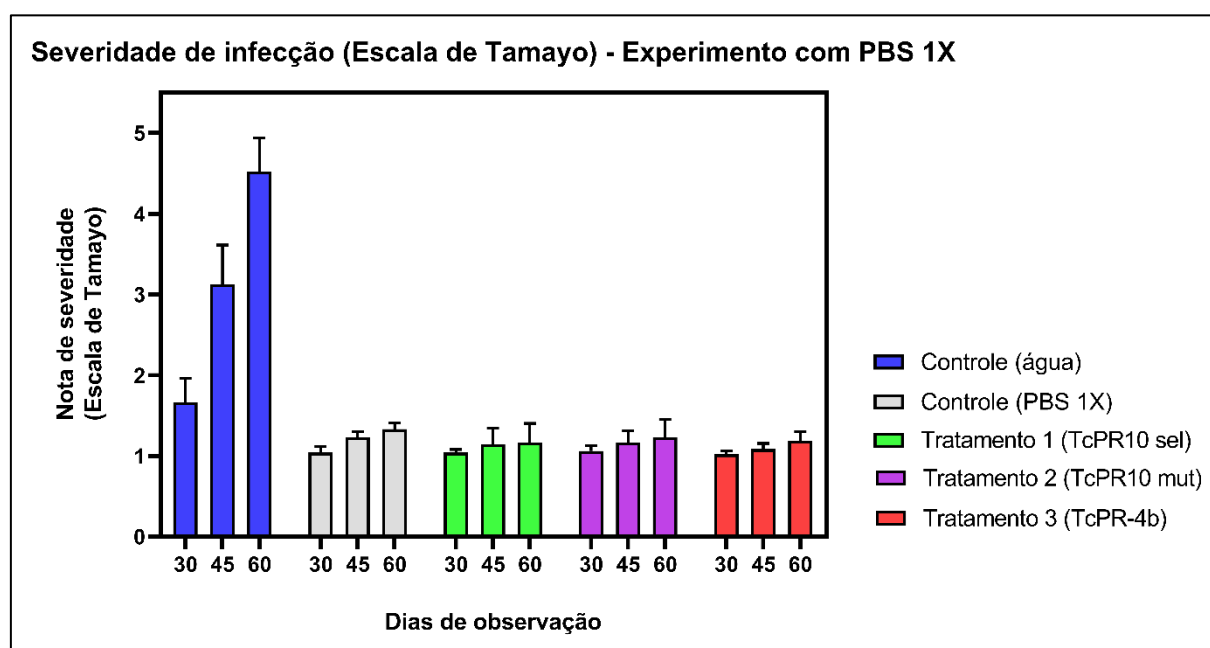


Figura 17. Gráfico representativo de severidade de infecção com base na escala de Tamayo (1988). Em azul, tem-se o controle de infecção com água. Em cinza, o controle com PBS. Em verde, roxo e vermelho, têm-se os tratamentos 1, 2 e 3, respectivamente.

A análise estatística entre os grupos foi realizada por ANOVA com correção de Tukey para comparação entre os tipos de tratamento. Para os discos foliares que apresentaram necrose em praticamente toda sua área na primeira observação (30 dias), foi considerada a nota 1 e, para aqueles que necrosaram com o passar do tempo, foi considerada a última nota na observação anterior.

Na primeira observação (30 dias), houve diferença significativa na severidade de infecção entre os tratamentos e o controle com água ($p < 0,05$). Isso indica que esses tratamentos podem possuir efeito protetor contra infecção das plantas por *H. vastatrix*. Entretanto, não

houve diferença significativa entre os tratamentos contendo proteínas e o controle contendo PBS ($p > 0,5$), sugerindo que os efeitos nestes primeiros 30 dias também podem ser atribuídos à presença do tampão veículo (PBS) ou à ação inespecífica dos compostos.

No segundo (45 dias) e terceiro (60 dias) tempos de observação do experimento, esse efeito se intensificou, ou seja: a diferença entre o controle contendo água e os demais grupos (incluindo o controle com PBS) continuou altamente significativa ($p < 0,0001$), reforçando o papel protetor dos tratamentos aplicados.

Como esperado, as notas finais de severidade para o tratamento 1 (TcPR10 sel) são ligeiramente melhores que as do tratamento 2 (TcPR10 mut), já que a proteína em sua forma mutada apresenta menor potencial alergênico em estudos realizados por Menezes (2012) mas, consequentemente, atividade antifúngica ligeiramente menor que a proteína em sua forma selvagem, quando aplicadas contra *Moniliophthora perniciosa*.

A ausência de diferença estatística entre os tratamentos e o PBS até o final do experimento reforça a necessidade de avaliar com mais profundidade o efeito isolado do tampão sobre o fungo, bem como sua possível interferência na ação das proteínas. Em 2019, Kesten e colaboradores publicaram um estudo sobre o efeito da alteração de pH nas plantas induzido pelos fungos que as infectam. O mesmo estudo levanta a informação de que o leve aumento do pH (alcalinização) do meio é um dos principais mecanismos de defesa que as plantas externalizam ao contato com patógenos, porque acaba “fortalecendo” a integridade do tecido foliar. O pH em torno de 7,4 do tampão fosfato, levemente alcalinizado, pode ter contribuído para iniciar esse processo, protegendo as amostras e impedindo a infecção rápida.

Apesar da diferença estatística não ter sido significativa entre o controle PBS e o restante dos tratamentos, através das imagens (figura 17) e das médias das notas na escala de Tamayo (tabela 4) é possível observar que alguns (poucos) discos de plantas presentes no controle PBS chegaram a esporular ao final dos 60 dias de observação, fato que não acontece nos demais tratamentos com proteínas.

O efeito antifúngico das proteínas TcPR10 sel, TcPR10 mut e TcPR-4b foi testado e teve boa eficácia contra *Moniliophthora perniciosa*, fungo causador da vassoura-de-bruxa (PUNGARTNIK, 2009; MENEZES, 2012). Este parasita é classificado como hemibiotrófico, ou seja, começa invadindo o hospedeiro sem matá-lo e depois, o mata para se nutrir de células mortas (MEINHARDT, 2008). Já o fungo *Hemileia vastatrix* é classificado como biotrófico,

ou seja, que precisa do hospedeiro vivo para sobreviver (TALHINHAS, 2017). Portanto, não se sabe se as proteínas podem ter maior efeito em fungos com outras características como o *Moniliophthora perniciosa*, que é hemibiotrófico (apresenta fases biotróficas e também necrotróficas no seu ciclo de vida).

