

Otimização de Método para Análise Molecular de Proteínas Expressas em Folhas de Soja



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Agroindústria de Alimentos
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
42**

Otimização de Método para Análise
Molecular de Proteínas Expressas
em Folhas de Soja

*Marília Penteado Stephan
Jeane Santos da Rosa
Tatiana de Lima Azevedo
Marcos José de Oliveira Fonseca*

Embrapa Agroindústria de Alimentos
Avenida das Americas, 29501, Guaratiba
CEP: 23020-470, Rio de Janeiro, RJ
Fone: +55 (21) 3622-9600
Fax: +55 (21) 3622-9713
www.embrapa.br/agroindustria-de-alimentos
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações e Editoração
da Embrapa Agroindústria de Alimentos

Presidente
Karina Maria Olbrich dos Santos

Secretária-executiva
Virgínia Martins da Matta

Membros
*André Luis do Nascimento Gomes, Celma
Rivanda Machado de Araujo, Daniela De Grandi
Castro Freitas de Sá, Elizabete Alves de Almeida
Soares, Janice Ribeiro Lima, Leda Maria Fortes
Gottschalk, Marcos de Oliveira Moulin, Melicia
Cintia Galdeano e Otniel Freitas Silva*

Supervisão editorial
Virgínia Martins da Matta

Revisão de texto
Janine Passos Lima

Normalização bibliográfica
Celma Rivanda Machado de Araújo

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
André Luis do Nascimento Gomes

Foto da capa
Alexsandro Araujo dos Santos

1ª edição
Publicação digital (2023): PDF

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Agroindústria de Alimentos

Otimização de método pra análise molecular de proteínas expressas em folhas
de soja / Marília Penteado Stephan... [et al.]. – Rio de Janeiro : Embrapa
Agroindústria de Alimentos, 2022.

PDF 19 p. : il. color. ; 27 x 21 cm. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento /
Embrapa Agroindústria de Alimentos, ISSN 0101-630X ; 42).

1. Ácido salicílico. 2. Proteínas-PR. 3. Ultrafiltração. I. Penteado, Marília
Stephan. II. Rosa, Jeane Santos da. Azevedo. III. Tatiana de Lima. IV. Fonseca,
Marcos José de Oliveira. V. Série.

CDD (23. ed.) 572.6

© Embrapa, 2023

Celma Rivanda Machado de Araujo (CRB-07/5517)

Sumário

Resumo	5
Abstract	6
Introdução.....	7
Material e Métodos	9
Resultados e Discussão	14
Conclusões.....	18
Agradecimento	18
Referências	18

Otimização de Método para Análise Molecular de Proteínas Expressas em Folhas de Soja

Marília Penteado Stephan¹

Jeane Santos da Rosa²

Tatiana de Lima Azevedo³

Marcos José de Oliveira Fonseca⁴

Resumo – A aplicação de ácido salicílico nos tecidos vegetais pode induzir a síntese de proteínas relacionadas à patogênese em suas folhas, o que as protege contra esse ataque biótico. O objetivo deste trabalho foi testar duas técnicas de extração, concentração e purificação para separação dessas proteínas, baseadas inicialmente em coagulação térmica das proteínas insolúveis, sendo uma delas finalizada com precipitação com álcool/ácido e a outra por ultrafiltração. A primeira é adequada para obtenção de fonte alimentar alternativa de proteína e a segunda para concentração e purificação proteica em sistemas biológicos. Nos extratos obtidos por ultrafiltração as bandas de proteínas no gel de eletroforese ficaram menos difusas e mais definidas e também foram observadas proteínas de baixa massa molecular. Cinco proteínas expressas foram encontradas em folha de soja tratada com ácido salicílico e a massa molecular destas estava na faixa de 30,9 a 17,0 kDa. Resultados similares foram obtidos via cromatografia líquida de alta eficiência usando separação por hidrofobicidade. Desta forma, o método de extração com ultrafiltração foi considerado mais adequado por permitir melhor e maior visualização de bandas na faixa de massa molecular das proteínas relacionadas à patogênese.

Termos para indexação: ácido salicílico, proteínas-PR, ultrafiltração.

¹ Farmacêutica, doutora em Bioquímica, pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

² Química, doutora em Ciência de Alimentos, analista da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

³ Química, pós-graduada em Ciências Ambientais, analista da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

⁴ Engenheiro-agrônomo, doutor em Produção Vegetal, pesquisador da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

Optimization of a Method for Molecular Analysis of Expressed Proteins in Soybean Leaves

Abstract – The application of salicylic acid in plant tissues can induce the synthesis of proteins related to pathogenesis in their leaves, which protects them against this biotic attack. The objective of this work was to test two techniques of extraction, concentration and purification for separation of these proteins, initially based on thermal coagulation of insoluble proteins, one of them being finished with alcohol/acid precipitation and the other by ultrafiltration. The first is suitable for obtaining an alternative food source of protein and the second for protein concentration and purification in biological systems. In the extracts obtained by ultrafiltration, the protein bands in the electrophoresis gel were less diffuse and more defined and low molecular weight proteins were also observed. Five expressed proteins were found in soybean leaves treated with salicylic acid and their molecular mass ranged from 30.9 to 17.0 kDa. Similar results were obtained via HPLC using hydrophobicity separation. Thus, the extraction method with ultrafiltration is considered the most suitable for characterization of proteins related to pathogenesis in soybean leaves.

