

MARCOS JORGE DE MAGALHÃES JUNIOR

**PROSPECÇÃO, ISOLAMENTO E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
PEPTÍDEOS DE FOLHAS DE *Mikania* SP.**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2009

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

M188e
2009

Magalhães Junior, Marcos Jorge de, 1982-
Prospecção, isolamento e atividade antimicrobiana de
peptídeos de folhas de *Mikania* sp. / Marcos Jorge de
Magalhães Junior. – Viçosa, MG, 2009.
xiii, 52f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui anexo.

Orientador: Maria Cristina Bacarat-Pereira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 38-47.

1. Pesticidas. 2. *Mikana* sp. 3. Peptídeos. 4. Fitopatologia.
5. Plantas medicinais. 6. Fungicidas. 7. Bactericidas.

I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 632.95

MARCOS JORGE DE MAGALHAES JUNIOR

**PROSPECÇÃO, ISOLAMENTO E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
PEPTÍDEOS DE FOLHAS DE *Mikania* SP.**

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

APROVADA: 31 de julho de 2009

Prof^a. Andréa de Oliveira Barros Ribon
(Co-orientadora)

Prof^a. Claudine Márcia Carvalho
(Co-orientadora)

Prof. João Paulo Viana Leite

Prof. Leandro Licursi de Oliveira

Prof^a. Maria Cristina Baracat-Pereira
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, pela oportunidade e privilégio que me foi dado em compartilhar tamanha experiência.

Ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular/DBB da Universidade Federal de Viçosa, pelo auxílio constante;

À Professora Maria Cristina Baracat-Pereira, pela orientação, apoio, amizade e presença constante no decorrer deste treinamento;

Ao Departamento de Fitopatologia da UFV, em especial ao Professor Reginaldo da Silva Romeiro e sua equipe, pela ajuda durante a realização do trabalho, especialmente na realização dos testes de atividade antimicrobiana;

Aos meus co-orientadores e aos membros da banca de avaliação, Professores Andréa de Oliveira Barros Ribon, Claudine Márcia Carvalho, Leandro Grassi de Freitas, João Paulo Viana Leite e Leandro Licursi de Oliveira, pelo grande auxílio e valiosas sugestões na condução e finalização desse trabalho;

Aos professores e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pelo apoio científico;

Aos amigos do Laboratório de Proteômica, que me proporcionaram muito mais que conhecimentos técnicos científicos: Meire, Hebréia, Paulo Wagner, Lanna, Rubens, Mariana, Patrícia, Ana, Fabiano, Tanus, Nayara, Pedro e Meire Sanne;

À minha filha Maria Eduarda e esposa Eliane, por se constituírem pessoas belas e admiráveis, me impulsionando a buscar vida nova a cada dia, meus agradecimentos por terem aceitado se privar de minha companhia pelos estudos, concedendo a mim a oportunidade de realizar ainda mais;

Aos meus pais Marcos Jorge e Maria da Luz, e irmãos Hilda Lucia e Hiana Carla, pela presença e apoio constantes;

E em especial ao amigo Kenner Morais, pela companhia em mais uma importante etapa da minha vida;

A todos que, direta ou indiretamente, auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT	xii
1 - INTRODUÇÃO.....	1
2 - REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 - <i>Mikania</i> sp. (guaco).....	2
2.2 - Mecanismo de defesa dos vegetais	3
2.3 - Proteínas e peptídios relacionados à defesa de plantas	4
2.4 - Patógenos de plantas	7
2.5 - Perspectivas para o estudo de peptídeos relacionados à defesa de plantas	8
3 - OBJETIVOS.....	9
4 – MATERIAL E METODOS	9
4.1 - Material vegetal e microrganismos.....	9
4.2 - Obtenção do extrato solúvel (ES).....	10
4.3 - Obtenção do extrato de parede (EP).....	10
4.4 - Fracionamento com sulfato de amônio	11
4.5 - Fracionamento de ES e EP por ultrafiltração.....	11
4.6 - Teste de atividade antibacteriana.....	11
4.7 - Teste de atividade antifúngica	12
4.8 - Cromatografia	12
4.9 - SDS-Tricina-PAGE	13
4.10 - Eletroeluição dos peptídeos do gel.....	14
4.11 - Espectrometria de massa.....	15
4.12 - Proteólise limitada.....	15
5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
5.1 - Obtenção do extrato protéico e purificação parcial.....	16
5.2 - Atividade antibacteriana	18
5.3 - Atividade antifúngica	23
5.4 - Eletroeluição e espectrometria de massa	24

5.5 - Cromatografia de fase reversa e espectrometria de massa.....	27
6 – CONCLUSÃO..	36
7 - PERSPECTIVAS	37
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
ANEXOS	48

LISTA DE FIGURAS	Pagina
Figura 1 – <i>Mikania</i> sp.	2
Figura 2 - A) Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida em presença de Tricina das frações de ES e EP obtidas após ultrafiltração. B) Mobilidade relativa do padrão de massa molecular (MM), para estimar a massa molecular da banda “a”	17
Figura 3 - Curvas de crescimento de <i>Xanthomonas axonopodis</i> e <i>Erwinia caratovora</i> subsp. <i>caratovora</i> na presença das frações protéicas ES>30kDa, ES3-30kDa, EP>30kDa e EP3-30kDa.	20
Figura 4 - Curvas de crescimento de <i>Pyseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> e <i>Ralstonia solanacearum</i> na presença das frações protéicas ES>30kDa, ES3-30kDa, EP>30kDa e EP3-30kDa.	21
Figura 5 - Curvas de crescimento de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> na presença das frações protéicas ES>30kDa, ES3-30kDa, EP>30kDa e EP3-30kDa.	22
Figura 6 - Curva de crescimento do fungo <i>Fusarium oxysporum</i> na presença das frações ES3-30kDa e ES>30kDa e EP3-30kDa e EP>30kDa.	23
Figura 7 - Géis obtidos por SDS-Tricina-PAGE do ES>30kDa e ES3-30kDa para eletroeluição.	25
Figura 8 - Géis obtidos por SDS-Tricina-PAGE do EP>30kDa e EP3-30kDa para eletroeluição.	26
Figura 9 - Espectro de massa da banda A1 obtida de ES>30 kDa (Figura 7), com massa molecular menor que 6kDa.	26
Figura 10 - Espectro de massa da banda B2 obtida de EP>30 kDa (Figura 8), com massa molecular menor que 6kDa.	27

Figura 11 - Cromatografia de fase reversa em coluna C18 em HPLC da fração ES>30kDa.	28
Figura 12 - Espectros de massas dos picos A, B, C, D e E da fração ES>30kDa (Figura 11) após a cromatografia de fase reversa em coluna C18.	29
Figura 13 - A) Cromatografia de fase reversa em coluna C18 em HPLC da fração ES3-30kDa. B) Espectrometria de massa tipo MALDI-TOF/TOF do pico indicado pela seta em A.	31
Figura 14 - A) Cromatografia de fase reversa em coluna C18 em HPLC da fração EP>30kDa. B) Espectrometria de massa tipo MALDI-TOF/TOF do pico indicado pela seta em A.	32
Figura 15 - Cromatografia de fase reversa em coluna C18 em HPLC da fração EP3-30kDa.	33
Figura 16 - Espectros de massas dos picos A, B, C, D, E, F, G e H da fração EP3-30kDa após a cromatografia de fase reversa em coluna C18.	34

LISTA DE TABELAS

	Pagina
Tabela 1 - Proteínas de defesa de vegetais, adaptada de Sels <i>et al.</i> (2008)	5
Tabela 2 - Percentagem de inibição das frações protéicas contra bactérias fitopatogênicas.	19
Tabela 3 - Percentagem de inibição das frações protéicas contra <i>Fusarium oxysporum</i> .	24

LISTA DE ABREVIATURAS

AMP	Peptídeos antimicrobianos
BIS	N,N' metileno-bis-acrilamida
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HR	Resposta hipersensitiva
LB	Luria-Bertani
LTP	Proteínas transferidoras de Lipídeos
MALDI-TOF/TOF	Ionização/dessorção de matriz assistida por laser – Time of flight/Time of flight
MIC	Concentração inibitória mínima
MM	Massa molecular
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonila
PR	Proteínas relacionadas à patógenos
SAR	Resistência sistêmica adquirida
SDS	Dodecilssulfato de sódio
TFA	Ácido trifluoracético
TRICINA	N-Tris(Hidroximetil)metilglicina
TRIS	Tris(Hidroximetil)aminometano

RESUMO

MAGALHAES JUNIOR, Marcos Jorge de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2009. **Prospecção, isolamento e atividade antimicrobiana de peptídeos de folhas de *Mikania* sp.** Orientadora: Maria Cristina Baracat-Pereira. Co-orientadores: Andréa de Oliveira Barros Ribon, Claudine Márcia Carvalho e Leandro Grassi de Freitas.

Peptídeos antimicrobianos (AMPs) têm atraído a atenção de pesquisadores como potenciais compostos de defesa para serem usados no agronegócio. O objetivo deste trabalho foi, por técnicas proteômicas, bioprospectar o potencial antimicrobiano de frações enriquecidas em peptídeos de folhas de guaco (*Mikania* sp.) contra fitopatógenos de importância comercial, visando aplicação biotecnológica. Folhas frescas de guaco foram maceradas em tampão Tris acrescido de inibidores de proteases, o homogenato foi centrifugado, e o sobrenadante foi nomeado extrato solúvel (ES). O precipitado foi ressuspensionado em solução de LiCl contendo inibidores de proteases, o homogenato foi centrifugado e o sobrenadante foi denominado extrato de parede celular (EP). ES e EP foram fracionados por ultrafiltração em membranas com limite de exclusão de 3 e 30 kDa. Para avaliar o potencial antimicrobiano das frações protéicas de guaco, as frações ultrafiltradas ES>30kDa, ES3-30kDa, EP>30kDa e EP3-30kDa foram testadas contra cinco bactérias, *Ralstonia solanacearum*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, *Erwinia caratovora* subsp. *caratovora* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, e o fungo *Fusarium oxysporum*. O ES>30kDa inibiu o crescimento de todos os seis microrganismos testados. Os microrganismos mais susceptíveis às frações protéicas foram a bactéria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* e o fungo *Fusarium oxysporum*. O procedimento de ultrafiltração foi essencial para a recuperação de grande quantidade de amostra parcialmente fracionada enriquecida em peptídeos. Com o objetivo inicial de confirmar a presença de AMPs nas frações ultrafiltradas, os extratos de guaco foram separados em SDS-Tricina-Page e as bandas de massa molecular sugestivamente enriquecidas em AMPs foram eletroeluídas e analisadas por espectrometria de massa em MALDI-TOF/TOF. Com o mesmo objetivo, as frações ultrafiltradas foram separadas em

C18-RP-HPLC e os picos analisados por espectrometria de massa, quando foram detectadas diversas moléculas com massas moleculares entre 4.367,092 e 9.164,098 kDa. Os picos com massas moleculares semelhantes aos AMPs foram selecionados e estão sendo submetidos à proteólise limitada para a caracterização bioquímica dos peptídeos via *peptide mass fingerprint* e/ou, MS/MS. Estes extratos protéicos ou peptídicos, com atividade antimicrobiana, podem ser biotecnologicamente explorados para aplicação comercial como compostos de defesa.

ABSTRACT

MAGALHAES JUNIOR, Marcos Jorge de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2009. **Prospection, isolation and antimicrobial activity of *Mikania* sp. leaves peptides** . Adviser: Maria Cristina Baracat-Pereira. Co-advisers: Andréa de Oliveira Barros Ribon, Claudine Márcia Carvalho and Leandro Grassi de Freitas.

Antimicrobial peptides (AMPs) have been attracting the researcher's attention as potential components of the plant defense, to be used in the agribusiness. The objective of this work was, by using proteomic techniques, to bioprospect the antimicrobial potential of peptide-enriched fractions from leaves of *Mikania* sp. for controlling the growth of important plant pathogens, aiming biotechnological applications. Leaves were macerated with Tris buffer added of protease inhibitors, the homogenate was centrifuged, and the supernatant was named soluble extract (ES). The precipitate was resuspended in LiCl solution containing protease inhibitors, the homogenate was centrifuged and the supernatant was named cell wall extract (EP). Both ES and EP were fractionated by ultrafiltration procedures by using membranes of 3 and 30 kDa cut-off. To evaluate the antimicrobial potential of the peptide enriched fractions, the ultrafiltered samples ES>30kDa, ES3-30kDa, EP>30kDa and EP3-30kDa were evaluated against five bacteria, *Ralstonia solanacearum*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, *Erwinia caratovora* subsp. *caratovora* and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, and against the fungus *Fusarium oxysporum*. ES>30kDa inhibited the growth of the six assayed microorganisms. The best inhibition degrees were obtained for the bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and the fungus *Fusarium oxysporum*. Considering the major objective of confirming the presence of AMPs in the ultrafiltered fractions, the extracts were separated by SDS-Tricine-PAGE, and the bands presenting molecular masses similar to AMPs were electroeluted and analyzed by mass spectrometry in a MALDI-TOF/TOF equipment. Also, the ultrafiltered fractions were separated on a C18-RP-HPLC column, and the peaks were analyzed by mass spectrometry, when various molecular mass values were observed, from 4,367.092 to 9,164.098

kDa. The fractions with molecular masses similar to AMPs were selected for development of limited proteolysis for biochemical characterization of the peptides through peptide mass fingerprint and/or MS/MS. These protein or peptide extracts, presenting antimicrobial activity, could be biotechnological explored for commercial application as defense agents.

1 - INTRODUÇÃO

Doenças em plantas causadas por bactérias e fungos que afetam colheitas são responsáveis por perdas significativas no agronegócio. Diversos países desenvolvidos, importadores de alimentos, vêm impondo barreiras comerciais sobre produtos agrícolas que utilizam pesticidas durante o seu cultivo e/ou armazenamento. Os exportadores brasileiros têm encontrado dificuldades para se adaptarem a estas regras devido à falta de combinações efetivas de agentes antimicrobianos.

Proteínas e peptídeos antimicrobianos (AMPs) têm sido objeto de estudos e candidatos a princípios ativos orgânicos para o desenvolvimento de produtos de proteção de plantas resistentes. As plantas são uma fonte de moléculas protéicas com atividade antimicrobiana. Muitas proteínas e peptídeos de defesa de plantas apresentam como característica: um amplo espectro de ação *contra* bactérias, fungos, nematóides e vírus envelopados e valores baixos de concentração inibitória mínima (MIC) (Hancock *et al.*, 1998). Na literatura são encontrados vários exemplos de peptídeos e proteínas produzidas por plantas com ação antimicrobiana, mostrando que os próprios vegetais são uma fonte na qual pode-se buscar novos produtos para substituir e/ou diminuir o uso dos agrotóxicos convencionais. Estas moléculas protéicas têm sido identificadas em camadas celulares periféricas de sementes e tecidos vegetativos, localização que está de acordo com sua função de defesa primária de tecidos vulneráveis.

Guaco, *Mikania gomerata* e *M. laevigata*, pertencentes à família Asteraceae, são utilizados na medicina popular no tratamento de afecções do trato respiratório. Alguns estudos têm comprovado o efeito inibitório destas espécies em vários microrganismos de importância clínica como *Candida* sp. e *Streptococcus mutans*. Algumas plantas que apresentam atividade contra microrganismos de importância clínica também podem ser úteis no controle de fitopatógenos. Os peptídeos antimicrobianos isolados de guaco podem ser utilizados como princípio ativo no desenvolvimento de novas drogas para o controle de microrganismos economicamente importantes e para o desenvolvimento de culturas vegetais resistentes. Dessa forma, este trabalho visa

ajustar uma metodologia para purificação dos peptídeos de folhas frescas de guaco, *Mikania* sp., e avaliar o potencial antimicrobiano destas frações contra fitopatógenos de interesse comercial.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - *Mikania* sp. (guaco)

O gênero *Mikania* possui mais de 430 espécies distribuídas pelas regiões tropicais da África, Ásia e América do Sul (Argentina, Paraguai e Uruguai). No Brasil ocorrem 192 espécies, sendo *Mikania glomerata* e *M. laevigata*, amplamente utilizadas como fitoterápico. Estas espécies são popularmente conhecidas como guaco, guaco liso ou guaco de cheiro. O uso destas plantas como fitoterápico é antigo estando *M. glomerata* oficializada na Farmacopéia Brasileira I (Farmacopéia Brasileira, 1929), e *M. laevigata* no sexto fascículo da farmacopéia brasileira (Farmacopéia Brasileira, 2005). Guaco esta incluído na LISTA DE MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS DE REGISTRO SIMPLIFICADO da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, não necessitando portanto da validação de suas indicações terapêutica e segurança de uso, para a comercialização de produtos a base de *Mikania* sp.. O extrato hidroalcoólico das folhas são utilizados como expectorante, no tratamento de febre, sífilis, reumatismo, neuralgia, dores, gripes e doenças do sistema respiratório (Delsin, 2004).



Figura 1 - *Mikania* sp.

A eficácia do guaco como fitoterápico tem sido descrita em alguns trabalhos científicos contra malária (Botsaris, 2007), contra *Candida albicans* (Duarte *et al.*, 2005), *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* (Pessini *et al.*, 2003) *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* (Yatsuda, 2004), e contra *Staphylococcus aureus* (Do Amaral *et al.*, 2003). O extrato alcoólico das folhas apresentou ação antiinflamatória em modelos de pneumonite alérgica em camundongos (Santos, 2005) e ação antiproliferativa sobre algumas linhagens de células cancerígenas (Delsin, 2004). Todos estes efeitos de *Mikania* sp. são atribuídos às cumarinas, os efeitos antimicrobianos das proteínas e/ou peptídeos não são explorados na literatura, portanto, os peptídeos e proteínas de guaco podem exercer efeito inibitório sobre microrganismos diversos, como fitopatógenos.

2.2 - Mecanismos de defesa dos vegetais

As plantas não aceitam de modo passivo as agressões que sofrem de vírus, bactérias, insetos e demais organismos ou de agentes não-biológicos como radiação, temperaturas extremas, poluição e outros. Elas percebem as agressões e sua alta capacidade de adaptação permite que sobrevivam, mesmo tendo muitas vezes seu desenvolvimento prejudicado. Os efeitos são mais graves sobre as espécies de interesse agrícolas muito vulneráveis, porque em geral são usadas em monoculturas geneticamente uniformes. Quando uma doença atinge essas espécies, as perdas podem ser severas (Margis-Pinheiro *et al.*, 1997)

A sobrevivência dos vegetais depende das várias estratégias de defesas selecionadas durante milhões de anos de co-evolução entre plantas e patógenos. Tais estratégias de defesa são divididas em mecanismos de defesa constitutivos, também chamado de defesa pré-formada e mecanismos de defesa induzidos. Dentre os mecanismos de defesa pré-formados estão a cutícula e a parede celular. Ambas funcionam como barreiras físicas contra a penetração de patógenos, e além de barreiras físicas, contém moléculas capazes de impedir o ataque de patógenos (Sels *et al.*, 2008). Chassot *et al.* (2007) demonstraram que perturbações na cutícula levam a total resistência de *A. thaliana* ao fungo *Botrytis cinerea*, e os autores apresentam outros exemplos demonstrando que os vegetais são capazes de identificar alterações na cutícula. Hückelhoven (2007) afirma que

quando o mecanismo de defesa basal é acionado, várias proteínas de defesa são produzidas e direcionadas à parede celular, dentre elas estão quitinases, glucanases, tioninas, osmontinas, esnaquinas, proteases e defensinas.

