



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

HENRIQUE PINHO OLIVEIRA

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA *Mm*-POX,
UMA PEROXIDASE DO LÁTEX DE *Marsdenia megalantha* (GOYDER; MORILLO,
1994).**

FORTALEZA
2013

HENRIQUE PINHO OLVEIRA

PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA *Mm*-POX, UMA PEROXIDASE DO LÁTEX DE *Marsdenia megalantha* (GOYDER; MORILLO, 1994)

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Ilka Maria Vasconcelos

FORTALEZA

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

O47p

Oliveira, Henrique Pinho.

Purificação, caracterização e atividade antifúngica da *Mm*-POX, uma peroxidase do látex de *Marsdenia megalantha* (GOYDER; MORILLO, 1994) / Henrique Pinho Oliveira. – 2013.
151 f. : il., color., enc. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciência, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2013.
Área de Concentração: Bioquímica vegetal.
Orientação: Profa. Dra. Ilka Maria Vasconcelos.

1. Peroxidase. 2. Enzimas. 3. Atividade antifúngica. I. Título.

CDD 574-192

HENRIQUE PINHO OLIVEIRA

PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA *Mm*-POX, UMA PEROXIDASE DO LÁTEX DE *Marsdenia megalantha* (GOYDER; MORILLO, 1994)

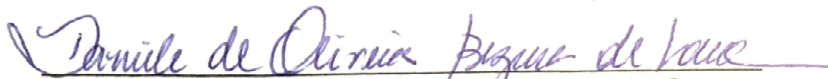
Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Bioquímica.

Aprovada em: 12/12/13

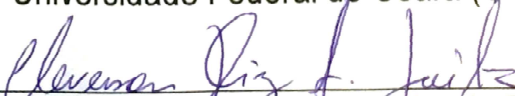
BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Ilka Maria Vasconcelos
Universidade Federal do Ceará (UFC)



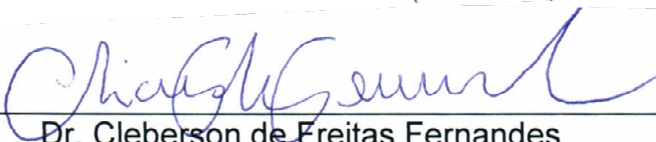
Profa. Dra. Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof. Dr. Cleverson Diniz Teixeira de Freitas
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof. Dr. Renato de Azevedo Moreira
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)



Dr. Cleberon de Freitas Fernandes
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Rondônia

À minha Mãe Selene,

Ao meu Pai Régis,

À minha Irmã Cristiane,

Às minhas Avós Celina e Laura (*in memoriam*),

À minha Sherecuda Linda

À todos os familiares,

Dedico

O Mundo está mudado.

Eu sinto isto na água,

eu sinto isto na terra,

eu farejo isto no ar.

Muito do que já existiu se perdeu;

pois não há mais ninguém vivo que se lembre.

J. R. R. Tolkien - O Senhor dos Anéis

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. **Ilka Maria Vasconcelos**, que desde muito cedo acreditou no meu potencial, proporcionou meu crescimento profissional, me apoiou em grandes decisões e me desencorajou em algumas idéias furadas, sempre visando extrair o meu máximo de potencial com a dedicação de uma verdadeira mãe. Sua contribuição na minha vida é incomensurável.

Ao Prof. **José Tadeu Abreu de Oliveira**, sempre disposto a esclarecer dúvidas e fornecer valiosas sugestões para a complementação do presente trabalho, bem como contribuir com meu desenvolvimento intelectual, algumas vezes com o auxílio do próprio suor.

À Profa. Dra. **Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa**, que guiou minhas mãos nos primeiros passos de aprendizado laboratorial, sempre aliando ciência e sorrisos, me moldando e ensinando o be-a-ba laboratorial. Espero ter contribuído com sua jornada ao menos metade do que você contribuiu para a minha. Agradeço também por ter aceitado fazer parte da avaliação do presente trabalho.

Ao Prof. Dr. **Renato de Azevedo Moreira**, pelo aceite em fazer parte da avaliação do presente trabalho, bem como os conselhos recebidos desde os primórdios da minha graduação, seja nos corredores do departamento de bioquímica, congressos da Sbbq, ou mesmo em seu laboratório na Unifor, onde tive o privilégio de desfrutar de sua companhia por alguns momentos.

Ao Prof. Dr. **Cleverson Diniz Teixeira de Freitas**, pelo aceite em fazer parte da avaliação do presente trabalho, juntamente com os conselhos e exemplos práticos de dedicação, trabalho, coleguismo, que permearam toda minha jornada acadêmica, desde a graduação, mestrado e doutorado, como colegas de curso, técnicos e agora como professor.

Ao Dr. **Clebson de Freitas Fernandes**, pelo aceite em fazer parte da avaliação do presente trabalho, assim como ter me inspirado na ciência, quando eu apenas iniciava meus passos rumo à vida acadêmica na graduação. Seu bom humor, sabedoria, paciência, dedicação e compromisso sempre foram bastante vivos na minha memória.

Aos amigos da família LabTox, que durante vários anos tive o privilégio de conviver, alguns por mais tempo, outros pelo tempo suficiente para se tornarem especiais. **Adelina Braga, Ana Paula Queiroz, Bella Gyselle, Clidia Moreira, Helen Costa, Isabela Lopes, Juliana Gifoni, Lucas Pinheiro, Mariana Reis, Marina Gabrielle, Mirella Leite, Paulo Carvalho, Raquel rocha, Vanessa Duarte**, presentes nessas etapas finais de doutorado, mas sem NUNCA esquecer alguns membros honorários, como **Hermogenes David, Janne Keila** e outros atualmente distantes, como **Georgia Fernandes, Isabel Cristina, Raquel Coelho, Silvinha e Andreia Maia**, dos quais sempre me lembro com carinho e saudosismo.

Em especial aos estudantes de iniciação científica (ICs), **Handerson Mota** (agora mestrando), **Yara Dias**, entre outros, que contribuíram para esse trabalho, sem os quais meu esforço teria sido triplicado, com grandes possibilidades de falha.

Aos estudantes e amigos do Laboratório de Defesa Vegetal, **Rodolpho Guedes, Ana Luiza Paiva, Freddy David, Ana Lúcia Varela, Hudson Fernando, Pedro Filho, Yara, Alexandra**, pela ajuda nos experimentos e empenho para a realização deste trabalho, assim como alguns bons momentos de alegria e descontração.

Aos Integrantes dos laboratórios de bioquímica da Universidade de Fortaleza, pelo acolhimento e auxílio nos experimentos, em especial à Professora **Ana Cristina Moreira** ao **Antonio Frederico (Pepeu)** e a **Marina Lobo**.

Agradeço também meus colegas de pós-graduação, em especial **Eliane Araújo, Cristina Lima e Raquel Benevides**, pelo carinho e companheirismo prestados durante esses anos de estudos e por sua amizade.

Aos meus grandes amigos, irmãos da vida **Ana Carolina Bezerra, Amora Matos, Elton Arruda, Ivan Fiuza, Jairo Mota, Julio Alencar, Sany Medeiros, Suely Medeiros**, amigos os quais eu devo todos os momentos de alegrias e realizações ao longo da vida, e que me apoiaram incondicionalmente e me deram estruturas para continuar todo dia a tentar realizar meus sonhos. Essa tese de fungos brilhantes também é de vocês.

A minha gigantesca família: **Meus Pais**, pelo carinho, amor e dedicação que me criaram para a vida; **minha Irmã**, sempre cuidando de mim com muito amor,

agora com o upgrade da minha **linda Sobrinha**, que com seus olhinhos brilhantes e seu gêniozinho mandão já reformulou toda uma família; **Meus Tios e Tias**, responsáveis diretos pelo meu crescimento intelectual e humano, e meus **Primos** e **Primas** que, acima de tudo, são meus irmãos e me apoiaram sempre em muitos momentos da minha vida. Em especial às **minhas Avós**, a quem cultivo eterno amor e dedicação, seja em vida ou em lembranças, saibam que boa parte do caminho que trilhei até hoje só me foi possível graças ao auxílio fornecido e amor cultivado pelas senhoras.

A todos vocês, meu mais sincero **MUITO OBRIGADO!**

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

Este trabalho foi realizado graças ao auxílio das seguintes instituições:

Universidade Federal do Ceará, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, em cujos laboratórios esta pesquisa foi desenvolvida.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de Pós-Graduação ao autor e, também, através de convênio com o Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Ciências, da Universidade Federal do Ceará.

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal e do Ensino Superior (CAPES), através de convênio com o Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), através de convênio com o Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

Universidade de Fortaleza, nas pessoas dos professores **Ana Cristina Oliveira Monteiro Moreira** e **Renato de Azevedo Moreira**, que forneceram condições para realização de atividades vinculadas à obtenção da sequência de aminoácidos.

RESUMO

As peroxidases estão presentes em todos os organismos vivos e constituem um grupo de enzimas multifuncionais com diversas aplicações biotecnológicas. Nesse grupo, as peroxidases de plantas classe III (POX) ([EC 1.11.1.7](#)) são enzimas bem caracterizadas, com participação na lignificação, suberização, catabolismo de auxinas, cicatrização e defesa vegetal. Tais enzimas têm sido detectadas em diferentes partes do vegetal, inclusive no látex. Esse trabalho teve como objetivo a purificação, caracterização e avaliação da atividade antifúngica de uma peroxidase presente no látex de *Marsdenia megalantha*, uma espécie endêmica da Caatinga. O látex foi coletado de plantas nativas da região do Quixadá Ceará, Brasil, diluído (1:2) em Tris-HCl 0,05 M, contendo NaCl 0,15 M, pH 8,0 e submetido à centrifugação e diálise contra água. O sobrenadante foi aplicado em matriz de DEAE-Celulose, equilibrada com tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2, resultando nas proteínas não retidas (FnRd) e nas proteínas retidas (FRd), essas últimas eluídas com a adição de NaCl 0,2 M no tampão inicial. A FnRd foi submetida à cromatografia em matriz de Superose 12 HR 10/30, originando duas frações proteicas (S1 e S2). S1 se mostrou como uma proteína pura, com atividade peroxidásica, massa molecular aparente de 60 kDa, pI de 5,2 e identidade com outras POXs, que foi denominado de peroxidase de *M. megalantha* (*Mm-POX*). *Mm-POX* obedece à cinética de Michaelis-Menten, apresenta alta afinidade pelo guaiacol e H₂O₂, estabilidade térmica elevada (60 °C, 1 hora) e pH ótimo em torno de 6,0. A atividade catalítica da *Mm-POX* foi reduzida diante de inibidores clássicos de peroxidases, incluindo azida, DTT, EDTA e Na₂S₂O₅ e de concentrações elevadas Na⁺, Mn²⁺ e ácido salicílico. Por outro lado, os íons Ca²⁺ e Mg²⁺, mesmo em baixas concentrações, foram capazes de potencializar a atividade enzimática da *Mm-POX*. Testada contra fungos, *Mm-POX* (0,2 µg/mL) foi capaz de inibir a germinação de conídios de *Fusarium oxysporum* e *F. solani*, ação que provavelmente decorre de alteração na membrana celular e indução de estresse oxidativo. Os dados em conjunto demonstram que a *Mm-POX* é uma peroxidase classe III, se constituindo na primeira proteína isolada de *M. megalantha*, com possibilidade de uso no controle de doenças vegetais ocasionadas por fungos, agregando valor biotecnológico a essa enzima.

Palavras-chave: Peroxidase; Látex vegetal; *Marsdenia megalantha*; Antifúngico.

ABSTRACT

The peroxidases are present in all living organisms and constitute a group of multifunctional enzymes with several biotechnological applications. In this group, the class III plant peroxidases (POX) (EC 1.11.1.7) are enzymes well characterized, with involvement in lignification, suberization, auxin catabolism, wound healing and plant defense. These enzymes have been detected in different parts of the plant, including the latex. The aim of this work was the purification, characterization and antifungal activity evaluation of a peroxidase from *Marsdenia megalantha* latex, an endemic species of the Caatinga. The latex was collected from plant grown in Quixadá, Ceará, Brazil, diluted (1:2) in 0.05 M Tris-HCl containing 0.15 M NaCl, pH 8.0, and subjected to centrifugation and dialysis against water. The supernatant was applied to a DEAE-Cellulose matrix previously equilibrated with 0.05 M sodium acetate buffer, pH 5.2 and two protein fractions were obtained. Elution of the non retained proteins (FnRd) was achieved by the equilibrium buffer, whereas the bound proteins (FRd) were eluted with 0.2 M NaCl in the same buffer. FnRd was subjected to a chromatography on Superose 12 HR 10/30 column, yielding two protein fractions (S1 and S2). S1 was shown to be a pure protein with peroxidasic activity, apparent molecular mass of 60 kDa, pI 5.2 and identity with other POXs, being named of *M. megalantha* peroxidase (*Mm*-POX). *Mm*-POX follows the Michaelis-Menten kinetics, with high affinity for guaiacol and H₂O₂, elevated thermal stability (60 °C, 1 hour) and optimum pH around 6.0. The catalytic activity of *Mm*-POX was reduced in the presence of classic peroxidases inhibitors, including azide, DTT, EDTA and Na₂S₂O₅ and also in high concentrations of Na⁺, Mn²⁺ and salicylic acid. On the other hand, Ca²⁺ and Mg²⁺, even at low concentrations, were able to enhance the enzymatic activity of *Mm*-POX. In addition, *Mm*-POX was able to inhibit the *Fusarium oxysporum* and *F. solani* conidia germination. This action is probably due to changes in the cell membrane as well as induction of oxidative stress. The results reveal that *Mm*-POX is a class III peroxidase, being the first enzyme isolated from *M. megalantha* species, with potential use in the control of plant disease caused by fungi, adding biotechnological value to this enzyme.

Keywords: Peroxidase; Vegetal latex; *Marsdenia megalantha*; Antifungal.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1 - Fundamentação Teórica		Página
FIGURA 1 –	Rotas metabólicas e processos fisiológicos envolvendo a participação das peroxidases.....	28
FIGURA 2 –	Endereçamento funcional das POXs via retículo endoplasmático.....	29
FIGURA 3 –	Estruturação dos domínios proteicos das POXs em geral.....	31
FIGURA 4 –	Exsicata de <i>M. megalantha</i>	36

CAPÍTULO 2 - <i>Mm</i>-POX: uma nova peroxidase...		Página
FIGURA 1 –	<i>M. megalantha</i> : Ocorrência e espécime utilizada para coleta do látex.....	45
FIGURA 2 –	Aspectos da exsudação do látex de <i>M. megalantha</i> ..	48
FIGURA 3 –	Esquema geral de obtenção da fração proteínas totais do látex (PTL) de <i>M. megalantha</i>	49
FIGURA 4 –	Esquema das etapas cromatográficas (DEAE-Celulose e Superose 12 HR 10/30) utilizadas no procedimento de purificação da peroxidase proveniente do látex de <i>M. megalantha</i>	52
FIGURA 5 –	Perfil cromatográfico das proteínas totais do látex de <i>M. megalantha</i> (480 µgP) em coluna de DEAE-Celulose (2 x 2 cm), equilibrada com tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2 e eluída com NaCl	

	(0,2 M).	58
FIGURA 6 –	Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) na presença de SDS, revelada com nitrato de prata, das frações proteicas obtidas após cromatografia das proteínas totais do látex de <i>M. megalantha</i> em matriz de DEAE-Celulose.....	59
FIGURA 7 –	Determinação de atividade peroxidásica ao longo da cromatografia de troca iônica em matriz de DEAE-Celulose.....	60
FIGURA 8 –	Perfil cromatográfico das proteínas não retidas na matriz de DEAE-Celulose (800 µg/P), após cromatografia em coluna de Superose 12 HR 10/30 (30 x 2 cm), acoplada ao sistema de FPLC, equilibrada com tampão acetato de sódio 0,050 M, pH 5,2.....	62
FIGURA 9 –	Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) na presença de SDS, revelada com nitrato de prata, do primeiro pico proteico (S1) obtido na cromatografia de exclusão molecular em matriz de Superose 12 HR 10/30, acoplada ao sistema de FPLC.....	63
FIGURA 10 –	Frações proteicas apresentando atividade peroxidásica (em vermelho) demonstrada no perfil cromatográfico obtido em matriz de Superose 12 HR 10/30 (30 x 2 cm), acoplada ao sistema de FPLC, equilibrada com tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2.....	64
FIGURA 11 –	Zimograma de atividade peroxidásica após eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) do primeiro pico (S1) obtido na cromatografia em	

matriz de Superose 12 HR 10/30, acoplada ao sistema de FPLC..... 65

FIGURA 12 – Determinação da massa molecular da *Mm*-POX por filtração em gel em coluna de Superose 12 HR 10/30 (30 x 2 cm), acoplada ao sistema de FPLC, equilibrada com tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2..... 67

FIGURA 13 – Espectro de absorção da *Mm*-POX em H₂O. Valores de comprimentos de onda variando de 230 a 500 nm. Figura inscrita: Detalhe para valores maiores de comprimento de onda, evidenciando as alterações de absorbâncias locais em escala menor.,..... 68

CAPÍTULO 3 - Caracterização enzimática de...