Index terms: salicylic acid, PR-proteins, ultrafiltration.

Introdução

Nas últimas décadas têm sido observadas mudanças climáticas que representam uma grande ameaça ao crescimento e produtividade de culturas agrícolas. Como consequência, acabam sendo gerados nas plantas estresses tanto de natureza abiótica como biótica. Quanto ao estresse biótico, deve-se ressaltar o estabelecimento de patógenos nos vegetais, podendo ser bactérias, fungos ou vírus. Este estado de senescência pode gerar disfunções metabólicas severas (Diaz-Mendoza et al., 2016). As plantas, de forma geral, possuem mecanismo de defesa contra o patógeno no seu interior, o que pode causar a destruição do tecido foliar. Tal mecanismo induz, de forma sistêmica, a liberação de fito hormônios, compostos fenólicos, fitoalexinas e proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-PR). A produção endógena de moléculas de baixa massa molecular em resposta ao estímulo do metabolismo secundário da planta acontece, então, desde aquelas relacionadas aos processos de redução do oxigênio (hipóxia) até a produção de diferentes fito hormônios tais como: ácido abscísico, etileno, ácido jasmônico, jasmonato de metila e ácido salicílico (AS), que agem como ferramentas de combate aos microrganismos (Randhir et al., 2004).

Já as proteínas-PR são macromoléculas alternativas que o metabolismo secundário produz, também no combate à patogenicidade. Já foram descritas na literatura a presença de 17 famílias de proteínas-PR, sendo a primeira delas expressa em folhas de tabaco (PR1), com massa molecular de 14-17 kDa (Vattem et al., 2005). As cadeias de proteínas-PR, de forma geral, são cadeias polipeptídicas que podem variar de 10-70 kDa (Breen et al., 2017).

A aplicação de ácido salicílico exógeno, tanto no solo como nas folhas, é uma prática que vem sendo utilizada no combate à patogenicidade. Esta tecnologia mostra que pode haver uma queda de aproximadamente 37% do percentual de incidência de doenças (PDI) em tomates contaminados com *Fusarium* e tratados com ácido salicílico. Neste caso, este índice foi quantificado pelo aumento (cm) da parte aérea e sistema radicular, bem como pelo número de folhas em resposta. O acúmulo de compostos fenólicos (ácido salicílico) nas células deste fungo limita o desenvolvimento dos mesmos, por funcionarem como um ataque químico, causando a destruição da membrana plasmática e mitocondrial do mesmo (Al-Surhane, 2022).

A aplicação exógena do ácido salicílico pode induzir a sua síntese nos tecidos vegetais devido ao aumento da atividade de enzimas específicas e devido à formação de metil salicilato. Dentre estes fatores deve ser destacado o estímulo concomitante da produção de proteínas-PR. Deste modo, há um aumento de resistência da planta contra o ataque de patógenos. Silva et al. (2008) monitoraram e evidenciaram a ação efetiva da presença de possíveis frações proteicas referentes às proteínas de defesa em um tratamento com e sem adição de ácido salicílico.

Em folhas, a fração proteica solúvel que é chamada de fração branca é predominantemente composta pela rubisco, uma enzima chave da fotossíntese. A presença dessa enzima no gel da eletroforese, através de suas cadeias polipeptídicas correspondentes, confirma que a fração branca solúvel foi devidamente extraída das folhas (Santamaría-Fernández; Lübeck, 2020).

Avaliar níveis baixos de proteínas em uma matriz complexa requer um procedimento eficiente de retirada de interferentes. Mesquita (2012) descreveu um método clássico de extração e purificação de proteína de folhas de soja. Neste método as proteínas solúveis e insolúveis sofreram uma etapa de *clean up* usando ácido tricloroacético (TCA) e acetona. O resíduo dessa extração foi então retirado com etanol. Junto com a adição desses reagentes ocorre a lise celular por meio da utilização concomitante do nitrogênio líquido.

Verifica-se, portanto, que o fator limitante na análise proteômica é uma extração adequada e o preparo dos extratos proteicos. No preparo desse tipo de amostra, também há necessidade de reagentes que atuam na quebra das ligações dissulfeto, ligações de hidrogênio, ligações hidrofóbicas e inibidores de proteases, que são altamente demandados tais como DTT (ditiotreitól), PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonila) e TRITON X100 (surfactante não iônico que possui uma cadeia hidrofílica de óxido de polietileno). Além da toxicidade (respiratória, dérmica e ocular), há necessidade contínua de nitrogênio líquido, onerando o método (Mesquita, 2012).

No método proposto por Santamaría-Fernández e Lübeck (2020), inicialmente modificado neste estudo, foi utilizada uma extração mecânica, seguida por coagulação térmica e precipitação com uma mistura de álcool/ácido para eliminação das fibras e debris celulares, resultando na obtenção de proteínas solúveis e purificadas. Uma segunda modificação inserida

neste método incluiu uma etapa de purificação via ultrafiltração. Esta última estratégia metodológica permitiu que fosse feita uma boa caracterização das proteínas expressas.