É possível que o efeito protetor e interferência causada pelo tampão veículo (PBS) tenha se perdido ao longo da duração do experimento e, por isso, o grau de severidade tenha se tornado ligeiramente maior. Em contrapartida, o mesmo pode ter ocorrido com o efeito das proteínas, que podem ter sido parcialmente degradadas com o tempo.

Uma opção, para futuros testes, seria aplicar uma segunda dose de solução proteica em cada tratamento ou dose única em maior concentração. Da mesma forma, repetir o experimento em diferentes períodos do ano e, de preferência, com maior número de replicatas também pode ser uma alternativa viável para melhorar a resolução do experimento.

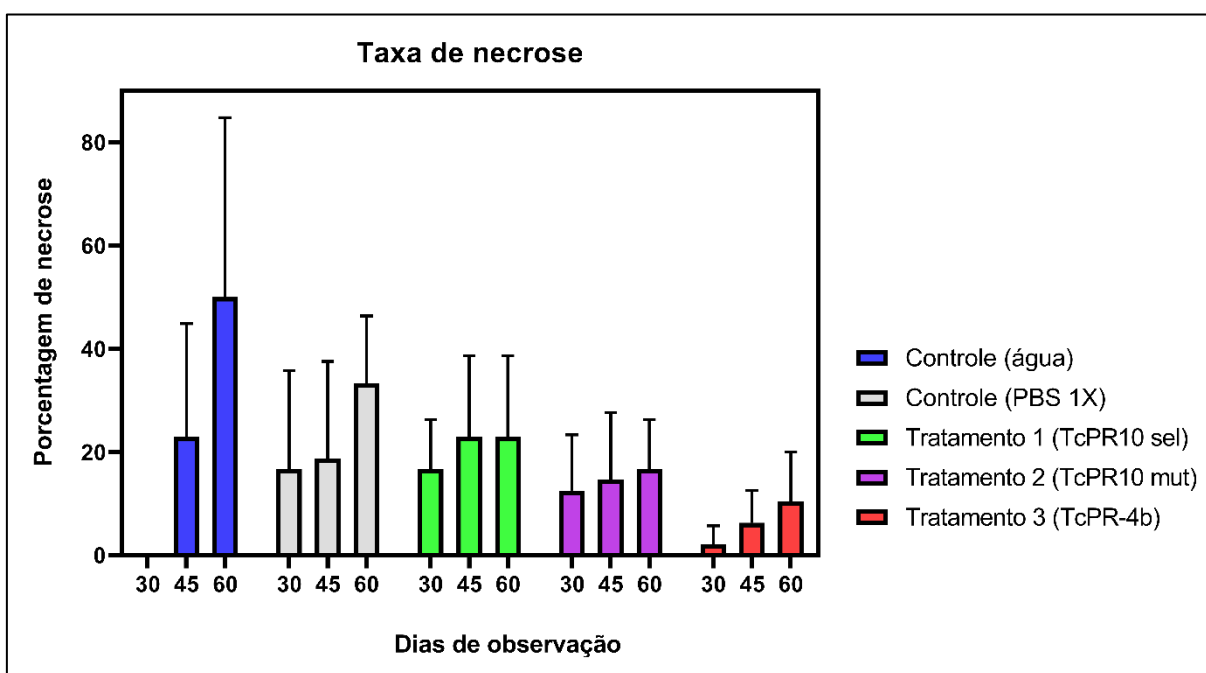


Figura 18. Gráfico representativo de taxa de necrose com base presença e ausência de lesão. Em azul, tem-se o controle de infecção com água. Em cinza, o controle com PBS. Em verde, roxo e vermelho, têm-se os tratamentos 1, 2 e 3, respectivamente.

Para avaliar taxa de necrose, também foi utilizada estatística por ANOVA e correção por Tukey. No primeiro (30 dias) e segundo (45 dias) tempo, não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os grupos ($p > 0,05$ para todas as comparações), indicando que

não houve efeitos estatisticamente significativos dos tratamentos aplicados, por ação direta das proteínas recombinantes ou por influência do tampão PBS.

Já no terceiro tempo (60 dias), houve uma diferença estatisticamente significativa entre o tratamento com a proteína TcPR-4b e o controle com água ($p = 0,0321$). Ou seja, entre todos os tratamentos avaliados, apenas a proteína recombinante TcPR-4b apresentou efeito diferenciado e relevante no último tempo de avaliação. No entanto, não foram detectadas diferenças significativas entre os demais tratamentos e, principalmente, entre os tratamentos e o controle contendo PBS, reforçando a hipótese de que o tampão veículo pode interferir no efeito protetor contra o fungo.

Apesar disso, o controle contendo PBS apresentou índice de necrose ligeiramente maior que os tratamentos, em valores absolutos (tabela 4).

6.4 Testes *in vivo* com proteínas e tampão veículo contendo ureia 300 mM

As segundas frações mais concentradas da purificação das proteínas TcPR10 selvagem e TcPR10 mutante contendo ureia foram utilizadas para os tratamentos 4 e 5. TcPR-4b não foi utilizada, pois não foi purificada em tampão contendo ureia. Com isso, foram preparadas amostras de 1 mL de solução contendo proteína e PBS para aplicar em cada Gerbox, conforme demonstrado na tabela a seguir.

Tabela 5. Concentração inicial (“[inicial]”) das amostras de proteína e final (“[final]”) da solução utilizada para cada tratamento.

PROTEÍNA	[INICIAL]	[FINAL]
TcPR10 sel	860 µg/mL	111 µL proteína + 2,85 mL PBS
TcPR10 mut	260 µg/mL	370 µL proteína + 7,74 mL PBS

Considerando o fato de que são 3 Gerbox para cada tratamento, o volume remanescente de cada preparo foi armazenado, visto que foi necessário adicionar uma quantidade superior e ultrapassando o volume necessário para o experimento (3 mL).