Página

FIGURA 1 – Representação esquemática do processo de ligação enzima-substrato (ES) e da reação. Primeiro, a molécula do substrato se liga ao sítio ativo da enzima partindo de uma distância infinita para sua localização final e, em seguida, a reação catalítica é iniciada, no momento em que a interação ES está quase concluída..... 79

FIGURA 2 – Cinética enzimática da *Mm*-POX variando-se o guaiacol e fixando-se o peróxido de hidrogênio..... 88

FIGURA 3 – Cinética enzimática da *Mm*-POX variando-se o peróxido de hidrogênio e fixando-se o guaiacol..... 89

FIGURA 4 – Efeito do pH sobre a atividade enzimática da *Mm*-POX. A atividade peroxidásica (UAP) foi mensurada na presença de diferentes tampões com valores de pH distintos..... 90

FIGURA 5 –	Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática da <i>Mm</i> -POX.....	92
FIGURA 6 –	Estabilidade térmica da atividade enzimática da <i>Mm</i> -POX.....	93
FIGURA 7 –	Efeito da concentração do tampão acetato de sódio sobre a atividade enzimática da <i>Mm</i> -POX.....	95
FIGURA 8 –	Efeito do íon sódio (Na ⁺) sobre a atividade enzimática da <i>Mm</i> -POX.....	96
FIGURA 9 –	Efeito do íon magnésio (Mg ²⁺) sobre a atividade enzimática da <i>Mm</i> -POX.....	97
FIGURA 10 –	Efeito do íon manganês (Mn ²⁺) sobre a atividade enzimática da <i>Mm</i> -POX.....	98
FIGURA 11 –	Efeito do íon cálcio (Ca ²⁺) sobre a atividade enzimática da <i>Mm</i> -POX.....	100
FIGURA 12 –	Efeito de inibidores clássicos de peroxidases em geral sobre a atividade enzimática da <i>Mm</i> -POX.....	101
FIGURA 13 –	Capacidade da <i>Mm</i> -POX de utilizar diferentes substratos de peroxidases como doadores de prótons na reação com o H ₂ O ₂	102
FIGURA 14 –	Efeito do ácido salicílico (AS) sobre a atividade enzimática da <i>Mm</i> -POX.....	104

CAPÍTULO 4 - Ação da *Mm*-POX contra Fungos...

Página

FIGURA 1 –	Fotomicrografia em microscópio óptico da germinação de conídios de <i>F. oxysporum</i>	122
-------------------	--	------------

FIGURA 2 –	Fotomicrografia em microscópio óptico da germinação de conídios de <i>F. solani</i>	123
FIGURA 3 –	Efeitos da incubação da <i>Mm</i> -POX (0,2 µg/mL) sobre a viabilidade dos conídios de <i>F. oxysporum</i> e <i>F. solani</i>	124
FIGURA 4 –	Fotomicrografia em microscópio óptico de esporos de <i>F. oxysporum</i> previamente incubados com amostras testes, seguida da adição de iodeto de propídio (IP) 1 µM e incubação por 30 minutos.....	125
FIGURA 5 –	Fotomicrografia em microscópio óptico de esporos de <i>F. solani</i> previamente incubados com amostras testes, seguida da adição de iodeto de propídio (IP) 1 µM e incubação por 30 minutos.....	126
FIGURA 6 –	Fotomicrografia em microscópio óptico de conídios de <i>F. oxysporum</i> , previamente incubados com amostras testes, seguida da adição de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) 0,5 mg/mL e incubação por 1 hora.....	127
FIGURA 7 –	Fotomicrografia em microscópio óptico de conídios de <i>F. oxysporum</i> , previamente incubados com amostras testes, seguida da adição de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) 0,5 mg/mL e incubação por 1 hora.....	128

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1 - Fundamentação Teórica		Página
TABELA 1 –	Classificação das peroxidases pela União Internacional de Bioquímica.....	23
TABELA 2 –	Classificação das peroxidases.....	25
TABELA 3 –	Compostos químicos presentes no látex de vegetais..	35

CAPÍTULO 2 - <i>Mm</i>-POX: uma nova peroxidase...		Página
TABELA 1 –	Índice de purificação e rendimento da peroxidase presente no látex de <i>M. megalantha</i> (<i>Mm</i> -POX).....	66

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - Fundamentação Teórica		Página
1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
1.1	Peroxidases.....	22
1.1.1	<i>Classificação das peroxidases.....</i>	24
1.1.1.1	<i>Peroxidases de plantas classe III (POX).....</i>	27
1.2	Látex Vegetal.....	30
1.3	<i>Marsdenia megalantha.....</i>	34
2.	HIPÓTESE DE TRABALHO.....	38
CAPÍTULO 2 - <i>Mm</i> -POX: uma nova peroxidase...		Página
1.	INTRODUÇÃO.....	40
2.	OBJETIVOS.....	43
2.1	Geral.....	43
2.2	Específicos.....	43
3.	MATERIAIS.....	44
3.1	Material biológico.....	44
3.2	Reagentes e soluções.....	44
4.	METODOLOGIA.....	47
4.1	Coleta e processamento do látex.....	47
4.2.	Dosagem proteica.....	47
4.2.1	<i>Dosagem de proteínas por método colorimétrico.....</i>	47
4.2.2	<i>Dosagem de proteínas por absorvância de luz.....</i>	50
4.3	Atividade peroxidásica.....	50
4.3.1	<i>Determinação por ensaio colorimétrico.....</i>	50
4.3.2	<i>Detecção por zimograma.....</i>	51
4.4	Purificação de uma peroxidase presente no látex de <i>M. megalantha</i>	51
4.4.1	<i>Cromatografia de troca iônica em matriz de DEAE-Celulose.....</i>	51
4.4.2	<i>Cromatografia de exclusão molecular em matriz de Superose 12 HR 10/30, acoplada ao sistema de FPLC.....</i>	53
4.5	Caracterização físico-química e estrutural da peroxidase	

	purificada.....	53
4.5.1	<i>Determinação da massa molecular aparente.....</i>	53
4.5.2	<i>Determinação da massa molecular via filtração em gel....</i>	54
4.5.3	<i>Determinação do ponto isoelétrico.....</i>	54
4.5.4	<i>Obtenção do espectro de absorvância.....</i>	55
4.5.5	<i>Determinação de sequências de aminoácidos.....</i>	55
5.	RESULTADOS.....	57
5.1	Coleta e processamento do látex.....	57
5.2	Obtenção da peroxidase pura.....	57
5.3	Caracterização físico-química e estrutural da <i>Mm-POX</i>	61
6.	DISCUSSÃO.....	70
7.	CONCLUSÃO.....	75

CAPÍTULO 3 - Caracterização enzimática de...		Página
1.	INTRODUÇÃO.....	77
2.	OBJETIVOS.....	81
2.1	Geral.....	81
2.2	Específicos.....	81
3.	MATERIAIS.....	82
3.1	Reagentes.....	82
4.	METODOLOGIA.....	83
4.1	Determinação da atividade enzimática de <i>Mm-POX</i>	83
4.2	Determinação dos parâmetros cinéticos da <i>Mm-POX</i>	83
4.3	Avaliação da influência do pH na atividade enzimática da <i>Mm-POX</i>	83
4.4	Avaliação da influência da temperatura na atividade enzimática da <i>Mm-POX</i>	84
4.5	Avaliação da estabilidade térmica da <i>Mm-POX</i>	84
4.6	Avaliação da influência da concentração do tampão acetato de sódio na atividade enzimática da <i>Mm-POX</i>	84
4.7	Avaliação da influência de íons metálicos na atividade enzimática da <i>Mm-POX</i>	85
4.8	Investigação do efeito de inibidores de peroxidases em geral sobre a atividade enzimática da <i>Mm-POX</i>	85

4.9	Avaliação da capacidade da <i>Mm</i> -POX em utilizar outros compostos como substratos.....	85
4.10	Avaliação da influência do ácido salicílico sobre a atividade enzimática da <i>Mm</i> -POX.....	86
4.11	Análise estatística.....	86
5.	RESULTADOS.....	87
5.1	Parâmetros cinéticos da <i>Mm</i> -POX.....	87
5.1.1	Valores de K_m e V_{max} da <i>Mm</i> -POX com o guaiacol como substrato.....	87
5.1.2	Valores de K_m e V_{max} da <i>Mm</i> -POX com o peróxido de hidrogênio como substrato.....	87
5.2	Efeito do pH na atividade enzimática da <i>Mm</i> -POX.....	87
5.3	Efeito da temperatura na atividade enzimática da <i>Mm</i> -POX.....	91
5.4	Estabilidade térmica da atividade enzimática da <i>Mm</i> -POX.....	91
5.5	Efeito da concentração do tampão acetato de sódio na atividade enzimática da <i>Mm</i> -POX.....	94
5.6	Efeito da presença de íons metálicos na atividade enzimática da <i>Mm</i> -POX.....	94
5.7	Inibidores da atividade enzimática da <i>Mm</i> -POX.....	99
5.8	Potencial de interação da <i>Mm</i> -POX com diferentes substratos de peroxidases em geral.....	99
5.9	Influência do ácido salicílico sobre a atividade enzimática da <i>Mm</i> -POX.....	103
6.	DISCUSSÃO.....	105
7.	CONCLUSÃO.....	111

CAPÍTULO 4 - Ação da <i>Mm</i> -POX contra Fungos...		Página
1.	INTRODUÇÃO.....	113
2.	OBJETIVOS.....	116
2.1	Geral.....	116
2.2	Específicos.....	116
3.	MATERIAIS.....	117

3.1	Fungos.....	117
3.2	Reagentes.....	117
4.	METODOLOGIA.....	118
4.1	Cultivo dos fungos e obtenção dos conídios.....	118
4.2	Avaliação da ação da <i>Mm-POX</i> sobre a germinação dos conídios.....	118
4.3	Determinação da viabilidade conidial pós-tratamento com <i>Mm-POX</i>	119
4.4	Avaliação da permeabilidade da membrana dos conídios após incubação com a <i>Mm-POX</i>	119
4.5	Avaliação da indução da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) pela <i>Mm-POX</i>	120
5.	RESULTADOS.....	121
5.1	Ação antifúngica da <i>Mm-POX</i> sobre a germinação dos conídios.....	121
5.2	Viabilidade conidial pós-tratamento com a <i>Mm-POX</i>	121
5.3	Alteração da permeabilidade da membrana dos conídios causada pela <i>Mm-POX</i>	121
5.4	Produção de EROs em conídios induzida pela <i>Mm-POX</i> ..	121
6.	DISCUSSÃO.....	130
7.	CONCLUSÃO.....	134

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		Página
Referências.....		136

Capítulo 1



Fundamentação Teórica



1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Peroxidases

São classificadas como peroxidases, todas as heme-proteínas com a capacidade de utilizar moléculas de peróxido de hidrogênio para catalisar a oxidação de uma vasta gama de substratos orgânicos ou inorgânicos (BANCI, 1997). Como grupo prostético associado às peroxidases, pode ser destacada a presença de um grupo protoporfirínico IX (Ferriprotoporfirina IX) Ferro (III) (HAMID; REHMAN, 2009). Embora essa questão catalítica seja uma premissa para a classificação dessas proteínas, alguns parâmetros são extremamente variáveis para o grupo das peroxidases. A massa molecular das peroxidases pode variar de 30 para mais de 150 kDa, algo em torno de 200 a 800 resíduos de aminoácidos (BANCI, 1997; YOSHIDA *et al.*, 2002; HAMID; REHMAN, 2009). O termo peroxidase (EC 1.11.1.X) pode representar um grupo de enzimas específicas, como NADH peroxidase (EC 1.11.1.1), glutathiona peroxidase (EC 1.11.1.9), tireoide peroxidase (EC 1.11.1.8), assim como um vasto grupo de enzimas não específicas, conhecidas apenas como peroxidases (HAMID; REHMAN, 2009). Atualmente, existem cerca de 15 diferentes códigos EC descritos para as peroxidases: De EC 1.11.1.1 até EC 1.11.1.16, com a remoção do EC 1.11.1.4, como demonstrados na Tabela 1 (PASSARDI *et al.*, 2007). Algumas peroxidases também podem apresentar dualidade catalítica e, por conseguinte, foram classificadas com outras nomenclaturas, como EC 1.13.11.44, EC 1.14.99.1, EC 1.6.3.1 e EC 4.1.1.44 (TABELA 1). No entanto, muitas dessas enzimas ainda não receberam descrições específicas de EC e são enquadradas no grupo das EC 1.11.1.7 (PASSARDI *et al.*, 2007).

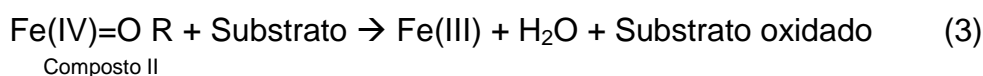
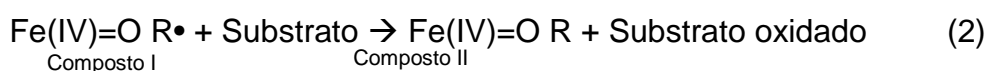
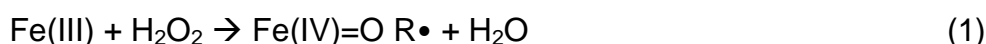
Atividade peroxidásica já foi descrita em plantas, animais e microrganismos e são amplamente relacionadas a diversos processos fisiológicos (HIRAGA *et al.*, 2001). Nas plantas, por exemplo, elas desempenham funções endógenas que incluem a remoção de peróxido, oxidação de compostos fenólicos (HAMID; REHMAN, 2009), catabolismo de auxinas, biossíntese e degradação de lignina na parede celular e respostas de defesa contra diversos patógenos (MANU; PRASADA; RAO, 2009).

TABELA 1 – Classificação das peroxidases pela União Internacional de Bioquímica

Número EC	Nome recomendado	Abreviação
EC 1.11.1.1	NADH peroxidase	NadPrx
EC 1.11.1.2	NADPH peroxidase	Sem sequencia determinada
EC 1.11.1.3	Ácido graxo peroxidase	Sem sequencia determinada (aDox?)
EC 1.13.11.11 (antigo EC 1.11.1.4)	2,3-Triptofano desoxigenase	Não mais considerada peroxidase
EC 1.11.1.5	Citocromo-c peroxidase	CcP, DiHCcP
EC 1.11.1.6	Catalase	Kat, CP
EC 1.11.1.7	Peroxidase	Heme peroxidases
EC 1.11.1.8	Iodo peroxidase	TPO
EC 1.11.1.9	Glutaciona peroxidase	GPx
EC 1.11.1.10	Cloreto peroxidase	HalPrx, HalNPrx, HalVPrx
EC 1.11.1.11	L-ascorbato peroxidase	APx
EC 1.11.1.12	Fosfolipídio hidroperóxido; glutaciona peroxidase	GPx
EC 1.11.1.13	Manganês peroxidase	MnP
EC 1.11.1.14	Lignina peroxidase	LiP
EC 1.11.1.15	Peroxiredoxina	1CysPrx, 2CysPrx, PrxII/V/, PrxGrx, PrxQ/BCP
EC 1.11.1.16	Versátil peroxidase	VP
EC 1.13.11.44	Linoleato diol sintase	LDS
EC 1.14.99.1	Prostaglandina endoperóxidase sintase	PGHS
EC 1.6.3.1	NAD(P)H oxidase	DuOx
EC 4.1.1.44	4-Carboximuconolactona descarboxilase	AhpD, CMD, CMDn, HCMD, HCMDn, DCMD, DCMDn, AlkyPrx, AlkyPrxn

Fonte: Adaptado de Passardi *et al.*, 2007.

O processo catalítico das peroxidases ocorre através de passos multireacionais, os quais envolvem, primeiramente, a reação do sítio ativo com o peróxido de hidrogênio. Nessa etapa, ocorre a redução do H₂O₂ para água, assim como a oxidação da proteína através de transferência de dois elétrons. Nesse momento, o estado da proteína é denominado de “Composto I”, onde é possível observar um centro oxiférico (Fe(IV)=O) e um radical cátion orgânico, localizado ou no grupo heme, ou no resíduo da proteína, dependendo da forma da isoenzima. Posteriormente, o “Composto I” oxida uma molécula de substrato (S), formando um radical do substrato específico, e o “Composto II”, que é a forma do radical cátion orgânico reduzido ao estado de repouso. Por fim, o “Composto II” é reduzido por uma segunda molécula de substrato para a forma de repouso do ferro (III) (POULOS, 1993; BANCI, 1997).



1.1.1 Classificação das peroxidases

Por serem um grupo de enzimas bastante abrangente e estarem presentes nas mais variadas formas de organismos vivos, as peroxidases foram classificadas com base na sua estrutura e nas propriedades catalíticas (HIRAGA *et al.*, 2001). Inicialmente, esse grupo é dividido em três superfamílias, consistindo das peroxidases de animais, catalases e peroxidases de plantas (TABELA 2).