Os mecanismos de defesa pré-formados não são eficientes contra todos os patógenos (Sels *et al.*, 2008). Em vegetais não susceptíveis, quando a defesa constitutiva não impede o ataque de um patógeno, são ativados dois tipos de mecanismos de defesa induzida: a resposta hipersensitiva (HR) e a resistência sistêmica adquirida (SAR).

A HR é caracterizada com a morte de células situadas na região por onde o agressor penetra o tecido vegetal. Os aspectos fisiológicos da HR incluem o aumento rápido e transitório de agentes oxidantes, a perda de íons potássio (K^+) e ganho de íons hidrogênio (H^+) pelas células, a destruição de compartimentos e o espessamento das paredes celulares e da cutícula, além da síntese de toxinas e proteínas relacionadas à defesa, conhecidas como proteínas PR (relacionadas à patogênese).

A SAR protege a planta junto com a resistência local contra novos ataques de um mesmo patógeno. Induzida por diferentes agentes, após uma primeira infecção, a SAR torna a planta resistente, por várias semanas, a infecções posteriores. Segundo Durrant *et al.* (2004), uma das características de SAR é o aumento da expressão de proteínas relacionadas à defesa (PR).

Como explicitado acima, a síntese de proteínas e peptídeos é uma regra nos mecanismos de defesa dos vegetais. Todas essas proteínas e peptídeos podem ser uma fonte de produtos candidatos a substituir e/ou diminuir o uso de agrotóxicos nas lavouras. A busca por esses antibióticos tem apresentado resultados promissores, muitos com atividade “in vitro” e alguns trabalhos “in vivo”.

2.3 - Proteínas e peptídeos relacionados à defesa (PR)

Conforme Loon *et al.* (2006), as proteínas PR estão agrupadas em 17 famílias, PR-1 a PR-17, de acordo com a ordem cronológica em que foram descritas e sua atividade biológica. Tais proteínas podem variar de 5 a 75 kDa

(Tabela 1, Sels *et al.*, 2008). Cada família combate determinados patógenos: PR-2 possui atividade β -1,3 glucanase, PR-3, 4, 8 e 11 são endoquitinases atuando contra fungos. As quitinases juntamente com as PR-6 (inibidores de proteases) podem atuar contra nematóides, herbívoros e fungos (Loon *et al.*, 2006 e Sels *et al.*, 2008). PR-8 possui atividade lisozima e atua contra bactérias. As defensinas (PR-12) e tioninas (PR-13) são antibacterianas e antifúngicas. Thaumatin-like (PR-5) são ativas contra oomicetos (Loon *et al.*, 2006). PR-7 são endoproteinases, PR-9 está associada a mecanismo de reforço da parede celular aumentando a resistência contra vários patógenos, PR-10 e PR-14 possuem atividade contra vírus (Park *et al.*, 2004 e Caporale *et al.*, 2004). PR-15, 16 e 17 produzem peróxido de hidrogênio que é tóxico para uma gama de patógenos, além de estimular reposta de defesa (Hu *et al.*, 2003).

Tabela 1 – Proteínas de defesa de vegetais, adaptada de Sels *et al.* (2008)

Família	kDa	Propriedades
PR-1	15	Antifúngico
PR-2	30	β -1,3-glucanase
PR-3	25-30	Quitinase
PR-4	15-20	Quitinase
PR-5	25	Semelhantes a Thaumatin
PR-6	8	Inibidores de proteases
PR-7	75	Endoproteinases
PR-8	28	Quitinases
PR-9	35	Peroxidases
PR-10	17	Semelhantes a Ribonucleases
PR-11	40	Quitinase
PR-12	5-7	Defensinas
PR-13	5	Thioninas
PR-14	9	Transferidoras de lipídeos
PR-15	20	Oxalato oxidase
PR-16	20	Semelhante a oxalato oxidase
PR-17	27	Não conhecida

Dentre estas proteínas de defesa estão alguns peptídeos, PR peptídeos (PR-6,12,13 e 14), que são moléculas menores que 10 kDa produzidas a partir da ação seletiva de peptidases, altamente básicos e ricos em resíduos de cisteína (Sels *et al.*, 2008 e Farrokhi *et al.*, 2008). PR-6 são inibidores de proteases com aproximadamente 8 kDa, podendo atuar contra insetos, nematóides e herbívoros inibindo suas enzimas digestivas. Alguns membros desta família podem limitar o crescimento de fungos, inibindo a atividade de enzimas relacionadas à síntese da parede celular (Sels *et al.*, 2008).

A família das defensinas (PR-12) é a família mais abundante de peptídeos de defesa dos vegetais. Elas são encontradas em invertebrados e vertebrados. Todas as defensinas de plantas encontradas até agora possuem de 45-54 resíduos de aminoácidos, com similaridade relativamente baixa, todas com oito resíduos de cisteína envolvidos em quatro ligações dissulfeto, que são responsáveis pela estabilização da estrutura tridimensional do peptídeo, além de outros resíduos conservados, incluindo duas glicinas, um anel aromático e ácido glutâmico (Farrokhi *et al.*, 2008 e Carvalho *et al.*, 2009). As defensinas já foram testadas contra vários fitopatógenos, e dentre os sensíveis a elas podemos citar as bactérias *Clavibacter michiganensis* e *Ralstonia solanacearum* (Segura *et al.*, 1998 e Kovalskaya *et al.*, 2009), algumas linhagens de *Pseudomonas* sp. (Kovalskaya *et al.*, 2009), e *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Chen *et al.*, 2005 e Franco *et al.*, 2006). Dentre os fungos sensíveis estão *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani* (Ye *et al.*, 2002) e *Alternaria longipes* (Terras *et al.*, 1995). Outra característica das defensinas é a especificidade, quando RsAFP2 e Dm-AMP1 interagem especificamente com glicosilceramidas e monosildinositolfosforilceramida, respectivamente, da membrana de fungos susceptíveis (Thevissen *et al.*, 2000; 2004).

As tioninas, PR-13, possuem de 45 a 47 resíduos de aminoácidos, sendo conservados os de arginina, lisina e cisteína. De acordo com o número de pontes dissulfeto, elas podem ser divididas em três grupos: com duas, três ou quatro pontes. Na literatura encontram-se diferentes relatos sobre plantas transgênicas que aumentaram a sua resistência contra fungos ou bactérias após a super-expressão de genes de tioninas. Como exemplos, plantas de tabaco tornaram-se

resistente a *Pseudomonas syringae*, plantas de arroz expressando uma tionina encontrada na parede celular de aveia tornou-se resistente a várias doenças bacterianas, e *A. thaliana* tornou-se resistente a *Fusarium oxysporum* (Epple *et al.*, 1997; Iwai *et al.*, 2002; Sels *et al.*, 2008).

As proteínas transferidoras de lipídeos (LTPs) (PR-14) são divididas em duas famílias, LTP1s (90-95 resíduos de aminoácidos) e LTP2s (aproximadamente 70 resíduos de aminoácidos), com MM entre 9 e 7 kDa, respectivamente (Sels *et al.*, 2008 e Carvalho *et al.*, 2007). São assim chamadas por causa da habilidade em se ligar e transportar moléculas hidrofóbicas “in vitro” (Carvalho *et al.*, 2007). Segundo Sels *et al.* (2008), várias LTPs estão localizadas na parede celular dos vegetais. Existem também diferentes relatos evidenciando a função das LTPs na defesa de plantas. Dentre as bactérias sensíveis a elas estão *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, *Ralsotnia solanacearum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* e aos fungos *Botrytis cinerea* e *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* (Molina *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 2004; Ooi *et al.*, 2006; Roy-Barman *et al.*, 2006).

Além dos peptídeos comentados anteriormente, ainda podem ser citados os peptídeos do tipo haveina, com 43 resíduos de aminoácidos, ricos em cisteína/glicina (Broekaert *et al.*, 1992); os peptídeos denominados knotinas, com 36 a 37 resíduos de aminoácidos e três ligações dissulfeto (Broekaert *et al.*, 1997); as duas famílias com quatro pontes dissulfeto, que são MBP-1, com 33 resíduos de aminoácidos, e Ib-AMPs (Tailor *et al.*, 1997); as eesnaquinas com 6 pontes dissulfeto e 63 resíduos de aminoácidos (Segura *et al.*, 1999); as sheferdinas, compostas por peptídeos lineares ricos em glicina/histidina (Park *et al.*, 2000); e os peptídeos macrocíclicos, com 28 a 37 resíduos de aminoácidos e três pontes dissulfeto (Mulvenna *et al.*, 2006).

2.4 - Patógenos de plantas

Doenças causadas por fitopatógenos podem levar a perdas significativas nas lavouras. Neste estudo foram escolhidos microrganismos que causam doenças em culturas comerciais para avaliar o potencial antimicrobiano dos extratos protéicos de *Mikania* sp.. Dentre os microorganismos-teste estão a bactéria

Gram-positiva *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, causadora do cancro bacteriano do tomateiro, que pode provocar perdas entre 30 a 50% da produção (Theodoro *et al.*, 2000). Dentre as bactérias Gram-negativas: *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, causadora da mancha bacteriana pequena do tomateiro (Soares *et al.*, 2001), *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, causadora do crestamento bacteriano do feijoeiro, que pode causar redução de até 70% na colheita (Marques *et al.*, 2005), *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora* que causa a prodridão-mole da batata (Assis, 2007) e *Ralstonia solanacearum*, agente causal da murcha bacteriana, que afeta várias culturas: batata (*Solanum tuberosum* L.), berinjela (*Solanum melongena* L.), banana (*Musa* spp.), pepino (*Cucumis sativus* L.) e abobora-de-moita (*Curcubita pepo* L.) (Patricio *et al.* 2005). Para avaliar a atividade antifúngica dos extratos protéicos de guaco, o microrganismo avaliado foi *Fusarium oxysporum*, causador de murchas vasculares em diversas culturas economicamente importantes: murcha-do-algodoeiro, murcha-de-fusarium-do-tomateiro, murcha-da-bananeira e murcha-do-feijoeiro (Pereira, 2007).

2.5 - Perspectivas para o estudo de peptídeos relacionados à defesa de plantas

Os métodos convencionais de controle de fitopatógenos são baseados na aplicação de agentes químicos e melhoramento genético visando à resistência. O uso de agentes químicos e sua presença no solo são altamente danosos ao meio ambiente, especialmente quando esses químicos são aplicados repetitivamente de modo exagerado no solo (Pieterse *et al.*, 2005). Embora estes antibióticos sejam altamente eficientes, seu uso não é autorizado em muitos países, e patógenos de plantas têm desenvolvido resistência a eles. O Brasil como um país exportador é prejudicado por essas exigências, logo torna-se necessário identificar novos compostos com baixo impacto ambiental, amplo espectro de atividade antimicrobiana, razoável seletividade bacteriana e baixa citotoxicidade para células eucarióticas (Badosa *et al.*, 2007).

Os vegetais são uma fonte atrativa de moléculas que atendem às características citadas anteriormente. Os peptídeos PR em plantas atendem à maioria destas características, e como exemplo bem sucedido, Gao *et al.* (2000)

demonstraram resistência de plantas de tomate transgênico expressando uma defensina de rabanete que tornou-se resistente ao fungo *Verticillium dahliae* em condições de campo.

O objetivo deste trabalho, portanto, é purificar e caracterizar peptídeos antimicrobianos de guaco para o desenvolvimento de novas drogas ou culturas resistentes a fitopatógenos. Esta etapa é a primeira de um longo trabalho que é a caracterização total dos peptídeos identificados. Tais tarefas, purificar e caracterizar, são esforços multidisciplinares, envolvendo químicos, biólogos, farmacêuticos, agrônomos e bioquímicos. A etapa aqui desenvolvida é de fundamental importância para a evidência do potencial antimicrobiano dos peptídeos para fins biotecnológicos.

3 - OBJETIVOS

Extrair e purificar parcialmente peptídeos das folhas de *Mikania* sp. (Guaco) e avaliar o potencial antimicrobiano das frações peptídicas sobre bactérias e fungos fitopatogênicos.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido na Universidade Federal de Viçosa (UFV), no Laboratório de Proteômica e Bioquímica de Proteínas / CCB II e BIOAGRO, sob orientação da Professora Maria Cristina Baracat-Pereira e contou com a colaboração do Professor Reginaldo da Silva Romeiro do Departamento de Fitopatologia (DFP) da UFV. As análises de espectrometria de massa foram realizadas no Laboratório de Análises de Biomoléculas do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UFV, com auxílio da Dra. Meire de Oliveira Barbosa, pós-doutoranda do Programa de Bioquímica agrícola, na UFV.

4.1 - Material vegetal e microrganismos

Folhas frescas de Guaco (*Mikania* sp.) foram adquiridas no grupo Entre Folhas - Plantas Medicinais do Departamento de Fitotecnia da UFV, em fevereiro de 2009, situado na Vila Gianetti, casa 20, no Campus da UFV. A planta encontra-se localizada em S 20° 45' 11.5" e W 42° 52' 28.5", medido em GPS Garmin Etrex

Vista, cedido pelo professor Elpidio Inacio Fernandes Filho do Departamento de Solos da UFV.

Os microrganismos-teste utilizados para avaliar a atividade antimicrobiana das frações protéicas foram as bactérias fitopatogênicas *Ralstonia solanacearum*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e *Erwinia caratovora* subsp. *caratovora*, dentre as Gram-negativas, e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, como Gram-positiva, além do fungo fitopatogênico *Fusarium oxysporum*, todos fornecidos gentilmente pelo Prof. Reginaldo da Silva Romeiro, do Departamento de Fitopatologia da UFV, responsável pelo Banco de Fitopatógenos do Laboratório de Bacteriologia de plantas e Controle Biológico.

Culturas estoque das bactérias foram preparadas em meio líquido (meio LB) contendo glicerol 50% e armazenadas a -80°C . Para os testes, as bactérias foram repicadas em meio líquido (meio LB 1X) e cultivadas até A_{560} de 0,9 e 1,0. O ensaio antifúngico foi realizado em meio líquido de acordo com Broekaert *et al.* (1990) e Games *et al.* (2008).

4.2 - Obtenção do extrato solúvel

A extração do material vegetal foi realizada conforme Teixeira *et al.* (2006). Folhas frescas (200 g) de guaco foram pulverizadas com N_2 líquido e trituradas em almofariz e pistilo e maceradas com 800 mL de tampão de extração 1:4 (grama de folhas: mL de tampão) contendo inibidores de proteases (Tris-HCl 50 mM, pH 7,0; EDTA 10 mM; fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) 1 mM, benzamidina 1 mM; e tiouréia 2mM). O homogenato foi centrifugado a 20.300 g por 30 min a 4°C e o sobrenadante obtido foi denominado extrato solúvel (ES).

4.3 - Obtenção do extrato de parede celular

O precipitado obtido na etapa anterior foi ressuspenso em 500 mL de LiCl 1,5 M, PMSF 1 mM, benzamidina 1 mM e tiouréia 2 mM, na proporção de 1:2,5 por 2 h a 4°C , sob agitação. O homogenato foi centrifugado nas mesmas condições anteriores e o sobrenadante resultante foi recuperado como extrato de parede celular (EP).

4.4 - Fracionamento com sulfato de amônio

Ambos os extratos, EP e ES, foram fracionados com sulfato de amônio entre 35 e 75% de saturação em banho de gelo. Os precipitados obtidos de EP e ES foram ressuspensos com 410 mL e 350 mL, respectivamente, em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7 contendo 14% (p/v) de acetato de amônio e centrifugado novamente, sendo recuperado o sobrenadante e descartado o precipitado.

4.5 - Fracionamento de ES e EP por ultrafiltração

ES e EP foram fracionados e concentrados em equipamento de ultrafiltração por pressão positiva AMICON BIOSEPARATIONS, modelo 8400 (Millipore) utilizando duas membranas, sendo inicialmente em membrana com limite de exclusão de 30 kDa (*polyethersulfone*, PM 30, Millipore) e os filtrados reservados. As frações retidas pela membrana com limite de exclusão molecular de 30 kDa continham moléculas acima de 30 kDa e foram denominadas respectivamente, **ES>30kDa e EP>30kDa**, que foram armazenadas a -20°C para posterior utilização. Durante o procedimento, foram realizadas três trocas de solução seqüenciais, todas com 25 mL de Tris-HCl 20 mM, pH 7, adicionado dos inibidores de proteases anteriormente descritos e de, respectivamente, 100 mM, 60 mM e 20 mM de acetato de amônio, para garantir a separação de amostras pelas massas moleculares, maiores e menores que 30 kDa, os extratos foram concentrados até aproximadamente 10 mL.

Cada filtrado recuperado foi novamente submetido à ultrafiltração utilizando membrana de limite de exclusão molecular de 3 kDa (*polyethersulfone*, PB GC, Millipore), utilizando o mesmo procedimento mencionado na etapa anterior. As frações recuperadas continham moléculas entre 3 e 30 kDa e foram denominadas, respectivamente, **ES3-30kDa e EP3-30kDa**, e foram armazenadas a -20°C.

4.6 - Teste de atividade antibacteriana

Testes de inibição das bactérias fitopatogênicas foram realizados de acordo com Teixeira *et al.* (2006), em microplacas de 96 poços, de fundo plano, estéreis e tampadas. Para os ensaios, foram adicionados em cada poço 50 µL de

meio LB 2x, 10 µL de inóculo e 40 µL da fração peptídica ultrafiltrada (amostra-teste) ou de água (controle da cultura). As amostras testes foram preparadas a partir de 100 µL referentes a 2 g de folhas frescas, que foram concentradas em speed vac até 40 µL. O controle do meio consistiu de 50 µL de meio LB 2x adicionados de 50 µL de água. As leituras de densidade ótica dos ensaios foram feitas em 560 nm com intervalos de duas horas, por 16 horas. Para efeito de normalização, todas as medidas de DO_{560} foram subtraídas das medidas correspondentes às do tempo 0h. A percentagem de inibição foi medida pela comparação dos valores de densidade ótica entre as curvas de crescimento na presença e na ausência dos peptídeos, no tempo de 8h, logo após a entrada na fase estacionária de crescimento. Os testes foram desenvolvidos em triplicata e em uma única concentração das frações testes.

4.7 - Teste de atividade antifúngica

O teste antifúngico foi realizado em microplaca de 96 poços em meio líquido contra *Fusarium oxysporum* em triplicata, e de acordo com Broekaert *et al.* (1990) e Games *et al.* (2008). Para todos os ensaios, foram adicionados em cada poço 150 µL de meio Kado & Heskett, e 3,6 µL da suspensão de esporos (10^4 esporos). Para o controle da cultura, foram adicionados 46,4 µL de água ultra-pura. Para o controle do tampão de amostra, foram adicionados 46,4 µL de tampão de amostra (Tris-HCl 20 mM, pH 7) adicionado de acetato de amônio 20 mM. Para o controle do meio, foram adicionados 50 µL de água ultra-pura. Nos poços-teste, foram adicionados 46,4 µL das amostras-testes. As amostras-teste foram preparadas a partir de 250 µL referentes a 5 g de folhas frescas, que foram concentradas em speed vac até 46,4 µL. No controle do tampão de amostra, 250 µL do tampão de amostra foi concentrado em speed vac até 46,4 µL. A concentração final do meio Kado & Heskett nos controles e nos testes foi 0,9x, primeiramente testada e confirmada como sendo a que permitiu melhores resultados, as leituras foram realizadas a 660 nm.

