



ATIVIDADE FUNGICIDA E LARVICIDA DE EXTRATO PROTEICO DE FOLHAS DE MAMOEIROS INFECTADAS PELO VÍRUS DA MELEIRA

Oeber de Freitas Quadros, José Aires Ventura, Antônio Alberto Ribeiro Fernandes,
Patrícia Machado Bueno Fernandes

Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Agronegócio da Universidade Federal do Espírito Santo. Av. Marechal
Campos, 1468, Vitória-ES, CEP 29040-090. E-mail: oeberquadros@gmail.com, ventura@incaper.es.gov.br,
alberto.fernandes@ufes.br, patricia.fernandes@ufes.br

INTRODUÇÃO

As plantas sofrem alterações morfológicas e fisiológicas como adaptação a estímulos bióticos e abióticos. Respostas de defesa ocorrem tanto no local do ataque quanto sistemicamente em outros órgãos distantes desses locais (SCHILMILLER e HOWE, 2005).

Os estudos sobre extratos vegetais têm-se apresentado como uma alternativa promissora no controle de pragas, reduzindo as aplicações de inseticidas químicos sintéticos prejudiciais à saúde humana e causadores de desequilíbrios ecológicos e impactos ambientais. Várias espécies de plantas têm sido investigadas e testadas por possuírem compostos com potencial atividade fungicida e larvicida para diversas espécies que causam ou transmitem doenças para as plantas, animais e para o homem (RODRIGUES et al., 2005).

A análise proteômica das folhas de mamoeiros (*Carica papaya* L.) sadias e infectadas pelo vírus da meleira, *Papaya meleira virus* (PMeV), indicaram que a infecção com o PMeV induziu superexpressão de várias proteínas relacionadas ao estresse, dentre elas, quitinases, glucanases e peroxidases (RODRIGUES et al., 2011). Observa-se, portanto, que estas enzimas estão envolvidas no processo de proteção contra patógenos em plantas e as quitinases, por exemplo, atuam nas plantas como biopesticidas, com ação tóxica em fungos e larvas de insetos (HIRAYAMA et al., 2004). A presença de lectina já foi determinada em sementes de *C. papaya* (WANG et al., 2011) e extratos contendo lectinas foram utilizados no combate as larvas de *Aedes aegypti*, ocasionando a paralisam a digestão das larvas e provocando a sua morte por desnutrição (SANTOS et al., 2009).

Uma característica físico-química em comum nas proteínas citadas (quitinases, glucanases, lectinas e peroxidases) é que o peso molecular está numa faixa entre 20 a 60 KDa, sendo possível então a separação por precipitação pelo sulfato de amônio.

Este estudo propôs extrair proteínas em estado nativo de folhas de mamoeiros sadios e infectados pelo PMeV, concentrar proteínas envolvidas no mecanismo de defesa da planta e avaliar atividade citotóxica dos extratos proteicos no fungo fitopatogênico *Chalara paradoxa* e em larvas de *A. aegypti*.

MATERIAL E MÉTODOS

Extração e concentração de proteínas

As folhas de mamoeiros sadios e infectados pelo PMeV foram maceradas em nitrogênio líquido e armazenadas em -80 °C. Para a extração de proteínas no estado nativo, 2 g de amostra foram maceradas em 6mL do tampão acetato de sódio (CH₃COONa, 50 mM, pH 5), gelado. O material foi centrifugado (4000 rcf, 4 °C, 20 min) e o sobrenadante foi coletado e armazenado em -20 °C.

Com o objetivo de concentrar proteínas de peso molecular de 20 a 60 kDa, foi adicionado sulfato de amônio aos extratos foliares, na concentração 0-30%. Os extratos ficaram em repouso no gelo por 1 h e depois centrifugados (4000 rcf, 4 °C, 20 min). O precipitado foi descartado e ao sobrenadante adicionaram-se mais sulfato de amônio (30-70% de saturação). Novamente os extratos ficaram em repouso no gelo por 1 h e depois centrifugados (4000 rcf, 4 °C, 20 min), sendo que nesta etapa o sobrenadante foi descartado e o precipitado (concentrado de proteínas) foi ressuscitado em 6 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5.