Este experimento contendo ureia foi realizado com a finalidade de analisar se a presença de baixas concentrações de ureia iria interferir nos resultados ou causar algum tipo de dano na planta. O protocolo experimental utilizado foi semelhante ao do subtópico anterior. O controle positivo de infecção com água também foi o mesmo (figura 11).

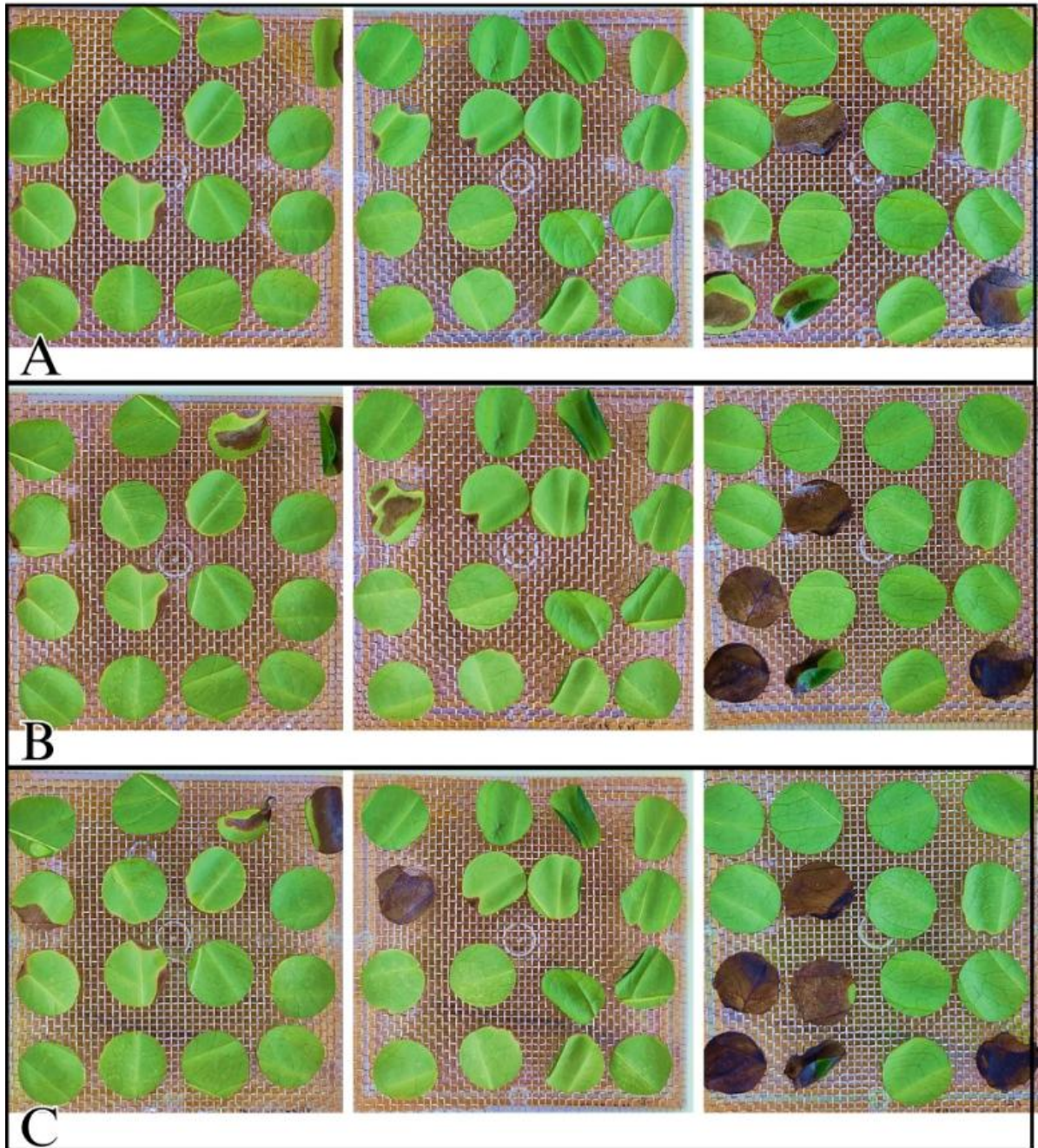


Figura 19. Replicatas do controle positivo de infecção contendo fungo *H. vastatrix* e ureia. A: fotografias após 30 dias de infecção. B: fotografias após 45 dias de infecção. C: fotografias após 60 dias de infecção.

