

PROSPECÇÃO E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE UREASES EM SEMENTES DE ESPÉCIES DE FABACEAE DA FLORA AMAZÔNICA

Ariadne Elisa Belo da SILVA¹

Larissa Ramos CHEVREUIL²

José Francisco de Carvalho GONÇALVES³

¹Bolsista Iniciação Científica INPA-PIBIC/CNPq;

²Colaboradora CDAM/INPA;

³Orientador CDAM/INPA

INTRODUÇÃO

A floresta amazônica compreende grande diversidade de espécies vegetais que, em sua maioria, apresentam propriedades biológicas, como plantas aromática, oleaginosas, medicinais, etc. (Pinto *et al.* 2002; Batagliion *et al.* 2014). Diante desse leque de possibilidades e de espécies aptas para investigação, evidenciam-se as plantas pertencentes à Fabaceae, pois são, comprovadamente, estocadoras de nitrogênio devido à sua capacidade em formar associações com bactérias. Desta maneira, as sementes dessas espécies representam importante fonte de várias proteínas de interesse bioquímico e biotecnológico como, por exemplo, as ureases (Carlini e Guimarães 1981; EL-Hefnawy *et al.* 2014). As ureases vegetais apresentam duas isoformas: ubíqua, que está presente em todos os tecidos da planta como folhas, embriões, raízes e sementes, relacionando-se diretamente ao processo de nutrição do embrião, além de assumir papel determinante na reciclagem de derivados da ureia; embrião-específica, que é sintetizada durante o desenvolvimento das sementes, desempenhando pouca ou nenhuma função de nutrição do embrião e, no entanto, sugere-se que estas estejam envolvidas na defesa vegetal devido efeito antifúngico realizado pelas ureases em plantas (Polacco e Holland 1993; Becker-Ritt *et al.* 2007). O potencial antifúngico dessa biomolécula tem sido relatado como meio de atuação a nível intracelular, pois ocorre em doses submicromolares, tornando estas proteínas de 2 a 3 ordens de grandeza mais potentes do que quaisquer outras proteínas antifúngicas conhecidas de origem vegetal, produzindo lesões na membrana celular dos microorganismos (Postal *et al.* 2012; Galvani *et al.* 2015). Contudo, permanece uma lacuna quanto ao conhecimento do potencial bioquímico e biotecnológico das ureases provenientes de espécies de Fabaceae da Amazônia. Assim, considerando o número significativo de Fabaceae na flora Amazônica, espera-se que o bioma Amazônico represente um grande repositório de diversidade de biomoléculas, principalmente e origem proteica.

MATERIAL E MÉTODOS

Sementes maduras de 15 espécies de Fabaceae da Amazônia (*Cassia fistula*, *Caesalpinia ferrea* var. *ferrea*, *Dimorphandra caudata*, *Copaifera venezuelana*, *Campsiandra comosa*, *Enterolobium schomburgkii*, *Zygia inaequalis*, *Dinizia excelsa*, *Parkia multijuga*, *Dalbergia spruceana*, *Canavalia brasiliensis*, *Erythrina fusca*, *Ormosia grossa*, *Swartzia inaequalis*, *Swartzia polyphylla*) foram coletadas de matrizes devidamente georreferenciadas, ao longo de 2010 até 2015 em vários sítios florestais da Amazônia, localizados no Amazonas- Brasil, Esses materiais biológicos foram depositados no herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA-MCTI), foram identificados pelo especialista em Fabaceae e conduzidos ao Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal para análises proteicas.

O material pulverizado obtido das sementes de cada espécie foi utilizado para a extração de proteínas em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,5 (5% p/v) durante 2 h à temperatura constante de 4°C, seguida de precipitação em sulfato de amônio e diálise. A quantificação de proteínas foi realizada a partir da metodologia de Bradford (1976).

As atividades ureolíticas a partir da medida colorimétrica da amônia liberada, utilizando o método do fenol-nitroprussiato-hipoclorito e uma curva padrão com sulfato de amônio (Weatherburn 1967), seguido de leituras espectrofotométricas. Uma unidade de atividade de urease correspondeu à quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de amônia por segundo.