4.8 - Cromatografia

Os extratos fracionados por ultrafiltração (ES>30kDa, ES3-30kDa, EP>30kDa e EP3-30kDa) foram submetidos à cromatografia de fase reversa

(C18-RP-HPLC), coluna analítica C18 Shim-Pack CLC-ODS Shimadzu, sendo a solução de equilíbrio (solução A) ácido trifluoracético (TFA) 0,1% (v/v) e a solução B de eluição composta de 80% de acetonitrila (v/v) e TFA 0,1% (v/v) ao fluxo de 1 mL.min⁻¹. As percentagens das soluções de A e B durante as corridas cromatográficas foram: (0-10 min) 100% da solução A, (11-40 min) de 0 a 60% da solução B, (41-50 min) de 61 a 100% de B, (51 a 60 min) 100% de B. As massas obtidas durante a C18-RP-HPLC foram analisadas em espectrômetro de massa do tipo MALDI-TOF/TOF.

Em uma segunda etapa, os extratos fracionados por ultrafiltração foram submetidos à cromatografia bidimensional. Na primeira dimensão as proteínas foram separadas por cromatografia de exclusão molecular usando sistema ÄktaBasicUPC, coluna Waters Protein-PackTM 125, 7,8 x 300 mm sendo a solução de equilíbrio e de eluição Tris-HCl 25mM acrescida de 150 mM de NaCl, pH 7, ao fluxo de 0,25 mL.min⁻¹. As frações obtidas na gel filtração foram submetidas à cromatografia e a espectrometria de massa conforme acima descrito.

4.9 - SDS-Tricina-PAGE

Para eletroforese em gel de três fases (Teixeira *et al.*, 2006) adaptada de Schägger & Jagow (1987) e Judd (1994), foi utilizado equipamento da BIORAD para minigel (cuba *Mini Protean III*) com géis de 0,75 mm de espessura. As amostras ES>30kDa, ES3-30kDa, EP>30kDa e EP3-30kDa, quando necessário, foram concentradas em speed-vac Thermo Electron Corporation até 16 µL, e a esta amostra foram adicionados 8 µL tampão de amostra 3x, resultando no tampão de amostra 1x (Tris-base, pH 6,8, 0,1 M, SDS 4%, azul de bromofenol 0,025%, glicerol 12% (v/v) e β-mercaptoetanol 10% (v/v)).

As três fases do gel consistiam de: gel de separação, 16,5% T e 3,0% C, pH 8,9; gel intermediário, 9,9% T e 3,0% C, pH 8,9, e gel de concentração, 5,12% T e 2,6% C, pH 6,8), em presença de tricina, que é preferencialmente usada para separar proteínas de baixas massas moleculares. Para a separação, utilizou-se tampão do catodo constituído de Tris-base 0,1 M, Tricina 0,1 M e SDS 0,1% (pH 8,25), e o tampão do anodo, constituído de Tris-base 0,2 M (pH 8,9). A eletroforese foi desenvolvida a 100 V até atingir o gel intermediário, a 80 V até

atingir o gel de concentração, e então a 60 V, até o final da corrida, perfazendo aproximadamente 5 h. Para estimar a MM das proteínas, utilizou-se o marcador molecular *Ultra-Low Range* (SIGMA) (6,5 kDa - Aprotinina; 14,2 kDa - α -Lactoalbumina; 17,0 kDa - Mioglobina; 26,6 kDa - Triofosfato isomerase; 3,496 kDa - cadeia β da insulina e bradiquinina, 1,060 kDa) e *Broad Range* (BIO-RAD) (6,5 kDa - Aprotinina, 14,4 kDa - Lisozima, 21,5 kDa - Inibidor de tripsina, 31,0 kDa - Anidrase carbônica, 45,0 kDa - Ovoalbumina, 66,2 kDa - Soroalbumina, 97,4 kDa - Fosforilase b, 116,2 kDa - β -galactosidase e 200 kDa - Miosina).

A revelação dos géis foi feita por Coomassie Brillante Blue R-250. Os géis foram deixados 120 min sob agitação branda em uma solução corante contendo: 0,1% de Coomassie Brillante Blue R-250, 9% (v/v) de ácido acético glacial, e 45% (v/v) de metanol. Depois deste tempo, a solução corante foi removida e o gel adicionado à solução descorante contendo 7,5% (v/v) de ácido acético glacial e 25% (v/v) de metanol, onde permaneceu sob leve agitação até o aparecimento das bandas (Patton, 2002).

4.10 - Eletroeluição dos peptídeos do gel

Após análise dos géis, as bandas de baixa MM foram recortadas, descoradas e eletroeluídas. Para a descoloração e remoção do SDS, as bandas foram deixadas em uma solução descorante (50% de acetonitrila e 25mM de bicarbonato de amônio, pH 8), a temperatura ambiente, sob leve agitação até ficarem transparentes. As bandas de aproximadamente 14 kDa foram eletroeluídas em sacos de diálise com limite de exclusão de 3,5 kDa, e as bandas menores que 14 kDa, em sacos de diálise com limite de exclusão de 1 kDa. As bandas descoradas foram primeiramente colocadas dentro do saco de diálise contendo 5 mM de Tris-HCl, pH 7. O saco de diálise foi colocado em uma cuba horizontal de eletroforese contendo tampão catodo (Tris-base 0,1 M, Tricina 0,1 M e SDS 0,1%, pH 8,25) e foi submetido a de 60V durante 4 horas. Ao fim deste período, a membrana contendo os peptídeos foi dialisada seqüencialmente com tampão catodo diluído 10 x, 20 x, 100 x e água, duas horas em cada solução. Após a diálise, as alíquotas foram concentradas em speed-vac Thermo Electron Corporation e analisadas por espectrometria de massa.

4.11 - Espectrometria de massa

As análises das massas moleculares dos peptídeos e proteínas eletroeluídos ou separados por técnicas cromatográficas foram realizadas em espectrômetro de massa MALDI-TOF/TOF localizado no Laboratório de Análise de Biomoléculas da UFV, pela Dr^a. Meire de Oliveira Barbosa, Pós-doutoranda no Laboratório de Proteômica e Bioquímica de Proteínas da UFV.

As amostras foram liofilizadas em microtubos e dessalinizadas em Zip-Tip C4. Foram misturados 1 μL da amostra com 1 μL de matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em 50% de acetonitrila e TFA 0,1%, e adicionada em cada ponto da placa de aço do espectrômetro de massa.

4.12 – Proteólise limitada

A seleção dos picos para proteólise baseou-se na intensidade de ionização das amostras e na pureza dos picos. Os picos selecionados foram ES>30: picos D e E; EP3-30kDa: picos A, B, C, D e G.

Todas as amostras selecionadas foram concentradas em Speed vac até 20 μL . Deste volume foram reservados 5 μL para proteólise limitada. Aos 5 μL são adicionados 95 μL de NH_4HCO_3 , 50mM, pH 7.8. Neste ensaio o DTT e a iodoacetamida são preparados em 100 mM de NH_4HCO_3 . Para redução das pontes dissulfeto, foi adicionado 5 μL de DTT 200 mM, aos 100 μL de amostra, deixando ferver por 10 min. A alquilação foi realizada adicionando nas amostras reduzidas 4 μL de uma solução 1M de iodoacetamida, os tubos foram então agitados em vortex, feito um “spin” e então deixados em repouso durante 30 min na ausência de luz. Para paralisar a alquilação, foi adicionado 10 μL de DTT 200 mM, os tubos foram novamente agitados em vortex, feito um “spin” e deixados em repouso a temperatura ambiente no escuro entre 30-45 minutos.

Após a paralisação da alquilação foram adicionados aos tubos 10 μL da solução de digestão contendo tripsina da marca Promega e incubado a 37°C overnight. Composição da solução de digestão: 25 mM NH_4HCO_3 , 2,5 mM CaCl_2 e 12 ng/mL de tripsina, pH 7.8.

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - Obtenção do extrato protéico e purificação parcial

A metodologia para extração de proteínas e peptídeos das folhas de guaco foi desenvolvida com sucesso. Em experimentos inicialmente realizados, a etapa de fracionamento de ES e de EP, por sulfato de amônio não foi utilizada, tendo ocorrido a formação de precipitados, aparentemente de origem protéica, especialmente nas amostras mais purificadas, comprometendo o desenvolvimento do trabalho. O fracionamento com sulfato de amônio certamente removeu compostos não protéicos, como carboidratos, compostos aromáticos, lipídeos e outros, o que favoreceu a manutenção das proteínas em solução. Outros interferentes como polifenóis e alcalóides (Gegenheimer *et al.*, 1990), e moléculas aromáticas, como as cumarinas, que possuem atividade antimicrobiana e estão presentes em altas concentrações em guaco (Celeghini *et al.*, 2001; Vigo-Schultz *et al.*, 2006) podem também promover precipitações protéicas.

A seleção da membrana com o limite de exclusão de 3 kDa para a etapa final da ultrafiltração permitiu a concentração, a dessalinização e a remoção de compostos fenólicos e outros de baixas massas moleculares como as cumarinas. Os extratos vegetais são amostras muito complexas (Baggerman *et al.*, 2004), por isso, é essencial a utilização de técnicas de preparação e clarificação das amostras anteriormente às purificações cromatográficas, como centrifugação, ultrafiltração e fracionamento salino dos extratos, para se obter um bom grau de separação dos peptídeos e proteínas de interesse.

A eficiência do fracionamento por ultrafiltração foi avaliada por SDS-Tricina-PAGE com as frações ES>30kDa, ES3-30kDa, EP>30kDa e EP3-30kDa (Figura 2A). No EP>30kDa, além das bandas de alta massa molecular (MM), foi possível verificar a presença de proteínas menores que 30 kDa (canaletas 2 e 3), o que pode ser explicado pela provável aglomeração dos peptídeos e proteínas de baixas MM em estruturas maiores que 30 kDa que, sob a condição desnaturante da eletroforese, foram desagregados. No EP3-30kDa (canaletas 4 e 5), ficou evidente o enriquecimento de uma banda peptídica, de

aproximadamente 7,5 kDa (banda “a”), comprovando a eficácia da ultrafiltração no enriquecimento destas moléculas de baixa MM.

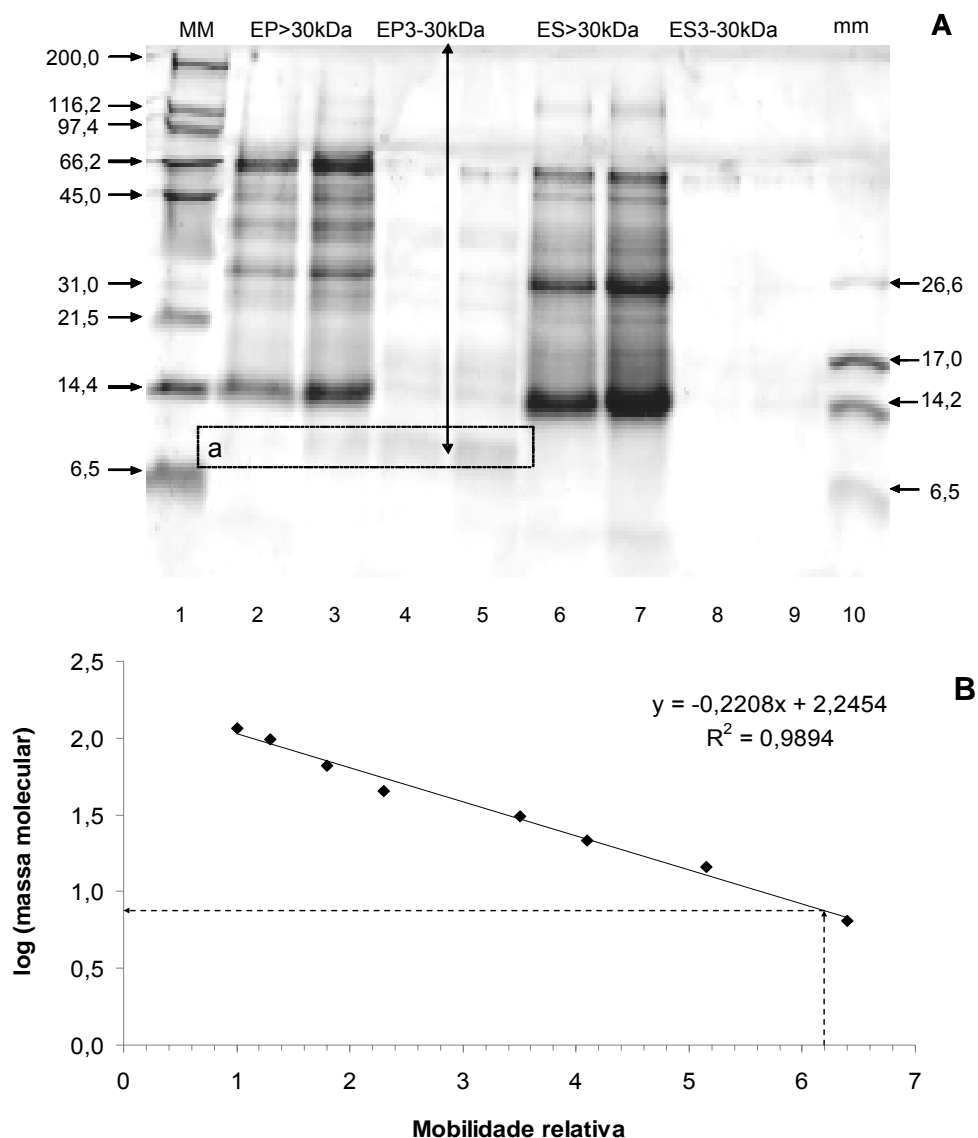


Figura 2 – A) Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida em presença de Tricina das frações de ES e EP obtidas após ultrafiltração. Canaletas: 1 e 10 - Marcadores de massa molecular (MM e mm) – *Broad Range* e *Ultra-Low*, respectivamente; 2 e 3: EP>30kDa (16 e 25 μ L, respectivamente); 4 e 5: EP3-30kDa (16 e 25 μ L, respectivamente); 6 e 7: ES>30kDa (16 e 25 μ L, respectivamente); 8 e 9: ES3-30kDa (16 e 25 μ L, respectivamente). “a” - Banda presente apenas em EP, 7,524 kDa (seta: x = 6,2 cm). **B)** Mobilidade relativa do padrão de massa molecular (MM), para estimar a massa molecular da banda “a”.

No ES>30kDa (canaletas 6 e 7) foram encontradas bandas menores e maiores que 30 kDa (Figura 2A). A presença de bandas menores que 30 kDa sugere também a aglomeração de peptídeos entre si e/ou com outras proteínas maiores que se desaglomeram sob a condição desnaturante da eletroforese. No ES3-30kDa (canaletas 8 e 9), não foi possível verificar a presença de proteínas/peptídeos na concentração testada, entretanto quando se usou o dobro da concentração (50 µL, Figura 7, Pág. 25), apenas proteínas/peptídeos menores que 30 kDa foram visualizadas, o que é condizente com o resultado esperado após a etapa de ultrafiltração. Porém não foi observado neste gel o enriquecimento de uma banda menor que 6 kDa presente no ES>30kDa, o que pode ser fruto da menor concentração protéica dessa amostra.

Considerando que na parede celular estão localizados peptídeos de defesa de várias classes, inclusive peptídeos antimicrobianos (AMPs) (Hückelhoven, 2007), a metodologia de ultrafiltração utilizada parece ter sido eficiente no fracionamento destas moléculas. De acordo com a experiência prévia do nosso grupo de trabalho, estes peptídeos estão provavelmente em associação uns com os outros, e as bandas maiores que 30 kDa nas frações ES3-30kDa e EP3-30kDa, portanto, podem ser resultado da aglomeração destes peptídeos. A banda “a” (Figura 2A), exclusiva do EP, e mais evidente na fração EP3-30kDa, evidencia a eficiência do fracionamento.

5.2 - Atividade antibacteriana

As frações obtidas na ultrafiltração (ES>30kDa, ES3-30kDa, EP>30kDa e EP3-30kDa) foram avaliadas quanto à atividade antibacteriana em uma única concentração, referente a 2g de folhas frescas, correspondente a 100 µL das frações, contra 5 bactérias fitopatogênicas; *Ralstonia solanacearum*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e *Erwinia caratovora* subsp. *caratovora*, que são Gram-negativas, e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, Gram-positiva. O extrato que apresentou maior atividade antibacteriana foi o ES>30kDa (Tabela 2), para a bactéria Gram-positiva, o extrato promoveu uma inibição de 66%, sendo esta a espécie mais susceptível a todas as frações avaliadas (Figura 5, Pág. 22).

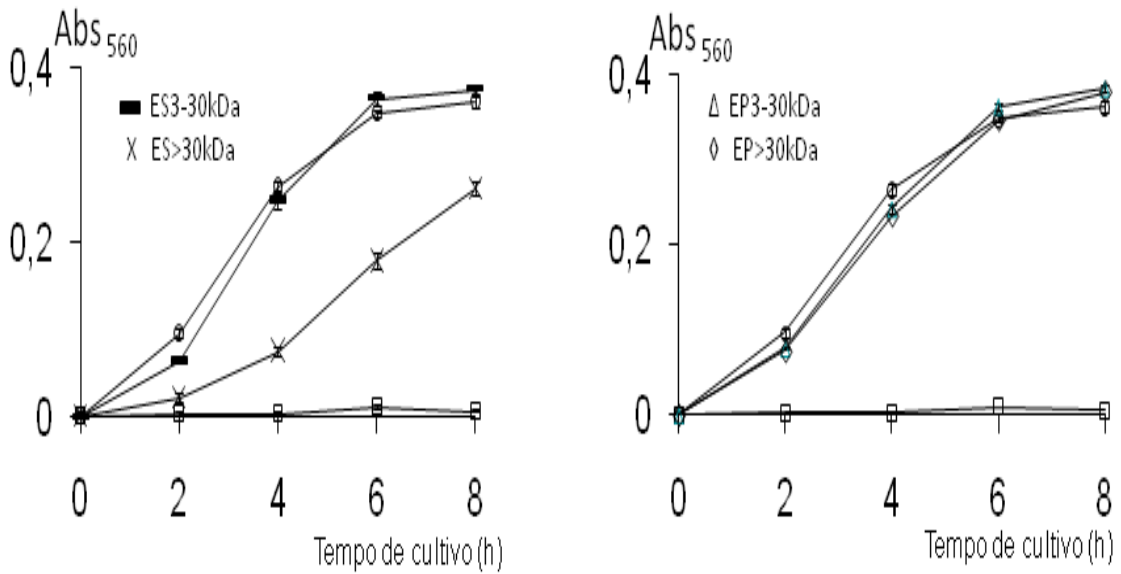
Tabela 2 - Percentagem de inibição das frações protéicas contra bactérias fitopatogênicas cultivadas por 8 horas a 28°C, tendo sido avaliados 100 µL das frações ES>30kDa, ES3-30kDa, EP>30kDa e EP3-30kDa, referentes a 2g de folhas frescas

Microrganismos	Frações			
	ES>30kDa	ES3-30kDa	EP>30kDa	EP3-30kDa
<i>Ralstonia solanacearum</i>	23%	0	0	0
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Tomato</i>	50%	0	0	0
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	41%	0	0	0
<i>Erwinia caratovora</i> subsp. <i>caratovora</i>	28%	0	0	0
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	66%	18%	8%	20%

O ES>30kDa contém moléculas protéicas com variadas MM (Figura 2) e comparando estas massas com as PR proteínas apresentadas na Tabela 1, podemos sugerir que várias PR-proteínas como a β -1,3-glucanases (30kDa), endoproteínases (75 kDa) e peroxidases (35 kDa) poderiam estar auxiliando nesta inibição, ao lado de proteínas de baixas MM (inferiores a 30 kDa) e peptídeos que podem estar presentes por terem se associado e formados estruturas de altas MM, selecionadas como moléculas maiores na ultrafiltração (Figura 2A).