O objetivo deste trabalho foi propor um método de extração das proteínas-PR de folha de soja mais eficiente, econômico e ecologicamente viável.

Material e Métodos

Amostras

Folhas de soja em senescência (Figura 1), oriundas de plantas de plantio comercial em Itapeva-SP, foram submetidas a dois tratamentos visando à extração das proteínas: com aplicação de ácido salicílico (AS) exógeno e o controle, sem aplicação do AS.



Foto: Alessandro Araujo dos Santos

Figura 1. Folhas de soja em senescência.

Método de extração das proteínas-PR expressas

O primeiro método avaliado neste trabalho foi baseado na técnica de Santamaría-Fernández e Lübeck (2020) modificado (Figura 2), que foi utilizada para efeito de comparação. Foram utilizados 2 gramas de folhas de soja em senescência e 100 mL de água. Realizou-se a homogeneização (processamento mecânico) em ultra processador da marca Ninja BL 492Br30 1200 W em dois ciclos de 70 segundos. O material celular processado foi filtrado em algodão. O filtrado sem fibras foi submetido a tratamento térmico

a 60 °C por 1 minuto e, logo após, foi mantido por 12 horas sob refrigeração. Foi então centrifugado a 5000 rpm por 15 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante obtido foi utilizado para realizar a purificação da fração proteica branca (solúvel) com adição de etanol PA 95% / ácido acético de 5% (v/v) em água. A fração proteica foi obtida seguindo o mesmo procedimento de centrifugação descrito anteriormente. O precipitado foi ressuspenso em 400 µL de água destilada (Figura 2).

O segundo método avaliado neste trabalho (Figura 3) consistiu em adicionar uma etapa extra de purificação por ultrafiltração em membrana de 100 kDa em microtubos tipo Eppendorff, realizada após a primeira centrifugação no procedimento original de Santamaria-Fernández e Lübeck (2020). Submetendo o conteúdo do tubo a 10 ciclos de filtração utilizando 400 µL de água destilada, o permeado foi então liofilizado e ressuspenso em 400 µL de água destilada para avaliações por eletroforese SDS-PAGE e por CLAE. Na Figura 3 podem ser observadas as etapas de extração e purificação da proteína-PR expressa realizadas pelo presente método.