A primeira superfamília, as peroxidases de animais, consiste de enzimas como a glutathiona peroxidase (EC 1.11.1.9), mieloperoxidase (EC 1.11.2.2), tireoide peroxidase (EC 1.11.1.8), eosinófilo peroxidase (EC 1.11.1.7), lactoperoxidase (EC 1.11.1.7) e uma região parcial da prostaglandina endoperoxidase sintase (EC 1.14.99.1). Embora a glutathiona peroxidase esteja aqui classificada como animal, sua atividade pode ser também detectada em plantas, bem como cDNAs codificando para essa enzima (HIRAGA *et al.*, 2001).

TABELA 2 – Classificação das peroxidases

Superfamília	Classe	Exemplo (numero EC)	Origem	Massa (kDa)
Peroxidase de animais		Eosinófilo peroxidase (EC 1.11.1.7)	Animal	50-75
		Lactoperoxidase (EC 1.11.1.7)	Animal	78-85
		Mieloperoxidase (EC 1.11.1.7)	Animal	79-150
		Tireoide peroxidase (EC 1.11.1.7)	Animal	90-110
		Glutathiona peroxidase (EC 1.11.1.9)	Animal e planta	6-22; 75-112
		Prostaglandina endoperóxido sintase (EC 1.14.99.1, partial)	Animal	115-140
		Catalase (EC 1.11.1.6)	Animal, planta e fungo	140-530
Peroxidase de plantas	I	Citocromo c peroxidase (EC 1.11.1.5)	Levedura e bactéria	32-63
		Catalase peroxidase (EC 1.11.1.6)	Bactéria e fungo	150-240
		Ascorbato peroxidase (EC 1.11.1.11)	Planta	30-58
	II	Manganês peroxidase (EC 1.11.1.13)	Fungo	43-49
		Ligninase (EC 1.11.1.14)	Fungo	40-43
	III	Peroxidase (EC 1.11.1.7) POX	Planta	28-60

Fonte: Adaptado de Hiraga *et al.*, 2001.

Já a segunda superfamília das peroxidases consiste das enzimas chamadas Catalases (EC 1.11.1.6) ou hidroperoxidases, que estão presentes em animais, plantas, fungos e bactérias. Estas enzimas são comumente encontradas nos peroxissomas em animais e plantas e, também, nos glioxissomas (apenas em plantas) e no citoplasma de procariontes (HIRAGA *et al.*, 2001; ŚCIBIOR; CZECZOT, 2006).

Entretanto, o foco do presente estudo está mais relacionado à terceira superfamília das peroxidases, ou peroxidases de plantas. Essa superfamília consiste de peroxidases presentes em plantas, fungos filamentosos, leveduras e bactérias (HIRAGA *et al.*, 2001). Essa superfamília de peroxidases pode ser subdividida em três classes distintas, agrupadas assim devido a similaridades nas sequencias de aminoácidos (TABELA 2). Essa divisão se faz necessária devido à grande gama de variações presentes nesse grupo, entre enzimas que não guardam muita semelhança genética, mesmo que em muitos casos as atividades catalíticas sejam parecidas. A sequencia de aminoácidos dos membros dessa superfamília mostrou ser extremamente variável, com menos de 20% de similaridade nos casos mais divergentes, além de não serem necessariamente encontradas em plantas (O'BRIEN, 2000; HIRAGA *et al.*, 2001; HAMID; REHMAN, 2009).

Dessa forma, são definidas como peroxidases de planta classe I algumas enzimas específicas, incluindo as peroxidases de vários procariontes, citocromos c peroxidase (EC 1.11.1.5) de leveduras e as ascorbato peroxidases (EC 1.11.1.11), normalmente consideradas as menores peroxidases encontradas, com cerca de 250 resíduos de aminoácidos (O'BRIEN, 2000). Enzimas, como as peroxidases de lignina extracelular e as fúngicas manganês (Mn) dependentes, constituem outro grupo de peroxidases, as de classe II. Na classe III, estão principalmente as peroxidases extracelulares e vacuolares de plantas (O'BRIEN, 2000; HIRAGA *et al.*, 2001; JOHRI *et al.*, 2005; PASSARDI *et al.*, 2007).

Quando comparados os sítios ativos de peroxidases, como mieloperoxidases e citocromo c peroxidase (superfamília de peroxidases de animais e plantas, respectivamente), pode ser constatado que embora ambas possuam uma arquitetura estrutural bastante similar, as sequencias primárias, bem como as

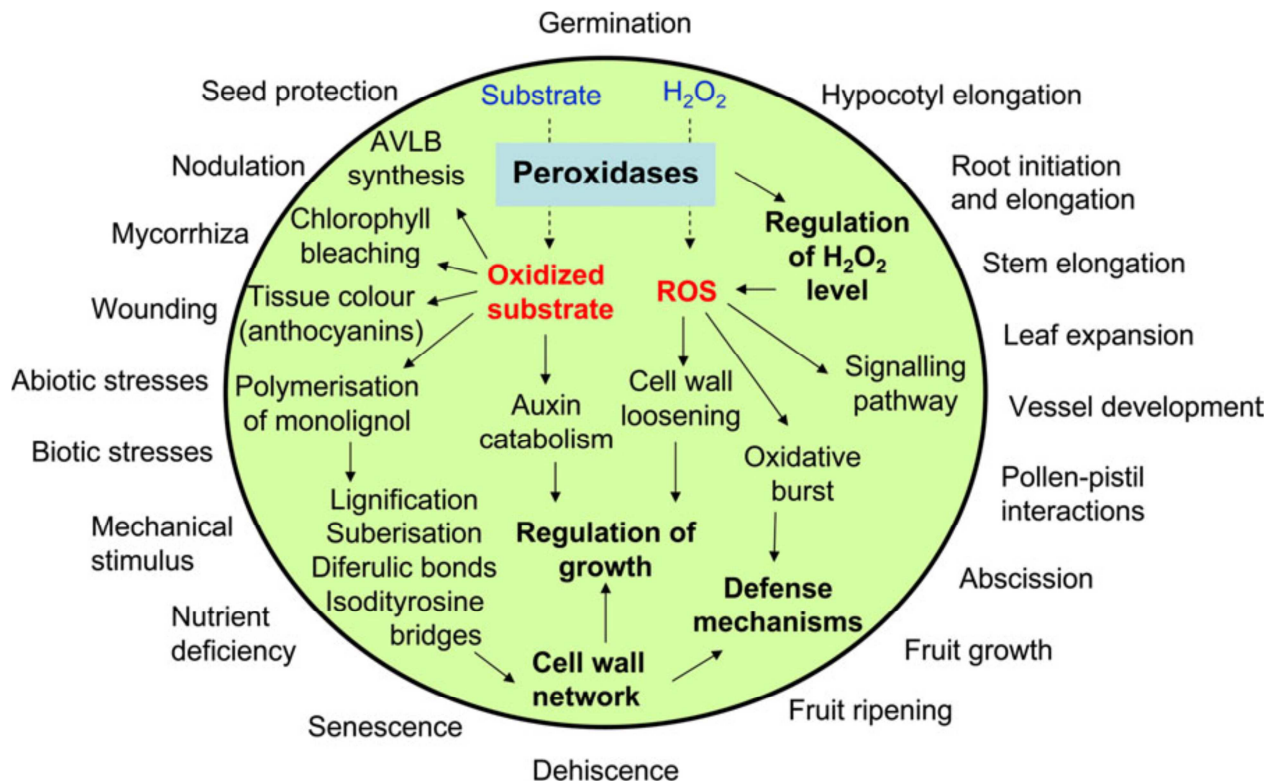
estruturas tridimensionais dessas proteínas são bastante diferentes, implicando que os genes dessas superfamílias evoluíram de ancestrais genéticos distintos (TAUROG, 1999; O'BRIEN, 2000).

1.1.1.1 Peroxidases de plantas classe III (POX)

As peroxidases classe III (POX) são um grupo de enzimas relacionadas à secreção celular que catalisam a redução do H_2O_2 em H_2O , tal qual as outras peroxidases, com a utilização de diversos substratos (compostos fenólicos, alcaloides, auxinas, guaiacol etc). Essas enzimas são comumente secretadas para o apoplasto, parede celular ou mesmo vacúolos, onde estão envolvidas em vários processos fisiológicos durante o ciclo de vida das plantas, incluindo respostas a estresses bióticos ou abióticos, catabolismo das auxinas, lignificação, metabolismo da parede celular, depleção do excesso ou produção de EROs (espécies reativas de oxigênio), oxidação de dejetos tóxicos, entre outros (FIGURA 1) (BAKALOVIC *et al.*, 2006; COSIO; DUNAND, 2009; ZIPOR; SHAMIR, 2013). Sua importância nas plantas é bastante evidente, pois praticamente todas as espécies apresentam algum tipo de POX em seu arsenal enzimático, sendo particularmente numerosa a quantidade de genes codificantes para essas enzimas em angiospermas (BAKALOVIC *et al.*, 2006; ZIPOR; SHAMIR, 2013).

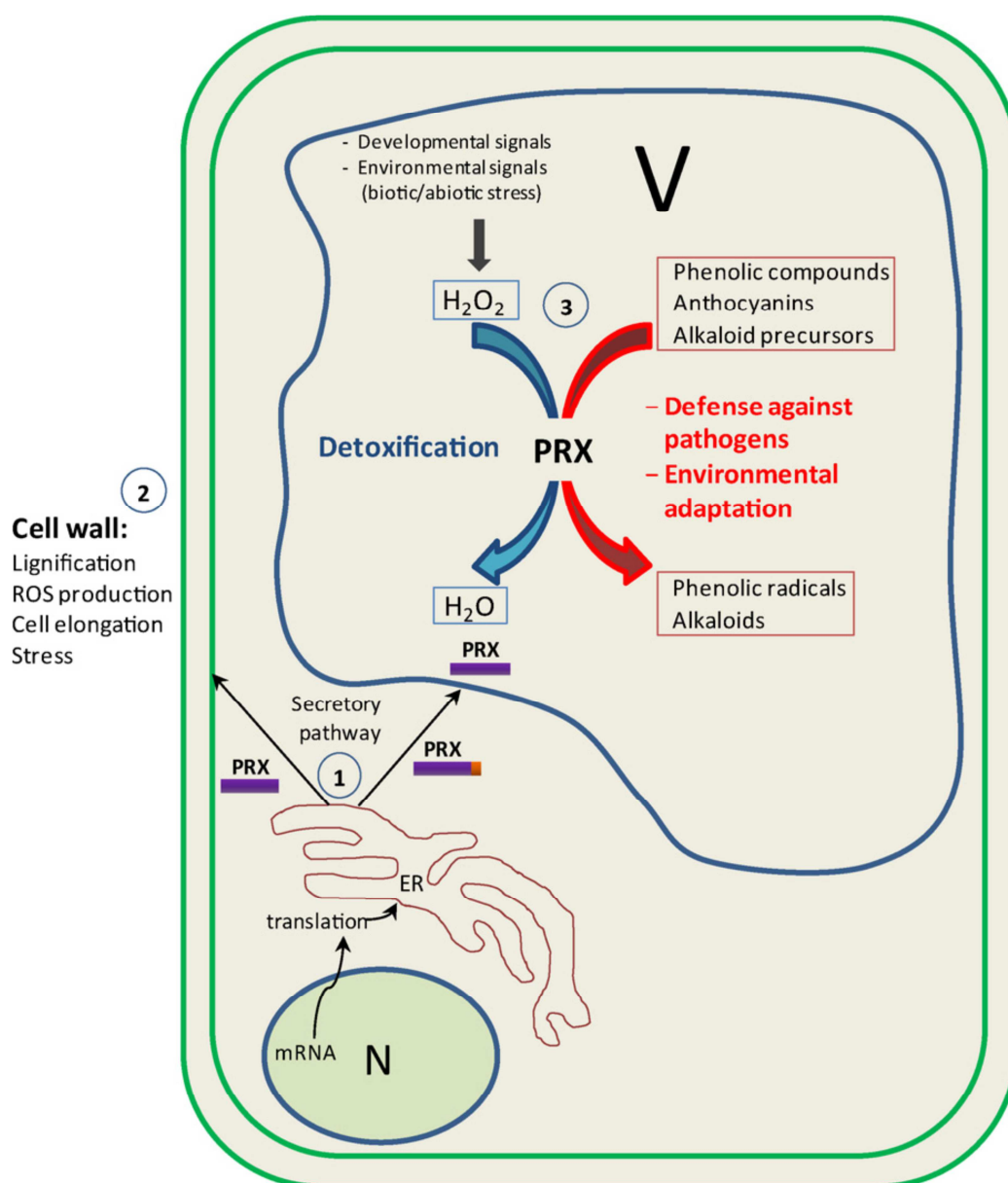
Geralmente as POX apresentam íons Ca^{2+} estruturantes (essenciais para sua atividade catalítica), pontes dissulfetos, com alguns resíduos de cisteínas bem conservados, e são amplamente descritas por apresentarem muitas glicosilações (BANCI, 1997; O'BRIEN, 2000; HIRAGA *et al.*, 2001). O direcionamento dessas proteínas para seus destinos finais (parede celular, apoplasto ou vacúolo) ocorre via retículo endoplasmático onde, durante esse processo, acontecem também as etapas de glicosilação, essenciais para o funcionamento dessas proteínas. Ao chegarem ao seu destino final, especialmente nos vacúolos, essas enzimas irão atuar de acordo com suas mais variadas funções (ZIPOR; SHAMIR, 2013). A Figura 2 destaca as possíveis atuações das POX, após a secreção ou vacuolização.

FIGURA 1 - Rotas metabólicas e processos fisiológicos envolvendo a participação das peroxidases.



Fonte: Cosio; Dunand, 2009

FIGURA 2 – Endereçamento funcional das POXs (PRX) via retículo endoplasmático (1). O destino final dessas enzimas é a parede celular (2) ou o vacúolo (3), onde suas atividades estão envolvidas na depleção de excessos de H_2O_2 , oxidação de compostos fenólicos, antocianinas ou precursores de alcaloides para formar compostos envolvidos na resistência a patógenos.



Fonte: Zipor; Shamir, 2013.

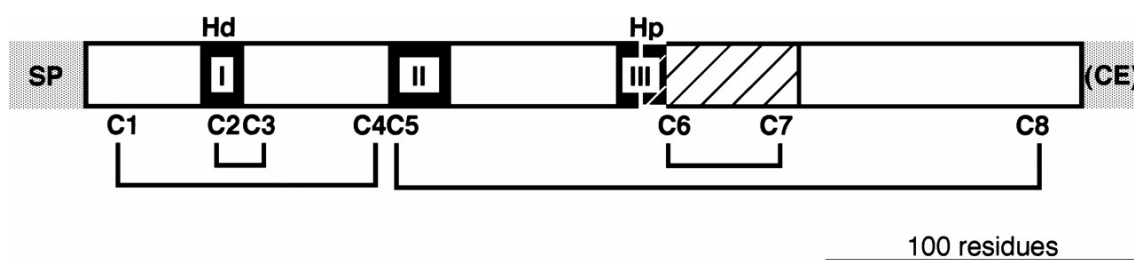
Já foi descrito anteriormente que uma mesma espécie vegetal pode apresentar diversos genes codificando para diferentes tipos de POX. Além disso, mesmo para uma determinada peroxidase específica, a quantidade de isoformas presentes no mesmo organismo pode ser bastante elevada, podendo ocasionar diferenças de pontos isoelétricos e/ou massa molecular expressivas. Com exceção das POXs, nenhum outro grupo de peroxidases (oriundas de plantas ou não) apresentam tantas isoformas (HIRAGA *et al.*, 2001). Outro aspecto importante é que, quando comparadas POXs diferentes de um mesmo organismo, o percentual de identidade na sequência de aminoácidos pode ficar abaixo de 40%. Entretanto, essa similaridade pode ser bem mais elevada, podendo chegar até 90%, quando comparadas POXs similares de espécies vegetais próximas (HIRAGA *et al.*, 2001).

Nas peroxidases de planta classe III, é possível constatar a presença de três domínios proteicos bastante conservados, sendo um na porção distal ao sítio de ligação heme (I), outro numa porção central (II) com funções ainda não bem compreendidas e, por último, um na porção proximal ao sítio de ligação heme (III) (FIGURA 3). Além dos três domínios citados, existe uma região pós-sítio de ligação proximal ao grupamento heme (III) que também merece destaque, por estar relacionada ao sítio catalítico em diversas POXs e à especificidade enzimática (HIRAGA *et al.*, 2001; COSIO; DUNAND, 2009). No entanto, apesar das informações significativas sobre sua estrutura catalítica *in vitro*, pouco se sabe como essas enzimas, de fato, participam dos processos fisiológicos *in vivo*, requerendo estudos mais aprofundados nesse contexto (VEITCH, 2004; ZIPOR; SHAMIR, 2013).

1.2 Látex Vegetal

O termo látex é amplamente usado para descrever o líquido de aspecto leitoso, presente em determinados grupos taxonômicos de plantas. Aproximadamente, 20 mil espécies pertencentes a mais de 40 famílias possuem laticíferos, isto é, 8,9% de todas as angiospermas conhecidas (EVERT, 2006; KONNO, 2011). Este fluido é liberado após algum tipo de injúria física (KEKWICK, 2001).