Como exemplos de peptídeos antimicrobianos, podem ser citadas as defensinas que, em geral, não são demasiadamente ativas contra bactérias, entretando *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* é uma espécie susceptível. Como outros exemplos, podem ser citados o Pth-St1, de batata (Moreno *et al.*, 1994), e os CyAMP₁ e CyAMP₂, ambas com 4,5 kDa (Yokoyama *et al.*, 2008), e as esnaquinas, como a esnaquinas-1, com 6,9 kDa (Segura *et al.*, 1999).

Xanthomonas axonopodis pv. *phaseoli*



Erwinia carotovora subsp. *carotovora*

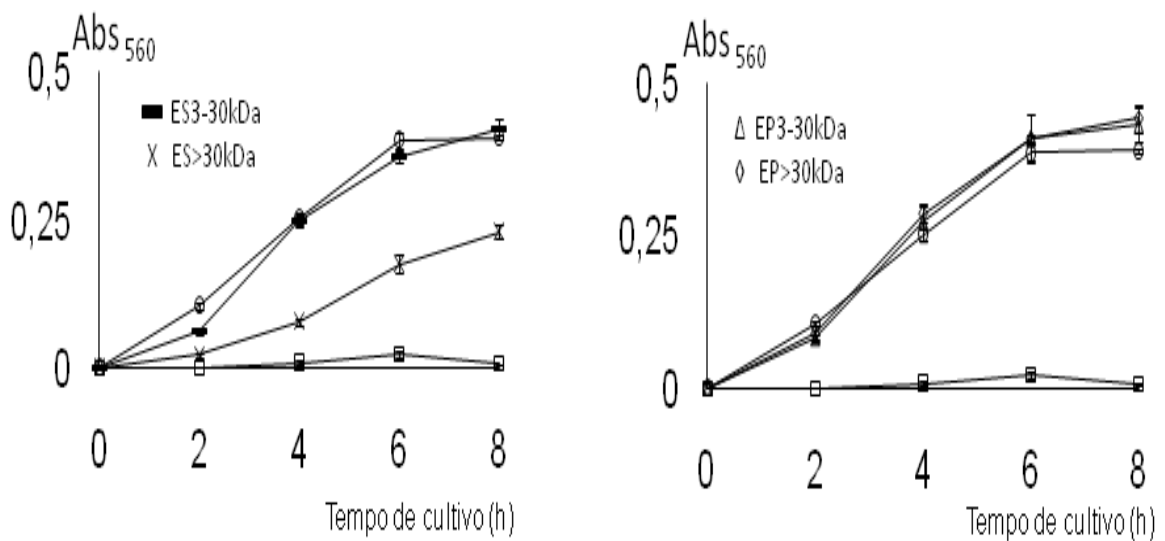
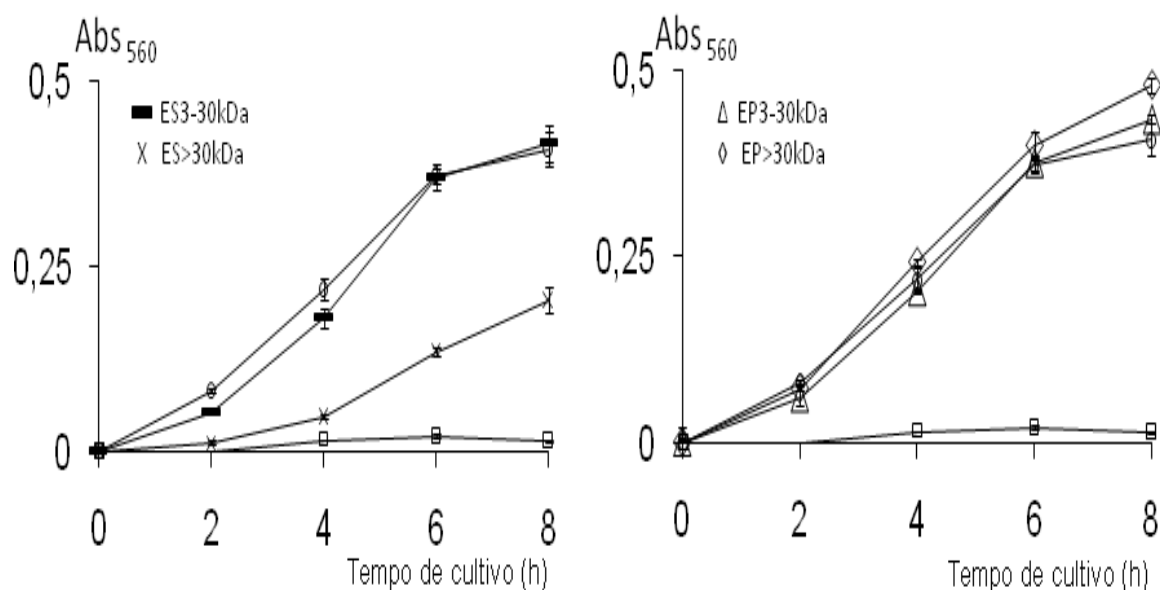


Figura 3 - Curvas de crescimento de *Erwinia caratovora* subsp. *caratovora* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* na presença das frações protéicas: ES>30kDa, ES3-30kDa, EP>30kDa e EP3-30kDa. Controle da cultura (o), que corresponde ao cultivo dos microrganismos na ausência da fração peptídica e Controle do meio (□) constituído apenas por meio LB e água ultra-pura.

Pseudomonas syringae pv. *tomato*



Ralstonia solanacearum

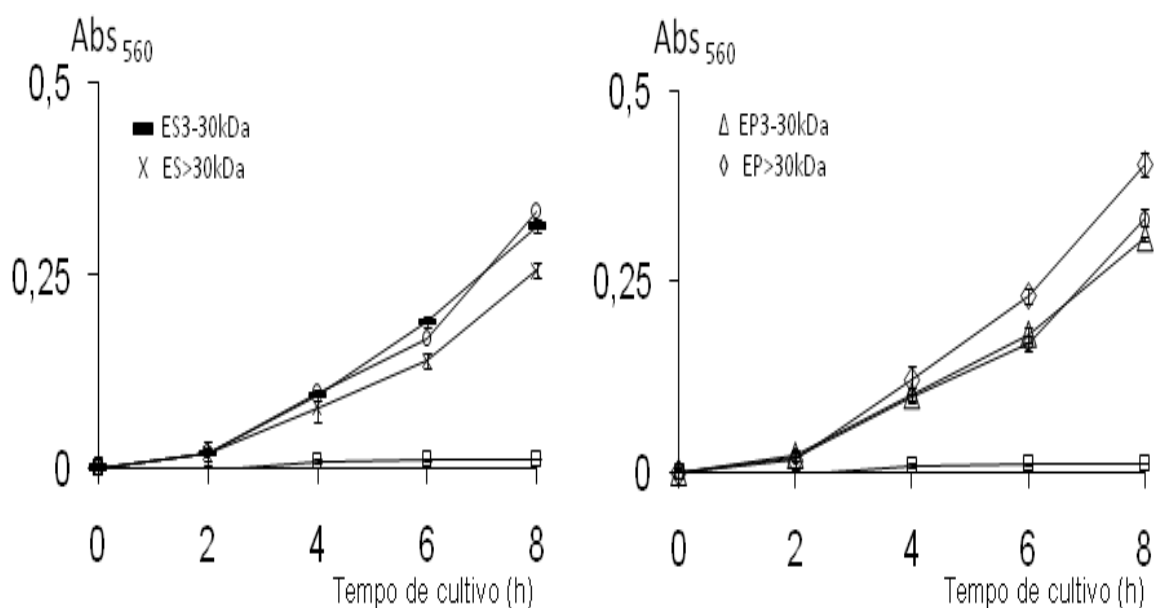


Figura 4 - Curvas de crescimento de *Pyseudomonas syringae* pv. *tomato* e *Ralstonia solanacearum* na presença das frações protéicas: ES>30kDa, ES3-30kDa, EP>30kDa e EP3-30kDa. Controle da cultura (o), que corresponde ao cultivo dos microrganismos na ausência da fração peptídica e Controle do meio (□) constituído apenas por meio LB e água ultra-pura.

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis*

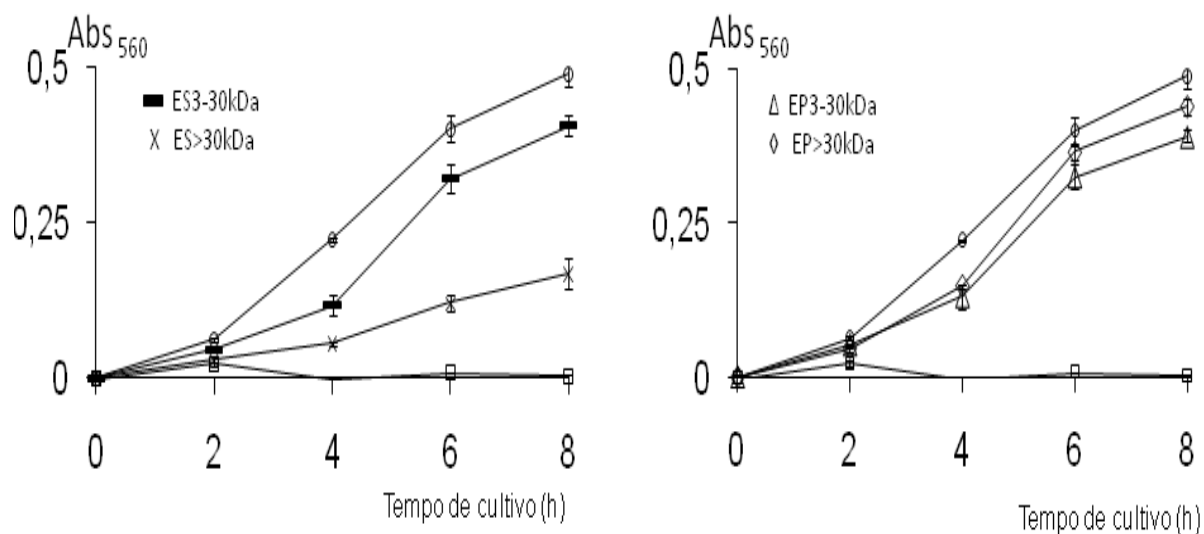


Figura 5 - Curvas de crescimento de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* na presença das frações protéicas: ES>30kDa, ES3-30kDa, EP>30kDa e EP3-30kDa. Controle da cultura (o), que corresponde ao cultivo dos microrganismos na ausência da fração peptídica e Controle do meio (□) constituído apenas por meio LB e água ultra-pura.

O extrato de parede celular (EP) apresentou atividade contra *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, sendo que a fração EP3-30kDa apresentou mais que o dobro da atividade do EP>30kDa, 20 e 8% de inibição, respectivamente. A parede celular é a primeira linha de defesa dos vegetais e muitos peptídeos antimicrobianos já foram isolados dessa estrutura: tioninas, em cevada (Bohlmann *et al.*, 1988), LTPs em *Arabidopsis* (Thoma *et al.*, 1993), defensinas e inibidores de proteases (Hückelhoven, 2007). Levando em consideração a localização dos AMPs e a eficiência da ultrafiltração obtida para a separação de EP, conforme discutido anteriormente, a atividade observada, embora pequena, pode estar relacionada à presença destas moléculas nestes dois extratos, EP>30 kDa e EP3-30 kDa. Resultados prévios de nossa equipe indicam que as atividades antimicrobianas observadas para frações peptídicas vegetais são dependentes de concentração.

Todas as bactérias testadas são economicamente importantes. Segundo Carvalho *et al.* (2009), *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* é sensível a vários AMPs como exemplos: esnaquinas-1 (Kovalskaya *et al.*, 2009), LTPs (Molina *et al.*, 1993), e defensinas (Segura *et al.*, 1998.; Tavares *et al.*, 2008). Khadeeva *et al.* (2009) descreveram plantas de tabaco e batata expressando um inibidor de protease de *Fagopyrum esculentum*, que tornaram-se resistentes à *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. A sensibilidade desta bactéria aos extratos protéicos de guaco fracionados por ultrafiltração, em especial ao EP pode ser um indicativo da presença de AMPs em *Mikania* sp..

5.3 - Atividade antifúngica

Para avaliação da atividade antifúngica, foram utilizadas as frações ES>30kDa, ES3-30kDa, EP>30kDa e EP3-30kDa, e a curva de crescimento do fungo *Fusarium oxysporum* foi monitorada durante 24 horas (Figura 6). Todas as amostras promoveram níveis de inibição (Tabela 3). A percentagem de inibição foi calculada correlacionando o crescimento do fungo nas amostras-teste com o controle do tampão de amostra, indicando que as percentagens de inibição pelas amostras são provenientes das proteínas e peptídeos das amostras.

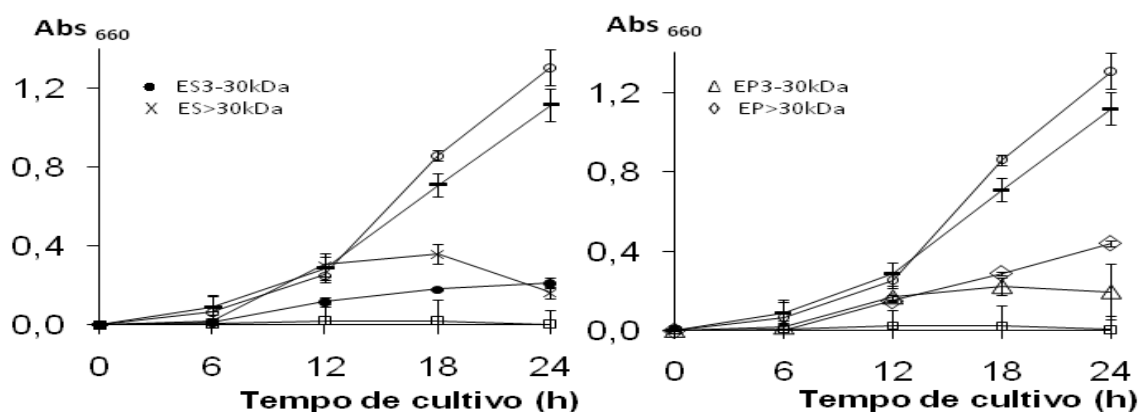


Figura 6 - Curva de crescimento do fungo *Fusarium oxysporum* na presença das frações ES3-30kDa, ES>30kDa, EP3-30kDa e EP>30kDa. O Controle da cultura (○) corresponde ao cultivo do fungo na presença do meio Kado & Heskett e água ultra-pura. O controle do tampão de amostra (-) corresponde ao cultivo na presença do tampão de amostra, e o controle do meio (□) é constituído apenas por meio Kado & Heskett e água ultra-pura.

Tabela 3. Percentagem de inibição das frações protéicas contra o fungo fitopatogênico *Fusarium oxysporum*, cultivado por 24h a 25°C, tendo sido avaliados 250µL das frações ES>30kDa, ES3-30kDa, EP>30kDa e EP3-30kDa, referentes a 5 g de folhas frescas

Fração	Percentagem de inibição
ES>30	85%
ES 3-30	81%
EP>30	61%
EP 3-30	83%

Fusarium oxysporum é um fungo economicamente importante que pode provocar perdas significativas em culturas de feijão, tomate, algodão e outras. Considerando que alguns AMPs como as LTPs (Carvalho *et al.*, 2007) e algumas defensinas possuem atividade inibitória significativa sobre fungos (Weerden *et al.*, 2008), o maior nível de inibição do EP3-30kDa que o EP>30kDa e a maior inibição sobre *Fusarium oxysporum* em relação à *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, pode-se sugerir que a ultrafiltração foi eficiente na concentração das proteínas de baixa MM, dentre elas AMPs que podem estar presentes no EP3-30kDa.

Como no teste antibacteriano, o ES>30kDa apresentou a maior percentagem de inibição, 85%. Este extrato contém moléculas protéicas com variadas massas moleculares, dentre elas massas semelhantes aos AMPs. No ES3-30kDa, a banda mais evidente, com aproximadamente 14 kDa, pode ser correspondente a uma proteína com atividade antifúngica.

5.4 - Eletroeluição e Espectrometria de massa

Na busca por AMPs, bandas peptídicas foram eletroeluídas do gel obtidos por SDS-Tricina-PAGE das frações ES>30kDa, EP>30kDa, ES3-30kDa e EP3-30kDa. Foram avaliadas bandas com valores de MM menores que 6 kDa e algumas em torno de 14 kDa (Figura 7 e 8). A eletroforese em gel de três fases adaptada de Schägger & Jagow (1987) e Judd (1994) possibilita a separação de

proteínas entre 1-100 kDa, com especial separação para as frações até 60 kDa. Os AMPs de interesse possuem entre 1-10 kDa (García-Olmedo *et al.*, 2001). Nas Figuras 7 e 8, que correspondem aos géis SDS-Tricina-PAGE preparados para a eletroeluição, as bandas apontadas foram removidas dos géis, descoradas, os peptídeos eletroeluídos e as amostras obtidas foram submetidas à espectrometria de massa.

Na Figura 9, observa-se o perfil de massas encontradas em uma banda menor que 6 kDa (Banda A1) eletroeluída de ES>30kDa. A própria banda é um indicativo da presença de peptídeos, os quais poderiam ser antimicrobianos. No espectro de massa desta banda são encontradas outras massas em torno de 6 kDa (4,3, 5,0 e 5,7), mostrando que a banda não é formada por um único peptídeo e que nela poderiam estar presentes outros peptídeos. Na literatura são encontrados AMPs como *Pp*-AMP1 (4,6 kDa), *Pp*-AMP2 (4,9 kDa), *Tu*-AMP1 (4,9 kDa) e *Tu*-AMP2 (5,0 kDa), todos com atividade contra *Fusarium oxysporum* e *Clavibacter michiganensis* (Fujimura *et al.*, 2004, 2005).

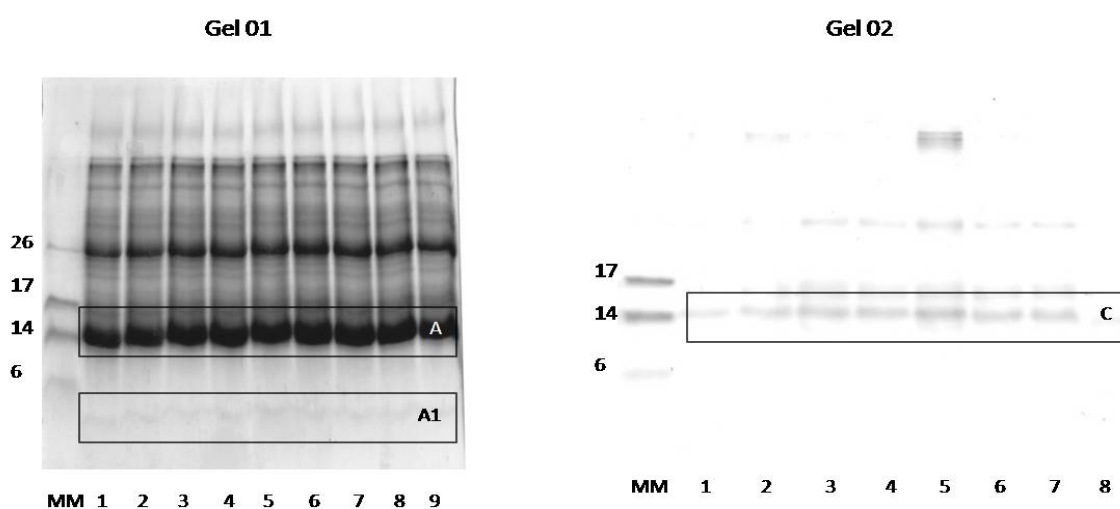


Figura 7 - Géis obtidos por SDS-Tricina-PAGE do ES>30kDa e ES3-30kDa para eletroeluição. Gel 01: canaletas de 1-9, ES>30kDa. Gel 02: canaletas de 1-8, ES3-30kDa. Alíquotas de 50µL de amostra foram separadas em cada canaleta. Marcador de massa molecular Ultra-low (MM): 5µL. Bandas demarcadas: A, A1 e C, foram recortadas dos géis, descoradas e eletroeluídas.