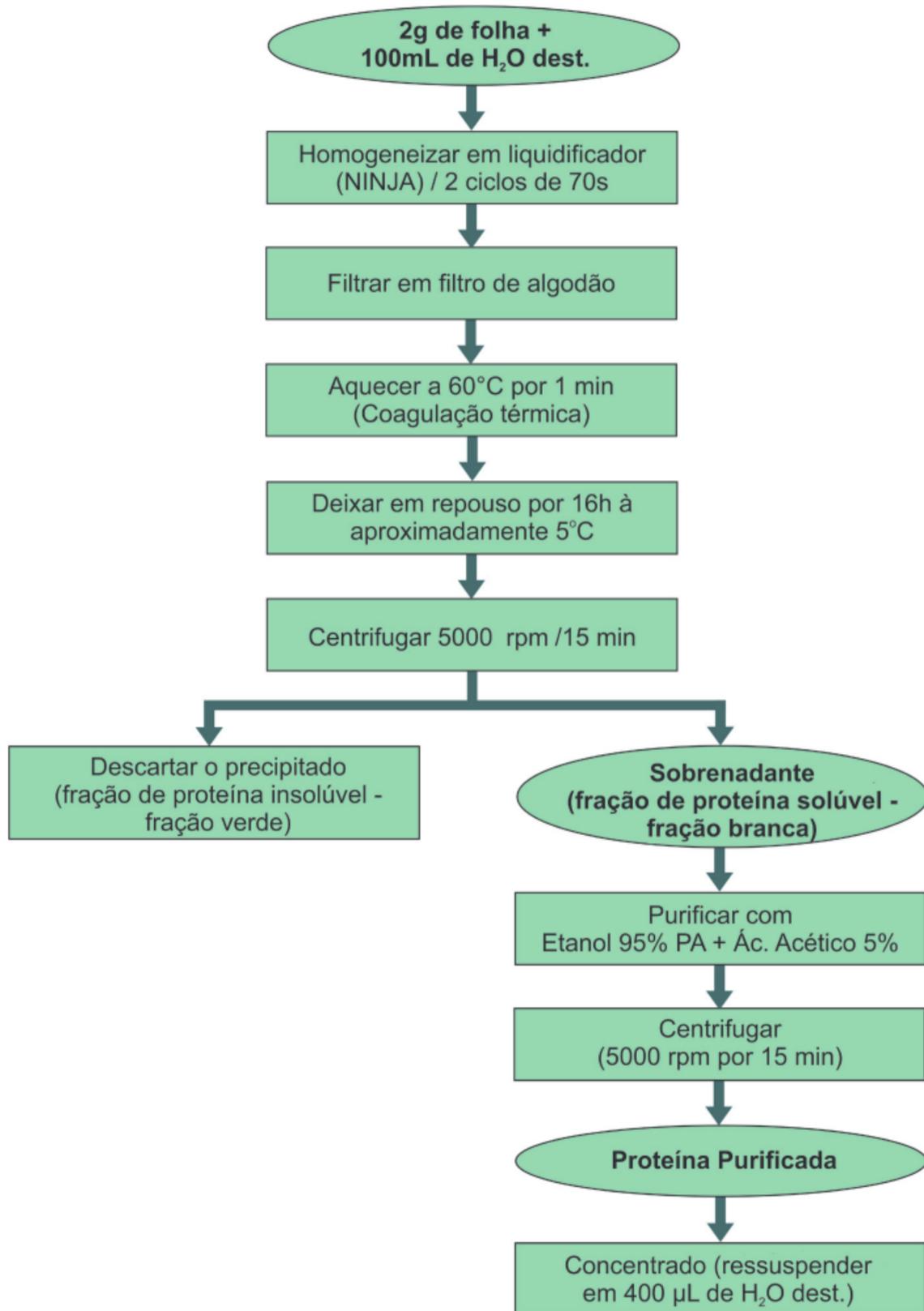


Figura 2. Etapas realizadas para extração e purificação da proteína-PR expressa pelo método álcool/ácido (Santamaría-Fernández; Lübeck (2020) modificado).

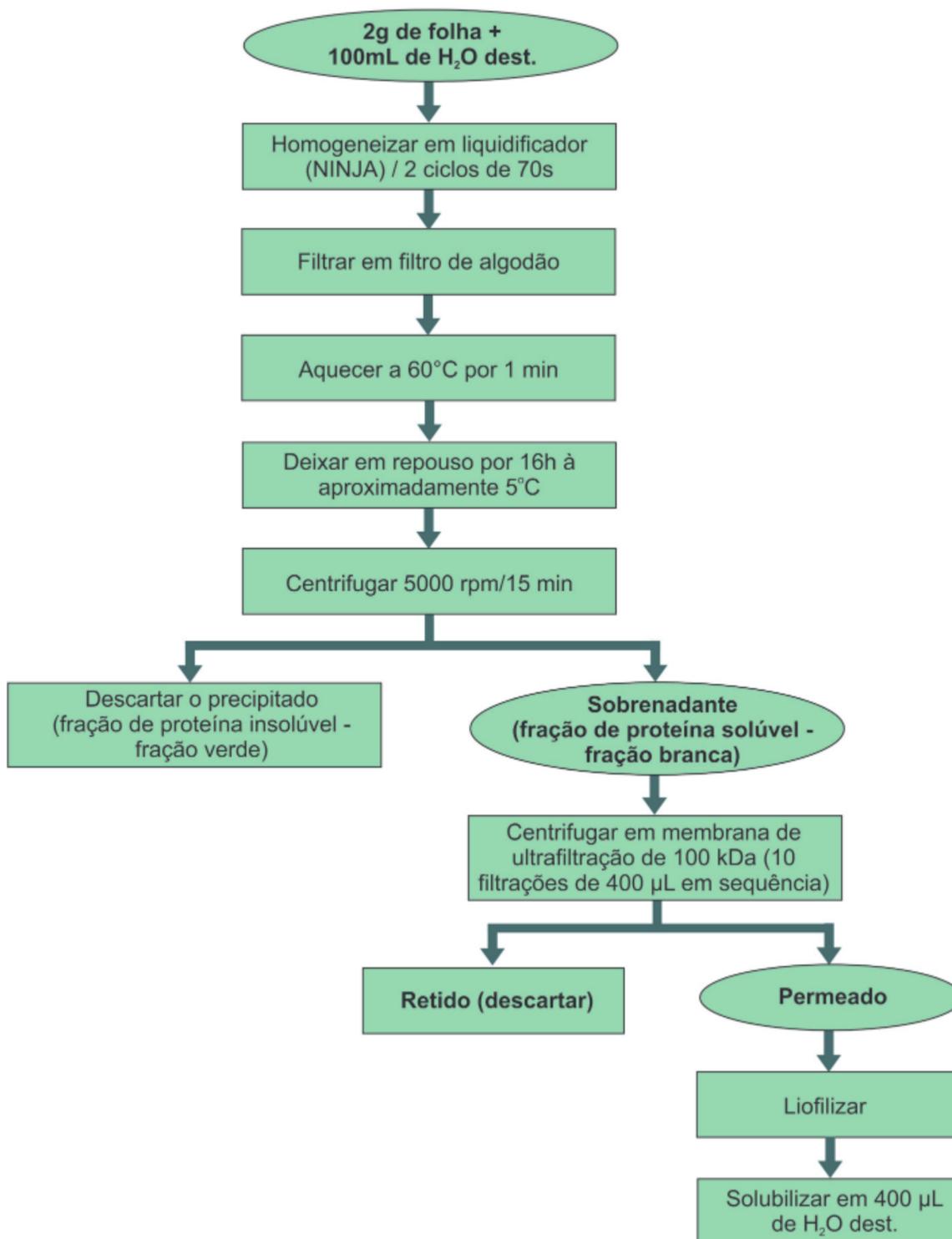


Figura 3. Etapas realizadas para extração e purificação da proteína expressa (PR) pelo método com ultrafiltração como etapa extra de purificação.