As atividades biológicas foram testadas sobre os fungos *Aspergillus niger*, *Aspergillus sp*, *Penicilium chrysogenum* e *Fusarium oxysporum*, obtidos da micoteca mantida pelo LFBV/INPA. Os ensaios de inibição do crescimento fúngico foram realizados conforme a metodologia descrita por Broekaert *et al.* (1990), com algumas adaptações. Os experimentos foram realizados em placas de microtitulação de poliestireno de fundo chato com 96 poços. Em cada poço foram adicionados 10 μL da suspensão de esporos (2×10^5 esporos/mL) do fungo e 90 μL de meio YPD (“Yeast Peptone Dextrose”). Após 16 horas, na ausência de luz à 27 °C, foram adicionados 100 μL do extrato. Os controles negativos e positivos foram o tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,5 e o peróxido de hidrogênio 200 mM, respectivamente. Os ensaios foram realizados na concentração de 10,0 mg/mL do extrato em tampão. Todas as amostras foram filtradas em membranas de 0,22 μm. O monitoramento do crescimento fúngico foi feito por meio de leituras espectrofotométricas a $\lambda=630$ nm, em intervalos de 12 horas, até um total de 72 horas, em leitora de microplacas (Thermo Plate Reader). A determinação do IC₅₀ foi realizada para os extratos capazes de inibir o crescimento fúngico, onde, então, foi feita a diluição seriada dos extratos proteicos, procedendo-se o mesmo protocolo de inibição do crescimento fúngico. Para os ensaios de germinação dos esporos, os extratos proteicos que apresentaram atividade antifúngica (10 μL) foram adicionados em uma placa tipo Rodac com 10 μL da suspensão de esporos na concentração de 2×10^5 (esporo/mL). a inibição da germinação dos esporos a partir da visualização em microscópio óptico (Carl Zeiss AxioLab A1). Foram considerados esporos germinados aqueles que apresentaram tubo germinativo igual ou superior ao seu crescimento. O delineamento experimental utilizado para os bioensaios foi o inteiramente casualizado (DIC), obedecendo ao esquema fatorial 15 x 4, com 10 repetições. As análises estatísticas dos dados foram feitas a partir de análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. O programa estatístico utilizado foi o Statistica 7.0.

As eletroforeses em géis de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE) foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por Laemmli (1970). As amostras foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8 contendo SDS, glicerol e β-mercaptoetanol e, posteriormente, imersas em água em ebulição durante 10 minutos. A eletroforese foi realizada em tampão de corrida Tris-HCl 0,025M, glicina e SDS, a 200 volts, 15 mA/gel, durante 2 horas. Como marcadores de massas moleculares foram utilizados marcadores da Promega. Após as corridas, os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue em ácido acético, etanol e água destilada durante 2 horas e descorados em solução de ácido acético glacial, etanol e água destilada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade de urease variou de 0 a 100 micromol/mg de proteína/min dentro das três subfamílias de Fabaceae, com foco para as espécies *Z. inaequalis* (Mimosoideae), *S. polyphylla* (Faboideae) e *C. comosa* (Caesalpinioideae), que apresentaram as maiores atividades ureolíticas dentre as 15 espécies estudadas, o que sugere que o potencial antifúngico não está relacionado ao desenvolvimento evolutivo das espécies, e sim ao que se refere à relação entre as isoformas de

ureases nos tecidos de estocagem e seu potencial de ruptura da membrana celular dos microorganismos. Quanto às atividades inibitórias, estas variaram de 5,3% (*Fusarium oxysporum*) a 84,3% (*Aspergillus niger*) entre os 4 fungos utilizados. O extrato de *Z. inaequalis* apresentou atividade contra todos os fungos, em especial para *Aspergillus niger* e *Aspergillus sp.*, com significativos percentuais inibitórios 84% e 79% respectivamente. Por outro lado, apesar de apresentar uma das maiores atividades ureolíticas (~30%), o extrato de *S. polyphylla* não inibiu qualquer um dos fungos testados, já o extrato de *C. comosa* apresentou alguma atividade (21, 24 e 12%) contra 3 (*A. niger*, *P. chrysogenum* e *F. oxysporum*) dos 4 fungos. Adicionalmente, as espécies *Z. inaequalis*, *P. pendula* e *C. venezuelana* se destacam por inibir todos os fungos testados com percentual de inibição de até 84,3% para *A. niger*. Em contrapartida, o fungo *F. oxysporum* apresentou maior resistência a quase todos os extratos proteicos, sendo inibido apenas por 5 (*Campsiandra comosa*, *Copaifera venezuelana*, *Parkia pendula*, *Zygia inaequalis* e *Dalbergia spruceana*) dos 15 extratos testados.