FIGURA 3 – Estruturação dos domínios proteicos das POXs em geral. O peptídeo sinal N-terminal (SP) e a extensão C-terminal (CE) estão indicados nas porções em cinza. Apenas as peroxidases vacuolares contêm a porção CE. As marcações numeradas indicam a porção distal e proximal ao sítio de ligação heme (I e III, respectivamente) e uma porção central conservada de função ainda não definida (II). Em hachurado, destaca-se uma região de extrema importância relacionada à especificidade das POXs. Os resíduos de cisteína conservados estão representados de forma numerada, de acordo com a proximidade à porção N-terminal.



Fonte: Hiraga *et al.* (2001)

Essa mistura leitosa é composta de uma suspensão e/ou solução de várias substâncias de diferentes composições químicas, bem como de “restos” celulares (SOEDJANAATMADJA; SUBROTO; BEINTEMA, 1995). Dentre os constituintes celulares presentes na maioria dos látex, destacam-se as mitocôndrias, partículas ribossômicas, núcleos e análogos lisossômicos. Aglomerados de baixa densidade, compostos por diversas enzimas, terpenos, alcalóides, vitaminas, carboidratos, lipídios e aminoácidos livres estão entre os componentes químicos presentes no látex, variando seu teor de acordo com a espécie estudada (MORCELLE; CAFFINI; PRIOLO, 2004; EVERT, 2006; WITITSUWANNAKUL *et al.*, 2008 a,b). Geralmente, metabólitos específicos presentes no látex são compostos bioquímicos derivados do metabolismo primário, que não são reaproveitados pelas células (HAGEL; YEUNG; FACCHINI, 2008). Por vezes, muitos desses produtos são citotóxicos, sugerindo a participação dos laticíferos no sequestro desses compostos, independentemente dos tecidos vasculares (McKEY, 1979).

Embora o látex, na maioria das vezes, apresente aspecto leitoso, este também pode apresentar uma coloração amarelada ou alaranjada como em plantas pertencentes à família Papaveraceae, marrom-amarelado em plantas do gênero *Cannabis*, esverdeado ou ciano na espécie *Sebertia acuminata* ou pode ser límpido como em *Nerium oleander* (KEKWICK, 2001; CALLAHAN *et al.*, 2008; KONNO, 2011). O látex é secretado por estruturas especializadas, que são compostas por uma única célula ou um enfileirado de células, chamadas de laticíferos. A disposição estrutural, dos laticíferos pode muito bem explicar a dificuldade de extração de látex em algumas plantas, enquanto que em outras, a liberação do látex é copiosa. A presença de laticíferos pode ocorrer em todos os órgãos da planta ou apenas estar restrita a alguns deles. Caule (*Hevea brasiliensis*), tubérculos (*Manihot glaziovii*), folhas (*Calotropis procera*), galhos (*Plumeria rubra*) ou fruto (*Achras sapota*, *Carica papaya*) podem ser bons provedores de tal fluido (ARAÚJO, 2013). A extração de látex de *H. brasiliensis* (a seringueira) ocorre através de incisões realizadas em seu tronco, porém esse processo de coleta não é igual para todas as espécies.

Devido ao armazenamento sob alta pressão, os laticíferos ao sofrerem qualquer tipo de injúria jorram todo o seu conteúdo citoplasmático (BERNAYS; CHAPMAN, 1994), que apresenta ação tanto “cicatrizante” quanto de defesa para o

vegetal (KEKWICK, 2001; KONNO 2011). Dentro dessa última proposta, o látex pode funcionar como barreira física, impedindo a entrada de bactérias e fungos fitopatogênicos pelos locais que sofrem injúrias, bem como exercer uma ação química, com efeitos antimicrobianos devido a determinados compostos presentes em sua constituição (KEKWICK, 2001). Outro ponto relevante está relacionado à ação coagulante seladora desse fluido que, em alguns casos, pode funcionar como um aprisionador de insetos ou pequenos invertebrados, impedindo a predação (MOURSY, 1997; KONNO, 2011).

O látex de *H. brasiliensis*, sem dúvida, é o mais estudado, principalmente devido à sua grande importância econômica na produção de borracha e seus derivados. Os fatores alergênicos de proteínas presentes no látex de *H. brasiliensis* também são impulsores de estudos acerca desse material biológico, conduzindo à identificação e purificação, bem como a caracterização bioquímica destas moléculas (D'AMATO *et al.*, 2010). Entretanto, é importante destacar o grande interesse científico nas proteínas do látex de *C. procera*, devido, principalmente, às suas inúmeras atividades biológicas, podendo ser destacados os efeitos relacionados com a proteção gástrica a úlceras em ratos (BHARTI; WAHANE; KUMAR, 2010) e a prevenção de choque séptico decorrente de infecções com *Salmonella sp.* em condições laboratoriais (LIMA-FILHO *et al.*, 2010). Existem ainda relatos de inúmeras outras atividades biológicas associadas ao látex de diferentes grupos taxonômicos.

Dentre os diferentes componentes químicos presentes nos laticíferos, sobressaem-se as proteínas, algumas delas constituindo-se em macromoléculas específicas (HAGEL; YEUNG; FACCHINI, 2008; WASANO *et al.*, 2009; KONNO, 2011). Apesar da grande maioria desses componentes proteicos ainda não ter sua função ou mesmo identidade descoberta, proteínas com atividades enzimáticas foram descritas em diversos látex, compreendendo glicosidases, proteases, fosfatases ácidas, amilases, quitinases, inibidores de proteases, β -1,3-glucanases etc (PEREIRA *et al.*, 1999; VAN DER HOORN; JONES, 2004; DOMSALLA; MELZING, 2008).

Quanto à sua atuação na defesa de plantas, a participação de proteínas laticíferas é bastante evidente. CpOsm, uma osmotina purificada do látex de *C. procera*, se mostrou bastante estável e ativa contra fungos fitopatogênicos, causando uma desestabilização da membrana celular (FREITAS *et al.*, 2011). Nesse mesmo contexto, mulatexina (MLX56), obtida do látex da amoreira (*Morus spp.*), foi caracterizada como uma proteína do tipo heveína, exibindo excelente atividade tóxica frente a lagartas do bicho-da-seda (*Bombyx mori*) (WASANO *et al.*, 2009). Outras proteínas, como a Ca^{2+} /peroxidase ligante à calmodulina, do látex de *Euphorbia charicas* (MURA *et al.*, 2005), e a aleno oxido sintase de *H. brasiliensis* (NORTON *et al.*, 2007), parecem estar relacionadas à cascata de sinalização estresse-induzido nas plantas, revelando o caráter participativo dessas estruturas na fisiologia e homeostase vegetal.

A Tabela 3 exemplifica os diversos tipos de compostos químicos presentes nos mais variados tipos de látex.

1.3 *Marsdenia megalantha*

Marsdenia megalantha (GOYDER; MORILLO, 1994) (FIGURA 4) pertence à família Apocynaceae, sendo um subarbusto perene, semisuculento, que produz um látex leitoso em vários de seus órgãos. Essa planta pode atingir cerca de 60 cm de altura e apresenta raízes espessas e carnosas, que se espalham lateralmente sobre a superfície de rochas em pequenas porções de terras (GOYDER; MORILLO, 1994). Essa espécie, foi primeiramente descrita como vivendo sobre rochas graníticas, a cerca de 425 m de altitude, no interior do estado da Bahia, Brasil. Porém, essa planta é característica de ambientes com estacionalidade de chuvas e, também, foi encontrada em outros pontos do bioma da caatinga, como por exemplo no município de Caicó-RN (OLIVEIRA, 2011) e sobre os monólitos da região de Quixadá, município do estado do Ceará, Brasil (OLIVEIRA, 2002). Essa última região é caracterizada por apresentar chuvas concentradas nos períodos de novembro ou dezembro até o final de março.

Tabela 3 – Compostos químicos presentes no látex de vegetais.

Categoria	Composto químico	Nome específico/abrangência
Metabólitos secundários	Alcaloides	Morfina (<i>Papaver somniferum</i>); Chelidonina, Sanguinarina, Copticina (<i>Chelidonium majus</i>); Lobelina (<i>Lobelia cardinalis</i>); Alcaloides doces, D-AB1, DNJ, entre outros (<i>Morus spp.</i>); Alcaloides fenantrolizidinos (<i>Ficus spp.</i>)
	Terpenoides	Lacticina, Lactucopricrina, Letucina A (<i>Lactuca spp.</i>); Forbol (<i>Euphorbia spp.</i>)
	Cardenolídeos	Voruscharina, Ushcharidina, Usharina, Calotropagenina (Apocynaceae); Toxicariosídeos (<i>Antiaris toxicaria</i>)
	Borracha	Isopreno (polímero cis-1,4-isopreno) (euphorbiaceae; Moraceae; Apocynaceae; Asteraceae)
	Fenóis	Ácido p-cumárico – Hexadecil, octadecil, Esteres eicosíls (Convolvulaceae); Urushiol (<i>Rhus spp.</i>)
	Furanocumarinos	Bergapetno, Xantotoxina, Angelina (Apiaceae)
Proteínas	Proteases	Cisteínicas (Caricaceae, Moraceae, Apocynaceae, Anacardiaceae); Serínica (Moraceae, Euphorbiaceae, Apocynaceae, Convolvulaceae, Anacardiaceae)
	Inibidores de proteases	Inibidores: Cisteínicos (Apocynaceae, Curcubitaceae); Serínicos (Moraceae, Caricaceae, Euphorbiaceae, Curcubitaceae); Aspárticos (Curcubitaceae)
	Oxidase	Polifenol oxidase (Euphorbiaceae, Asteraceae, Anacardiaceae); Peroxidase (Moraceae, Convolvulaceae, Asreraceae, Anacardiaceae); Lipoxigenase (<i>Curcubita maxima</i>)
	Lectinas, Proteínas ligantes à quitina (PLQ) e quitinases	Lectinas (Euphorbiaceae); PLQ (Euphorbiaceae, Moraceae, Curcubitaceae); Quitinases (Apocynaceae, Moraceae)
	Outras	Lipases (Euphorbiaceae, Apocynaceae, Caricaceae); Glutamina ciclase (Caricaceae); Glicoproteína de goma arábica (Fabaceae); Fenil alanina amônia liase (Asteraceae); Fosfatases (Euphorbiaceae); Glicosídates (Euphorbiaceae)

Fonte: Adaptado de Konno, 2011.

FIGURA 4 - Exsicata de *M. megalantha*.

Fonte: Missouri Botanical Garden, 2006.

Apesar dos diversos relatos, pela população local onde a *M. megalantha* é encontrada, da alta toxicidade dessa espécie para bovinos e caprinos, apenas mais recentemente é que registros científicos a esse respeito foram disponibilizados.

Pessoa *et al.* (2011) destacaram os efeitos clínicos oriundos da intoxicação por essa espécie, os quais incluem ataxia, tremores musculares, cólicas e, eventualmente, a morte em algumas horas de evolução clínica. Uma avaliação mais recente dos efeitos da *M. megalantha*, envolvendo cabras, bezerros, ovelhas e porcos, mostrou a ocorrência de edema cerebral, hérnia tentorial e morte neuronal nas regiões frontal, temporal, parietal e nos lobos occipitais, tanto cerebral como cerebelar (GERALDO NETO *et al.*, 2013). O fato é que, o(s) composto(s) responsável(is) pela toxicidade de *M. megalantha* ainda não é(são) conhecido(s), mesmo sendo bastante especulada a participação de esteroides glicosídicos similares a cinancosídeos, como efetores reais das patologias apresentadas pelos animais envenenados (PESSOA *et al.*, 2011). Contudo, Geraldo Neto *et al.* (2013) não identificaram a presença de tais compostos nessa espécie vegetal, concluindo que a *M. megalantha* não deve ser classificada como exemplo de planta cianogênica.

Outras atividades detectadas no extrato aquoso de *M. megalantha* vêm sendo investigadas. Oliveira (2011) avaliou as propriedades anticoagulante, antioxidante e antiproliferativa de extratos aquosos de folhas, caules e raízes de *M. megalantha*, tendo observado o potencial desses materiais na obtenção de fármacos antioxidantes e antitumorais. O látex de *M. megalantha* também vem sendo estudado como repositório de proteínas relacionadas à defesa vegetal. Oliveira (2006) observou no látex de *M. megalantha* atividades enzimáticas vinculadas a proteínas envolvidas na defesa vegetal. Posteriormente, foi detectada atividade antifúngica, associada a diversas atividades enzimáticas, em frações proteicas desse látex (OLIVEIRA, 2009). Há, também, estudos sobre a anatomia dessa planta, relacionados à formação e estruturação do seu floema e xilema, bem como ao modelo anatômico de seus laticíferos (LOPES, 2004). Sem dúvida, um dos grandes destaques dessa espécie é a presença de laticíferos. Essas estruturas estão ligadas a adaptações ecológicas dessa espécie, pois mesmo em ambientes de extrema

escassez hídrica, ainda perpetua a produção de látex e a sua distribuição por toda a planta que, muitas vezes, permanece verde e suculenta, promovendo a atração de ruminantes nos períodos de estiagem (GOYDER; MORILLO, 1994; PESSOA *et al.*, 2011).

Outro enfoque de maior evidência no estudo dessa espécie está centrado na sistemática e biogeografia, visando à compreensão da relação dessa espécie com seus pares (OLIVEIRA, 2011).

2. HIPÓTESE DE TRABALHO

É creditado ao látex de plantas, a função de defesa contra herbívoros e patógenos, tendo as proteínas uma participação importante nesse papel. Assim, é provável que peroxidases integrantes do arsenal proteico do látex de *M. megalantha* tenham uma atuação relevante nesse processo, apresentando, inclusive, potencial uso na defesa contra fitopatógenos de relevância agrícola.

Com base na hipótese apresentada, nos próximos capítulos, serão abordadas a purificação, caracterização bioquímica e atividade antifúngica de uma nova peroxidase de plantas classe III (POX), obtida do látex de *M. megalantha*. Esse estudo irá discorrer sobre a obtenção dessa molécula a partir de exsudados laticíferos, alcançando sua purificação e posterior caracterização estrutural e enzimática. A ação da POX sobre fungos fitopatogênicos também será descrita, contribuindo para o conhecimento da participação das peroxidases na defesa de plantas e agregando valor biotecnológico à enzima em estudo, ao mesmo tempo, que trará contribuições significativas para o conhecimento científico da *M. megalantha*, uma espécie que é pouco estudada e exclusiva do bioma caatinga.

Capítulo 2



Mm-POX: uma nova peroxidase do látex de Marsdenia megalantha



1. INTRODUÇÃO

Estudos prévios, realizados por nosso grupo de pesquisa, mostraram ser o látex de *M. megalantha* um excelente repositório de proteínas com atividade contra fungos fitopatogênicos, com potencial de utilização na agronomia. Oliveira (2006), com foco na prospecção de proteínas relacionadas à defesa vegetal, detectou, no látex, a presença de quitinases, proteases, peroxidases. Posteriormente, Oliveira (2009) prosseguiu com a purificação parcial de tais enzimas, tendo sugerido a associação de várias dessas atividades enzimáticas presentes em frações proteicas à ação contra fungos fitopatogênicos. No presente trabalho, ênfase foi dada a atividade peroxidásica, buscando a purificação e caracterização da proteína.

As peroxidases são amplamente utilizadas em vários contextos biotecnológicos, ecológicos, industriais, bem como no ensino. Um bom exemplo é a utilização de peroxidases de plantas ou microrganismos como agente degradante de uma gama de poluentes orgânicos, como corantes de tecidos (SONGULASHVILI *et al.*, 2007; BOUCHERIT; ABOUSEOUD; ADOUR, 2013; SILVA *et al.*, 2013). A utilização dessas enzimas como método de descoloração é muito atrativa devido a impactos mínimos no ecossistema (MICHNIEWICZ *et al.*, 2008). Recentemente, na produção de tecidos, foi acoplada a horseradish peroxidase (HRP) em algodão, com vistas à sua atuação como filtros, proporcionando o escoamento de resíduos industriais com um prévio tratamento (MOHAMED; DARWISH; EL-SHISHTAWY, 2013). Outra propriedade relevante das peroxidases é a sua alta solubilidade mesmo em águas contaminadas (AITKEN, 1993; BOUCHERIT; ABOUSEOUD; ADOUR, 2013). Uma vantagem também é que estas enzimas são raramente inibidas por substâncias tóxicas presentes nas águas contaminadas, capazes de debilitar a vida dos organismos que lá habitam (HAMID; REHMAN, 2009). No ramo alimentício, também é bastante descrito o uso dessas enzimas, as quais podem ser empregadas no tratamento de resíduos orgânicos nas linhas de produções, representando uma forma ecológica de processamento dos materiais fibrosos e lignificados (SONGULASHVILI *et al.*, 2007). Peroxidases são ainda utilizadas com diversas finalidades experimentais, incluindo técnicas de Western blot, ELISA, entre outras (HAMID; REHMAN, 2009). Adicionalmente, dada à atividade catalítica de

peroxidases e a sua versatilidade de substratos, peroxidases podem ser utilizadas na produção guiada de biomoléculas em geral, compilando ligações cruzadas em modelos homogêneos ou heterogêneos de moléculas (SALVACHUA *et al.*, 2013).