Avaliação dos extratos por eletroforese SDS-PAGE

Os extratos obtidos (com e sem aplicação de ácido salicílico) foram avaliados por meio da técnica de eletroforese SDS-PAGE. Foi utilizado o sistema de eletroforese vertical (BioRad) e a metodologia de preparação dos géis foi realizada conforme Laemmli (1970). A concentração de acrilamida utilizada no gel de separação foi de 12% e no gel de empilhamento de 8%. A corrida eletroforética foi realizada inicialmente em cuba grande, durante 7 horas e depois em uma cuba pequena durante 3 horas, sob uma tensão de 100 V. Os marcadores de baixo peso molecular foram obtidos utilizando-se os seguintes padrões de proteínas (em kDa): fosforilase B 105,20; albumina de soro bovino 84,17; ovalbumina 50,44; anidrase carbônica 36,81; inibidor de tripsina de soja 29,06 e lisozima 20,49. As proteínas dos géis foram coradas com o reagente de cor “Coomassie blue R250”, durante 12 horas, e descoradas com uma solução de metanol/ácido acético/água destilada (40:10:50), por meio de três lavagens com duração de meia hora.

Caracterização do perfil proteico dos extratos

A caracterização do perfil proteico por hidrofobicidade na fração proteica solúvel foi realizada utilizando um cromatógrafo líquido modular Jasco, composto por detetor UV 2077 e bomba quaternária PU 2089 plus, com a técnica de cromatografia por hidrofobicidade que consiste no uso de uma coluna BDS Hipersil C18 (100 x 4,6 mm e 2,4 µm). As amostras proteicas (20 µL) foram injetadas manualmente na coluna através de injetor Rheodyne 7125 e eluídas com duas fases móveis: Fase A - água ultrapura: 0,1% TFA (ácido trifluoroacético) e Fase B - acetonitrila UV/HPLC: 0,1% de TFA. Um gradiente com rampa linear iniciando em 95% da Fase A (mais polar, mais fraca) com taxa de mudança para 80% de A em 15 minutos, 60% em 25 minutos, 50% em 28 minutos, 40% em 32 minutos, 30% em 34 minutos e 20% de A em 36 minutos. A partir de 38 minutos o gradiente retornou às condições iniciais, assim permanecendo até o final da corrida em 40 minutos a fim de equilibrar a coluna para uma nova corrida cromatográfica. A temperatura do forno foi de 30 °C e detecção realizada a 216 nm.

Resultados e Discussão

O método proposto por Santamaría-Fernández e Lübeck (2020) é útil para semi-purificação das proteínas solúveis de folha de soja, que normalmente são utilizadas para avaliação nutricional, onde proteínas estão presentes em maior quantidade. A modificação realizada consistiu na extração das proteínas solúveis por meio do processamento mecânico, utilizando um ultraprocessador tipo Ninja. No método clássico descrito por Mesquita et al. (2012) utiliza-se nitrogênio líquido, que é muito útil para romper células vegetais.

O método de Santamaria-Fernández e Lubeck (2020) foi então otimizado para avaliação da fração de proteína expressa em resposta a patógenos. A fração proteica verde (insolúvel) foi precipitada por coagulação térmica, retirando também os debris celulares (partes das paredes celulares resultante do processamento mecânico). E a mistura etanol/ácido acético foi utilizada para obtenção de extratos purificados, como visto na Figura 2.

Na Figura 4, pode-se visualizar o gel de eletroforese. Nas três primeiras amostras (três primeiros poços com volumes diferentes), Ta=30 μ L, Tb=20 μ L e Tc=10 μ L, não foram observadas bandas de proteínas. Essas amostras são do tratamento de folhas de soja que não receberam o fito hormônio AS. Por outro lado, nas amostras tratadas com ácido salicílico (T2a=30 μ L, T2b=20 μ L e T2c=10 μ L) observam-se duas proteínas expressas com massa molecular de 30,9 e 29,8 kDa.

Como alternativa mais eficiente e tecnológica ao método Santamaria-Fernández e Lubeck (2020) modificado, trocou-se, então, a etapa de purificação (precipitação) da proteína com álcool/ácido por uma purificação via ultrafiltração analítica em micro tubos, pois proteínas interferentes em maior quantidade e maior tamanho (acima de 100 kDa) ficam retidas na membrana de ultrafiltração e as proteínas menores (de interesse) são permeadas. Bandas pouco difusas, porém bem nítidas, foram observadas em T3. O resultado mostrado na Figura 5 pode ser explicado pela etapa de liofilização que concentrou outras moléculas não proteicas menores que 100 kDa que podem ter interferido na nitidez das bandas e, portanto, causado um perfil proteico apresentando difusões. Entretanto, das cinco proteínas expressas no tratamento com ácido salicílico, duas entre as de menores massas moleculares (18,2 e 17,0 kDa) estavam também presentes no tratamento sem aplicação de ácido salicílico. Isso pode ser explicado possivelmente devido à síntese enzimática do metabolismo da planta em resposta à produção de AS endógeno (Randhir et al., 2004).