A partir das análises eletroforéticas, observou-se a predominância de bandas proteicas com massas moleculares variando de 15 a 225 kDa, adicionalmente, nos extratos proteicos de *E. fusca*, *Z. inaequalis*, *C. fistula*, *C. ferrea*, *D. caudata*, *D. excelsa* e *P. multijuga* verifica-se a presença de bandas proteicas de, aproximadamente, 90 kDa, indicando a possível presença de ureases, uma vez que a literatura científica tem relatado essa faixa de massa molecular para ureases obtidas de sementes de espécies de Fabaceae (Becker-Ritt *et al.* 2007; Postal *et al.* 2012; Balasubramanian *et al.* 2013). É importante ressaltar que, dos extratos com a presença de bandas proteicas de 90 kDa, observou-se também alguma atividade de antifúngica contra os fungos testados, reforçando, desta maneira, a possível presença de ureases nos extratos proteicos das espécies estudadas, exceto para as espécies *C. ferrea* e *D. excelsa*, *D. caudata* e *P. multijuga*, que não apresentaram inibição do crescimento dos fungos testados.

Relacionando as massas moleculares, a atividade de urease e as inibições, é possível inferir que os extratos com alguma atividade ureolítica apresentaram massas moleculares em torno daquelas pertencentes à classe das ureases e também alguma atividade antifúngica, indicando a importância de se investigar o potencial inibitório dessas biomoléculas dentro do bioma Amazônico, visto que há evidências desse potencial.

CONCLUSÃO

As ureases estão amplamente distribuídas em sementes de espécies de Fabaceae da Amazônia, evidenciando a importância dessa família botânica em estudos envolvendo a obtenção de moléculas com possível aplicação biotecnológica.

REFERÊNCIAS

- Balasubramanian, A.; Durairajpandian, V.; Elumalai, S.; Mathivanan, N.; Munirajan, A.K.; Ponnuraj, K. 2013. Structural and functional studies on urease from pigeon pea (*Cajanus cajan*). *International Journal of Biological Macromolecules*, 58: 301-309.
- Bataglioni, G.A.; Silva, F.M.A.; Santos, J.M.; Santos, F.N.; Barcia, M.T.; Lourenço, C.C.; Salvador, M.J.; Godoy, H.T.; Eberlin, M.N.; Koolen, H.H.F. 2014. Comprehensive characterization of lipids from Amazonian vegetable oils by mass spectrometry techniques. *Food Research International*, 64: 472-481.
- Becker-Ritt, A.B.; Martinelli, A.H.S.; Mitidieri, S.; Feder, V.; Wassermann, G.E.; Santi, L.; Vainstein, M.H.; Oliveira, J.T.A.; Fiuza, L.M.; Pasquali, G.; Carlini, C.R. 2007. Antifungal activity of plant and bacterial ureases. *Toxicon*, 50:971-983.

- Broekaert, W.F.; Allen, A.K.; Peumans, W.J. 1990. Separation and partial characterization of isolectins with different subunit compositions from *Datura stramonium* seeds. *FEMS Microbiology Letters*, 220: 116-120.
- Carlini, C.R.; Guimarães, J.A. 1981. Plant and microbial toxic proteins as hemilectins: Emphasis on canatoxin. *Toxicon*, 29: 791-806.
- EL-Hefnawy, M. E.; Sakran, M.; Ismail, A.I.; Aboelfetoh. 2014. Extraction, purification, kinetic and thermodynamic properties of urease from germinating *Pisum Sativum* L. seeds. *BMC Biochemistry*, 15: 15-23.
- Galvani, G.L.; Fruttero, L.L.; Coronel, M.F.; Nowicki, S.; Demartini, D.R.; Defferrari, M.S.; Postal, M.; Canavoso, L.E.; Carlini, C.R.; Settembrini, B.P. 2015. Effect of the urease-derived peptide Jaburetox on the central nervous system of *Triatoma infestans* (Insecta: Heteroptera). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1850: 255-262.
- Pinto, A.C.; Silva, D.H.S.; Bolzani, V.S. 2002. Current status, challenges and trends on natural products in Brazil. *Quimica Nova*, 25: 45-61.
- Polacco, J.C.; Holland, M.A. 1993. Roles of urease in plant cells. *International Review in Cytology*, 145: 65-103.
- Postal, M.; Martinelli, A.H.S.; Becker-Ritt, A.B.; Ligabue-Braun, R.; Demartini, D.R.; Ribeiro, S.F.F.; Pasquali, G.; Gomes, V.M.; Carlini, C.R. 2012. Antifungal properties of *Canavalia ensiformis* urease and derived peptides. *Peptides*, 38:22-32.
- Weatherburn, M.W. 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical Chemistry*, 39: 971-974.