

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE PROTEÍNAS DE LÁTEX

Elivelto Gomes da Silva (bolsista PIBIC-CNPq) e Cleverton Diniz Teixeira de Freitas (Professor-Orientador, Departamento de Biologia, Campus Amilcar Ferreira Sobral, UFPI.)

Introdução:

Os vegetais estão cercados por um grande número de inimigos potenciais, tais como: fungos, bactérias, vírus, nematóides, insetos e mamíferos (WANG et al., 2007). Em resposta a tais agressores biológicos existem efetivos e sofisticados mecanismos de defesa nas plantas, onde reações complexas estão presentes ou são ativadas, levando à síntese local e/ou sistêmica de uma variedade de compostos (TIFFIN & MOELLER, 2006). Dentre as mais variadas substâncias produzidas, algumas são frutos do metabolismo primário, destacando-se os peptídeos e as proteínas (ALVES et al., 2009). Outra possível forma de defesa contra a invasão de patógenos e insetos encontrada pelas plantas é a produção de látex (HAGEL et al., 2008). O presente trabalho tem foco bem específico e definido voltado na identificação e purificação de proteínas antifúngicas de fluidos laticíferos de plantas nativas do estado do Piauí.

Material e Métodos:

O látex de *Calotropis procera* foi coletado de plantas crescidas na cidade de Floriano, Piauí. Após quebra das extremidades de ramos terminais, o látex foi coletado em tubos de plástico tipo "falcon" sobre um volume de água destilada para finalizar uma razão de 1:1 (v:v), como descrito anteriormente (FREITAS et al., 2007). Todas as amostras foram estimadas quanto ao teor protéico pelo método colorimétrico descrito por Bradford (1976), utilizando-se albumina sérica bovina como referência padrão na curva de calibração. Eletroforeses unidimensionais e bidimensionais foram realizadas como descrito por Laemmli (1970). Os zimogramas para a detecção de proteases em gel de poliacrilamida foram feitos de acordo com Macedo et al. (2004). A atividade antifúngica do látex foi testada sobre os fungos *Fusarium solani* e *Rizoctonia solani*, pelo método de inibição de crescimento em meio sólido e pela inibição da germinação de esporos.

Resultados e discussão:

Ensaio de dosagem de proteínas solúveis e eletroforeses unidimensionais foram realizados. A fração de estudo mostrou ser muito rica em proteínas (8,3 mg/ml). As eletroforeses mostraram que a fração tem uma grande diversidade de proteínas com massas moleculares variando de 97 KDa a 14 KDa (Figura 1A). Os zimogramas mostraram que o látex de *C. procera* possui pelo menos três proteases com massas moleculares na faixa de 30 KDa e uma na faixa de 50 KDa. Atividade proteolítica foi máxima em pH 5,0 e 6,0. Em pH 2,6, a atividade proteolítica foi evidenciada apenas na banda de 50 KDa. Esses resultados mostram que o látex de *C. procera* é rico em proteases com diferentes massas moleculares. Diferentes métodos de solubilização e precipitação de proteínas foram realizados com objetivo de obter géis bidimensionais reproduzíveis e de boa qualidade. Quando as proteínas do látex de *C. procera* foram solubilizadas em água e precipitadas com acetona,

36 “spots” foram detectados, sendo a maioria com massas moleculares de 11 KDa a 45 KDa (Figura 1 B1). A precipitação das proteínas do látex dissolvidas em água com acetona contendo TCA 10%, foi mais efetiva que a precipitação somente com acetona, sendo visualizados 88 “spots”, compreendendo proteínas com massas moleculares variando de 12 KDa a 27 KDa (Figura 1 B2). A solubilização com tampão piridina 50 mM (pH 5,0), contendo tiouréia 10 mM e SDS 1%, e posterior precipitação utilizando acetona contendo TCA 10% foi a mais eficiente das metodologias utilizadas. Foram detectados 108 “spots” com massas moleculares variando de 13 kDa a 110 kDa e pI 4 a 10 (Figura 1 B3).

O próximo passo foi avaliar a atividade antifúngica do látex de estudo. Foram realizados ensaios de inibição de crescimento em placas de Petri, onde foram feitos poços na frente do micélio dos fungos e adicionadas as proteínas do látex em diferentes concentrações. A figura 2 mostra que o látex de *C. procera* foi capaz de inibir o crescimento dos fungos *Fusarium solani* e *Rizoctonia solani*, mesmo diluído 8 vezes e após 96 h de ensaio. O látex de *C. procera* também foi efetivo em inibir a germinação dos esporos dos dois fungos testados (Figura 2).

Conclusão:

A fração protéica do látex de *Calotropis procera* apresentou uma grande diversidade de proteínas com atividade proteolítica e atividade antifúngica, sendo assim uma potencial fonte de moléculas a serem purificadas, caracterizadas e posteriormente utilizadas em programas de melhoramento genético de plantas suscetíveis ao ataques dos patógenos *Fusarium solani* e *Rizoctonia solani*. Esses resultados reforçam a hipótese do envolvimento de proteínas laticíferas na defesa da planta contra fungos.