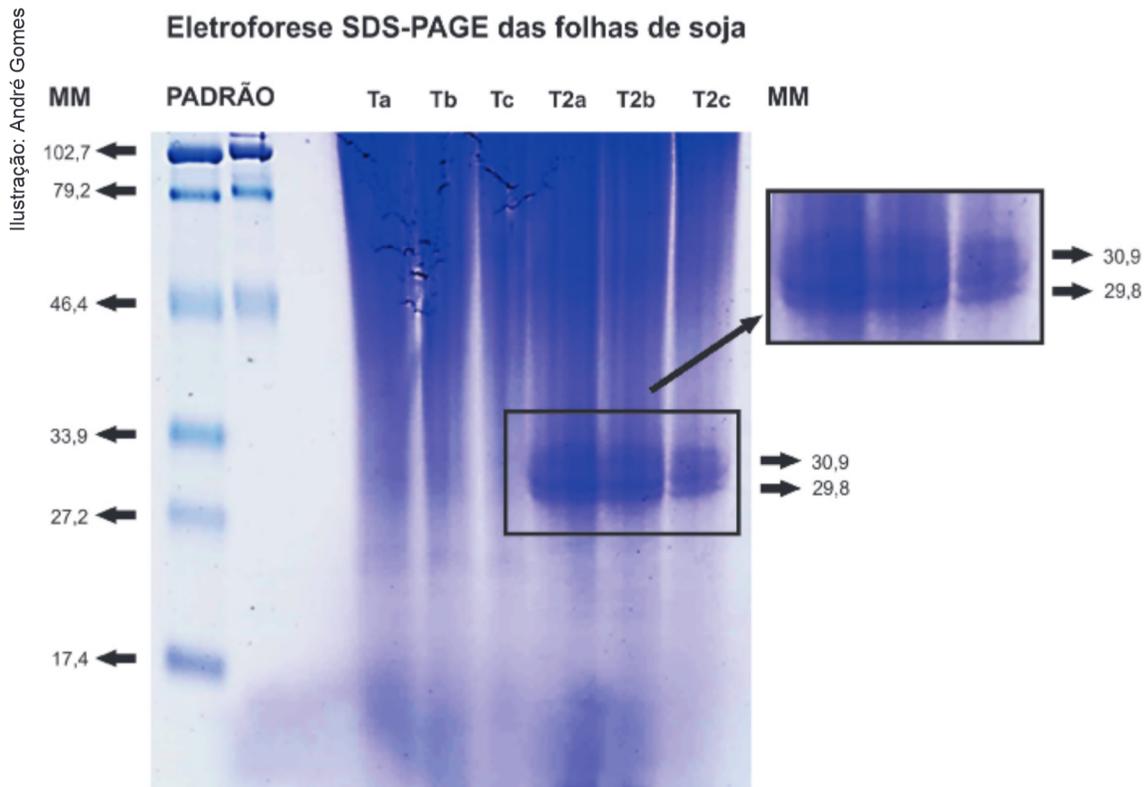


Figura 4. Gel de eletroforese SDS-PAGE das proteínas da fração branca de folhas de soja em senescência, que foram extraídas, purificadas e concentradas pelo método Santamaria-Fernández e Lübeck modificado, sendo Ta =30 μ L, Tb=20 μ L e Tc=10 μ L (volume de amostra sem ácido salicílico) e T2a=30 μ L , T2b=20 μ L e T2c =10 μ L (volume de amostra com ácido salicílico). MM= Massa molecular em kDa.

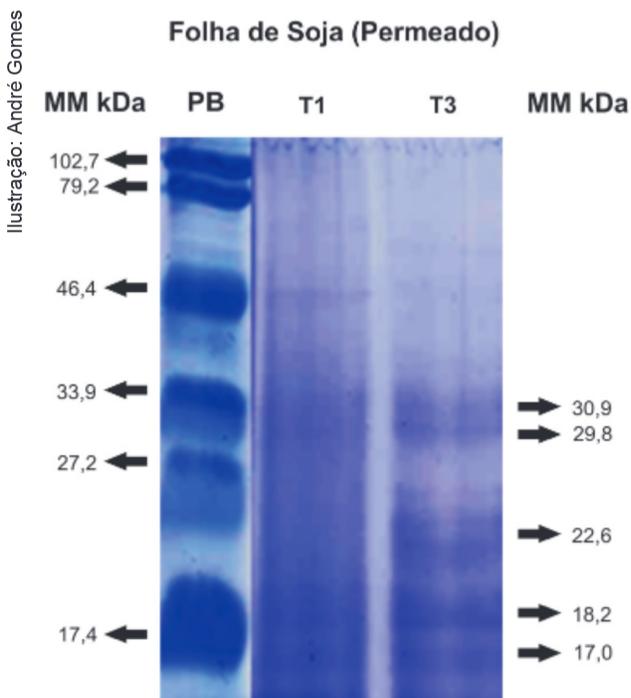


Figura 5. Gel de eletroforese SDS-PAGE das proteínas da fração branca extraídas, purificadas e concentradas pelo método Santamaria-fernández e Lübeck modificado com ultrafiltração, sendo T1 sem ácido salicílico e T3 com ácido salicílico. MM= Massa molecular em kDa; PB = Padrão de baixa massa molecular.