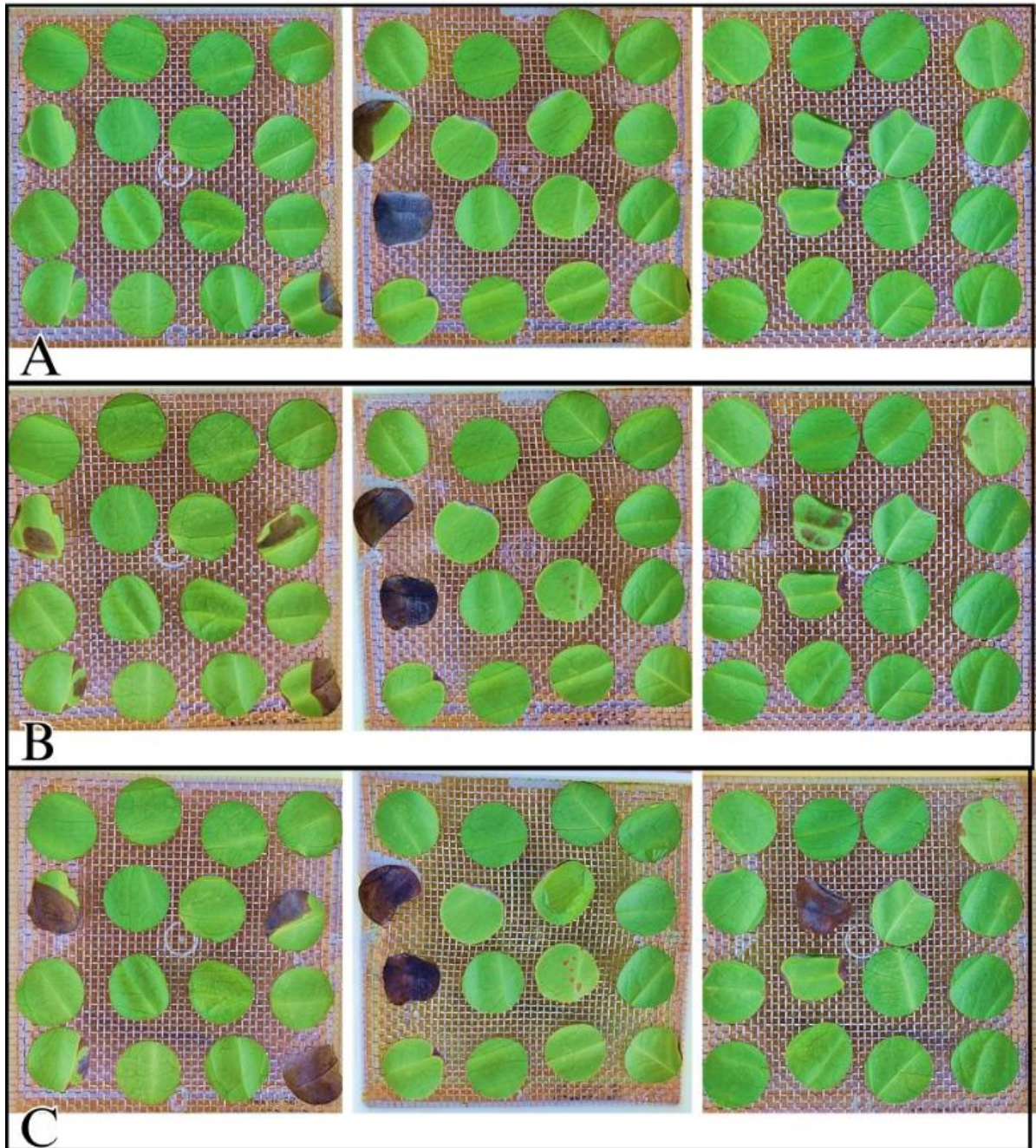


Figura 20. Replicatas do tratamento 4 contendo fungo *H. vastatrix* e proteína TcPR10 sel em solução de ureia. A: fotografias após 30 dias de infecção. B: fotografias após 45 dias de infecção. C: fotografias após 60 dias de infecção.

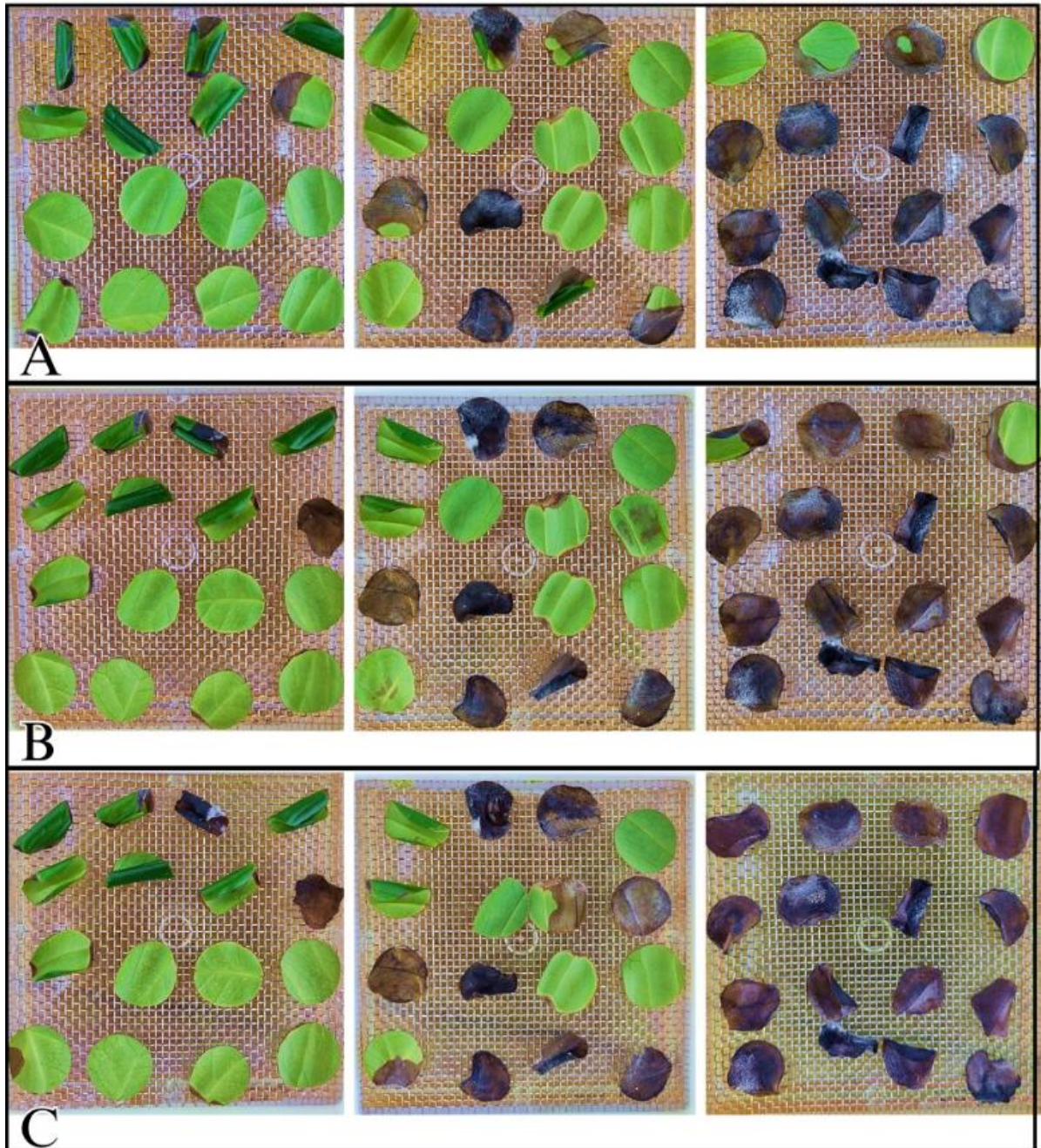


Figura 21. Replicas do tratamento 5 contendo fungo *H. vastatrix* e proteína TcPR10 mut. A: fotografias após 30 dias de infecção. B: fotografias após 45 dias de infecção. C: fotografias após 60 dias de infecção.