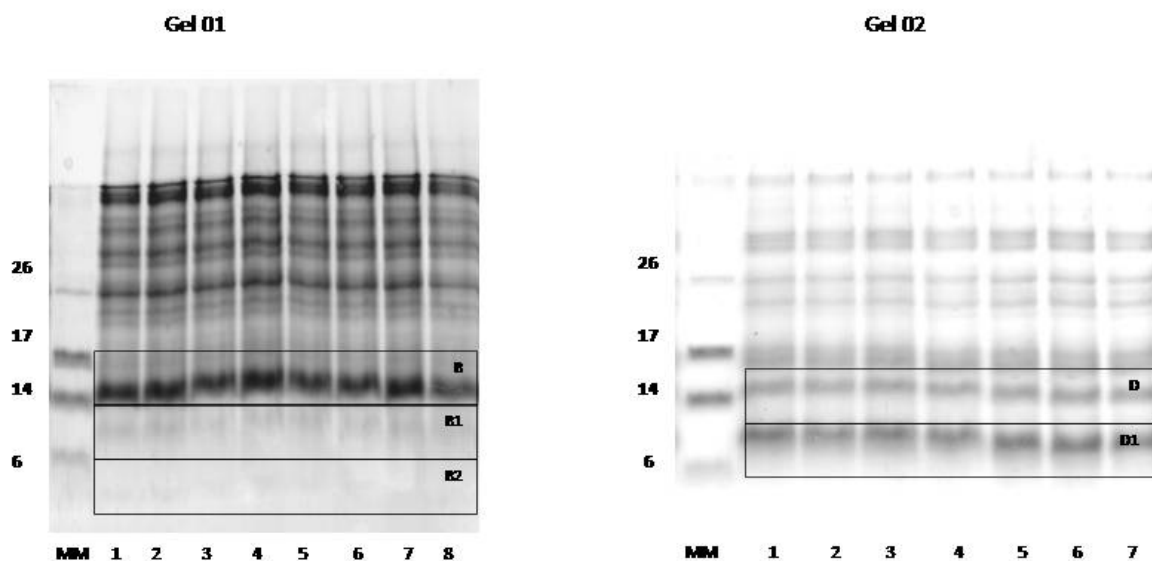


Figura 8 - Géis obtidos por SDS-Tricina-PAGE do EP>30kDa e EP3-30kDa para eletroeluição. Gel 01: canaletas de 1-8, EP>30kDa, Gel 02: canaletas de 1-7, EP3-30kDa. Alíquotas de 50 μ L de amostra foram separadas em cada canaleta. Marcador de massa molecular Ultra-low (MM): 5 μ L. As bandas demarcadas: B, B1, B2, D e D1, foram recortadas dos géis, descoradas e eletroeluidas.

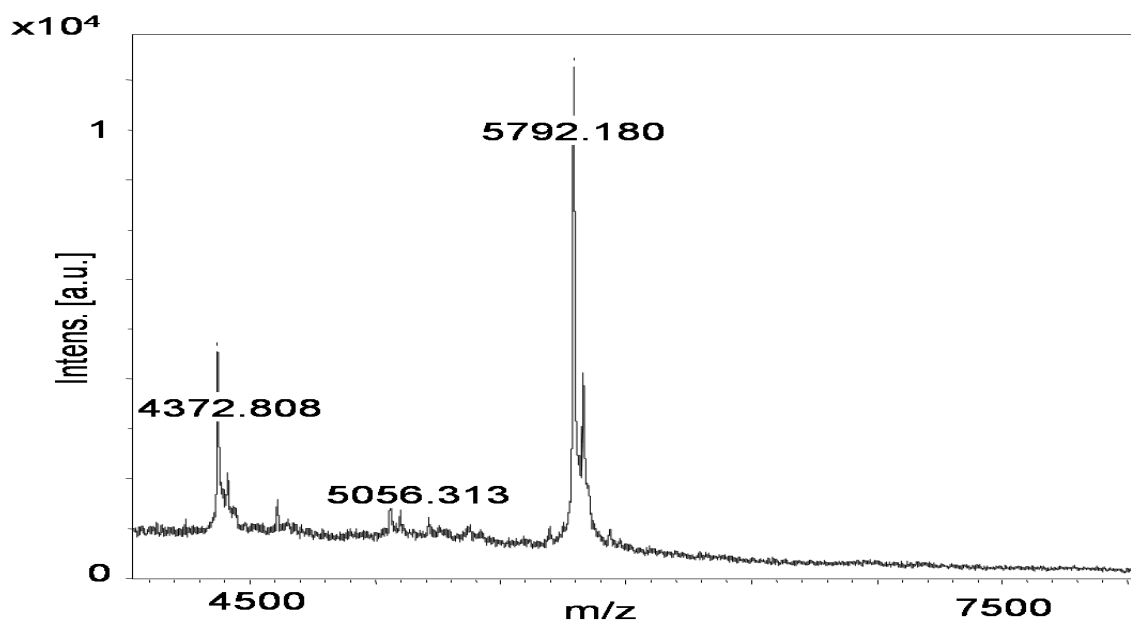


Figura 9 - Espectro de massa da banda A1 obtida de ES>30 kDa (Figura 7), com massa molecular menor que 6 kDa. Espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF/TOF operando em modo linear positivo de proteínas (LPP) e usando matriz α -ciano-4-hidroxicinâmico.

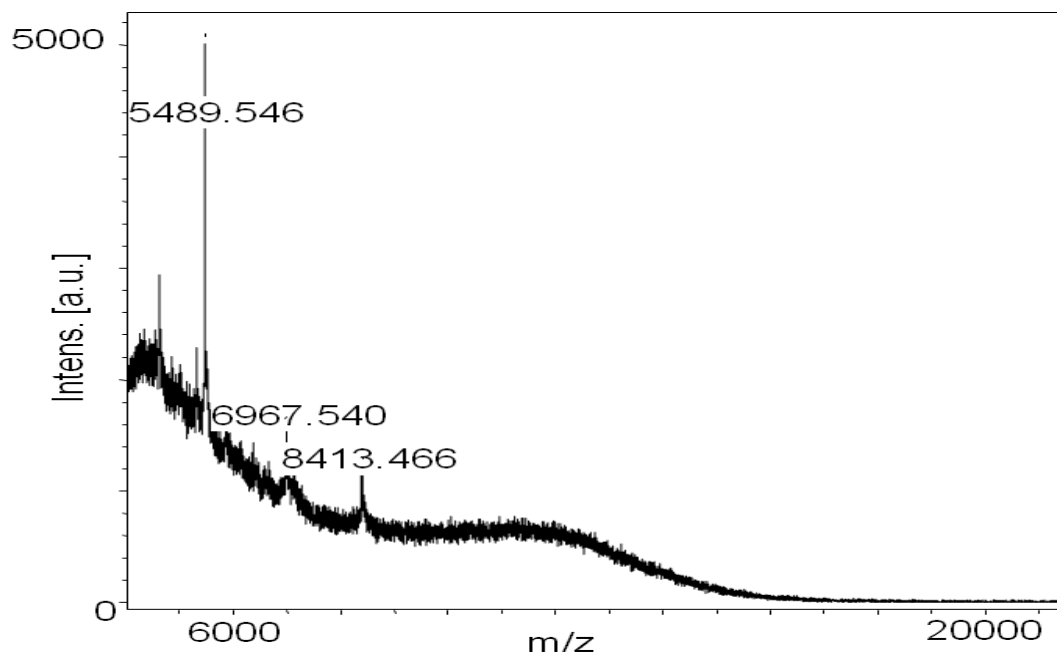


Figura 10 - Espectro de massa da banda B2 obtida de EP>30 kDa (Figura 8), com massa molecular menor que 6 kDa. Espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF/TOF operando em modo linear positivo de proteína (LPP) e usando matriz α -ciano-4-hidroxicinâmico.

Na Figura 10, encontra-se o espectro de massas de uma banda menor que 6 kDa eletroeluída (Figura 8, B2). O perfil espectrométrico encontrado nesta banda revelou peptídeos: 5489.546, 6967.540 e 8413.466 Da, massas semelhantes as massas moleculares de defensinas, tioninas, LTPs e Inibidores de proteases.

5.5 - Cromatografia de fase reversa C18-RP-HPLC e espectrometria de massa

A cromatografia de fase reversa, que separa proteínas baseando-se na hidrofobicidade e na carga líquida das proteínas, foi a segunda metodologia avaliada para o isolamento de frações enriquecidas em peptídeos de guaco, tendo sido realizadas por C18-RP-HPLC.

A fração ES>30kDa apresentou a maior atividade antimicrobiana, inibindo o crescimento das cinco bactérias testadas e do fungo *Fusarium oxysporum*. No gel obtido por SDS-Tricina-PAGE deste material foram encontradas bandas com diferentes valores de MM, incluindo-se uma banda menor que 6 kDa. O espectro

de massa desta banda (Figura 9) evidenciou moléculas com MM entre 4372.808 e 5792.180 Da, não tendo sido possível obter a seqüência aminoacídica destes peptídeos em função da quantidade de interferentes presentes nas amostras eletroeluídas, que geram um alto ruído frente aos perfis espectrométricos gerados para os peptídeos e proteínas.

Os picos protéicos ou peptídeos nomeados A, B, C, D e E, obtidos da separação da fração ES>30kDa por C18-RP-HPLC (Figura 11), quando analisados por espectrometria de massa (Figura 12, Pág. 30) evidenciaram a presença de moléculas com MM que correspondem a AMPs, como defensinas e tioninas, que foram eluídos, respectivamente, nos gradientes da solução B: 30, 60, 61, 92 e 100% (que correspondem respectivamente às concentrações de 24, 48, 48,8, 73,6 e 80% de acetonitrila). As defensinas e tioninas, assim como os demais AMPs, são catiônicas e, em geral, têm cerca de 50% dos resíduos aminoacídicos apolares e são eluídos em concentrações de acetonitrila entre 20 e 40% (v/v) (Terras *et al.*, 1992; Almeida *et al.*, 2000; Carvalho *et al.*, 2001, Fogaça *et al.*, 2004).

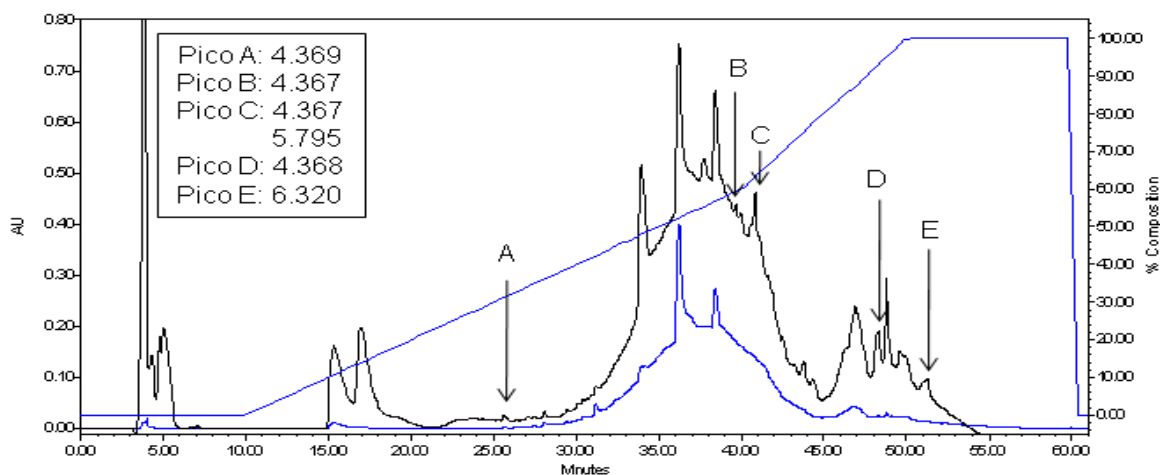


FIGURA 11 - Cromatografia de fase reversa em coluna C18 em HPLC da fração ES>30kDa. A coluna foi equilibrada com solução A e as proteínas eluídas em um gradiente descontínuo crescente da solução B, a um fluxo de 1 mL.min⁻¹. Solução A: TFA 0,1% (v/v); solução B: TFA 0,1% (v/v) e acetonitrila 80% (v/v). Linha superior: A₂₁₄. Linha inferior: A₂₈₀. As setas indicam os picos analisados por espectrometria de massa que geraram valores de massas moleculares no quadro, em destaque.

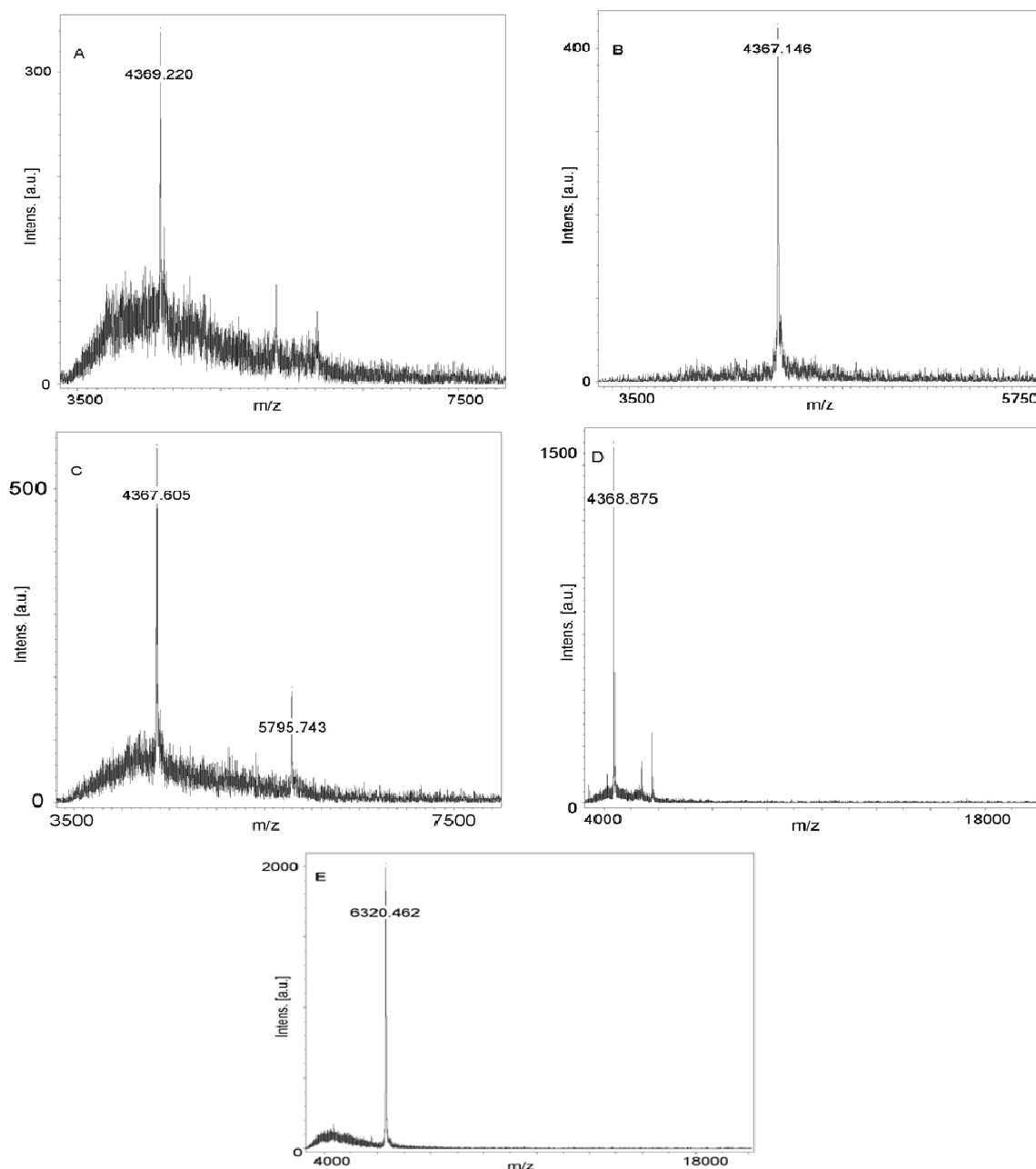


Figura 12. Espectro de massas dos picos A, B, C, D e E de ES>30kDa (Figura 11) obtidos após a cromatografia de fase reversa, C18-RP-HPLC,. Espectrometria de massa tipo MALDI-TOF/TOF operando em modo linear positivo de proteínas (LPP) e usando matriz α -ciano-4-hidroxicinâmico.

A cromatografia de fase reversa (RP-HPLC) é em geral utilizada em procedimentos de cromatografia líquida multidimensional (MDLC), como última dimensão, em geral. Observar que na sequência de purificação aqui desenvolvida, não foi utilizada outra etapa cromatográfica, além da RP-HPLC, a exemplo da cromatografia de exclusão molecular ou de troca iônica. As amostras

protéicas vegetais são complexas, podendo até mesmo gerar tempos de retenção maiores do que os descritos quando comparados com a separação de peptídeos em amostras com alto grau de pureza. Os picos B e E da C18-RP-HPLC do ES>30kDa, conforme pode ser observado no espectro de massas da Figura 12, são frações com um único peptídeo de MM 4367.146 e 6320.462 Da, respectivamente. Estes picos (B e E) foram apontados como de grande interesse em nosso trabalho e, por estarem com maior nível de pureza, estão sendo tripsinizados para caracterização aminoácida e identificação dos peptídeos.

Do conjunto de resultados obtidos até então, verifica-se que na Figura 2A, (Pág. 17), canaleta 7, uma banda de MM menor que 6 kDa no ES>30kDa, que depois de eletroeluída (Figura 7, Banda A1, Pág. 25) foi possível identificar as MM de 4372.808, 5056.313 e 5792.180 Da (Figura 9, Pág. 26). E na análise das MM (Figura 12), das frações obtidas na C18-RP-HPLC (Figura 11), observaram-se picos de 6320.462, 5795.743 e de aproximadamente 4368.875 Da. Tanto as massas obtidas por eletroeluição a partir dos géis de SDS-Tricina-PAGE, quanto as encontradas na RP-HPLC, são semelhantes as massas moleculares dos peptídeos *Pp*-AMP1 (4693.9 Da), *Pp*-AMP2 (4916.0 Da), *Tu*-AMP1 (4988.0 Da), *Tu*-AMP2 (5006.0 Da), e *PvD1* (6 kDa) descritos na literatura com atividade contra *Fusarium oxysporum* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Fujimura *et al.* (2004, 2005) e Games *et al.* (2008). Tais moléculas, juntamente com as PR-proteínas citadas anteriormente, podem ser as responsáveis pela atividade inibitória mais acentuada do ES>30kDa.

Na fração ES3-30kDa apenas um pico da C18-RP-HPLC (Figura 13A), eluído com 92% da solução B, teve sua MM identificada na espectrometria de massa (Figura 13B). Os outros picos foram analisados, porém não foi possível obter as massas moleculares nos espectros destes picos por não terem sido ionizados.