Por exemplo, a proteína RUBISCO (majoritária em folhas) tem 560 kDa e, em função de seu tamanho, não permearia por essa membrana de ultrafiltração. Entretanto, caso nessa etapa de limpeza da amostra ela permeasse, poderia ser observada na visualização eletroforética, pois o detergente dodecil sulfato de sódio iria destruir a sua conformação e a transformaria em cadeias polipeptídicas. Deve-se lembrar de que a proteína com função enzimática é constituída por oito cadeias polipeptídicas de 55 kDa e oito cadeias de 15 kDa. Portanto, foram encontradas cinco proteínas expressas em soja tratada com ácido salicílico e a massa molecular delas encontra-se na faixa de 30 a 17 kDa. Quando se compara, por meio de eletroforese, o método de precipitação álcool/ácido com o de ultrafiltração, verifica-se que o último é mais eficaz, pois podem ser observadas mais bandas de proteínas expressas.

Com o intuito de confirmar os resultados, o mesmo permeado foi avaliado por cromatografia líquida utilizando uma coluna C18 e resultados similares foram obtidos. Cinco principais picos de proteínas separadas pela hidrofobicidade só foram observados nas folhas de soja tratadas com ácido salicílico (Figura 6). Dados similares, usando a técnica Laemmli (1970), mostraram a indução de resistência à ferrugem-asiática (*Phakopsora parachryzizi*) de genótipos de soja pela indução da expressão de cinco enzimas marcadoras: lipoxigenase, peroxidase, fenilalanina amônia liase, quitinase e β -glucanases. Estas enzimas são todas de baixa massa molecular com exceção da lipoxigenase que traz amargor à soja. Todas as demais têm massa molecular em torno de 30 kDa. As β -glucanases, especificamente, atuam sobre as glicanas que estão nas paredes celulares externas de bactérias e fungos (Almeida et al., 2012).