Tabela 6. Índice de severidade de cada tratamento: avaliação realizada visualmente com base na escala de Tamayo (1988). Os valores indicam a média das três replicatas para cada um dos dias de observação. Taxa de necrose de cada tratamento: avaliação realizada visualmente com base em presença ou ausência de pontos de necrose. Os valores indicam a média das três replicatas, em porcentagem, para cada um dos dias de observação.

TRATAMENTO	Índice de severidade (Tamayo)			Taxa de necrose (%)		
	30 DIAS	45 DIAS	60 DIAS	30 DIAS	45 DIAS	60 DIAS
Controle 1 (água)	1,67	3,13	4,52	0	22,92	50
Controle 3 (ureia)	1,04	1,23	1,33	25	27,08	29,17
Tratamento 4	1,04	1,13	1,29	25	31,25	33,33
Tratamento 5	1	1,03	1,09	60,42	70,83	77,08

Severidade de infecção (Escala de Tamayo) - Experimento com ureia

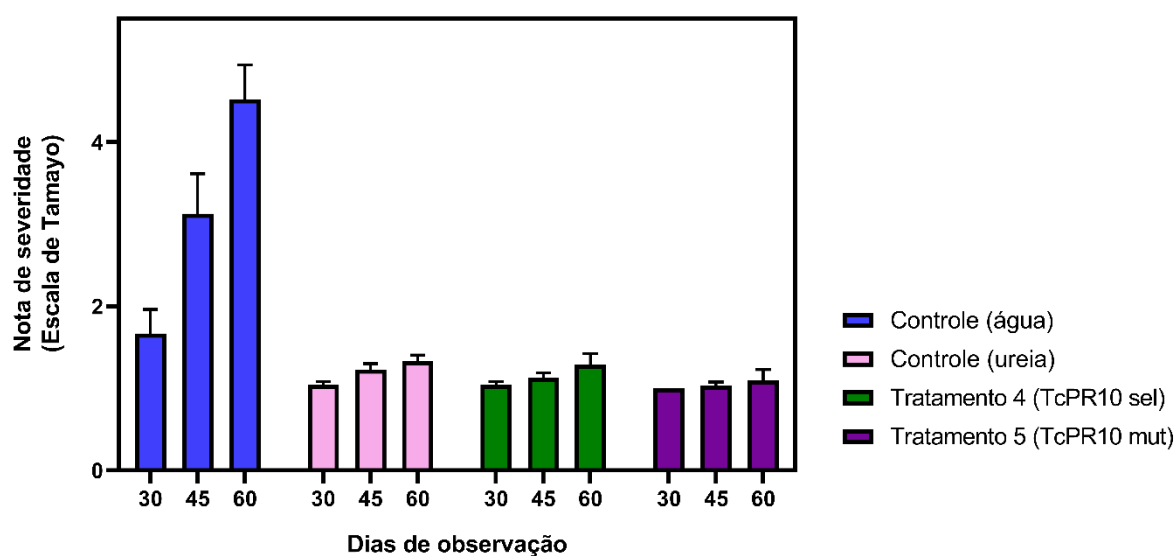


Figura 22. Gráfico representativo de severidade de infecção com base na escala de Tamayo (1988). Em azul, tem-se o controle de infecção com água. Em rosa, o controle com ureia. Em verde e roxo, têm-se os tratamentos 4 e 5, respectivamente.

Para análise dos testes com ureia, também foi utilizada estatística por ANOVA e correção por Tukey. Para os discos foliares que apresentaram necrose em praticamente toda sua área já no primeiro momento de observação (30 dias) foi considerada a nota 1, e para aqueles que necrosaram com o passar do tempo, foi considerada a última nota dada a cada um deles na observação anterior.

No primeiro, segundo e terceiro tempos, o controle com água apresentou valores significativamente maiores que os demais grupos, incluindo o controle com ureia ($p < 0.05$). Por outro lado, não houve diferenças significativas entre o controle com ureia e os tratamentos ($p > 0,05$), sugerindo que a presença de ureia como veículo pode interferir no resultado observado quando associada às proteínas, diminuindo o efeito protetor contra o fungo.

Apesar de os resultados aparentarem eficazes em relação ao controle com água, a comparação da progressão de infecção ao longo dos 60 dias é demasiadamente dificultada devido ao aumento de lesão e necrose nos discos de planta de café, impedindo assim a quantificação real por escala de Tamayo.