Após a pré-concentração pelo sulfato de amônio, os extratos proteicos foram dialisados (em membrana de poro 2 kDa) durante 18 h em 4 L de tampão de acetato de sódio (50 mM, pH 5), a 4 °C. Após a diálise, os extratos de proteínas foram congelados à -80 °C e concentrados em um liofilizador. O produto proteico seco, obtido após liofilização, foi ressuscitado em 5 mL de tampão de acetato de sódio (50 mM, pH 5).

Microdiluição seriada e avaliação antifúngica dos extratos proteicos

O fungo *C. paradoxa* (código E-411 da micoteca do INCAPER) foi pré-inoculado em meio de cultura (caldo nutriente, enriquecido com 2% glicose - CNG), e cultivado sob agitação por 24 h, a 28 °C. Foram pipetados 500 µL do pré-inóculo e diluído em 50 mL de CNG. Esta mistura foi homogeneizada em agitador do tipo “vortex” por 1 minuto e em seguida filtrada em compressas de gazes estéreis. A partir deste ponto foram preparadas microdiluições seriadas, baseadas na Norma M38-A (NCCLS, 2002). Foram feitas alíquotas de 150 µL em placas para cultura de células de 96 poços (tipo ELISA). Foi acrescentado ao primeiro poço da placa 150 µL de extrato proteico e homogeneizado com refluxo da pipeta. Em seguida, 150 µL eram retirados do 1º poço e transferidos para os poços seguintes (Figura 1), sendo zero a concentração de extrato proteico no 11º poço e somente meio de cultura (branco) no 12º poço. Para cada amostra de extrato proteico foram feitas duplicatas das microdiluições e três repetições independentes.

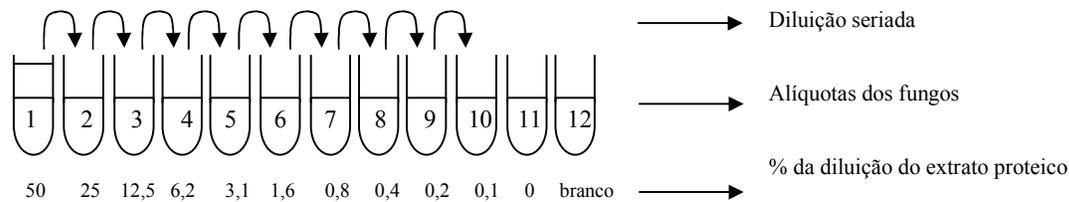


FIGURA 1. Esquema da microdiluição seriada em placas para cultura de células visando à avaliação antifúngica dos extratos proteicos.

Efeito larvicida dos extratos proteicos

Ovos de *A. aegypti*, coletados em placas de compensado de madeira, foram colocados para incubar a 28°C, por 24 horas em água para que ocorresse a eclosão e liberação das larvas. Extratos proteicos previamente purificados foram preparados nas concentrações 100%, 75%, 50% 25% e zero. As larvas foram coletadas, contadas e separadas em 10 unidades por tubo, contendo 1 mL de extrato. Os experimentos foram realizados no delineamento experimental em blocos casualizados, com três repetições e feitos em duplicata, totalizando 60 larvas por concentração.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os extratos proteicos, feitos a partir do tampão de acetato de sódio (50 mM, pH 5) foram divididos em **A1** e **B1**, sendo A1 - extrato proteico de folhas sadias, e B1 - extrato proteico de folhas infectadas pelo PMeV. Após fracionamento por sulfato de amônio, diálise e concentração por liofilizador, os extratos proteicos A1 e B1 passaram a se chamar **A2** e **B2** respectivamente. As análises em eletroforese de proteína (PAGE) mostraram que os extratos proteicos apresentaram bandas que variaram de 15 a 220 kDa e observa-se um aumento na concentração das proteínas com peso molecular entre 20 a 60KDa nos extratos A2 e B2 (Figura 2).