Quando destacadas as propriedades das peroxidases de plantas, pode ser evidenciado o seu importante papel na homeostase celular, sendo atribuído a essas enzimas participação no metabolismo primário e secundário, seja na eliminação do excesso de peróxidos, na lignificação da parede celular de plantas, oxidação de compostos tóxicos, sinalização hormonal e celular, catabolismo do IAA (ácido indol acético), biosíntese de etileno ou, até mesmo, envolvimento na defesa vegetal (JOHRI *et al.*, 2005; ALMAGRO *et al.*, 2009).

É possível que o amplo espectro de atuação das peroxidases esteja relacionado ao elevado número de isoformas (isoenzimas), associado à sua grande versatilidade de catálise enzimática (ALMAGRO *et al.*, 2009). Essa complexidade se tornou mais evidente após a elucidação e decodificação do código genético de *Arabidopsis*, para o qual foram estimados mais de 100 genes completos de peroxidases, todos apresentando grandes similaridades de sequências e, aparentemente, codificando enzimas estáveis (TOGNOLLI *et al.*, 2002; WELINDER *et al.*, 2002). Essa informação permite inferir que cada espécie vegetal apresenta uma gama de isoformas de peroxidases, que podem ter diversas funções. Entretanto, para a elucidação legítima das funções das peroxidases nas plantas, uma das alternativas mais viáveis é a sua purificação, procedida por estudos acerca de seu papel fisiológico.

Já é conhecido, há bastante tempo, que o látex vegetal é uma fonte de proteínas com atividade peroxidásica, podendo ser citados, como exemplos, as peroxidases presentes no látex de *Euphorbia characias* (FLORIS; MEDDA; RINALDI, 1984) e de *Hevea brasiliensis* (WITITSUWANNAK *et al.*, 1997). Aliás, esses estudos despontaram como precursores na proposição de látex vegetal como repositório de moléculas bioativas, principalmente no que diz respeito à presença de peroxidases. Entretanto, a ocorrência de peroxidases é verificada em diversos outros látex vegetais, incluindo diversas espécies das famílias Euphorbiaceae, Moraceae e Anacardiaceae (AGRAWAL; KONNO, 2009), *Calotropis procera* (FREITAS *et al.*,

2007), *Carica papaya* (CHEN; CHUNG; CHANG *et al.*, 2012), entre outras. Nesse contexto, a presença de atividade peroxidásica no látex de *M. megalantha* não deve ser ignorada. Oliveira (2009) observou a existência de peroxidases com propriedades distintas nesse fluido, porém nenhuma dessas enzimas foi purificada. Assim, estudos com foco na purificação e caracterização de peroxidases são importantes de modo a contribuir para o entendimento de seu papel fisiológico e potencial biotecnológico.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

- Purificar e caracterizar físico-química e estruturalmente uma peroxidase classe III presente no látex de *M. megalantha*.

2.2 Específicos

- Estabelecer um protocolo de purificação para uma peroxidase previamente detectada no látex de *M. megalantha*;
- Obter dados da atividade específica e do rendimento dessa enzima em relação às proteínas totais do látex de *M. megalantha*;
- Caracterizar essa enzima, particularmente quanto a sua massa molecular e ao seu ponto isoelétrico;
- Obter dados da sequência de aminoácidos das regiões N-terminal e internas da peroxidase purificada.

Através da obtenção da peroxidase pura e do conhecimento de seus parâmetros estruturais, espera-se classificar essa enzima adequadamente e caracterizar sua atividade catalítica, bem como investigar sua ação contra fungos fitopatogênicos.

3. MATERIAIS

3.1 Material biológico

Espécimes vivos de *M. megalantha* (GOYDER; MORILLO, 1994) foram encontrados crescendo sobre monólitos do município de Quixadá, Ceará – Brasil, que foram usados para coleta do látex (FIGURA 1).

A classificação taxonômica dessa espécie, de acordo com o “Missouri Botanical Garden – MoBOT”, é dada como:

Reino: Plantae

Sub-Reino: Tracheobionta

Divisao: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Ordem: Gentianales

Família: Apocynaceae

Gênero: *Marsdenia*

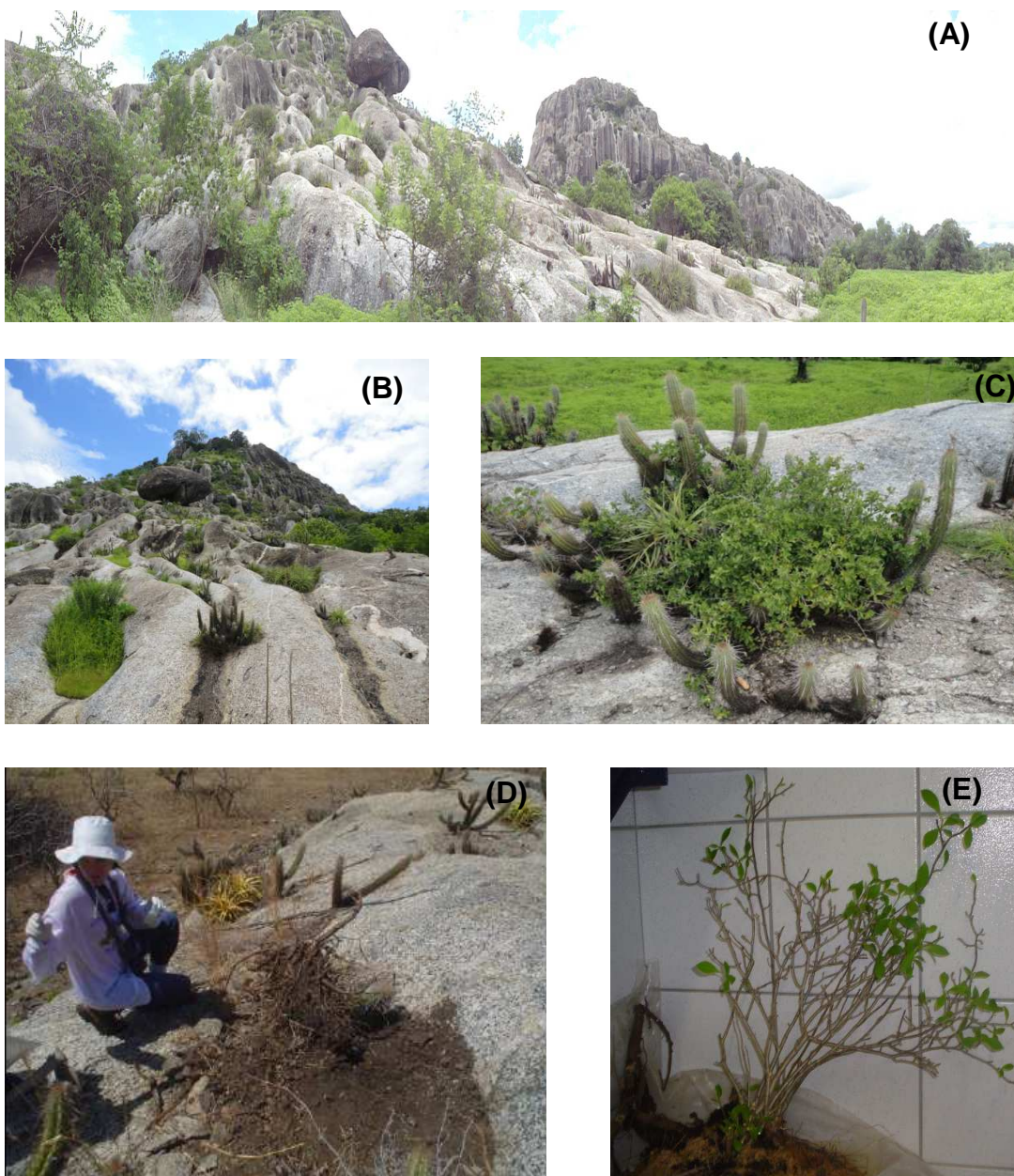
Espécie: *Marsdenia megalantha*

3.2 Reagentes e soluções

Os reagentes utilizados na purificação da peroxidase, análises eletroforéticas e outras atividades estão citados a seguir:

Acetonitrila, acrilamida, *N,N'*-metileno bisacrilamida, “Coomassie Brilliant Blue” (G e R) 250, nitrato de prata, ditioneitol (DTT), membrana de difluoreto polivinilideno (PVDF), marcadores de massa molecular (“bench mark pre-stained protein ladder), 2-metoxifenol (guaiacol) 3-amino-9-etil-carbazole, persulfato de

FIGURA 1 – *M. megalantha*: Ocorrência e espécime utilizada para coleta do látex. (A, B e C) - Monólitos localizados no município de Quixadá, CE, Brasil. (D e E) - Coleta de um indivíduo para obtenção do látex.



Fonte: Elaborada pelo autor.

amônio, *N,N,N',N'*-tetrametiletenodiamina (TEMED) foram obtidos da Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA ou Invitrogen, Carlsbad, EUA.

β -mercaptoetanol e dodecil sulfato de sódio (SDS) foram obtidos da Merck, Darmstadt, Alemanha. Os reagentes utilizados para análise da sequência N-terminal foram adquiridos da Wako Pure Chemicals Industries, Osaka, Japão.

As matrizes cromatográficas de DEAE-Celulose e Superose-12 HR 10/30 foram obtidas da GE HealthCare, Uppsala, Suécia.

Os demais reagentes foram de grau analítico e obtidos comercialmente.

4. METODOLOGIA

4.1 Coleta e processamento do látex

A exsudação do látex foi promovida através de incisões no caule e raiz da planta, após terem sido lavados com água corrente, solução de hipoclorito de sódio a 5%, por 5 minutos e, em seguida, água destilada, em 5 ciclos de 2 minutos. A coleta foi realizada com auxílio de seringas descartáveis de 1 mL, contendo pequenas alíquotas, cerca de 50 μ L do tampão Tris-HCl 0,05 M, contendo NaCl 0,15 M, pH 8,0 (FIGURA 2). Esse material foi, então, submetido a um processamento com a finalidade de separar a borracha, realizado de acordo com a metodologia descrita por Freitas (2004), adaptada por Oliveira (2006), como mostrada na Figura 3. Cerca de 1 mL do látex coletado, de aspecto leitoso e denso, foi centrifugado a 10.000 x g, 10 minutos, 25 °C. O precipitado obtido (borracha) foi descartado e o sobrenadante submetido à diálise exaustiva contra água destilada (*cut-off* 12 kDa). O material dialisado foi novamente centrifugado sob as mesmas condições descritas. O precipitado (borracha) foi mais uma vez descartado. O sobrenadante límpido foi denominado de proteínas totais do látex (PTL) (OLIVEIRA, 2006).

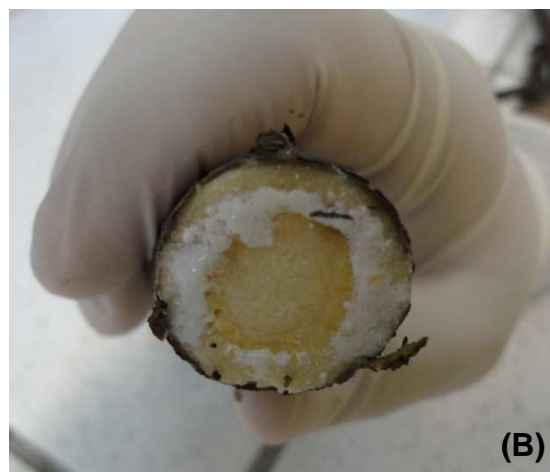
4.2. Dosagem proteica

Para determinação do teor de proteínas, diferentes metodologias foram empregadas, de acordo com a concentração da amostra e a sensibilidade do método.

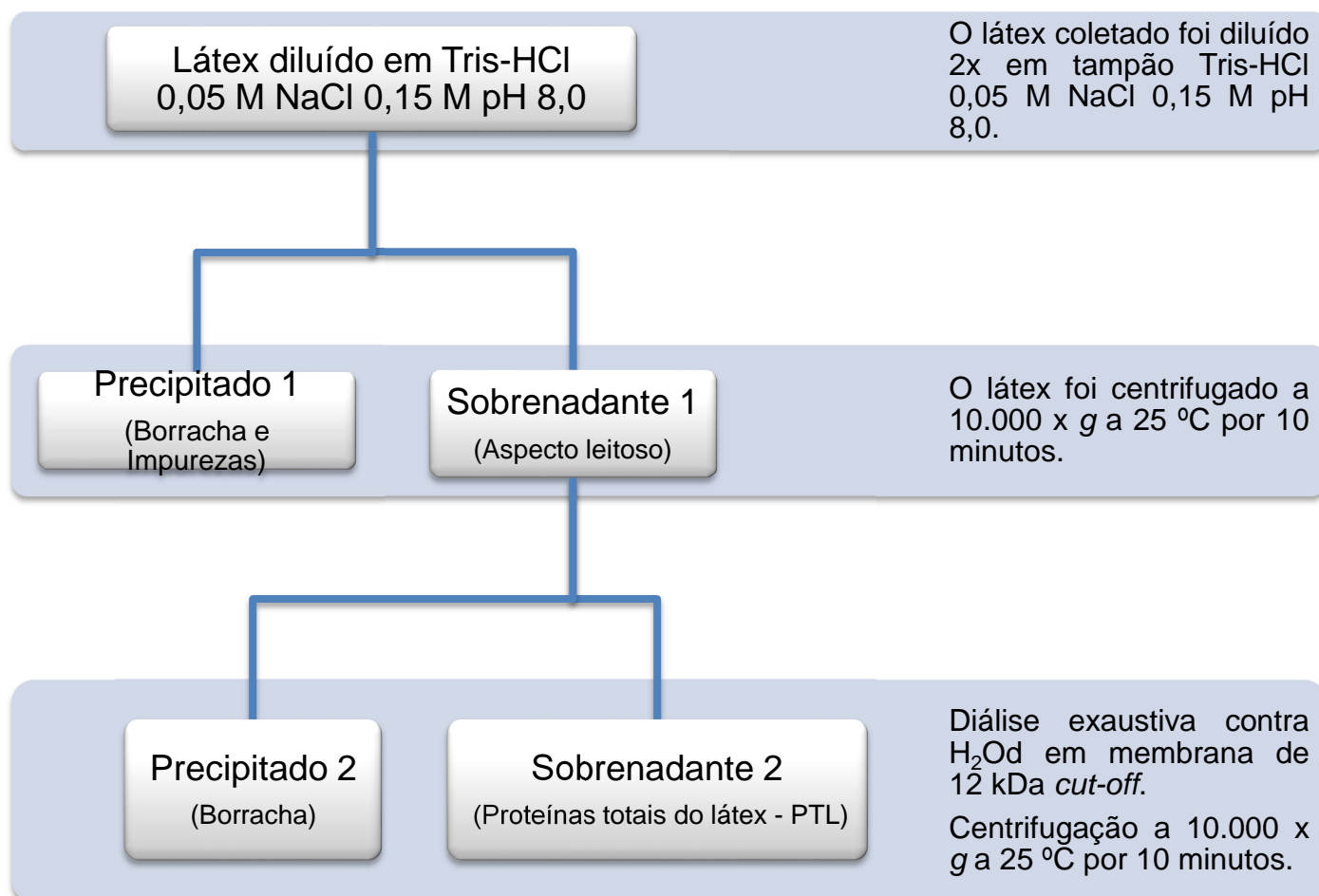
4.2.1 Dosagem de proteínas por método colorimétrico

O método colorimétrico de dosagem proteica foi baseado na metodologia descrita por Bradford (1976). Partindo-se de uma alíquota de 100 μ L de amostra, em diferentes concentrações, foram adicionados 2,5 mL do reagente de Bradford. A

FIGURA 2 - Aspectos da exsudação do látex de *M. megalantha*. (A) - Exsudação do látex do caule. (B) - Exsudação do látex da raiz. (C) - Látex de *M. megalantha* após a exsudação e coleta.



Fonte: Elaborada pelo autor

FIGURA 3 - Esquema geral de obtenção da fração proteínas totais do látex (PTL) de *M. megalantha*.

Fonte: Elaborada pelo autor.

mistura foi agitada e após 10 minutos em repouso foram feitas leituras das absorbâncias a 595 nm (espectrofotômetro tipo Novapesc II, Pharmacia). A concentração proteica foi estimada através de curva padrão obtida a partir de concentrações conhecidas de albumina sérica bovina (BSA).

4.2.2 Dosagem de proteínas por absorbância de luz

Outra metodologia empregada na dosagem proteica foi baseada no modelo descrito por Warburg-Christian (1941). Nessa técnica, foi utilizado um espectrofotômetro do tipo NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific®), no qual é utilizado um volume de apenas 5 µL de amostra que, em contato com o equipamento, permite a quantificação do teor de proteínas baseado nas absorbâncias a 230 e 280 nm.