Na fração EP>30kDa, à semelhança da fração ES3-30kDa, vários picos da C18-RP-HPLC (Figura 14A, Pág. 32) foram analisadas na espectrometria de massa, porém, apenas um pico, eluído com 58% de B, teve sua MM caracterizada

(Figura 14B, Pág, 32). As massas moleculares deste pico são massas semelhantes a massas de defensinas e LTPs, a percentagem de eluição esta próxima ao descrito na literatura. Estes peptídeos estão presentes no EP3-30kDa (Figura 16, Pico:A, Pág. 34). Analisando o espectro de massas destes peptídeos, Figura 14: B e Figura 16, os mesmos estão mais limpos e com maior intensidade no EP3-30kDa, o que demonstra a eficiência da ultrafiltração no fracionamento e clarificação dos extratos proteicos do EP.

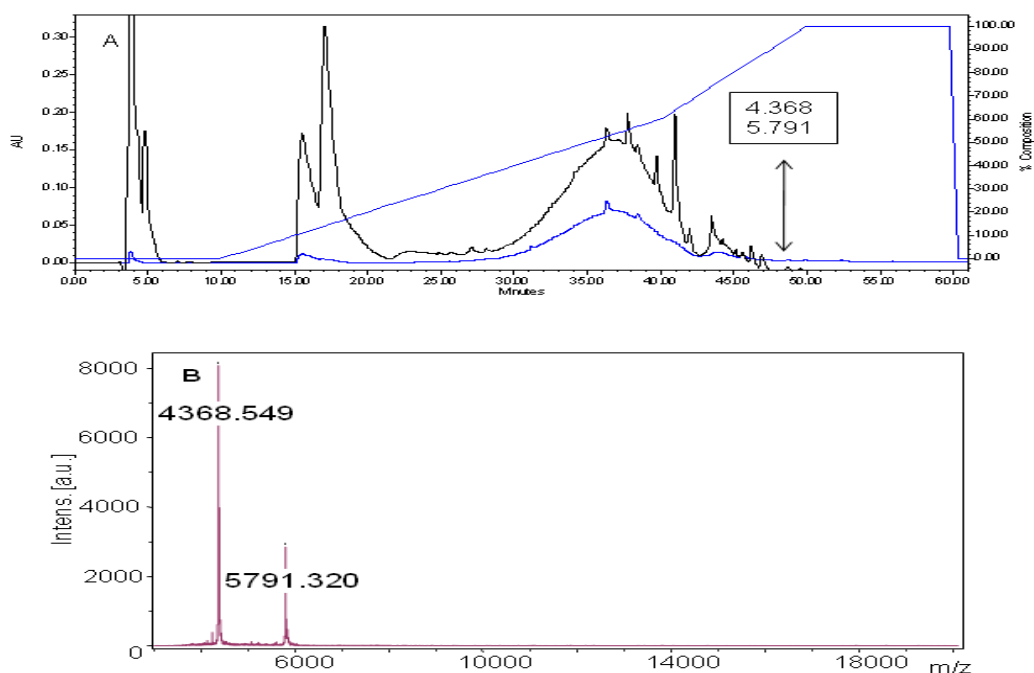


FIGURA 13 – A) Cromatografia de fase reversa em coluna C18 em HPLC da fração ES3-30kDa. A coluna foi equilibrada com solução A e as proteínas eluídas em um gradiente descontínuo crescente da solução B, a um fluxo de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Solução A: TFA 0,1%(v/v); solução B: TFA 0,1% (v/v) e acetonitrila 80% (v/v). Linha superior: A_{214} . Linha inferior: A_{280} . A seta indica pico analisado por espectrometria de massa que geraram valores de massas moleculares no quadro em destaque as correspondentes massas encontradas no pico. **B):** Espectrometria de massa tipo MALDI-TOF/TOF operando em modo linear positivo de proteína (LPP) e usando matriz α -ciano-4-hidroxicinâmico do pico indicado pela seta em A.

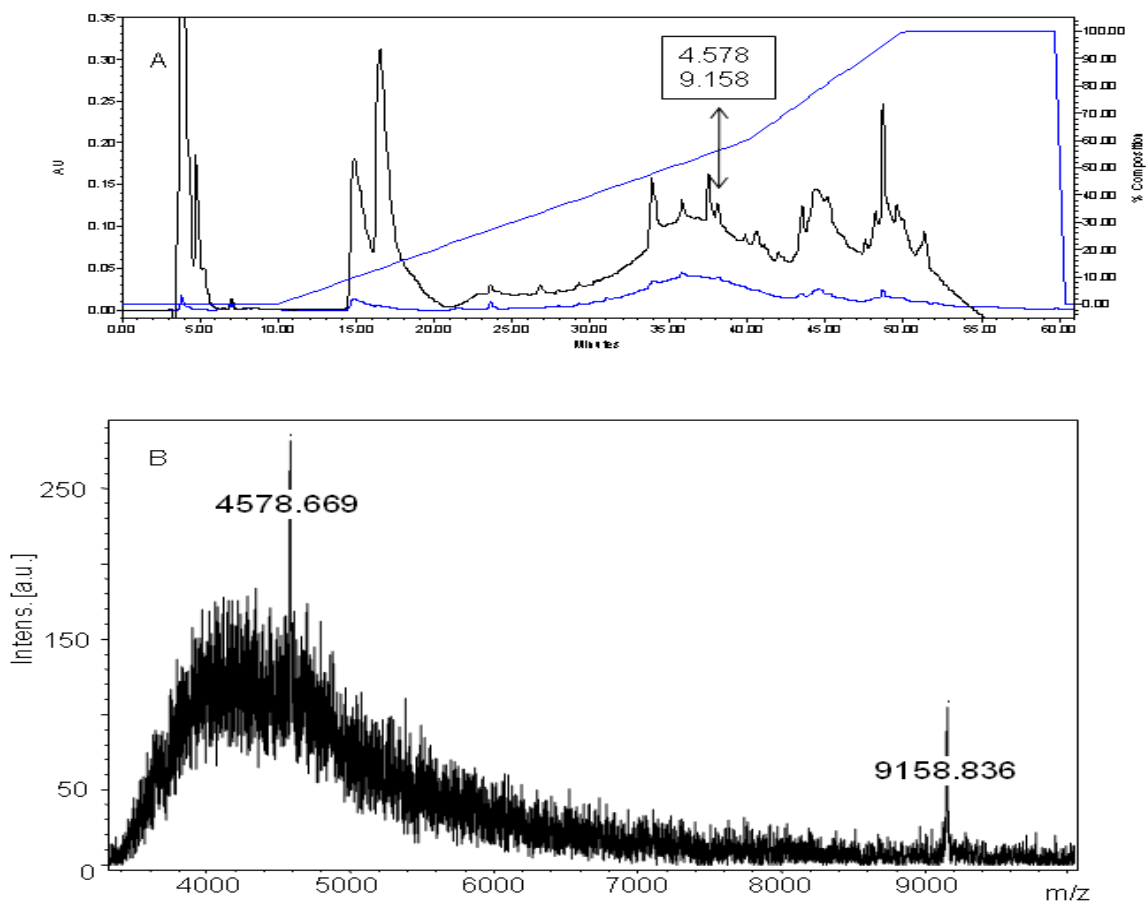


FIGURA 14 - A) Cromatografia de fase reversa em coluna C18 em HPLC da fração EP>30kDa. A coluna foi equilibrada com solução A e as proteínas eluídas em um gradiente descontinuo crescente da solução B, a um fluxo de 1 mL.min⁻¹. Solução A: TFA 0,1%(v/v); solução B: TFA 0,1% (v/v) e acetonitrila 80% (v/v). Linha superior: A₂₁₄. Linha inferior: A₂₈₀. A seta indica pico analisado por espectrometria de massa que geraram valores de massas moleculares no quadro em destaque **B)** Espectrometria de massa do tipo MALDI- TOF/TOF operando em modo linear positivo de proteínas (LPP) e usando matriz α -ciano-4-hidroxicinâmico do pico indicado pela seta em A.

Dentre as quatro frações, ES>30kDa, ES3-30kDa, EP>30kDa e EP3-30kDa, submetidas a C18-RP-HPLC, a ultima foi a que produziu o maior numero de espectros de MM, 8, Figura 15 e 16. Na cromatografia C18-RP-HPLC do EP>30kDa, apenas um dos picos teve sua MM caracterizadas por espectrometria de massa. Não foi possível obter espectros de massa dos outros picos testados, por problemas de ionização. Já na C18-RP-HPLC da fração EP3-30kDa, a maior

parte dos picos testados teve suas massas analisadas por espectrometria de massa.

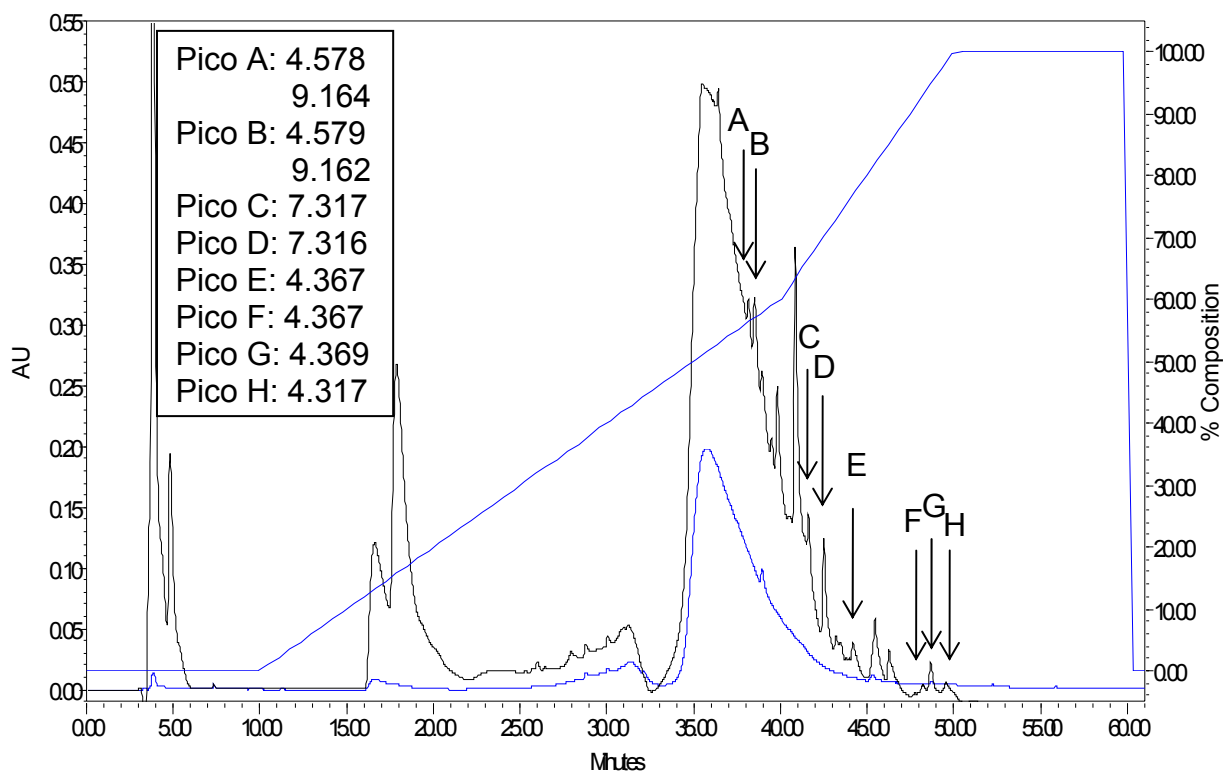


FIGURA 15 -.Cromatografia de fase reversa em coluna C18 em HPLC da fração EP3-30kDa. A coluna foi equilibrada com solução A e as proteínas eluídas em um gradiente descontínuo crescente da solução B, a um fluxo de 1 mL.min-1. Solução A: TFA 0,1% (v/v); solução B: TFA 0,1% (v/v) e acetonitrila 80% (v/v). Linha superior: A_{214} . Linha inferior: A_{280} . As setas indicam picos analisados por espectrometria de massa que geraram valores de massas moleculares.

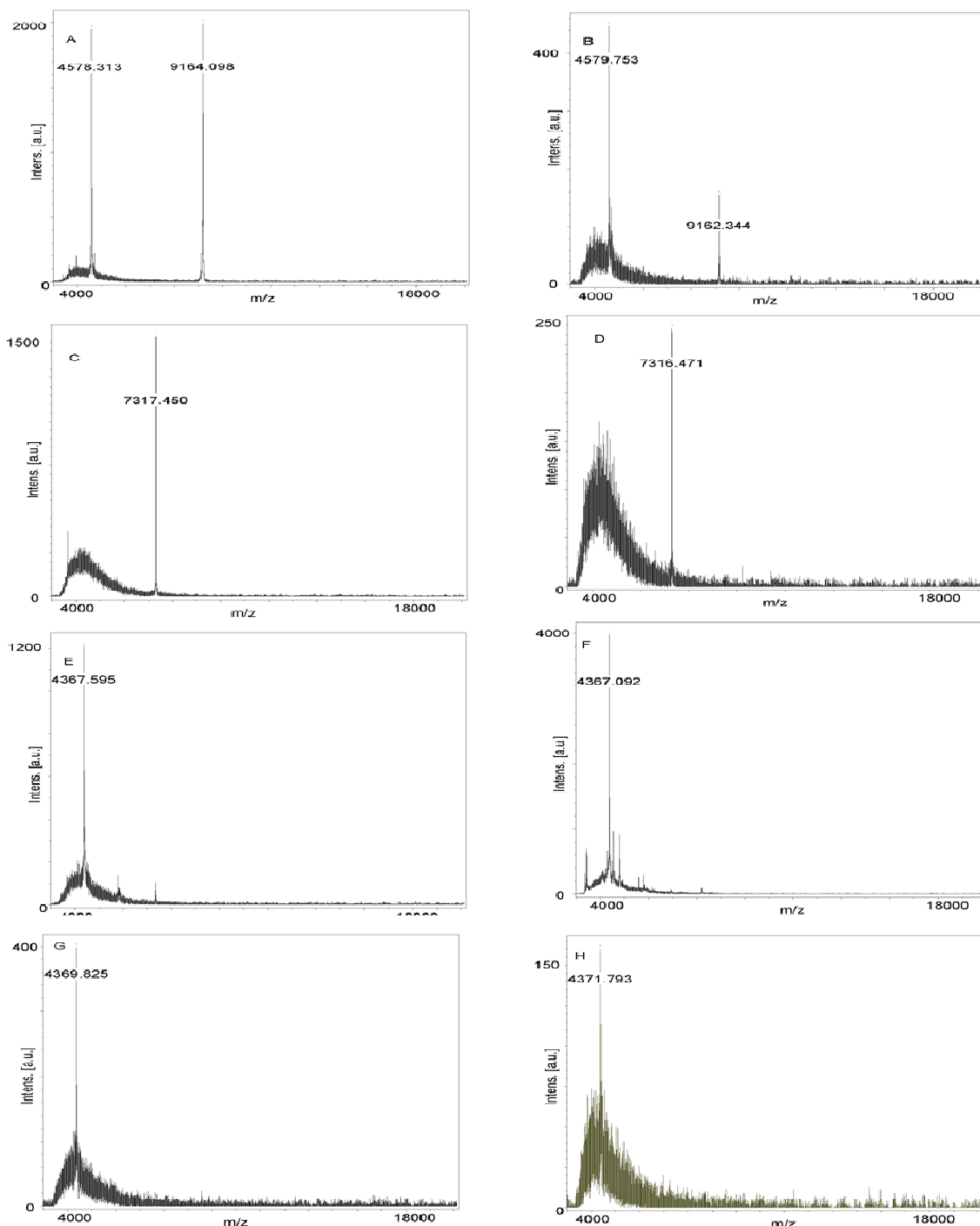


Figura 16 - Espectros de massas dos picos A, B, C, D, E, F, G e H da cromatografia de fase reversa, C18-RP-HPLC, da fração EP3-30kDa. Espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF/TOF operando em modo linear positivo de proteínas (LPP) e usando matriz α -ciano-4-hidroxicinâmico. A, B, C, D, E, F, G e H, correspondem, respectivamente, aos picos A, B, C, D, E, F, G e H da C18-RP-HPLC da fração EP3-30kDa, Figura 15.

Os picos C e D da C18-RP-HPLC, com massas moleculares de 7317.450 e 7316.471 Da, respectivamente (Figura 15 e 16: C e D), provavelmente correspondem aos peptídeos encontrados na banda "a". A ultrafiltração mostrou-se eficiente no fracionamento destas proteínas, e como a atividade antimicrobiana da fração EP3-30kDa encontra-se mais acentuada que a fração EP>30kDa, podemos sugerir que peptídeos com massa molecular semelhante a LTPs2, com MM em torno de 7 kDa, podem estar atuando neste extrato. Como exemplo de LTPs 2 atuando contra bactérias podemos citar a LTP2 de *Arabidopsis thaliana* (Clark *et al.*, 1999). Durante a análise dos picos da C18-RP-HPLC foram encontradas massas semelhantes a LTPs1, pico A e B, 9164.098 e 9162.344 Da, respectivamente (Figura 15: pico A e B e Figura 16: A e B). Carvalho *et al.* (2007) descrevem que as LTPs estão localizados na parede celular e além da função de defesa, elas também podem estar envolvidas na síntese de cutina (Chassot *et al.*, 2007). As demais massas moleculares encontradas nos picos da C18-RP-HPLC do EP3-30kDa, 4367.595, 4367.092, 4369.826, 4371.793 Da (Figura 15) podem corresponder a AMPs presentes na parede celular, como exemplos de AMPs já isolados da parede celular estão descritos thioninas de cevada e esnaquina-1 de batata (Bohlmann *et al.*, 1988 e Segura *et al.*, 1999).

As massas moleculares 6967.540 e 8413.466 (Figura 10) encontradas na banda B2 (Figura 8), juntamente com as massas moleculares encontradas na C18-RP-HPLC da fração EP3-30 kDa (Figura 15 e 16) são semelhantes aos AMPs isolados por Fujimura *et al.* (2004, 2005) e Cy-AMP3 (Yokoyama *et al.*, 2008) e aos peptídeos, *Mj*-AMP1(7,0 kDa) e *Mj*-AMP2 (8,0 kDa), ambos com atividade contra *Fusarium oxysporum* e contra uma bactéria gram positiva (Cammue *et al.*1992).

Baseando-se na maior atividade antimicrobiana do EP3-30kDa em relação ao EP>30kDa e a melhor resolução dos espectros de massa do EP3-30kDa (Figura 16), podemos sugerir que a ultrafiltração foi eficiente na separação das proteínas e peptídeos do EP, e ainda dizer que esta técnica, ultrafiltração, é eficiente na clarificação do EP.

6 – CONCLUSÃO

Segundo García-Olmedo *et al.* (2001) e Zasloff (2002), as folhas não são boas fontes de peptídeos antimicrobianos, porém em concordância com Molina *et al.* (1993), Teixeira *et al.* (2006), Almeida *et al.* (2007, 2008) e Games (2008), e baseando-se na atividade inibidora do extrato protéico das folhas de guaco contra um fungo e uma bactéria, podemos inferir que a folhas de *Mikania* sp. são boas fontes de peptídeos antimicrobianos.

A metodologia utilizada para preparar, clarificar, fracionar e concentrar os extratos, ultrafiltração (equipamento AMICON/ Millipore-EUA) após *salting-out* mostrou-se satisfatória para obtenção de extratos protéicos de guaco. A eficiência deste fracionamento ficou evidente no EP, considerando que muitos AMPs já foram isolados da parede celular, tal técnica pode ser empregada efetivamente no fracionamento e concentração dos AMPs.