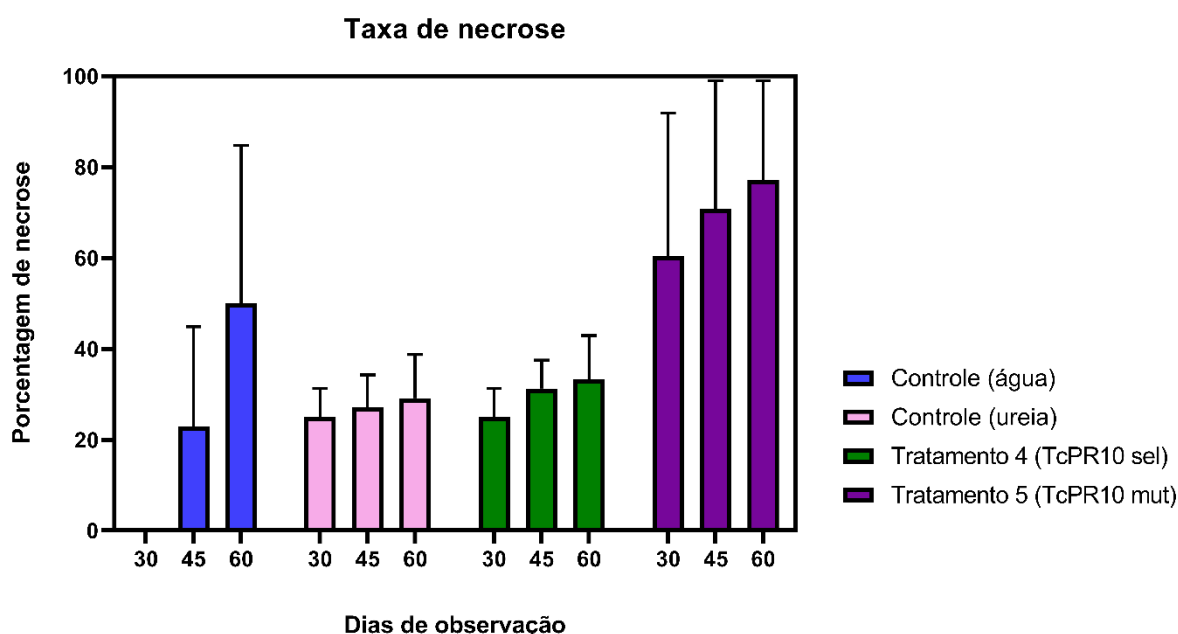


Figura 23. Gráfico representativo de taxa de necrose com base na presença e ausência de lesão. Em azul, tem-se o controle de infecção com água. Em rosa, o controle com ureia. Em verde e roxo, têm-se os tratamentos 4 e 5, respectivamente.

Para avaliação de necrose, também foi utilizada estatística por ANOVA e correção por Tukey. Nos primeiro (30 dias) e segundo (45 dias) tempos, apenas o tratamento contendo proteína TcPR10 mut diferiu significativamente do controle com água ($p < 0,05$) e controle com ureia ($p < 0,05$). Já no tempo 60 dias, as diferenças entre o controle com água e os tratamentos não foram estatisticamente significativas ($p > 0,3$), indicando estabilização dos resultados devido à necrose. Entretanto, a comparação entre o controle com ureia e o tratamento 5

contendo TcPR10 mut ($p = 0,0238$) se manteve significativa, e o tratamento 4 contendo TcPR10 sel também passou a se diferenciar significativamente do mutado.

Esses resultados podem indicar que, apesar de o controle com tampão contendo ureia não ter apresentado diferença significativa na taxa de necrose quando comparado com o controle com água e tratamento 4 com TcPR10 sel, a combinação de tampão com ureia + proteína TcPR10 mut parece ser mais citotóxica para a planta que os demais tratamentos.

É provável que a presença de ureia, mesmo que em pequena concentração, tenha interferido na atividade das proteínas, principalmente em TcPR10 mutante e diminuído seu efeito protetor. Além disso, em estudos anteriores (MALEVA, et al, 2015), concentrações de ureia acima de 100 mg/L podem desnaturar importantes proteínas com função antioxidante nas plantas da espécie *Elodea densa*. É possível que o mesmo ocorra para as plantas de café, contribuindo, então, para uma maior quantidade de discos lesionados e/ou necrosados e dificultando, conseqüentemente, a avaliação da infecção propriamente dita.

7. CONCLUSÃO

O combate à infecção causada por *Hemileia vastatrix* se faz essencial para diminuição de perdas e prejuízos nas safras cafeeiras. Encontrar novas tecnologias para contornar este obstáculo na produção de um dos maiores produtos da agricultura em todo mundo é de grande valia. Apesar das certas limitações nos métodos apresentados, foi possível observar alguns pontos relevantes (principalmente 3) no estudo que podem servir de base para novos experimentos e melhorias na metodologia:

- Houve um efeito protetor das proteínas contra a infecção pelo fungo *Hemileia vastatrix*. Apesar de, na maioria das replicatas de cada tratamento, a infecção não ter sido completamente impedida, em algumas o período latente do fungo tornou-se maior e isso facilita o processo de identificação precoce da sintomatologia, possibilitando o combate dos fungos antes que a infecção cause danos econômicos maiores;

- No geral, a taxa de necrose em tratamentos que continham ureia foi maior que os que não continham. Este ponto demonstra que o tampão veículo contendo ureia e imidazol podem não interferir na ação da proteína como meio de controle do fungo, porém apresentam efeito citotóxico para as plantas de café utilizadas neste estudo mesmo em baixa concentração;

- O tampão veículo PBS utilizado parece apresentar efeito benéfico, de forma isolada, nas plantas contra o fungo. É possível que tenha agido de maneira a impedir variações bruscas no pH do meio e alcalinizando-o levemente (mecanismo semelhante ao que algumas plantas realizam de imediato na presença de patógenos), colaborando para a preservação das estruturas do tecido da planta e tornando-as mais resistentes à infecção. Apesar desse efeito, o controle com PBS ao final dos 60 dias de experimento apresentou alguns discos com evolução de infecção, chegando a esporular.

Em resumo, algumas sugestões de melhorias e testes futuros a serem consideradas:

- Confirmar a atividade das proteínas *in vitro*, visto que algumas delas são expressas de forma insolúvel e o tampão de eluição contendo ureia desnatura a maioria das proteínas, podendo reduzir sua atividade após retirá-las do meio;

-Um número amostral maior, com mais replicatas biológicas e em diferentes momentos do ano (variação de estação, umidade, temperatura) poderia melhorar a resolução dos dados obtidos;

- Testar o efeito de reaplicação dos tratamentos ou maior concentração de proteínas em tratamentos com aplicação única. Há possibilidade de que essas alternativas contribuam para maior efeito protetor das proteínas sobre as plantas;

- Testar a estabilidade e atividade das proteínas em água ou outro tampão que não seja PBS, para avaliar se o efeito protetor das proteínas supera o efeito causado pelo tampão PBS.

Não obstante, este trabalho abre oportunidades para que novos e aprofundados estudos possam ser realizados acerca do potencial antifúngico e bioprotetor dessas proteínas, tanto em plantas de café, como em outras plantas acometidas por doenças causadas por fungos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGROFIT. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 3 nov. 2024.

AGROSABER. Café: da lenda africana ao domínio brasileiro. 2021. Disponível em: <https://agrosaber.com.br/cafe-da-lenda-africana-ao-dominio-brasileiro/>. Acesso em: 4 dez. 2024.