4.3 Atividade peroxidásica

A avaliação da atividade peroxidásica das frações do látex de *M. megalantha* foi utilizada para monitorar a purificação da peroxidase.

4.3.1 Determinação por ensaio colorimétrico

Para determinação da atividade peroxidásica foi seguida a metodologia descrita por Urbanek, Kuzniak-Gebarowska e Herka (1991). Foi utilizado como substrato doador de prótons o guaiacol e como acceptor o peróxido de hidrogênio. A reação catalisada pela peroxidase produz um composto colorido, 3,3'-dimetoxi-4,4'-bifenolquinona (DOERGE; DIVI; CHUCHWELL, 1997), que é medido por espectrometria. Partindo-se de 100 µL das frações, diluída ou não dependendo de sua concentração proteica, foram adicionados 500 µL de guaiacol 0,02 M e 500 µL de peróxido de hidrogênio 0,06 M para um volume final de ensaio de 2 mL, completados com tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2. A mistura foi incubada por 10 minutos, a 30 °C, e a absorbância medida a 480 nm. A variação de 1 unidade

de absorvância por minuto foi assumida como sendo 1 unidade de atividade peroxidásica (1 UAPOX).

4.3.2 Detecção por zimograma

A atividade peroxidásica foi também avaliada em gel de poliacrilamida (PAGE-SDS), seguindo-se a metodologia descrita por Caruso *et al.* (1999), com algumas modificações (OLIVEIRA, 2006). Após corrida eletroforética em condições desnaturantes (presença de SDS), conforme metodologia a ser descrita mais adiante, o gel foi imerso em solução “renaturante” de Triton X-100 2,5%, por 30 minutos, a 25 °C e, posteriormente, imerso em tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2. Para revelação da atividade peroxidásica, o gel foi mergulhado em solução reveladora, composta de guaiacol 0,2% (v/v), 3-amino-9-etil-carbazol 0,01% (p/v) e peróxido de hidrogênio 0,03% (v/v). A reação foi interrompida por sucessivas lavagens com água destilada.

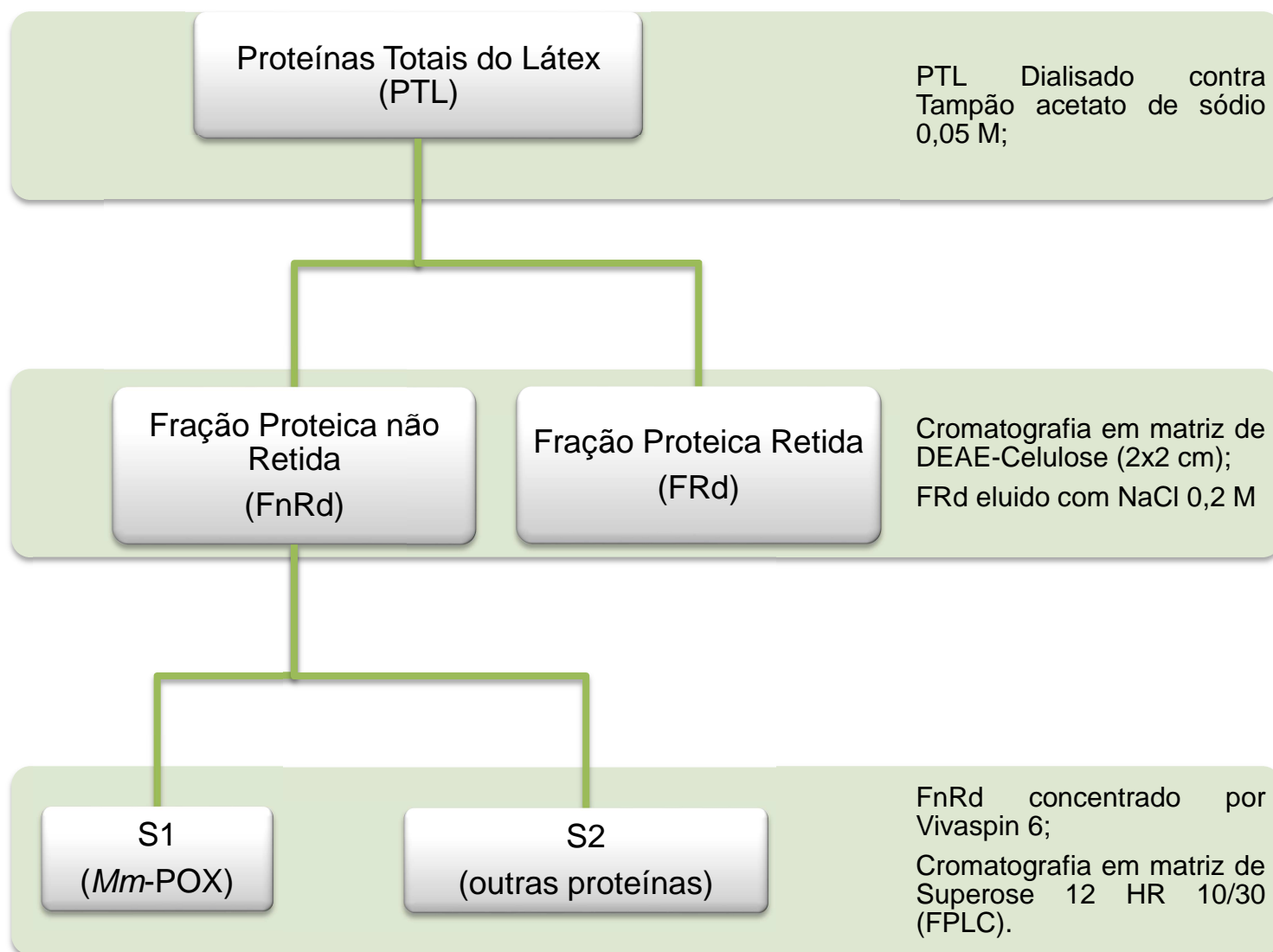
4.4 Purificação de uma peroxidase presente no látex de *M. megalantha*

A presença de atividade peroxidásica na fração PTL de *M. megalantha* já havia sido previamente descrita por Oliveira (2006, 2009). Para purificação da peroxidase, foram adotados os procedimentos descritos a seguir:

4.4.1 Cromatografia de troca iônica em matriz de DEAE-Celulose

Alíquotas de 1 mL das PTL (aproximadamente 0,3 mgP), dialisadas contra tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2, foram aplicadas em matriz de DEAE-Celulose (2 x 2 cm), previamente equilibrada com esse mesmo tampão. A coluna foi percolada com tampão de equilíbrio até remoção completa das proteínas não retidas, denominadas de fração não retida na DEAE (FnRd). NaCl 0,2 M foi acrescentado ao tampão de equilíbrio para eluição da fração proteica retida na matriz (FRd). A cromatografia foi monitorada através de leituras de absorvância a 280 nm (FIGURA 4).

FIGURA 4 - Esquema das etapas cromatográficas (DEAE-Celulose e Superose 12 HR 10/30) utilizadas no procedimento de purificação da peroxidase proveniente do látex de *M. megalantha*.



Fonte: Elaborada pelo autor.

4.4.2 Cromatografia de exclusão molecular em matriz de Superose 12 HR 10/30, acoplada ao sistema de FPLC

A fração não retida na matriz de DEAE-Celulose foi concentrada por filtração em membrana de 10 kDa de *cut-off* (concentrador centrifugacional Vivaspin 6 - GE Healthcare) e submetida à cromatografia de exclusão molecular em coluna de Superose 12 HR 10/30 (30 x 2 cm) acoplada ao sistema de FPLC (coletor Pharmacia LKB FRAC-100), previamente equilibrada com tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2. A cromatografia foi monitorada através de leituras de absorvância a 280 e 230 nm (FIGURA 4).

4.5 Caracterização físico-química e estrutural da peroxidase purificada

De posse da peroxidase pura, diversos parâmetros moleculares foram determinados para essa proteína, conforme metodologias descritas a seguir:

4.5.1 Determinação da massa molecular aparente

A determinação da massa molecular aparente da proteína purificada, assim como das proteínas presentes nas frações resultantes nas etapas de purificação do extrato, foi avaliada seguindo a metodologia descrita por Laemmli (1970), adaptada para uso de placas medindo 10,0 x 8,0 cm. O gel de aplicação encerrava 3,5% de acrilamida e 1,0% de SDS, preparados em tampão Tris-HCl 1 M, pH 6,8, e o gel de separação 15% de acrilamida e 1% de SDS, solubilizados em tampão Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8. O preparo das amostras foi realizado através de diluição em tampão Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8, contendo SDS 1% e bromofenol 2%, na presença ou ausência de β -mercaptoetanol 1%. As amostras foram previamente aquecidas a 100 °C, por 10 minutos, submetidas à centrifugação a 5.000 x g, por 5 minutos, 15 °C. Alíquotas do sobrenadante foram aplicadas no gel, que foi submetido a uma corrente de 20 mA. As bandas proteicas foram visualizadas por revelação com nitrato de prata (BLUM; BEIER; GROSSA, 1987). Como marcadores de massa molecular foram utilizados: fosforilase B (97,0 kDa); albumina sérica bovina (67 kDa); albumina do ovo (45,0 kDa); anidrase carbônica bovina (29,0 kDa); inibidor de tripsina de soja

do tipo Kunitz (20,1 kDa) e α -lactalbumina (14,2 kDa). Comparação das mobilidades das bandas proteicas em relação às aquelas dos marcadores foi empregada para cálculo da massa molecular aparente das proteínas em análise.

4.5.2 Determinação da massa molecular via filtração em gel

A massa molecular da peroxidase purificada, na sua forma nativa, foi avaliada através de cromatografia de exclusão molecular em coluna de Superose 12 HR 10/30, acoplada ao FPLC. Para a obtenção da massa nativa, inicialmente foi promovida o equilíbrio da coluna com tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2, em fluxo constante de 0,3 mL/min. Azul de dextrana foi injetado na coluna para determinação do volume morto da coluna (V_0), seguindo-se da calibração da mesma com os seguintes padrões proteicos: conalbumina (75 kDa), ovalbumina (43 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), ribonuclease A (13 kDa) e aprotinina (6,5 kDa), obtidos do Kit Gel Filtration Calibration Kit LMW (GE Healthcare). Após a corrida dos padrões e a construção da curva de calibração, uma amostra da peroxidase purificada foi aplicada na coluna sob as mesmas condições. A massa molecular da peroxidase foi calculada com base na equação da reta, obtida através da plotagem do logaritmo da massa molecular versus o volume de retenção sobre o volume morto da coluna.

4.5.3 Determinação do ponto isoelétrico

Para a obtenção do pI, a peroxidase (10 μ g/mL) foi solubilizada em solução de uréia 7 M e tiouréia 2 M. Tiras de gel imobilizado com gradiente de pH de 4 a 11, medindo 11 cm de comprimento, (DryStrip IPG, Amersham Bioscience) foram postas em contato com 240 μ L de tampão de reidratação (uréia 8 M, CHAPS 2%, DTT 0,3% e pequenas quantidades de azul de bromofenol) e 10 μ L da amostra, por aproximadamente 16 horas, em bandeja de reidratação (*Immobiline DryStrip Reswelling Tray*), à temperatura ambiente. Em seguida, as tiras foram submetidas à focalização isoelétrica a uma temperatura constante de 20 °C, em um sistema

Multiphor II (Pharmacia Biotech). A voltagem foi aumentada progressivamente: 500 V por 30 minutos; 3000 V por 6 horas e 9500 V por 2 horas. Após a focalização isoelétrica, as tiras foram reveladas para detecção da banda de pI por revelação com nitrato de prata (BLUM *et al.*, 1987) e avaliadas no software Y.

4.5.4 Obtenção do espectro de absorbância

Para a obtenção do espectro de absorbância da peroxidase, foi utilizado um espectrofotômetro tipo Novapesc II (Pharmacia), onde alíquotas de 2 mL da enzima purificada (0,02 mg/mL em H₂O ultra pura), foram submetidas à leituras de absorbâncias em comprimentos de onda crescentes (190 – 800 nm). Os dados foram plotados em gráfico e avaliado o espectro de absorbância da proteína.

4.5.5 Determinação de sequências de aminoácidos

A obtenção de sequências de aminoácidos da proteína foi procedida por metodologias distintas. A análise da sequência de aminoácidos N-terminal foi realizada em sequenciador automático de proteínas (Shimadzu, PPSQ-23A, Japão), através da reação de degradação de Edman. Para tanto, a peroxidase solubilizada em água foi submetida ao sequenciamento e os derivados de feniltioidantoína dos aminoácidos (PTH-aminoácidos) foram detectados a 269 nm, após separação em coluna de fase reversa C18 (4,6 x 2,5 mm), conduzida sob condições isocráticas de acordo com as instruções do fabricante.

Sequências internas da proteína foram obtidas por espectrometria de massas. Os espectros de massas (ESI Q-TOF) foram obtidos no espectrômetro de massas SYNAPT HDMS (Waters, UK) acoplado a um sistema de ESI-NanoUPLC. Para tanto, as amostras foram diluídas em água contendo ácido fórmico 0,1% numa concentração final de 2 mg/mL. Cinco microlitros foram retirados desta solução para a realização de cromatografia de fase reversa, utilizando gradiente de 5 a 80% (v/v) de acetonitrila em 0,1% de ácido fórmico (v:v), com fluxo de 600 nL/min, em coluna nanoACQUITY UPLC C18 BEH (1,7 mm, 100 mm x 10 cm). O espectro

deconvoluído foi obtido usando uma técnica de máxima entropia (MaxEnt). Para a obtenção dos dados de sequência da proteína, esta foi quimicamente reduzida com DTT 0,01 M, alquilada com iodoacetamida 0,01 M e enzimaticamente digerida com tripsina em uma razão de 1:100 (w/w), tripsina:peroxidase.

As sequências obtidas foram submetidas ao alinhamento automático através do sistema NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), utilizando o programa protein BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>) e avaliadas quanto à presença de domínios catalíticos similares em outras proteínas.

5. RESULTADOS

5.1 Coleta e processamento do látex

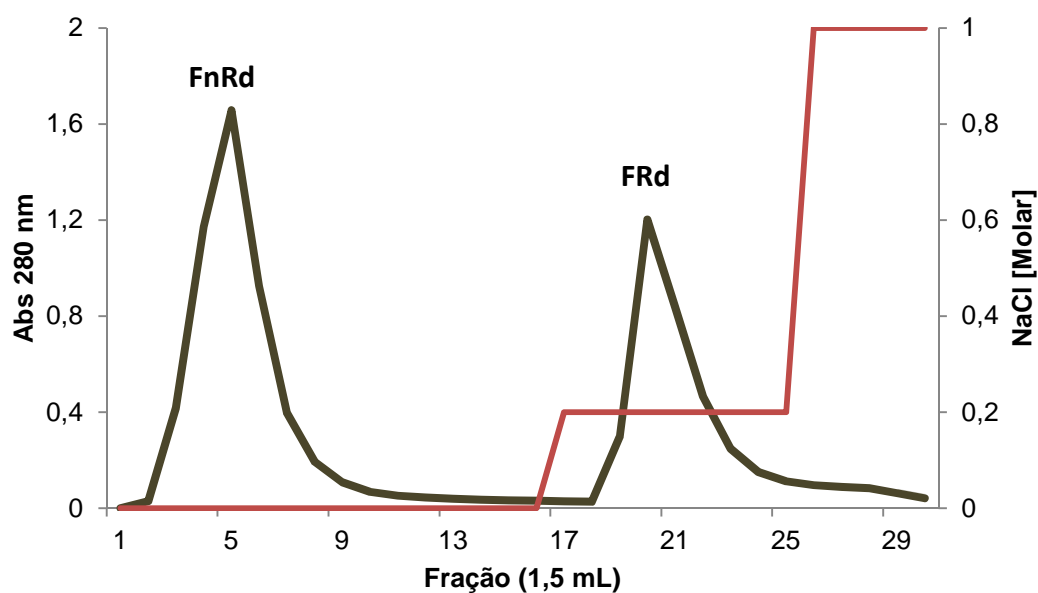
A realização de injúrias sobre o caule e raiz da planta promoveu a exsudação de látex, que apresentou aspecto bastante leitoso e capacidade de rápida coagulação. A utilização do tampão Tris-HCl 0,05 M, contendo NaCl 0,15 M, pH 8,0, foi eficaz em impedir a coagulação de substâncias presentes no látex, mantendo suas características iniciais. O processamento do látex, conforme descrito em “Métodos”, foi capaz de remover substâncias que conferiam cor e viscosidade elevada a essa secreção, resultando uma solução incolor, de viscosidade semelhante a da água, que foi denominada de proteínas totais do látex (PTL). Característica essa que foi de fundamental importância para o procedimento de purificação da peroxidase.