A atividade antifúngica superior a atividade antibacteriana associada a eficiência da ultrafiltração do extrato de parede sugere que na parede celular de guaco podem estar presente AMPs. No extrato solúvel o ES-3-30 kDa mostrou uma única banda neste gel que pode corresponder a uma forma de defesa das plantas que poderia eventualmente ser explorada para a produção de produtos antimicrobianos.

Considerando que a aglomeração, que aparentemente ocorre, vem aumentando o grau de dificuldade da obtenção de peptídeos purificados para as caracterizações, a eletroforese foi utilizada com sucesso como etapa de purificação.

Guaco é uma planta conhecida por suas atividades fitoterápicas que por sua vez são atribuídas as cumarinas. Os mecanismos de defesa dos vegetais incluem a síntese de proteínas e peptídeos de defesa que poderiam eventualmente estar agindo em sinergia com as cumarinas. De acordo com os efeitos inibitórios dos extratos protéicos contra uma bactéria Gram positiva e um fungo podemos prever que as folhas de guaco são uma fonte peptídeos de defesa que podem ser biotecnologicamente exploradas para aplicação comercial como agentes químicos para a agricultura, agentes para a proteção de sementes,

defesa de frutos e grãos no pós-colheita. Além dos peptídeos este trabalho descreve pela primeira vez a atividade antimicrobiana das proteínas de guaco que eventualmente também podem ser usadas para proteção de culturas contra fitopatogenos.

A maioria destes compostos protéicos são biodegradáveis e muitos podem ser usados na dieta humana e animal sem causar prejuízos à saúde dos mesmos e muito menos ao meio ambiente.

7 – PERSPECTIVAS

- Realizar a caracterização aminoacídica dos picos obtidos na C18-RP-HPLC e fazer homologia computacional em banco de dados, Gen Bank, usando programas como Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), para caracterizar AMPs dos extratos protéicos de *Mikania* sp..
- Propõe-se a clonagem e expressão heteróloga de peptídeos de defesa identificados de guaco em bactérias ou leveduras, ou a super-expressão nas próprias plantas de guaco ou em plantas de fácil modificação, visando a recuperação dos peptídeos, possivelmente parcialmente purificados, para a produção de agentes de defesa para vegetais, aplicável ao agronegócio, ou a produção de fitomedicamentos.
- A expressão e obtenção dessas moléculas em grandes quantidades certamente permitirão o desenvolvimento de ensaios biológicos diversos (antimicrobianos, toxicológicos, estudos de mecanismos de ação), que permitirão a caracterização das moléculas e trarão avanços na compreensão da fisiologia de defesa das plantas.

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, M. S.; Cabral, K. M. S.; Zingali, R. B. and Kurtenbach, E.. Characterization of two novel defense peptides from pea (*Pisum sativum*) seeds. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **378**(2): 278-286, 2000.
- Almeida, H. O.; Mattos, E. C.; Barbosa, M. O.; Teixeira, F. R.; Magalhães, R. D. M.; Romeiro, R. S.; Fontes, E. P. B.; Baracat-Pereira M. C.. Peptide Fraction Inhibiting Plant Pathogen Growth Predominated in Cell Wall Extracts from Young Plants or in Soluble Cell Fraction from Expanded leaves from Eggplants. *Journal of Phytopathology* **155**: 735-737, 2007.
- Almeida, H. O.; Teixeira, F. R.; Romeiro, R. S.; Silva, D. J. H.; Pereira, P. R. G.; Fontes, E. P. B.; Baracat-Pereira, M. C.. Atividade antimicrobiana de extratos peptídicos de folhas de berinjela na inibição do crescimento de *Ralstonia solanacearum* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Summa Phytopathologica*. **34**: 62-64, 2008.
- Assis, J. C.. Resistência de clones de batata à prodridão-mole (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*). 2007. 51f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Genética e Melhoramento de Plantas). Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- Badosa, E.; Ferre, R.; Planas, M.; Feliu, L.; Besalú, E.; Cabrefiga, J.; Bardají, E.; Montesinos, E.. A library of linear undecapeptides with bactericidal activity against phytopathogenic bacteria. *Peptides*. **28**: 2276–2285, 2007.
- Baggerman, G.; Verleyen, P.; Clynen, E.; Huybrechts, J.; De Loof, A.; Schoofs, L.. Peptidomics. *The Journal of Chromatography B*. **803**: 3-16, 2004.
- Bohlmann, H.; Clausen, S.; Behnke, S.; Giese, H.; Hiller, C.; Reimann-Philipp, U.; Schrader, G.; Barkholt, V.; Apel, K.. Leaf-specific thionins of barley-a novel class of cell wall proteins toxic to plant-pathogenic fungi and possibly involved in the defence mechanism of plants. *The EMBO Journal*. **7**(6): 1559-1565, 1988.
- Botsaris, A. Plants used traditionally to treat malaria in Brazil: the archives of Flora Medicinal. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*. **3**: 1-8, 2007.

- Brasil. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Determina a publicação da “LISTA DE MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS DE REGISTRO SIMPLIFICADO”. Instrução Normativa nº 5, de 11 de dezembro de 2008. D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 12 de dezembro de 2008.
- Broekaert, W. F.; Terras, F. R. G.; Cammue, B. P. A.; Vanderleyden, J. An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. *FEMS Microbiology Letters*. **69**: 55-60, 1990.
- Broekaert, W. F.; Mariën, W.; Terras, F. R. G.; De Bolle, M. F. C.; Proost, P.; Damme, J. V.; Dillen, L.; Claeys, M.; Rees, S. B.; Vanderleyden, J.; Cammue, B. P. A.. Antimicrobial peptides from *Amaranthus caudatus* seeds with sequence homology to the cysteine/glycine-rich domain of chitin-binding proteins. *Biochemistry*. **31**: 4308-4314, 1992.
- Broekaert, W. F.; Cammue, B. P. A.; De Bolle, M. F. C.; Thevissen, K.; De Samblanx, G. W.; Osborn, R. W.. Antimicrobial peptides from plants. *Critical Reviews in Plants Science*. **16**: 297-323, 1997.
- Cammue, B. P.A.; De Bolle, M. F.C.; Terras, Franky, R.G.; Proost, P.; Van Damme, J.; Rees, S.B.; Vanderleyden, J.; Broekaert, W. F.. Isolation and characterization of a novel class of plant antimicrobial peptides from *Mirabilis jalapa* L. seeds. *The Journal of Biological Chemistry*. **267(4)**: 2228-2233, 1992.
- Caporale, C.; Bernardino, I.D.; Leonardi, L.; Bertini, L.; Cascone, A.. Wheat pathogenesis-related proteins of class 4 have ribonuclease activity. *FEBS Letters* **575**: 71–76, 2004.
- Carvalho, A. O.; Machado, O. L. T.; Cunha, M. D.; Santos, I. S.; Gomes, V. M.. Antimicrobial peptides and immunolocalization of a LTP in *Vigna unguiculata* seeds. *Plant Physiology and Biochemistry*., **39**: 137-146, 2001.
- Carvalho, A. O.; Gomes, V. M.. Role of plant lipid transfer proteins in plant cell physiology – A concise review. *Peptides*. **28**: 1144-1153, 2007.
- Carvalho, A. O; Gomes, V. M.. Plant defensins — Prospects for the biological functions and biotechnological properties. *Peptides*. **30**: 1007-1020, 2009.

- Celeghini, R. M. S.; Vilegas, J. H. Y.; Lanças, F. M.. Extraction and quantitative HPLC analysis of coumarin in hydroalcoholic extracts of *Mikania* sp. *Spreng.* (“guaco”) leaves. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. **12(6)**: 706-709, 2001.
- Chassot, C.; Nawrath, C.; Métraux, JP.. Cuticular defects lead to full immunity to a major plant pathogen. *The Plant Journal*. **49**: 972–980, 2007.
- Chen, Gan-Hong; Hsu, Ming-Pin; Tan, Chi-Hsing; Sung, Hsien-Yi; Kuo, C. G.; Fan, Ming-jen; Chen, Huei-Mei; Chen, S.; Chen, Ching-San.. Cloning and characterization of a plant defensin VaD1 from Azuki Bean. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53(4)**: 982-988, 2005.
- Clark, A.M.; Bohnert, H.J.. Cell-specific expression of genes of the lipid transfer protein family from *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **40**: 69-76, 1999.
- DELSIN, A. P. M.. Estudo Químico e Avaliação Antiproliferativa de Diferentes Espécies do Gênero *Mikania*. 2004. 84f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba.
- Do Amaral, R.R.; Arcenio Neto, F.; Carvalho, E.S.; Teixeira, L.A.; De Araújo, G.L.; Sharapin, N.; Testa B.; Gnerre. C.; Rocha, L.. Avaliação da atividade IMAO e antibacteriana de extratos de *Mikania* sp. *Sprengel*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. **13**: 24-27, 2003.
- Duarte, M. C. T.; Figueira, G. M.; Sartoratto, A.; Rehder, V.L.G.; Delarmelina, C.. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. **97**: 305-311, 2005.
- Durrant, W.E.; Dong, X.. Systemic Acquired Resistance. *Annual Review of Phytopathology* **42**: 185-209, 2004.
- Epple, P.; Apel, K.; Bohlmann, H.. Overexpression of an endogenous thionin enhances resistance of *Arabidopsis* against *Fusarium oxysporum*. *The Plant Cell*. **9**: 509-520, 1997.

- Farmacopéia Brasileira I. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1929.
- Farmacopéia Brasileira 2005.4. ed. São Paulo: Editora Atheneu, parte II, sexto fascículo.
- Farrokhi, N.; Whitelegge, J. P.; Brusslan, J.A.. Plant peptides and peptidomics. *Plant Biotechnology Journal*, **6**: 105-134, 2008.
- Fogaça, A. C.; Lorenzini, D. M.; Kaku, L. M.; Esteves, E.; Bulet, P. and Daffre, S.. Cysteine-rich antimicrobial peptides of the cattle tick *Boophilus microplus*: isolation, structural characterization and tissue expression profile. *Developmental & Comparative Immunology*. **28**: 191- 200, 2004
- Franco, O. L.; Murad, A. M.; Leite, J.R.; Mendes, P.A.M.; Prates, M. V.. Identification of cowpea γ -thionin with bactericidal activity. *The FEBS Journal*. **273**: 3489-3497, 2006.
- Fujimura, M.; Ideguchi, M.; Minami, Y.; Watanabe, K.; Tadera, K.. Purification, characterization, and sequencing of novel antimicrobial peptides, *Tu*-AMP 1 and *Tu*-AMP 2, from bulbs of Tulip (*Tulipa gesneriana* L.). *Bioscience Biotechnology Biochemical*. **68(3)**: 571-577, 2004.
- Fujimura, M.; Ideguchi, M.; Minami, Y.; Watanabe, K.; Tadera, K.. Amino acid sequence and antimicrobial activity of chitin-binding peptides, *Pp*-AMP 1 and *Pp*-AMP 2, from Japanese bamboo shoots (*Phyllostachys pubescens*). *Bioscience Biotechnology Biochemical*. **69**: 642-645, 2005.
- Games, P.D.; Santos, I.S.; Mello, E.O.; Diz, M.S.S.; Carvalho, A.O.; Souza-filho, G. A.; Cunha, M. ; Vasconcelos, I.M.; Ferreira, B. S.; Gomes, V.M.. Isolation, characterization and cloning of a cDNA encoding a new antifungal defensin from *Phaseolus vulgaris* L. seeds. *Peptides*. **29**: 2090-2100, 2008.
- Games, P. D.. Detecção e isolamento de peptídeos antimicrobianos de folhas de *Capsicum annum* L. (Pimentão 'Magali R'). 2008. 52f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola). Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG.

- Gao A.G., Hakimi S.M., Mittanck C.A., Wu Y., Woerner B. M., Stark D. M., Shah D. M., Liang J., Rommens C. M.. Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide. *Nature Biotechnology*. **18**: 1307–1310, 2000.
- Garcia-Olmedo, F.; Rodríguez-Palenzuela, P.; Molina, A.; Alamillo, J. M.; López-Solanilla, E.; Berrocal-Lobo, M.; Poza-Carrión, C.. Antibiotic activities, hydrogen peroxide and peroxynitrite in plant defense. *FEBS Letters* **498**: 219 – 222, 2001.
- Gegenheimer, P.. Preparation of Extracts from Plants. In: Abelson, J. N.; Simon, M. I.. *Methods in Enzimology – Guide to Protein Purification (182)*. San Diego: Academic Press, 1990. Capítulo 14, 174-193.
- Hancock, R. E. W.; Lehrer, R.. Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends in Biotechnology*. **16**: 82-88, 1998.
- Hu, X.; Bidney, D.L.; Yalpani, N.; Duvick, J.P.; Crasta, O.; Folkerts, O.; Lu, G.. Overexpression of a Gene encoding hydrogen peroxide-Generating oxalate oxidase evokes defense responses in sunflower. *Plant Physiology*. **133**: 170-181, 2003.
- Hüchelhoven, Ralph.. Cell Wall–Associated Mechanisms of Disease Resistance and Susceptibility. *Annual Review. Phytopathology*. **45**: 101-127, 2007.
- Iwai, T.; Kaku, H.; Honkura, R.; Nakamura, S.; Ochiai, H.; Sasaki, T.; Ohashi, Y.. Enhanced resistance to seed-transmitted bacterial diseases in transgenic rice plants overproducing an oat cell-wall-bound thionin. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **15(6)**: 515-521, 2002.
- Judd, R.C.. Electrophoresis of peptides. In: *Methods in Molecular Biology*, vol. 32: Basic Protein and Peptide Protocols, Ed. J. M. Walker Copyright, Humana Press Inc, Totowa, NJ, 49-57, 1994.
- Khadeeva, N.V.; Kochieva, E.Z.; Tcherednitchenko, M.Y.; Yakovleva, E.Y.; Sydoruk, K.V.; Bogush, V.G.; Dunaevsky, Y.E.; Belozersky, M.A.. Use of Buckwheat Seed Protease Inhibitor Gene for Improvement of Tobacco and

Potato Plant Resistance to Biotic Stress. *Biochemistry (Moscow)*. **74(3)**: 260-267, 2009

- Kovalskaya, N.; Hammond, R. W.. Expression and functional characterization of the plant antimicrobial esnaquinas-1 and defensin recombinant proteins. *Protein Expression and Purification*. **63**: 12-17, 2009.
- Loon, L.C.V.; Rep, M.; Pieterse, C.M.J.. Significance of inducible Defense-related proteins in Infected Plants. *Annual. Review Phytopathology* **44**: 135-162, 2006.
- Margis-pinheiro, M.; Gerhardt, L. B. de A.; Lima, V. M.; Magioli, C.; Ferreira, R. P.; Menezes, R. M. G.; Tarré, E.; Sachetto-Martins, G. S.; Oliveira, D. E.. Regulation of bean an *arabidopsis thaliana* chitinase expression in response to stress. . in: ii encontro brasileiro de biotecnologia vegetal , REDBIO - sub-região Brasil, 1997, Gramado. II ENCONTRO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL , REDBIO - SUB-REGIÃO BRASIL, 1997. p. P34.
- Marques, A.S.A.; Guimarães, P. M.; Santos, J. P.; Vieira, T. M.. Sobrevivência e viabilidade de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijão armazenadas sob condições controladas. *Fitopatologia Brasileira*. **30(5)**: 527-531, 2005.
- Molina, A.; Segura, A.; Garcia-Olmedo, F.. Lipid transfer proteins (nsLTPs) from barley maize leaves are potent inhibitors of bacterial and fungal plant pathogens. *FEBS Letters*. **316(2)**: 119-122, 1993.
- Moreno, M.; Segura, A; Garcia-Olmedo, F.. Pseudothionin, a potato peptide active against potato pathogens. *European Journal Biochemical*. **233**: 135-139, 1994.
- Mulvenna, P.J.; Mylene, J.S.; Bharathi, R.; Burton, R.A.; Shirley, N.J.; Fincher, G.B.; Anderson, M.A.; Craik, D.J.. Discovery of Cyclotide-Like Protein Sequences in Gramineous Crop Plants: Ancestral Precursors of Circular Proteins? *The Plant Cell*. **18**: 2134-2144, 2006.

- Ooi, L.S.M.; Wong, E.Y.L.; Sun, S.S.M.; Ooi, V.E.C.. Purification and characterization of non-specific lipid transfer proteins from the leaves of *Pandanus amaryllifolius* (Pandanaceae). *Peptides*, **27**: 626-632, 2006.
- Park, C. J.; Park, C. B.; Hong, S. S.; Lee, H. S.; Lee, S. Y.; Kim, C.. Characterization and cDNA cloning of two glycine- and histidine-rich antimicrobial peptides from the roots of shepherd's purse, *Capsella bursa-pastoris*. *Plant Molecular Biology*. **44**: 187-197, 2000.
- Park, C.J.; Kim, K.J.; Shin, R.; Park, J.M.; Shin, Y.C.; Paek, K.H.. Pathogenesis-related protein 10 isolated from hot pepper functions as a ribonuclease in an antiviral pathway. *The Plant Journal*. **37**: 186–198, 2004.
- Patricio, F.R.A.; Almeida, I.M.G.; Santos, A. S.; Cabral, O.; Neto, J.T.; Sinigaglia, C.; Beriam, L.O.S.; Neto, J.R.. Avaliação da solarização do solo para o controle de *Ralstonia solanacearum*. *Fitopatologia Brasileira*. **30**: 475-481, 2005.
- Patton, W.F.. Detection technologies in proteome analysis. *Journal of Chromatography B*. **771**: 3-31, 2002.
- Pereira, M. J. Z.. Resistência do feijoeiro a *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. 2007. 103f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras. Lavras, MG.
- Pessini, G.L.; Sanches, N.R.; Cortez, D.A.G.; Dias Filho, B.P.; Nalamura, C.V.. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. **13**: supl., 21-24, 2003
- Pieterse, C.M.J.; Pelt, J.A.V.; Wees, S.C.M.V.; Ton, J.; Verhagen, B.W.M.; Léon-Kloosterziel, K.; Hase, S.; Vos, M.D.; Oosten, V.V.; Pozo, M.; Spoel, S.; Ent, S.V.; Koornneef, A.; Chalfun-Junior, A.; Resende, M.L.V.; Loon, L.C.V.. Indução de Resistência Sistêmica por rizobactérias e comunicação na rota de sinalização para uma defesa refinada. *RAPP*. **13**: 277-295, 2005.