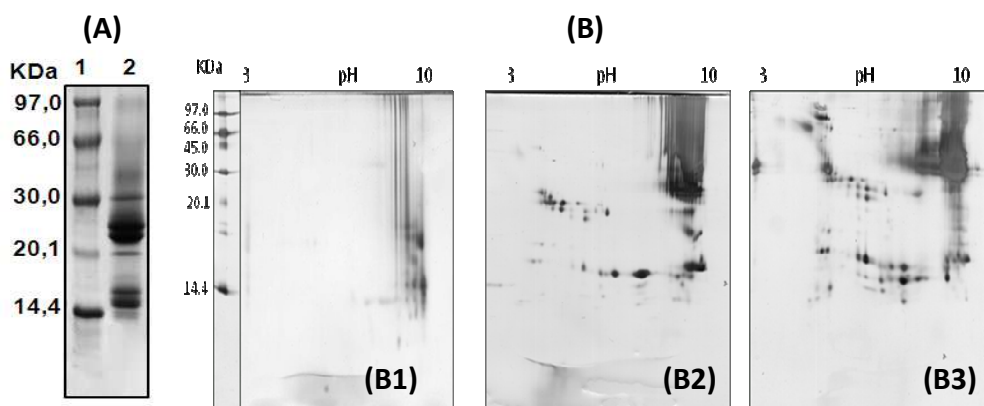


Figura 1: (A) Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) da fração aquosa do látex de *Calotropis procera* (Raia 2). (B) Eletroforeses bidimensionais das proteínas do látex de *C. procera* utilizando diferentes métodos de solubilização e precipitação de proteínas. (B1) Proteínas do látex (PL) dissolvidas em água e precipitadas com acetona; (B2) PL dissolvidas em água e precipitadas com acetona contendo TCA 10%; e (B3) PL solubilizadas com tampão piridina 50 mM, pH 5,0, contendo tiouréia 10mM e SDS 1%, e precipitadas com acetona contendo TCA 10%.

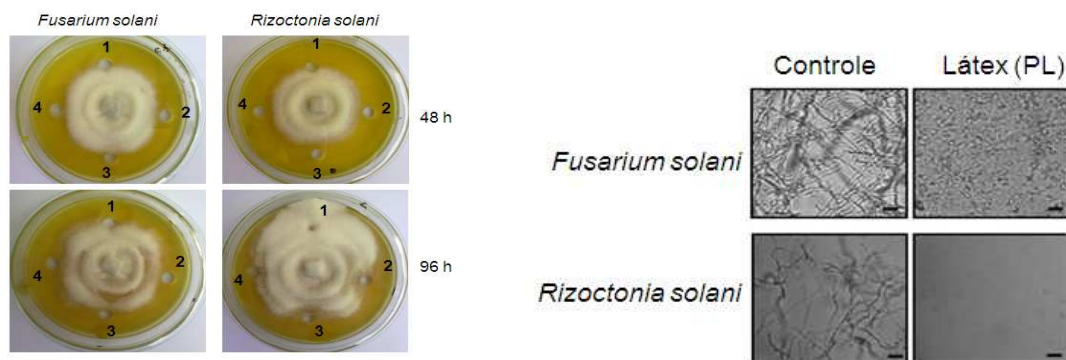


Figura 2: Atividade antifúngica do látex de *C. procera* sobre diferentes fungos fitopatogênicos. (Esquerda) Fotos tiradas após 48 h e 96 h da aplicação das amostras. 1: água; 2: látex (1:2); 3 (1:4) e (1:8). (Direita) Ensaio de inibição da germinação de esporos. Fotos tiradas após 24 h de ensaio com o auxílio de um microscópio óptico (aumento 40 x).

Palavras-chave: Eletroforese. Látex. Proteoma. **Órgãos Financiadores:** FUNCAP e CNPq/Universal.

Referências

ALVES, D.T.; VASCONCELOS, I.M.; OLIVEIRA, J.T.A.; FARIAS, L.R.; DIAS, S.C.; CHIARELLO, M.D.; MARIA-NETO, S.; FRANCO, O.L. Identification of four novel members of Kunitz-like α -amylase inhibitors family from *Delonix regia* with activity toward Coleopteran insects. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 95, p. 166-172, 2009.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

FREITAS, C.D.T.; OLIVEIRA, J.S.; MIRANDA, M.R.A.; MACEDO, N.M.R.; SALES, M.P.; VILLAS-BOAS, L.A.; RAMOS, M.V. Enzymatic activities and protein profile of latex from *Calotropis procera*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 45, p. 781-789, 2007.

HAGEL, J.M.; YEUNG, E.C.; FACCHINI, P.J. Got milk? The secret life of laticifers. **Trends in Plant Science**, v.13, n. 12, p. 631-639, 2008.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

MACEDO, M.L.; FREIRE, M.D.; PARRA JR. A. A Kunitz-type inhibitor of coleopteran proteases, isolated from *Adenanthera pavonina* L. seeds and its effect on *Callosobruchus maculatus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 2533-2540, 2004.

TIFFIN, P.; MOELLER, D. Molecular evolution of plant immune system genes. **Trends in Genetics**, v. 22, p. 662-670, 2006.

WANG, H. X.; NG, T.B. An antifungal peptide from red lentil seeds. **Peptides**, v. 28, p. 547-552, 2007.