5.2 Obtenção da peroxidase pura

As PTL de *M. megalantha*, após serem submetidas à cromatografia de troca iônica em matriz de DEAE-Celulose, apresentaram o perfil cromatográfico mostrado na Figura 5. Utilizando um tampão com pH levemente ácido, acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2, foi possível a separação das PTL em duas frações proteicas distintas. A primeira delas, representando a “Fração não Retida na DEAE-Celulose”, abreviada como FnRd, foi obtida com o próprio tampão de equilíbrio. A segunda, denominada de “Fração Retida na DEAE-Celulose”, ou simplesmente FRd, foi recuperada após eluição das proteínas ligadas à matriz com o tampão de equilíbrio acrescido de NaCl 0,2 M.

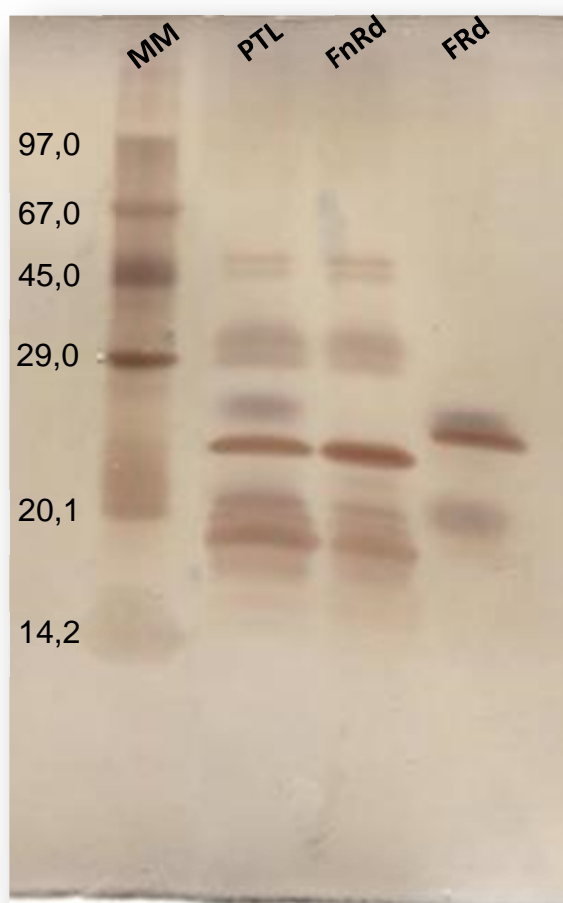
A Figura 6 mostra os perfis eletroforéticos das frações proteicas resultantes dessa cromatografia. Foi mostrado, por colorimetria, que ambas as frações da DEAE-Celulose se apresentaram positivas para atividade peroxidásica, utilizando-se guaiacol como substrato (FIGURA 7), evidenciando uma aparente distribuição igualitária de atividade POX entre as duas frações. Esse fato demonstra que as PTL de *M. megalantha* incluem tipos diferentes de peroxidases, com pls distintos.

FIGURA 5 - Perfil cromatográfico das proteínas totais do látex de *M. megalantha* (480 µgP) em coluna de DEAE-Celulose (2 x 2 cm), equilibrada com tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2 e eluída com NaCl (0,2 M). Fluxo: 0,5 mL/min; Frações: 1,5 mL/tubo. (FnRd) - Proteínas não retidas na DEAE-Celulose e (FRd) - Proteínas retidas na DEAE-Celulose



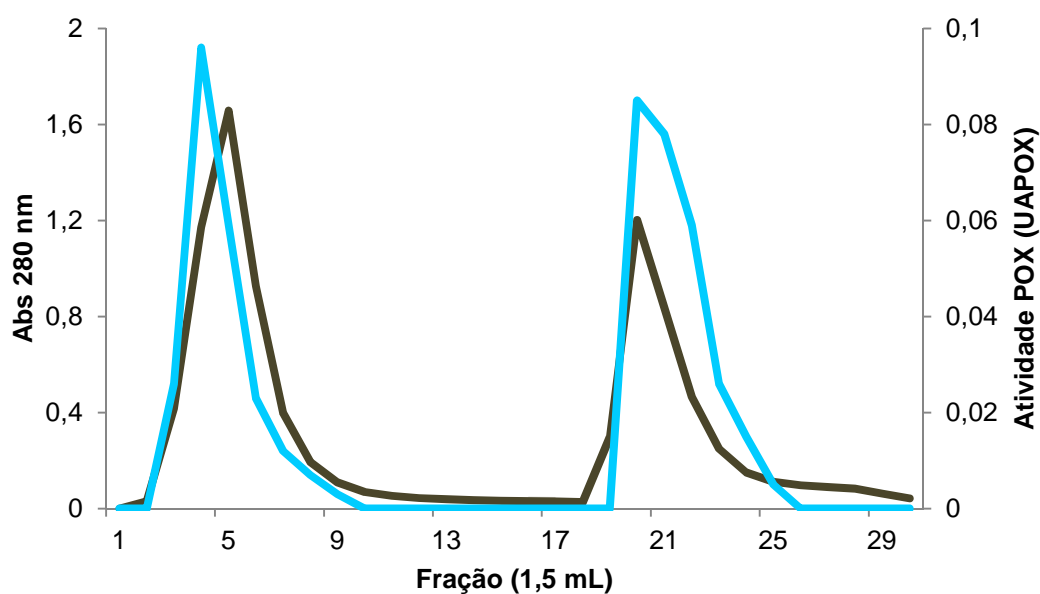
Fonte: Elaborada pelo autor.

FIGURA 6 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) na presença de SDS, revelada com nitrato de prata, das frações proteicas obtidas após cromatografia das proteínas totais do látex de *M. megalantha* em matriz de DEAE-Celulose. (MM) – Marcadores de massa molecular; (PTL) – Proteínas totais do látex, 12 µg; (FnRd) - Proteínas não retidas na DEAE-Celulose, 5 µg e (FRd) - Proteínas retidas na DEAE-Celulose, 5 µg, eluídas com tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2 contendo NaCl 1 M.



Fonte: Elaborada pelo autor.

FIGURA 7 - Determinação de atividade peroxidásica ao longo da cromatografia de troca iônica em matriz de DEAE-Celulose. A linha em azul claro está relacionada à presença de atividade peroxidásica. Unidade de Atividade Peroxidásica (UAPOX): Quantidade de enzima requerida para produção de 1 μ M de tetraguaiacol/minuto.



Fonte: Elaborada pelo autor.

A FnRd após ser submetida à cromatografia de exclusão molecular em matriz de Superose 12 HR 10/30, acoplada ao sistema de FPLC, apresentou dois picos proteicos, denominados de S1 e S2 (FIGURA 8). Por eletroforese em gel de poliacrilamida, foi visualizada em S1 apenas uma única banda proteica. O tratamento da fração S1 com o agente redutor β -mercaptoetanol promoveu um pequeno retardo na mobilidade dessa proteína (FIGURA 9).

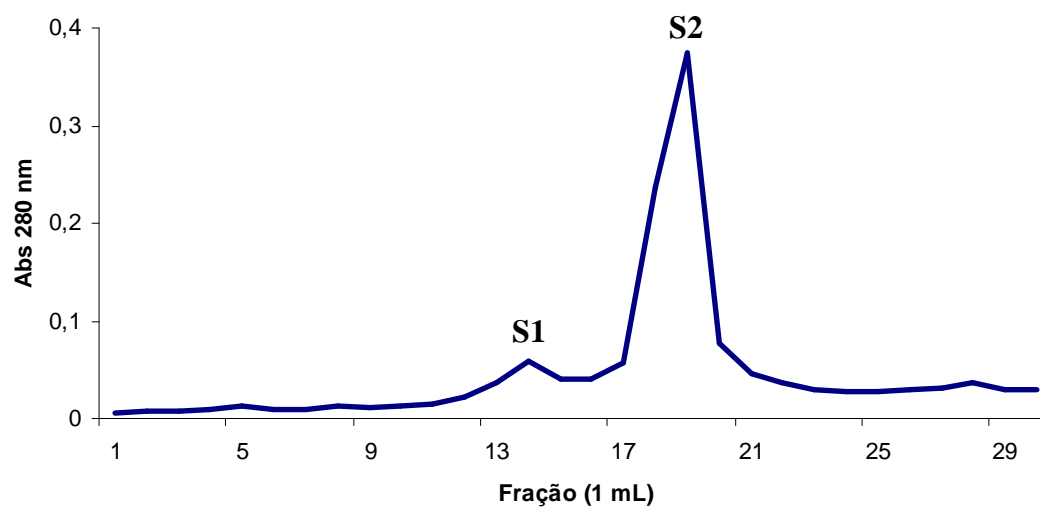
Avaliando a atividade peroxidásica dos picos provenientes da Superose 12 HR 10/30, resultado positivo foi encontrado apenas no pico S1 (FIGURA 10). Somado à atividade *in vitro*, a visualização do zimograma para guaiacol peroxidase com S1 demonstrou que a atividade peroxidásica foi observada na região que corresponde exatamente ao valor de massa molecular da banda única encontrada em PAGE-SDS (67 kDa) (FIGURA 11). Uma vez constatado que S1 se constituía de apenas uma proteína com atividade peroxidásica, esse material passou a ser chamado de *Mm-POX*, proveniente da denominação “Peroxidase de *M. megalantha*”. A Tabela 1 mostra dados de teor proteico e da atividade peroxidásica obtidos ao longo da estratégia experimental adotada para purificação da *Mm-POX*. O índice de purificação de *Mm-POX* foi de 230,23 vezes, resultando um rendimento proteico de 0,03%.

5.3 Caracterização físico-química e estrutural da *Mm-POX*

A massa molecular aparente de *Mm-POX* foi inicialmente determinada por PAGE-SDS, variando em torno de 65 kDa (FIGURA 9). Por filtração em gel, em matriz de Superose 12 HR 10/30, a peroxidase apresentou uma massa molecular bem próxima, cerca de 58,5 kDa (FIGURA 12). Quanto ao pI da *Mm-POX*, obtido por focalização isoelétrica, este foi em torno de 5,2.

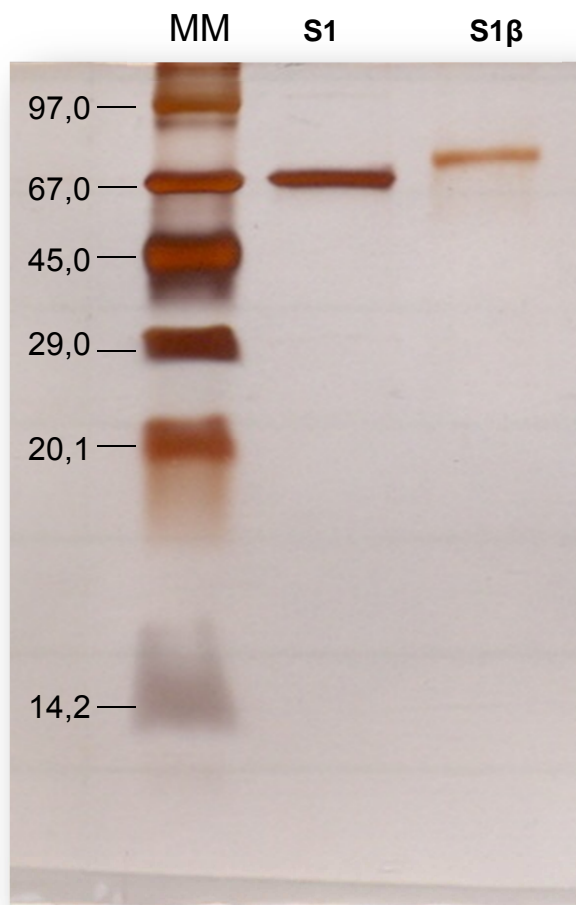
Devido ao baixo rendimento da *Mm-POX* no látex de *M. megalantha*, a obtenção do espectro de absorvância foi bastante prejudicada. Ainda assim, foi possível verificar um máximo de absorvância em torno de 230 nm, com picos menores de absorção nas regiões de comprimento de onda de 280 e 400 nm (FIGURA 13).

FIGURA 8 - Perfil cromatográfico das proteínas não retidas na matriz de DEAE-Celulose (800 µg/P), após cromatografia em coluna de Superose 12 HR 10/30 (30 x 2 cm), acoplada ao sistema de FPLC, equilibrada com tampão acetato de sódio 0,050 M, pH 5,2. Fluxo: 0,3 mL/min; Frações: 1,0 mL/tubo.



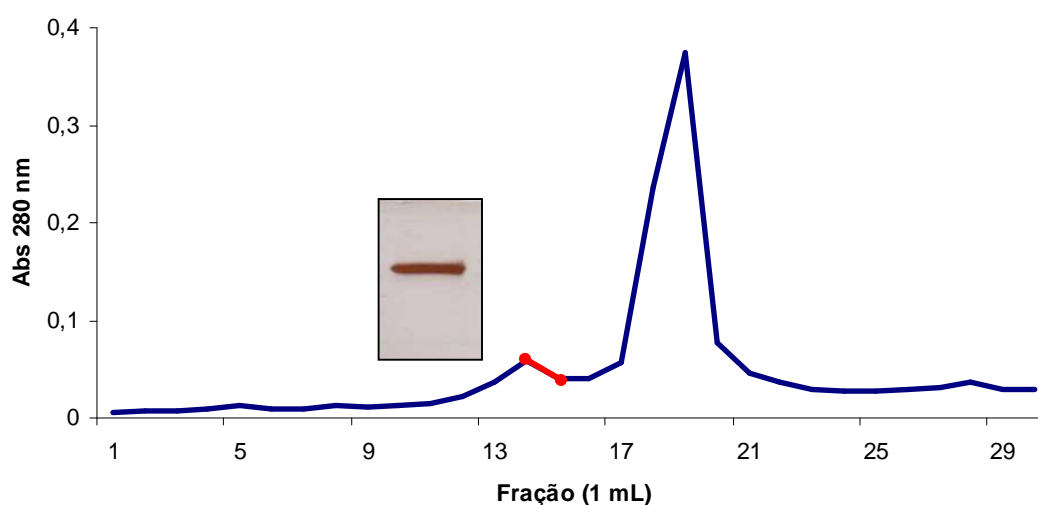
Fonte: Elaborada pelo autor.

FIGURA 9 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) na presença de SDS, revelada com nitrato de prata, do primeiro pico proteico (S1) obtido na cromatografia de exclusão molecular em matriz de Superose 12 HR 10/30, acoplada ao sistema de FPLC. (MM) - Marcadores de massa molecular; (S1) e (S1 β) - S1 na ausência e na presença de β -mercaptoetanol 2%, respectivamente.



Fonte: Elaborada pelo autor.

FIGURA 10 – Frações proteicas apresentando atividade peroxidásica (em vermelho) demonstrada no perfil cromatográfico obtido em matriz de Superose 12 HR 10/30 (30 x 2 cm), acoplada ao sistema de FPLC, equilibrada com tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2. Amostra: Fração não retida na DEAE-Celulose (800 µgP); Fluxo: 0,3 mL/min; Frações: 1,0 mL/tubo. Figura inscrita: PAGE-SDS evidenciando o perfil proteico de S1.



Fonte: Elaborada pelo autor.

FIGURA 11 - Zimograma de atividade peroxidásica após eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) do primeiro pico (S1) obtido na cromatografia em matriz de Superose 12 HR 10/30, acoplada ao sistema de FPLC. PTL: Proteínas totais do látex; S1: Primeiro pico da cromatografia em matriz de Superose 12 HR 10/30.



Fonte: Elaborada pelo autor.

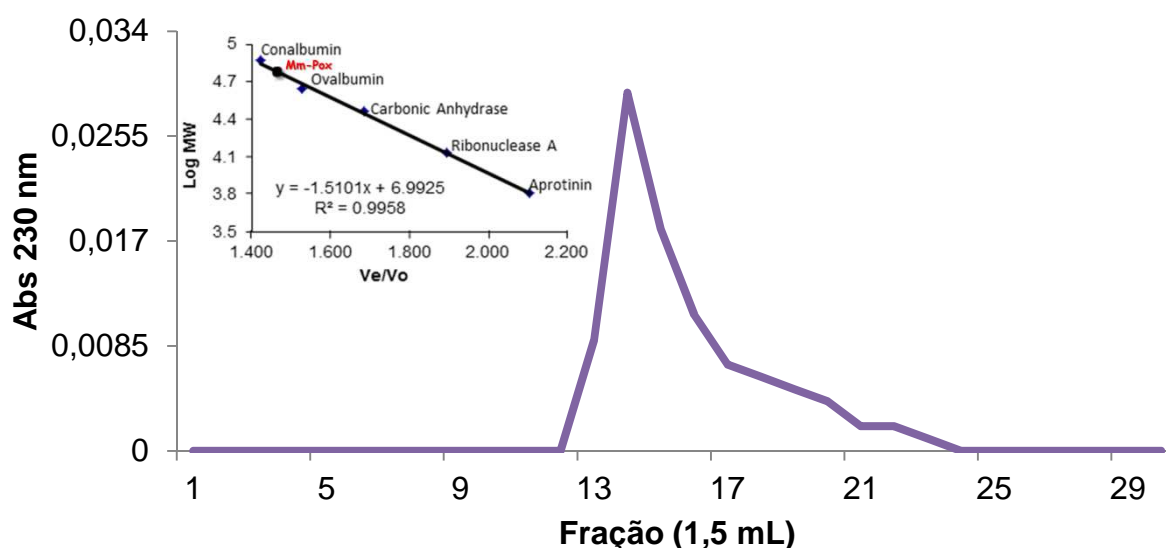
TABELA 1 – Índice de purificação e rendimento da peroxidase presente no látex de *M. megalantha* (Mm-POX)*

Etapas	Atividade Total (10 mL)	Proteína Total (mg)	Atividade Específica (Unid ^a /mg)	Rendimento (%)	Índice de Purificação
Proteínas Totais do Látex	730,00 ± 30	30,67 ± 1,37	23,80	100	1
DEAE-Celulose	128,30 ± 27	3,41 ± 0,31	37,62	11,12	1,58
Superose 12 H-10/30 (Mm-POX)	54,80 ± 9	0,01 ± 0,01	5480,00	0,03	230,23

* Valores obtidos com base em 10 mL de proteínas totais do látex.