- Roy-Barman, S.; Sautter, C.; Chattoo, B.B.. Expression of the lipid transfer protein *Ace-AMP1* in transgenic wheat enhances antifungal activity and defense responses. *Transgenic Research*. **15**: 435-446, 2006.
- Santos, S. C.. Caracterização Cromatográfica de Extratos Medicinais de Guaco: *Mikania laevigata* SCUHULTZ BIP. EX BAKER e *M. glomerata* SPRENGEL e ação de *M. laevigata* na inflamação alérgica pulmonar. 2005. 81f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade do Vale do Itajaí, Itajai, SC.
- Schagger, H., Jagow, G.. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, **166**: 368-379, 1987.
- Segura, A.; Moreno, M.; Molina, A.; Garcia-Olmedo, Francisco.. Novel defensin subfamily spinach (*Spinacia oleracea*). *FEBS Letters*. **435**: 159-162, 1998.
- Segura, A., Moreno, M., Madueño, F., Molina, A., García-Olmedo, F.. Esnaquinas-1 a peptide from potato that is active against plant pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **12**: 16-23, 1999.
- Sels, J.; Mathys, J.; Coninck, B.M.A.D.; Cammue, B.P.A.; Bolle, M.F.C.D.. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. *Plant Physiology and Biochemistry*. **46**: 941-950, 2008.
- Soares, F.M.P.; Valarini, P. J.; Menten, J.O.M.. Meio semi-seletivo para detecção de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, agente causal da mancha bacteriana pequena do tomateiro. *Revista Brasileira de Sementes*. **23(2)**: 21-26, 2001.
- T.B. Ng. Antifungal proteins and peptides of leguminous and non-leguminous origins. *Peptides*: **25**: 1215-1222, 2004
- Taylor, R. H.; Acland, D. P.; Attenborough, S.; Cammue, B. P. A.; Evans, I. J.; Osborn, R. W.; Ray, J. A.; Rees, S. B.; Broekaert, W. F.. A novel family of small cysteine-rich antimicrobial peptides from seed of *Impatiens balsamina* is derived

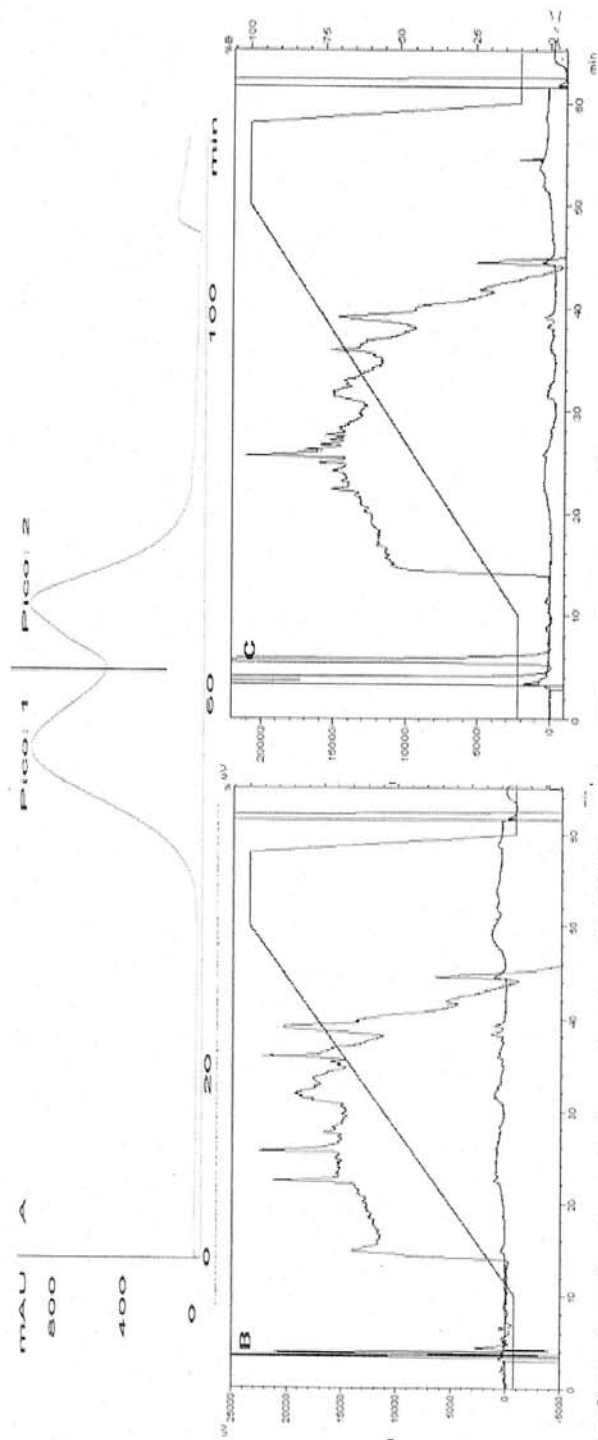
from a single precursor protein. *The Journal of Biological Chemistry*. **272**: 24480-24447, 1997.

- Tavares, L.S.; Santos, M.O.; Viccini, L.F.; Moreira, J.S.; Miller, R.N.G.; Franco, O.L..Biotechnological potential of antimicrobial peptides from flowers. *Peptides*: **29**: 1842-1851, 2008.
- Teixeira, F. R., Lima, M. C. O. P., Almeida, H. O., Romeiro, R. S., Silva, D. J. H., Pereira, P. R. G., Fontes, E. P. B., Baracat-Pereira, M. C.. Bioprospection of Cationic and Anionic Antimicrobial Peptides from Bell Pepper Leaves for Inhibition of *Ralstonia solanacearum* and *Clavibacter michiganensis* sp. *michiganensis* growth. *Journal of Phytopathology*,**154**: 418-421, 2006.
- Terras, F. R. G.; Schoofs, H. M. E.; De Bolle, M. F. C.; Leuven, F. V.; Rees, S. B.; Vanderleyden, J.; Cammue, B. P. A.; Broekaert, W. F.. Analysis os two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *The Journal of Biological Chemistry*, **267**: 15301-15309, 1992.
- Terras, F.R.G.; Eggermont, K.; Kovaleva, V.; Raikhel, N.V.; Osborn, R.W.; Kester, A.; Rees, S.B.; Torrekens, S.; Leuven, F.V.; Vanderleyden, J.; Cammue, B.P.A.; Broekaert, W.F.. Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. *The Plant Cell*. **7**: 573-588, 1995.
- Theodoro, G. F.; Maringoni, A. C.. Ação de produtos quimicos *in vitro* e *in vivo* sobre *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, agente causal do cancro bacteriano do tomateiro. *Scientia Agricola*. **57(3)**: 439-443, 2000.
- Thevissen, K.; Cammue, B.P.A.; Lemaire, K.; Winderickx, J.; Dickson, R.C.; Lester, R.L.; Ferket, K.K.A.; Even, F.V.; Parret, A.H.A.; Broekaert, W.F.. A gene encoding a sphingolipid biosynthesis enzyme determines the sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to an antifungal plant defensin from dahlia (*Dahlia merckii*). *PNAS*. **97(17)**: 9531-9536, 2000.
- Thevissen, K.; Warnecke, D.C.; François, I.E.J.A.; Leipelt, M.; Heinz, E.; Ott, C.; Zähringer, U.; Thomma, B.P.H.J.; Ferket, K.K.A.; Cammue, B.P.A.. Defensins from insects and plants interact with fungal glucosylceramides. *The Journal of Biological Chemistry*. **279(6)**: 3900-3905, 2004.

- Thoma, S.; Kaneko, Y.; Somerville, C.. A non-specific lipid transfer protein from *Arabidopsis* is a cell wall protein. *The Plant Journal*, **3**: 427-436, 1993.
- Vigo-Schultz, S.C.; Stangarlin, J.R.; Franzener, G.; Portz, R.L.; Kuhn, O.J.; Schwan-Estrada, K.R.F.. Effect of alcoholic extract of guaco (*Mikania* sp.) on the control of dark rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) in cauliflower. *Semina: Ciências Agrárias*. **27(4)**: 515-524, 2006.
- Wang, S. Y.; Wu, J.H.; Ng, T.B.; Ye, X.Y.; Rao, P.F.. A non-specific lipid transfer protein with antifungal and antibacterial activities from the mung bean. *Peptides*. **25**: 1235-1242, 2004.
- Weerden, N.L.; Lay, F.T.; Anderson, A.M.. The plant defensin, NaD1, Enters the Cytoplasm of *Fusarium oxysporum* Hyphae. *The Journal of Biological Chemistry*. **283(21)**: 14445-14452, 2008
- Yatsuda, R.. Efeito antimicrobiano *in vitro* da *Mikania laevigata* e da *Mikania* sp. sobre estreptococos do grupo mutans. 2004. 55f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, SP.
- Ye, X.Y.; Ng, T.B.. A new antifungal peptide from rice beans. *Journal Peptide Research*. **60**: 81-87, 2002.
- Yokoyama, S.; Kato, K; Koba, A.; Minami, Y.; Watanabe, K.; Yagi, F.. Purification, characterization, and sequencing of antimicrobial peptides, Cy-AMP1, Cy-AMP2, and Cy-AMP3, from the Cycad (*Cycas revoluta*) seeds. *Peptides*. **29**: 2110 – 2117, 2008.
- Zasloff, M.. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*. **415**: 389-395, 2002.

ANEXOS

CROMATOGRAFIA BIDIM IONAL - EP>30kDa



APÊNDICE 1

A: Cromatografia de exclusão molecular, EP>30kDa. Coluna Waters Protein-Pack™ 125, 7,8 x 300 mm sendo a solução de equilíbrio e de eluição Tris-HCl 25mM acrescida de 150 mM de NaCl, pH 7, ao fluxo de 0,25 mL.min⁻¹, aplicado 500µL. Fluxo: 0.25 mL.min⁻¹. **B e C:** Cromatografia de fase reversa (C18-RP-HPLC) do pico 1 e pico 2 da cromatografia de exclusão molecular, respectivamente. A coluna foi equilibrada com solução A e as proteínas eluídas em um gradiente descontinuo crescente da solução B, a um fluxo de 1 mL.min⁻¹. Solução A: TFA 0,1%(v/v); solução B: TFA 0,1% (v/v) e acetonitrila 80% (v/v). Linha superior: ABS₂₁₄. Linha inferior: ABS₂₈₀.

CROMATOGRAFIA BIDIMENSIONAL - ES>30kDa

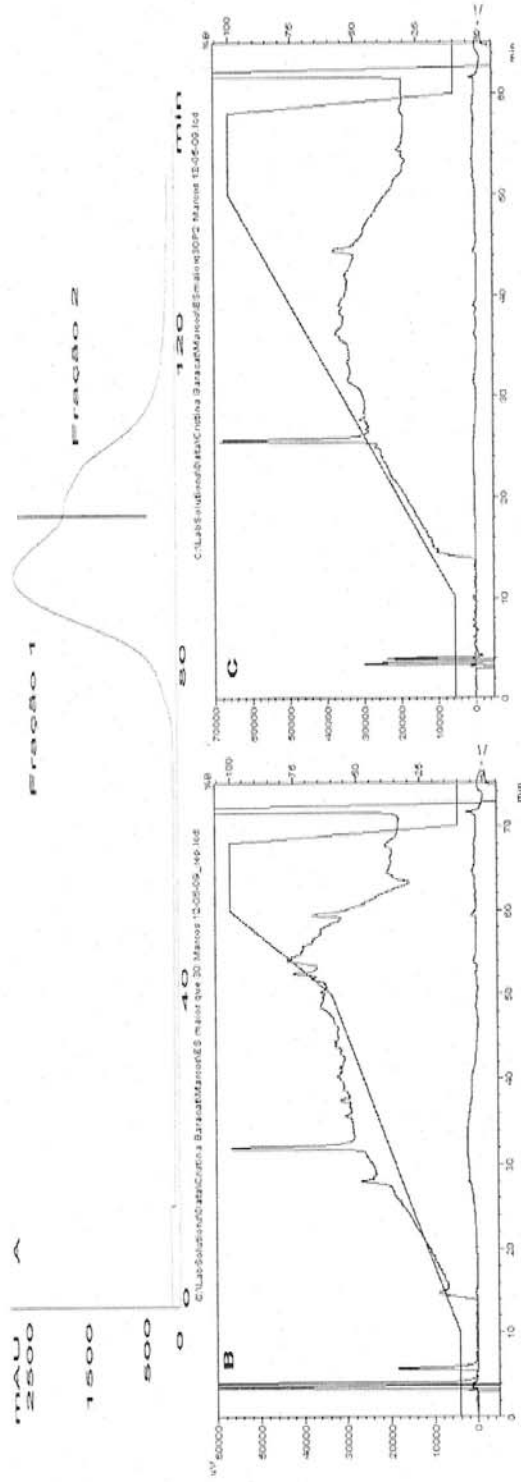
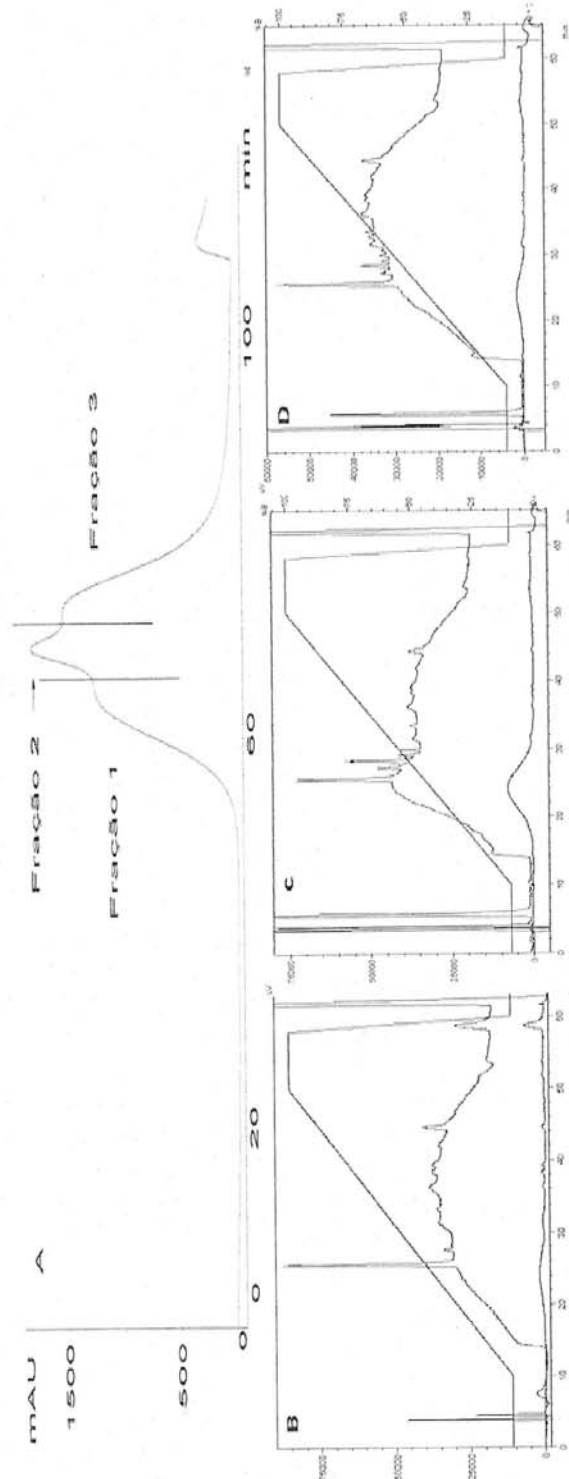


Figura - 15. A: Cromatografia de exclusão molecular, ES>30kDa. Coluna Waters Protein-Pack™ 125, 7,8 x 300 mm sendo a solução de equilíbrio e de eluição Tris-HCl 25mM acrescida de 150 mM de NaCl, pH 7, ao fluxo de 0,25 mL.min⁻¹, aplicado 500µL. Fluxo: 0,25 mL.min⁻¹. **B e C:** Cromatografia de fase reversa (C18-RP-HPLC) da fração 1 e fração 2 da cromatografia de exclusão molecular, respectivamente. A coluna foi equilibrada com solução A e as proteínas eluídas em um gradiente descontinuo rescente da solução B, a um fluxo de 1 mL.min⁻¹. Solução A: TFA 0,1%(v/v); solução B: TFA 0,1% (v/v) e acetonitrila 80% (v/v). Linha superior: ABS₂₁₄. Linha inferior: ABS₂₈₀.

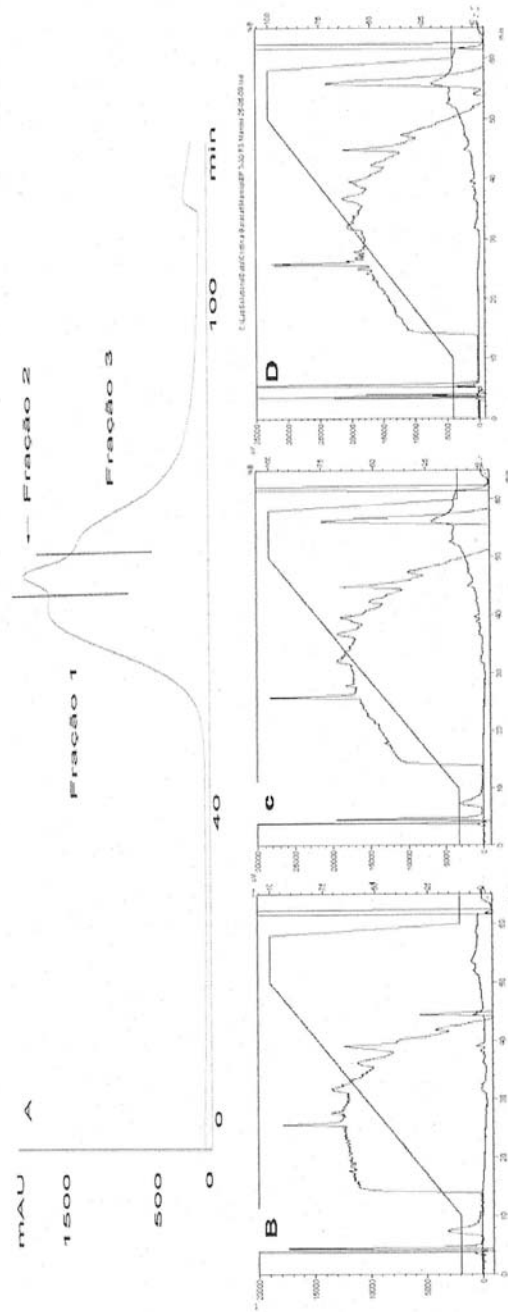
CROMATOGRAFIA BIDIMENSIONAL – E3-30kDa



APÊNDICE 3

Figura 16 - A: Cromatografia de exclusão molecular, ES3-30kDa. Coluna Waters Protein-Pack™ 125, 7,8 x 300 mm sendo a solução de equilíbrio e de eluição Tris-HCl 25mM acrescida de 150 mM de NaCl, pH 7, ao fluxo de 0,25 mL.min⁻¹, aplicado 1000µL. Fluxo: 0,25 mL.min⁻¹. **B, C e D:** Cromatografia de fase reversa (C18-RP-HPLC) da fração 1, 2 e 3 da cromatografia de exclusão molecular, respectivamente. A coluna foi equilibrada com solução A e as proteínas eluídas em um gradiente descontinuo crescente da solução B, a um fluxo de 1 mL.min⁻¹. Solução A: TFA 0,1%(v/v) e acetonitrila 80% (v/v). Linha superior: ABS₂₁₄. Linha inferior: ABS₂₈₀.

CROMATOGRAFIA BIDIMENSIONAL – EP3-30kDa



APÊNDICE 4

Figura 17 - A: Cromatografia de exclusão molecular, EP3-30kDa. Coluna Waters Protein-Pack™ 125, 7,8 x 300 mm sendo a solução de equilíbrio e de eluição Tris-HCl 25mM acrescida de 150 mM de NaCl, pH 7, ao fluxo de 0,25 mL.min⁻¹, aplicado 1000µL. Fluxo: 0,25 mL.min⁻¹. **B, C e D:** Cromatografia de fase reversa (C18-RP-HPLC) da fração 1, 2 e 3 da cromatografia de exclusão molecular, respectivamente. A coluna foi equilibrada com solução A e as proteínas eluídas em um gradiente descontinuo crescente da solução B, a um fluxo de 1 mL.min⁻¹. Solução A: TFA 0,1%(v/v); solução B: TFA 0,1% (v/v) e acetonitrila 80% (v/v). Linha superior: ABS₂₁₄. Linha inferior: ABS₂₈₀.