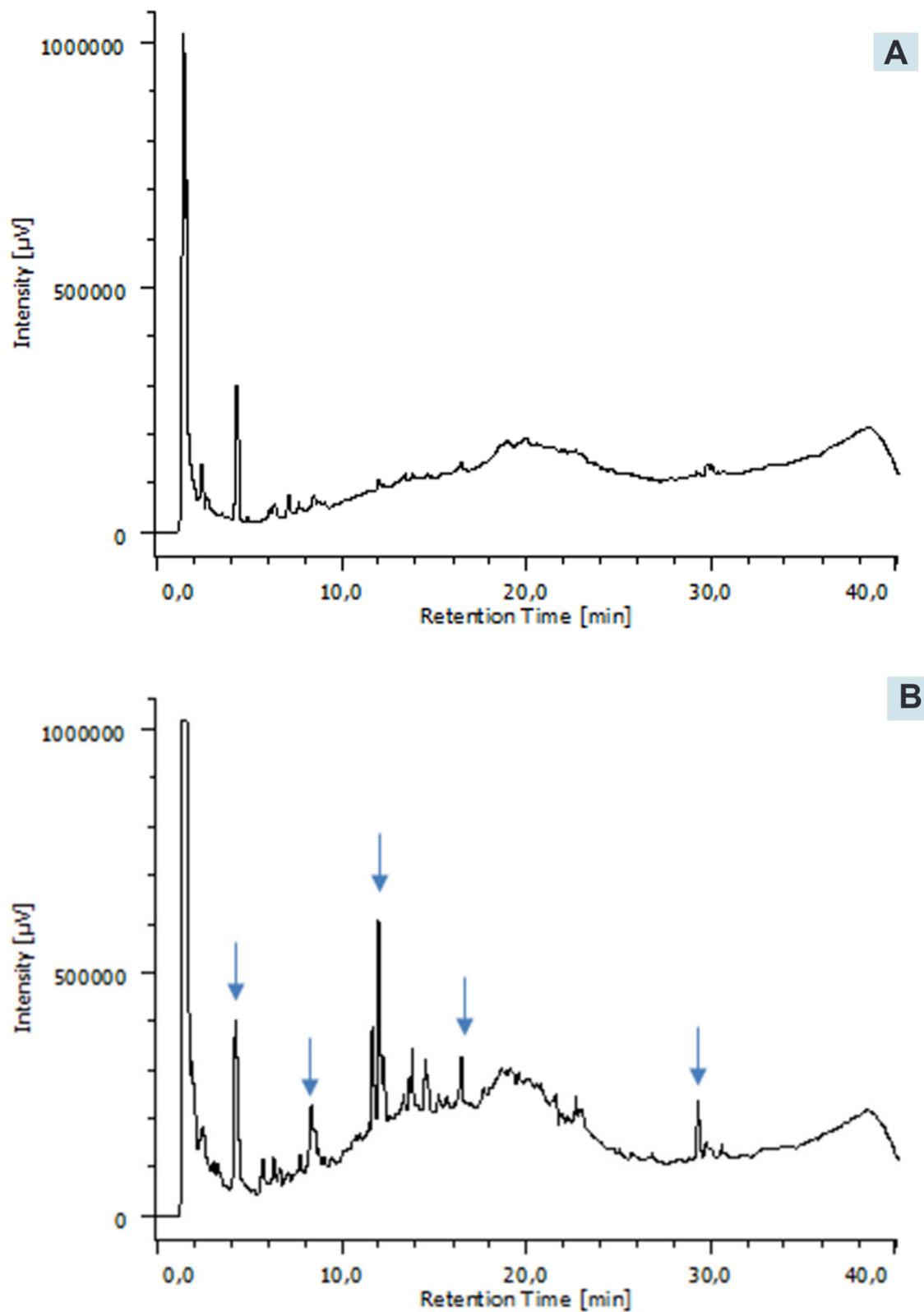


Figura 6. Cromatogramas da proteína purificada (por ultrafiltração) de folha de soja em senescência. (A) plantas tratadas sem ácido salicílico e (B) plantas tratadas com ácido salicílico. Setas indicam principais bandas encontradas.

Conclusão

Os resultados mostraram que houve maior presença de proteínas expressas, na faixa de massa molecular referentes às proteínas-PR, nos tratamentos onde houve aplicação de ácido salicílico, evidenciada pela análise eletroforética e comprovada pela análise cromatográfica.

As proteínas permeadas na ultrafiltração da fração proteica branca das folhas de soja submetidas ao tratamento com ácido salicílico mostraram massas moleculares de 30,9; 29,8; 22,6; 18,2 e 17,0 kDa. Todas apresentaram baixa massa molecular, como tem sido descrito para as proteínas-PR. Conclui-se que o método proposto deve ser utilizado como padrão para o estudo de proteínas expressas em resposta à patogenicidade e que a etapa de ultrafiltração permite a visualização de outras bandas na região das proteínas-PR.

Agradecimento

Os autores agradecem à Alexsandro Araújo dos Santos pela extração das amostras e confecção de todos os géis de eletroforese e fotografias que deram origem a este trabalho.

Referências

AL-SURHANE, A. A. Protective role of antifusarial eco-friendly agents (Trichoderma and salicylic acid) to improve resistance performance of tomato plants. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 29, n. 4, p. 2933-2941, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2022.01.020>

ALMEIDA, H. O.; BARBOSA, M. d. O.; MARQUES, A. E.; PEREIRA, T. H. A.; MAGALHÃES JÚNIOR, M. J.; TESSAROLLO, N. G.; GAMES, P. D.; BARROS, E. G. de; STOLF-MORERIA, R.; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C.; ABDELNOOR, R. V.; PEREIRA, P. R. G.; BARACAT-PEREIRA, M. C. Enzimas marcadoras de indução de resistência diferencialmente reguladas em soja resistente e suscetível à ferrugem-asiática-da-soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, N. 2, p. 163-172, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2012000200003>

BREEN, S.; WILLIAMS, S. J.; OUTRAM, M.; KOBE, B; SOLOMON, P. S. Emerging insights into the functions of pathogenesis-related protein 1. **Trends in plant science**, v. 22, n. 10, p. 871-879, 2017. DOI: 10.1016/j.tplants.2017.06.013

DIAZ-MENDOZA, M.; VELASCO-ARROYO, B.; SANTAMARIA, M. E.; GONZÁLEZ-MELENDI; MARTINEZ, M.; DIAZ, M. P. Plant senescence and proteolysis: two processes with one destiny. **Genetics and Molecular Biology**, v. 39, n. 3, p. 329-338, 2016. DOI: 10.1590/1678-4685-GMB-2016-0015.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970. DOI: <https://doi.org/10.1038/227680a0>

MESQUITA, R. S. (Ed.); SOARES, E. de A.; BARROS, E. G.; LOUREIRO, M. E. Method optimization for proteomic analysis of soybean leaf: Improvements in identification of new and low-abundance proteins. **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, n. 1, supl. 1, p. 353-361, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1415-47572012000200017>

RANDHIR, R.; LIN, Y.-T.; SHETTY, K. Stimulation of phenolics, antioxidant and antimicrobial activities in dark germinated mung bean sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors. **Process Biochemistry**, 39, n. 5, p. 637-646, 2004. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00197-3](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00197-3)

SANTAMARÍA-FERNÁNDEZ, M.; LÜBECK, M. Production of leaf protein concentrates in green biorefineries as alternative feed for monogastric animals. **Animal Feed Science and Technology**, v. 268, 114605, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2020.114605>

SILVA, R. A. da; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; OLIVARES, F. L. **Defesa de plantas contra o ataque de fitopatógenos**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2008. 49 p. (Documentos. Embrapa Agrobiologia, 250). Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/630318/1/doc250.pdf>. Acesso em: 5 dez. 2022.

VATTEM, D. A.; RANDHIR, R.; SHETTY, K. Cranberry phenolics-mediated antioxidant enzyme response in oxidatively stressed porcine muscle. **Process biochemistry**, v. 40, n. 6, p. 2225-2238, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.09.001>.



Agroindústria de Alimentos

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA
E PECUÁRIA



CGPE 018008