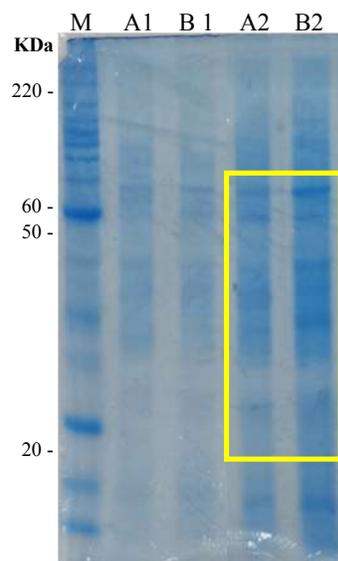


FIGURA 2. Eletroforese de proteína (PAGE) onde **M** - Marcador Molecular "Benchmark" Life®, **A1** e **B1** extratos proteicos, feitos a partir do tampão de acetato de sódio (50 mM, pH 5), sendo **A1** -

extrato de folhas saudias e **B1** - extrato de folhas infectadas pelo PMeV. Após fracionamento por sulfato de amônio, diálise e concentração por liofilizador: **A2** - extrato de folhas saudias e **B2** - extrato de folhas infectadas pelo PMeV. Em destaque observa-se um aumento na concentração das proteínas entre 20 a 60KDa.

Os extratos A1, B1, A2 e B2 foram utilizados em ensaios de microdiluição seriada, com o fungo *C. paradoxa*, visando avaliar da capacidade antifúngica dos extratos (Figura 3).

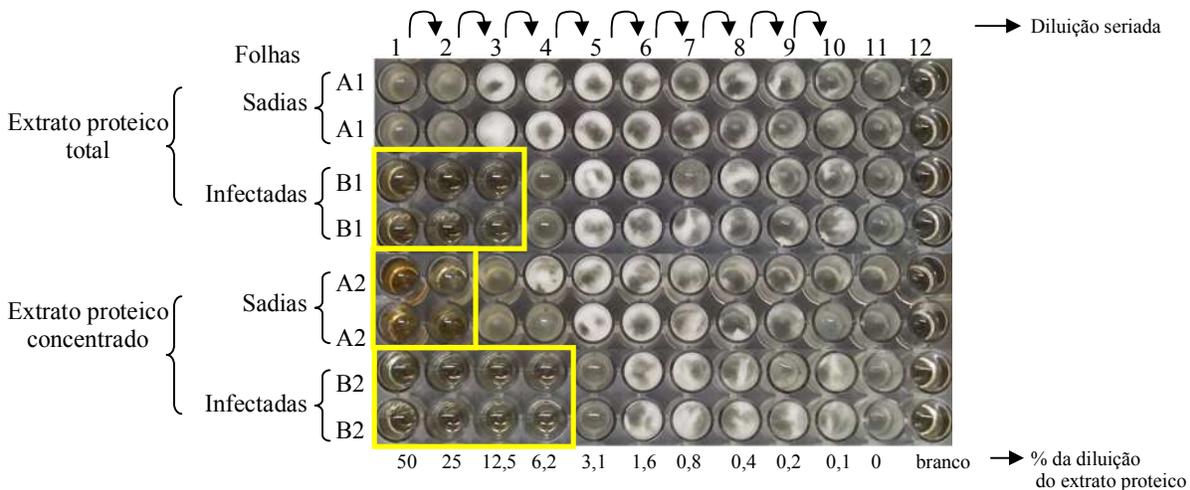


FIGURA 3. Resultado da microdiluição seriada, obtido a partir dos extratos proteicos totais A1 e B1 e dos extratos concentrados A2 e B2. As folhas infectadas (extratos B1 e B2) apresentaram maior quantidade de proteínas com ação *antifúngica*. A coluna 11 apresenta os poços com as alíquotas do meio de cultura com fungo, sendo zero a concentração de extrato proteico. Na coluna 12, os poços apresentam somente meio de cultura (branco). Para cada amostra foram feitas duplicatas e três repetições independentes.

