

BIOPROSPECÇÃO DE PROTEÍNAS ANTIFÚNGICAS DE FLUIDOS LATICÍFEROS

Elivelto Gomes da Silva (bolsista PIBIC-UFPI) e Cleverton Diniz Teixeira de Freitas (Orientador-Depto 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 como objetivo geral a 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) (FREITAS et al., 2007). A fração proteica do látex de *Calotropis procera* (PLCp) foi submetida a cromatografias de troca iônica em coluna de CM-Sepharose Fast Flow, previamente equilibrada em tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,0). Eletroforeses unidimensionais foram realizadas para verificação da pureza das frações obtidas (LAEMMLI, 1970). A atividade antifúngica das frações foi testada sobre os fungos *Fusarium solani*, *Neurospora sp.* e *Colletotrichum gloeosporioides*, pelo método de inibição de crescimento em meio sólido e pela inibição da germinação de esporos. As amostras foram estimadas quanto ao teor protéico pelo método colorimétrico descrito por Bradford (1976). A atividade proteolítica das frações foi avaliada usando azocaseína como substrato (XAVIER-FILHO, 1989).

Resultados e discussão

Na concentração de 2,5 mg/ml de PLCp, o crescimento dos três fungos testados foi totalmente inibido. Os valores de IC₅₀ para *F. solani*, *Neurospora sp* e *C. gloeosporioides* foram 134,5 ± 8,1, 549,9 ± 14,3 e 455,0 ± 9,3 µgProteína/ml, respectivamente. A fração PLCp fervida durante 30 min ou tratada com uma mistura de proteases inespecíficas perdeu totalmente a atividade antifúngica. Estes resultados suportam a hipótese do envolvimento de proteínas nesta atividade biológica. O envolvimento de proteases cisteínicas na atividade antifúngica foi avaliado inibindo irreversivelmente estas proteínas com E-64. Esta fração perdeu a atividade antifúngica sobre *F. solani*, evidenciando o envolvimento destas proteases na atividade. Contudo, esta fração permaneceu ativa contra *Neurospora sp.* e *C. gloeosporioides*. Esses resultados mostram que outras proteínas além das

proteases cisteínicas estão envolvidas em tal atividade. Em paralelo, ensaios antifúngicos foram realizados com três proteases purificadas: Papaína (protease cisteínica do látex *Carica papaya*), Tripsina e Quimotripsina (proteases serínicas). A papaína apresentou resultados similares ao da fração PLCp. A tripsina e quimotripsina não foram ativas sobre os três fungos testados. Esses resultados reforçam a ideia do envolvimento de proteases cisteínicas de látex na defesa da planta contra fungos. Ficou evidente nos resultados anteriores que diferentes proteínas na fração PLCp estão envolvidas na atividade antifúngica. Com o objetivo de purificar a(s) proteína(s) envolvida(s) nesta atividade, a fração PLCp foi fracionada em uma coluna de troca iônica CM-Sepharose Fast Flow, onde foram obtidos três picos, um pico não retido e dois retidos, um eluído com NaCl 0,2 M e outro com 0,3 M (Figura 1A). Nenhum pico foi obtido após adição de NaCl 1 M.

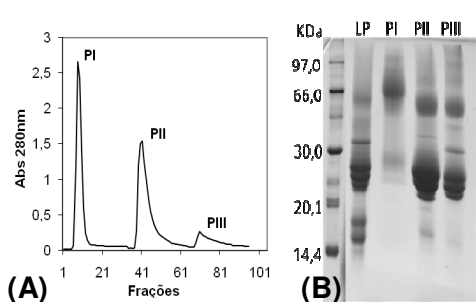


Figura 1: (A) Cromatografia de Troca Iônica da fração PLCp em coluna de CM-Sepharose Fast Flow, equilibrada em tampão acetato 50 mM pH 5,0. Fluxo 0,5 ml/min. Frações de 3 ml. Os picos foram eluídos com tampão de equilíbrio (PI-CM) mais NaCl 0,2 M (PII-CM) ou NaCl 0,3 M (PIII-CM). (B) Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) das frações obtidas após cromatografia de troca iônica. Foram aplicados 30 µg de proteína por poço. Gel corado com “Coomassie Brilliant Blue” R-250.

A eletroforese mostra que o pico não retido (PI) foi constituído principalmente por uma proteína com massa molecular aparente de 66 kDa e algumas proteínas com massas moleculares em torno de 25 kDa. Os dois picos retidos (PII e PIII) apresentaram proteínas com perfis eletroforéticos semelhantes, com massas moleculares variando de 97 kDa a 20 kDa (Figura 1B). Quando as frações cromatográficas foram avaliadas em ensaios de inibição da germinação de esporos de *F. solani*, *Neurospora* sp. e *C. gloeosporioides*, foi observado que o PI-CM não apresentou atividade antifúngica, enquanto o PII-CM foi ativo contra os três fungos testados (Figura 2). O PIII-CM mostrou-se ativo apenas contra o fungo *Neurospora* sp. PII-CM e PIII-CM apresentam atividade proteolítica do tipo cisteínica, enquanto PI não, evidenciando novamente o envolvimento de proteases cisteínicas na atividade antifúngica promovida pela fração proteica do látex.

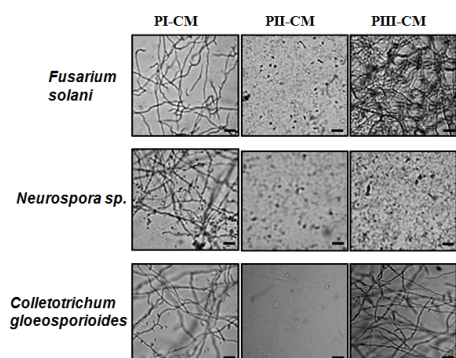


Figura 2: Ensaio de inibição da germinação de esporos de diferentes fungos fitopatogênicos utilizando as frações obtidas da cromatografia de troca iônica em CM-Sepharose Fast Flow (PI, PII e PIII, Figura 1). Amostras foram dissolvidas em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 nas concentrações de 2 mg/ml. Fotografias tiradas após 24 h de ensaio a 27 °C. Barras, 40 µm.

Conclusões

Esses conjuntos de resultados mostram que o látex de *C. procera* possui forte atividade antifúngica e que tal atividade foi associada parcialmente a proteases cisteínicas, fortalecendo a hipótese que estas enzimas participam na defesa direta da planta contra fungos. As cromatografias de troca iônica em coluna de CM-Sepharose não foram eficientes na purificação das proteínas, logo novos passos cromatográficos deverão ser realizados para a purificação e caracterização destas proteínas antifúngicas.

Apoio: FUNCAP e CNPq (Universal).

Referências

ALVES, D.T. *et al.* Identification of four novel members of Kunitz-like α -amylase inhibitors family from *Delonix regia* with activity toward Coleopteran insects. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 95: 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**, 72: 248-254, 1976.

FREITAS, C.D.T. *et al.* Enzymatic activities and protein profile of latex from *Calotropis procera*. **Plant Physiology and Biochemistry**, 45:781-789, 2007.

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

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

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

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

XAVIER-FILHO, J. *et al.* Poor correlation between the levels of protease inhibitors found in seeds of different cultivars of cowpea (*Vigna unguiculata*) and the resistance/susceptibility to predation by *Callosobruchus maculatus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 37: 1139-1143, 1989.

Palavras-Chave: *Calotropis procera*. Látex. Protease.