ANAND, T., et al. Plant glucanases and their role as a part of the plant defense system. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2009. v. 30(3). p. 259–266.

ANVISA. Legislação. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 28 de 09/08/2010. 2010. Disponível em: <<https://antigo.anvisa.gov.br/legislacao#/visualizar/28566>>. Acesso em: 3 nov. 2024.

BASTOS, J. A. B. Principais pragas das culturas e seus controles. São Paulo: Nobel, 1985. 329 p.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, New York, v. 72, p. 248–254, 1976. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.

BRASIL. Lei nº 11.105, de 24 de março de 2005. Regulamenta os incisos II, IV e V do §1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização de atividades que envolvam organismos geneticamente modificados - OGM e seus derivados. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, 28 mar. 2005, p. 1. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2005/lei/111105.htm. Acesso em: 4 dez. 2024.

BRASIL. Lei nº 14.785, de 27 de dezembro de 2023. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem, a rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e das embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos e afins. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, 28 dez. 2023. Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2023-2026/2023/lei/114785.htm. Acesso em: 5 dez. 2024.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Protocolo de Cartagena sobre Biossegurança. 2014. Disponível em: <https://antigo.mma.gov.br/biodiversidade/convenção-da-diversidade-biológica/protocolo-de-cartagena-sobre-biosseguranca.html>. Acesso em: 4 dez. 2024.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Convenção de Roterdã. 2018. Disponível em: <https://antigo.mma.gov.br/seguranca-quimica/convencao-de-roterda.html>. Acesso em: 4 dez. 2024.

CAPUCHO, Alexandre S.; RUFINO, Raphael J. N.; ZAMBOLIM, Eunize M.; CAIXETA, Eveline T.; OLIVEIRA, Antônio C. B. de; ALMEIDA, Robson F. de; BRITO, Giovani G. de; ZAMBOLIM, Laércio. Método de inoculação de *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. em folhas destacadas de cafeeiro. In: Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 4., 2005, Londrina. Anais. Brasília, DF: Embrapa Café, 2005. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/909241/1/Metododeinoculacao.pdf>. Acesso em: 25 jun. 2025.

CARVALHO, C. R. de; SOUSA, T. V.; OLIVEIRA, S. A. S. de; ZAMBOLIM, L. *Hemileia vastatrix*: genetic variability and implications for coffee resistance breeding. *Plant Pathology*, [S. l.], v. 68, n. 3, p. 533–543, 2019. Disponível em: <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/ppa.12411>. Acesso em: 25 jun. 2025.

CARVALHO, V. L.; MATOS, C. S. M.; PEREIRA, A. B. Ferrugem-do-cafeeiro. Ciência Móvel, EPAMIG. 2019. <https://www.livrariaepamig.com.br/wp-content/uploads/2023/02/Ferrugem-do-cafeeiro.pdf>. Acesso em: 4 dez. 2024.

CIFC – Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro. Investigação. Lisboa, Portugal. <https://www.isa.ulisboa.pt/cifc/investigacao>. Acesso em: 04 dez. 2024.

COCOAGENDB. Cocoa Genome Database. CocoaGenDB, [2025]. Disponível em: <https://cocoa-genome-hub.southgreen.fr>. Acesso em: 7 jun. 2025.

CONAB. Café - Conjuntura Semanal - 28/10/2024. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuario-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-de-conjunturas-de-cafe/item/24713-cafe-conjuntura-semanal-28-10-2024>>. Acesso em: 2 nov. 2024.

CONSELHO NACIONAL DO CAFÉ. Café do Brasil História. 2023. Disponível em: <<https://cncafe.com.br/cafe-do-brasil-historia/>>.

EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA DE MINAS GERAIS – EPAMIG. Informe Agropecuário. Belo Horizonte: EPAMIG, 2014. v. 35. num. 280, p. 1-100, maio/junho 2014. ISSN 0100-3364.

EPPO Global Database. *Hemileia vastatrix* (HEMIVA). Disponível em: <<https://gd.eppo.int/taxon/HEMIVA/distribution>>. Acesso em: 4 dez. 2024.

FILHO, E. M. V.; DOMIAN, C. A. Prevention and control of coffee leaf rust. Handbook of best practices for extension agents and facilitators. Tropical Agricultural Research and Higher Education Center (CATIE). 2019. 1 ed. p. 96. ISBN 978-9977-57-704-3.

FRANCIS, Dana M.; PAGE, Rebecca. Strategies to optimize protein expression in *Escherichia coli*. Current Protocols in Protein Science, Hoboken, v. 61, p. 5.24.1-5.24.29, ago. 2010. DOI: 10.1002/0471140864.ps0524s61.

JÚNIOR, J. R. V.; FONSECA, A. S. DA; FREIRE, T. C. Guia de bolso: diagnose e manejo de doenças e pragas do cafeeiro na Amazônia. Embrapa, 2020. cap. 1. p. 11-43. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/217687/1/cpafro-18471-cap1.pdf>>. Acesso em: 2 nov. 2024.

KASPRZEWSKA, A. Plant chitinases--regulation and function. Cell Mol Biol Lett. 2003. v. 8. p. 809-824. PMID: 12949620.

KESTEN, Christopher; GÁMEZ-ARJONA, Francisco M.; MENNA, Alexandra; SCHOLL, Stefan; DORA, Susanne; HUERTA, Apolonio I.; HUANG, Hsin-Yao; TINTOR, Nico; KINOSHITA, Toshinori; REP, Martijn; KREBS, Melanie; SCHUMACHER, Karin; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, Clara. Pathogen-induced pH changes regulate the growth–defense balance in plants. The EMBO Journal, v. 38, n. 24, artigo e101822, 2019. DOI: 10.15252/embj.2019101822. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6912046/>. Acesso em: 1 jul. 2025.

KUSHALAPPA, A.C.; ESKES, A. B. Coffee Rust: Epidemiology, Resistance and Management. 1. ed. 1989. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781351070775>. Acesso em: 4 dez. 2024.