O extrato proteico das folhas de mamoeiro sadio, A1, não apresentou ação fungicida em nenhuma das diluições. O extrato B1, de folhas de mamoeiro infectados pelo PMeV, apresentou ação fungicida na diluição de 12,5%. O extrato proteico concentrado A2 conseguiu inibir o crescimento do fungo na diluição de 25%. Os melhores resultados foram obtidos com o extrato B2, onde apenas 6,2% de diluição foi eficaz na ação fungicida, contra o *C. paradoxa*. Os resultados deste trabalho ainda corroboram com os de Rodrigues et al. (2011), onde foi observado que o mamoeiro quando infectado pelo PMeV superexpressava proteínas relacionadas a defesa. Os extratos feitos, usando o tampão acetato de sódio, permitiu a extração das proteínas totais em seu estado nativo. Já o fracionamento por sulfato de amônio separou proteínas de peso molecular entre 20 a 60KDa (como quitinases, lectinas, peroxidases).

Os extratos A1, B1, A2 e B2 também foram utilizados nos ensaios sobre o efeito larvicida. Não houve mortalidade significativa das larvas de *A. aegypti* em nenhuma das diluições dos extratos A1, B1 e A2. Já o extrato B2 apresentou eficiente mortalidade das larvas ($p < 0,01$) nas concentrações 100% e 75% (Tabela 1).

TABELA 1. Mortalidade das larvas de *A. aegypti* após 24 h de exposição em diferentes diluições do extrato proteico B2.

Concentração do extrato (%)	Mortos acumulados	Mortalidade (%)
100	60	100
75	52	86,6
50	18	30
25	8	13,3
Zero	2	3,3

CONCLUSÕES

Entender como as plantas se protegem é essencial para obtenção de variedades resistentes, sempre visando o aumento da produção e a qualidade dos alimentos.

A metodologia utilizada neste trabalho na extração e concentração de proteínas em seu estado nativo, obtidas a partir das folhas de mamoeiros sadios e infectados pelo PMeV, evidenciaram atividade citotóxica para o fungo *C. paradoxa* e para larvas de *A. aegypti*.

A extração de proteínas envolvidas no mecanismo de defesa da planta contra patógenos apresentaram um grande potencial biotecnológico, onde extratos de folhas de mamoeiro podem ser utilizados como fungicidas e larvicidas naturais.

AGRADECIMENTOS

Apoio Financeiro: CNPq, CAPES, FINEP, FAPES.

REFERÊNCIAS

HIRAYAMA, K. K; KONNO, K; HIRAYMA, C; NAKAMURA, M; TATEISHI, K; TAMURA, Y; HATTORI, M; KOHNO, K. Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex. **Plant Journal**, v. 37, n.3, p.370-378, 2004.

NCCLS. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidial forming filamentous fungi**. Approved standard NCCLS M38-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, 2002.

RODRIGUES, A. M. S; DE PAULA, J. E; ROBLOT, F; FOURNET, A; ESPINDOLA, L. S. Larvicida activity of *Cybistrax antisiphilitica* against *Aedes aegypti* larvae. **Fitoterapia**, v.76, p.755-757, 2005.

RODRIGUES, S. P; VENTURA, J. A; AGUILAR, C; NAKAYASU, E. S; ALMEIDA I. C; FERNANDES P. M; ZINGALI, R. B. Proteomic analysis of papaya (*Carica papaya* L.) displaying typical sticky disease symptoms. **Proteomics**, v.11, n.13, p.2592-602, 2011.

SANTOS, A. F. S; LUZ, L. A; ARGOLO, A. C. C; TEIXEIRA, J. A; PAIVA, P. M. G; COELHO, L. C. B. “Isolation of a seed coagulant *Moringa oleifera* lectin”. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 504-508, 2009.

SCHILMILLER, A. L; HOWE, G. A. Systemic signaling in the wound response. **Current Opinion in Plant Biology**. v.8, n. 4, p. 369-377, 2005.

WANG, T. H; KUNG, Y. L; LEE, M. H; SU, N. W. N-acetyl-d-galactosamine-specific lectin isolated from the seeds of *Carica papaya*. **J. Agric. Food Chem.** v.59, n.8, p.4217-24, 2011.