LIU, D., et al. Antifungal activity of plant-derived thaumatin-like proteins and their mode of action in inhibiting *Fusarium oxysporum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010. v. 58(24). p. 12172–12177.

MALEVA, M.; BORISOVA, G.; CHUKINA, N.; *et al.* Urea-induced oxidative damage in *Elodea densa* leaves. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 22, p. 13556–13563, 2015. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4600-x>.

MANI, Sheida; ARAB, Bahareh; AKBARI, Vajihe; CHOU, C. Perry. Integrated bioprocessing and genetic strategies to enhance soluble expression of anti-HER2 immunotoxin in *Escherichia coli*. *AMB Express*, [S.l.], v. 14, n. 1, art. 107, 28 set. 2024. DOI: 10.1186/s13568-024-01765-6

MARCOLAN, A. L.; ESPINDULA, M. C.; DE, C. Café na Amazônia. Brasília, Df: Embrapa, 2015. cap. 12. p. 255–278. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/145490/1/Livro-Cafe-na-Amazonia-Digital-2015.pdf>>. Acesso em: 2 nov. 2024.

MEINHARDT, L. W.; RINCONES, J.; BAILEY, B. A.; AIME, M. C.; GRIFFITH, G. W.; ZHANG, D.; PEREIRA, G. A. *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of cacao: what's new from this old foe?. *Molecular plant pathology*, 2008. v. 9, p. 577–588. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2008.00496.x>

MENEZES, S. P.; SANTOS, J. L.; CARDOSO, T. H. S.; PIROVANI, C. P.; MICHELI, F.; NORONHA, F. S. M.; ALVES, A. C.; FARIA, A. M. C.; GESTEIRA, A. S. Evaluation of the Allergenicity Potential of TcPR-10 Protein from *Theobroma cacao*. *PLoS ONE*. 2012. v. 7. e37969. doi:10.1371/journal.pone.0037969.

MENEZES, S. P.; SILVA, E. M. A.; LIMA, E. M. *et al.* The pathogenesis-related protein PR-4b from *Theobroma cacao* presents RNase activity, Ca²⁺ and Mg²⁺ dependent-DNase activity and antifungal action on *Moniliophthora perniciosa*. *BMC Plant Biol*. 2014. v. 14, 161. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-14-161>.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA. Café no Brasil e Ementário do Café. 2022. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/politica-agricola/cafe/cafeicultura-brasileira>>.

MIRANDA, M. B. 2013. Recomendaciones para el combate de la roya del café. 3 ed. San José, Costa Rica, Icafé. 63 p. ISBN: 978-9977-55-045-9.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). *Theobroma cacao* PR protein TcPR-10a gene, complete cds. Bethesda: NCBI, [2025]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/ES439858.1/?report=fasta>. Acesso em: 7 jun. 2025.

NUNES, C. C. Diversidade genética de populações de *Hemileia vastatrix* no estado de Minas Gerais. Tese (Mestrado em Fitopatologia). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa. p. 47. 2006. Disponível em: <<https://locus.ufv.br/server/api/core/bitstreams/267ffac9-5739-4032-97b4-4ef731be90f8/content>>. Acesso em: 4 dez. 2024.

Organização Internacional do Café (OIC). Disponível em: <<https://ico.org/pt/>>.

PROMEGA CORPORATION. *E. coli* competent cells protocol. Madison: Promega, [2025]. Disponível em: <https://www.promega.com.br/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/0/e-coli-competent-cells-protocol.pdf>. Acesso em: 7 jun. 2025.

- PUNGARTNIK, C.; SILVA, A. C.; MELO, S. A.; GRAMACHO, K. P.; CASCARDO, J. C. M.; BRENDDEL, M.; MICHELI, F.; GESTEIRA, A. S. High-Affinity Copper Transport and Snq2 Export Permease of *Saccharomyces cerevisiae* Modulate Cytotoxicity of PR-10 from *Theobroma cacao*. MPMI. 2009. v. 22. p. 39–51. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-1-0039>.
- RHINEY, K.; GUIDO, Z.; KNUDSON, C.; AVELINO, J.; BACON, C. M.; LECLERC, G.; AIME, M. C.; BEBBER, D. P. Epidemics and the future of coffee Production. Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS). 2021. p. 118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2023212118>.
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, MX). Ficha técnica roya del café Hemileia vastatrix Berkeley & Broome. 28 p. 2013.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. R., & MANIATIS, T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. (2nd ed.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SERA, G. H.; CARVALHO, C. H. S. de; REZENDE ABRAHÃO, J. C. de; POZZA, E. A.; MATIELLO, J. B.; ALMEIDA, S. R. de; BARTELEGA, L.; SANTOS BOTELHO, D. M. dos. Coffee leaf rust in Brazil: historical events, current situation, and control measures. Agronomy, Basel, v. 12, n. 2, p. 496, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/agronomy12020496>. Acesso em: 25 jun. 2025.
- SILVA, M. C.; GUERRA-GUIMARÃES, L.; DINIZ, I.; LOUREIRO, A.; AZINHEIRA, H.; PEREIRA, A. P.; TAVARES, S.; BATISTA, D.; VÁRZEA, V. An Overview of the Mechanisms Involved in Coffee-Hemileia vastatrix Interactions: Plant and Pathogen Perspectives. Agronomy. 2022, 12, p. 326. <https://doi.org/10.3390/agronomy12020326>.
- THOMMA, B. P.; CAMMUE, B. P.; THEVISSSEN, K. Plant defensins. Planta. 2002. v. 216. p.193-202. doi: 10.1007/s00425-002-0902-6. Epub 2002 Oct 8. PMID: 12447532.
- VANETTI, F. Entomologia agrícola. Viçosa, MG: UFV, 1973. 356p. Apostila.
- VIVAPRODUCTS. Vivaspin® 6 and 20 for in vitro diagnostics: instructions for use. Vivaproducts, 2022. Disponível em: <https://www.vivaproducts.com/downloads/vivaspin-6-20-operating-instructions-in-vitro.pdf>. Acesso em: 7 jun. 2025.
- WATSON, J. D. Biologia molecular do gene. 7. ed. Porto Alegre: Artmed. 2015. p. 711-714. ISBN 978-85-8271-209-2.