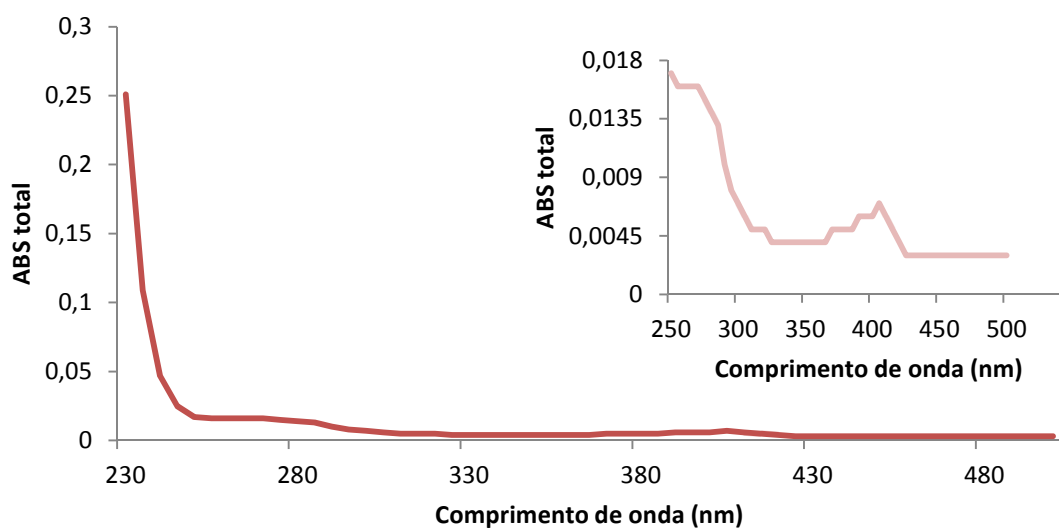
^a Uma unidade de atividade peroxidásica é definida pela quantidade de enzima requerida para produção de 1 mmol de 3,3'-dimetoxi-4,4'-bifenoquinona por minutos a 30 °C

FIGURA 12 – Determinação da massa molecular da *Mm-POX* por filtração em gel em coluna de Superose 12 HR 10/30 (30 x 2 cm), acoplada ao sistema de FPLC, equilibrada com tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2. Fluxo: 0,3 mL/min; Frações: 1,0 mL/tubo. Figura Inscrita: padrões proteicos: conalbumina (75 kDa); ovalbumina (43 kDa); anidrase carbônica (29 kDa); ribonuclease A (13,7 kDa) e aprotinina (6,5 kDa).



Fonte: Elaborada pelo autor.

FIGURA 13 - Espectro de absorção da *Mm-POX* em H₂O. Valores de comprimentos de onda variando de 230 a 500 nm. Figura inscrita: Detalhe para valores maiores de comprimento de onda, evidenciando as alterações de absorbâncias locais em escala menor.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Em relação à sequência de aminoácidos N-terminal da *Mm-POX*, foram inúmeras as tentativas visando sua obtenção. Os resultados obtidos demonstram estar essa região bloqueada. No entanto, por espectrometria de massas, utilizando a proteína degradada com tripsina foi possível a identificação de sequências internas.

Duas sequências, dentre as obtidas, mereceram destaque, as quais compreendem: “DSVFLSGGPDYDLPLGRR” (1) e “IIEDLRR” (2). Essas sequências apareceram em todas as amostragens de espectrometria de massas da *Mm-POX* e, quando analisadas nos bancos de dados de proteínas, apresentaram identidade com peroxidases de *Nicotiana tabacum* (100% 1 e 2), *Eucommia ulmoides* (100% 2), *Solanum lycopersicum* (94% 1 e 100% 2), *Copaifera officinalis* (89% 1), *Litchi chinensis* (89% 1), *Panax ginseng* (100% 2), entre outras. A primeira sequência também foi identificada como pertencente ao domínio catalítico da superfamília das peroxidases-*like* vegetais, dentro da subfamília das peroxidases de secreção de plantas. Com relação à segunda sequência acima citada, embora ela esteja presente em diversas peroxidases, não foi possível especular a importância dela para a atividade peroxidásica, uma vez que ela foi encontrada em regiões totalmente distintas nas espécies acima citadas.

6. DISCUSSÃO

O presente capítulo descreve e purificação de uma nova peroxidase classe III de plantas presente no látex de *M. megalantha*, uma espécie conhecida por ser bastante adaptada a condições climáticas severas, envolvendo escassez de água e temperaturas elevadas (GOYDER; MORILLO, 1994). As condições na qual essa planta sobrevive, bem como relatos de sua toxicidade para animais (PESSOA *et al.*, 2011; GERALDO NETO *et al.*, 2013), motivaram o presente estudo por nosso grupo de pesquisa.

A presença de atividade peroxidásica no látex de *M. megalantha* já havia sido detectada por Oliveira (2009), quando realizada uma prospecção de proteínas relacionadas à defesa vegetal nesse material. Outros estudos, relacionados não ao látex dessa espécie, mas sim aos órgãos da planta, identificaram grande potencial antioxidante (dentre outras atividades observadas) nas raízes, caules e folhas (OLIVEIRA, 2011). No entanto, sabe-se que os laticíferos de *M. megalantha* permeiam todos os órgãos vegetais (GOYDER; MORILLO, 1994), não sendo possível excluir que essa atividade antioxidante também esteja relacionada a metabólitos primários e/ou proteínas presentes no látex. Portanto, para o alcance dos objetivos pretendidos, previamente apresentados, foi necessária a coleta do látex de caule e raiz dessa espécie, seguida de seu processamento, pois as propriedades do látex em sua forma bruta, aspecto leitoso e viscosidade elevada, teriam impossibilitado muito dos procedimentos realizados, tais como filtração e dosagens colorimétricas. Nesse contexto, de fundamental importância foi a utilização do tampão Tris-HCl 0,05 M, contendo NaCl 0,15 M, pH 8,0, que se mostrou eficaz em inibir a coagulação dos compostos de isopreno presentes no látex. Esses compostos, em sua maioria, são carregados negativamente que, uma vez expostos às proteínas carregadas positivamente, presentes em organelas especializadas nos laticíferos, coagulam rapidamente. A coagulação, no aspecto fisiológico, é extremamente importante para a planta, pois realiza a “cicatrização” imediata do ferimento (SOEDJANAATMADJA; SUBROTO; BEINTEMA 1995; KEKWICK, 2001; HELMUS; DUSSOURD, 2005). Entretanto, esse processo natural inviabilizaria a

obtenção das proteínas presentes nessa secreção, devido à diminuição drástica de sua solubilidade. Após o processamento do látex bruto adotado nesse trabalho, dialise exaustiva contra água e centrifugação, um material proteico de aspecto límpido, quase transparente e viscosidade semelhante a da água foi obtido, tendo sido denominado de proteínas totais do látex (PTL). A utilização dessas etapas para a separação da borracha dos constituintes solúveis em água já havia sido testada previamente, tendo sido verificada sua eficácia (OLIVEIRA 2006, 2009). Processamentos similares foram realizados em outras espécies vegetais laticíferas, tais como *Calotropis procera*, *Hevea brasiliensis*, *Sobertia acuminata* e *Ficus benjamina* (YEANG, 2002; SRITANYARAT *et al.*, 2006; FREITAS, 2007; DAMIEN *et al.*, 2008; MOTA, 2013).

Nos estudos prévios realizados por Oliveira (2009), foi suposto que a atividade peroxidásica detectada na fração PTL não estaria restrita a apenas uma peroxidase específica. Assim sendo, no presente estudo se buscou testar essa hipótese que, por sua vez, foi comprovada, tendo sido obtidas duas frações proteicas distintas com atividade peroxidásica, através do uso de técnicas cromatográficas. Nessa primeira etapa cromatográfica, uma matriz de DEAE-Celulose foi escolhida (FIGURA 5). Os resultados obtidos foram semelhantes àqueles verificados por Oliveira (2009), quando utilizou uma matriz de Resource-Q, os quais são justificados pelo fato de ambas as matrizes apresentarem propriedades químicas (trocadoras de anions) bastante similares. Os perfis eletroforéticos (FIGURA 6) das frações proteicas obtidas revelou bandas com predominância de massas moleculares aparentes entre 60 e 15 kDa para as PTL e fração não retida na DEAE-Celulose (FnRd), enquanto massas moleculares em torno de 25 kDa estiveram mais proeminentes na fração retida (FRd) na referida matriz. FRd se mostrou com uma fração mais pura, enquanto FnRD se destacou por apresentar maior conteúdo proteico. Os dados apresentados demonstram a eficiência dessa matriz de troca iônica na separação de proteínas, possibilitando o prosseguimento da purificação aqui pretendida.

A atividade peroxidásica ao longo da cromatografia de troca iônica foi avaliada fração a fração (isto é, tubo a tubo), pois, para o alcance dos objetivos

pretendidos, era importante a informação precisa quanto à sua distribuição (FIGURA 7). Com base nas análises colorimétricas, foi verificada a presença dessa atividade em ambas as frações proteicas (FnRd e FRd), sugerindo a presença de tipos distintos de peroxidases, com pls diferentes. Entretanto, uma atividade peroxidásica maior foi detectada na FnRd, implicando na predominância de proteínas com pl igual ou acima de pH 5,2. A presença de pontos isoelétricos não tão ácidos (acima de 5,2), apresentado pelas PTL de *M. megalantha* foi descrita por Oliveira (2009), em análises eletroforéticas bidimensionais, cujo perfil proteico se mostrou semelhante aos de outras espécies laticíferas, como exemplos em *H. brasiliensis* (POSCH, 1997) e *Papaver somniferum* (DECKER *et al.*, 2000). Esse fato é atribuído, principalmente, à necessidade de manutenção de um ambiente bioquímico apenas levemente ácido, essencial para engatilhar as reações de polimerização da borracha, no momento e local da injúria (KEKWICK, 2001). Considerando especificamente as peroxidases, enzimas com pls acima de 5,2 já foram descritas para látex de outras espécies vegetais, incluindo *F. benjamina* e *F. sicomurus* (MOTA, 2013; MOHAMED; DARWISH; EL-SHISHTAWY, 2013).

Diante do fato de que FnRD apresentou maior atividade peroxidásica, este foi selecionado e submetido à cromatografia de exclusão molecular em matriz de Superose 12 HR 10/30, acoplada ao sistema de FPLC, tendo em vista não estar puro. Como resultado, duas frações distintas, denominadas de S1 e S2, foram obtidas (FIGURA 8). S1 se apresentou como uma proteína única, de massa molecular aparente de 65 kDa. Essa banda exclusiva, quando na presença de agente redutor (β -mercaptoetanol), se manteve como uma só, porém, com migração ligeiramente retardada (FIGURA 9). Provavelmente essa pequena diferença de mobilidade eletroforética seja devido à ruptura de pontes dissulfeto intracadeia (BANCI, 1997; PITRE, 2007). De maior relevância foi o fato de S1 ter concentrado toda a atividade peroxidásica (FIGURAS 10 e 11), denotando o alcance de um dos objetivos pretendidos, que foi a purificação de uma peroxidase, merecendo ser ressaltado que se trata da primeira peroxidase purificada da espécie *M. megalantha*, tendo recebido o nome de *Mm-POX*.

Os procedimentos experimentais adotados para obtenção da *Mm-POX* resultaram em uma atividade específica de 5480,00 UAPOX/mg proteína, índice de purificação de 230,23 e rendimento de 0,03% (TABELA 1). O rendimento é um tanto baixo quando comparado com o da peroxidase purificada do látex de *F. sycomorus*, muito embora as técnicas de purificação empregadas tenham sido similares as aqui utilizadas (MOHAMED *et al.*, 2011). No entanto, a compreensão de baixo rendimento dessa proteína em um contexto biotecnológico não deve ser considerada como um problema limitante, visto que procedimentos de expressão heteróloga ou de indução de superexpressão podem ser usados para reverter a baixa quantidade proteica, algo já relatado inclusive para outras peroxidases, como a horseradish (HRP) (VEITCH, 2004; ZIPOR; SHAMIR, 2013).

Mm-POX mostrou ser uma proteína monomérica, de massa molecular em torno de 60 kDa, considerando os valores determinados por PAGE-SDS (65 kDa) e filtração em gel em matriz de Superose 12 HR 10/30 (58,5 kDa) (FIGURAS 9 e 12). Essa massa condiz com os valores obtidos para o grupo das POX em geral, cujas massas moleculares se encontram na faixa de 25 – 60 kDa (HIRAGA *et al.*, 2001). No entanto, há peroxidases classe III que não se enquadram nessa faixa de massa molecular, ainda que também sejam monoméricas, como são aquelas purificadas do látex de *E. charicas*, *F. sycomorus* e *H. brasilienseis* (FLORIS; MEDDA; RINALDI, 1984; WITITSUWANNAK *et al.*, 1997; MOHAMED *et al.*, 2011, 2013).

Mm-POX apresentou um *pI* em torno de 5,2. Entretanto, a determinação desse parâmetro molecular foi complicada, devido a dificuldades na focalização isoelétrica da *Mm-POX*. Esse impedimento pode estar atrelado à existência de diferentes isoformas, impossibilitando uma focalização satisfatória. De fato, as POX normalmente são expressas em múltiplas isoformas, ocasionando alterações drásticas em seu *pI* (HIRAGA *et al.*, 2001). Contudo, nas condições fisiológicas em que os laticíferos se apresentam, isto é, pH levemente ácidos (WITITSUWANNAKUL *et al.*, 2008a,b), é provável que a *Mm-POX* seja capaz de sequestrar prótons (H^+) do meio no qual se encontra.

O espectro de absorção da *Mm-POX* mostrou além dos picos de absorbância característicos de proteínas (230 e 280 nm), um pequeno pico de absorbância a 400

nm (FIGURA 13), Tal comportamento se assemelha ao de diversas peroxidases classe III, como as de *Jatropha curcas*, *Ipomea carnea*, *H. brasiliensis* ou mesmo com a horseradish peroxidase, indicando a presença do grupo prostético “heme” na proteína (WITITSUWANNAK *et al.*, 1997; CAI *et al.*, 2012).

Apesar das diversas tentativas de obtenção da sequência N-terminal da *Mm-POX*, os dados foram inconclusivos, fato este atribuído ao possível bloqueio nessa extremidade. Caruso *et al.* (2001), buscando a determinação da sequência N-terminal de uma peroxidase de trigo, declararam que a maioria das peroxidases de plantas apresenta essa região bloqueada, não permitindo o seu sequenciamento através da reação de degradação de Edman. Entretanto, através de espectrometria de massas, sequências de aminoácidos internas da *Mm-POX* foram obtidas, as quais corroboraram com os dados já descritos de que a proteína purificada do látex de *M. megalantha* tratava-se, de fato, de uma peroxidase da classe III. Dentre as diversas peroxidases que apresentaram identidade com *Mm-POX*, a peroxidase aniônica de tabaco (*Nicotiana tabacum*) foi a que mais se destacou, com uma similaridade de 100 % frente às sequências de aminoácidos dos fragmentos peptídicos. A peroxidase oriunda do tabaco é uma das peroxidases mais bem caracterizadas, se mostrando capaz de oxidar, *in vitro*, uma ampla gama de compostos secundários de plantas, incluindo ácidos fenólicos, ácido 3-indolacético e alguns tipos específicos de álcoois (DIAZ-DE-LEON; LAGRIMINI, 1993).

Embora o presente trabalho tenha permitido a obtenção de vários dados importantes sobre a *Mm-POX*, ainda há muitas informações a serem buscadas de modo a compreender melhor as potencialidades dessa proteína e, assim, propor sua utilização como ferramenta biotecnológica.

7. CONCLUSÃO

Do látex de *M. megalantha* foi purificada uma nova peroxidase, denominada *Mm-POX*, com alto potencial catalítico na oxidação do guaicol. Essa enzima apresenta massa molecular em torno de 60 kDa, pI 5,2 e elevada similaridade com outras peroxidases vegetais. Os dados em conjunto sugerem que a *Mm-POX* é uma peroxidase classe III, se constituindo na primeira proteína isolada da espécie *M. megalantha*.

Capítulo 3



Caracterização Enzimática da Mm-POX



1. INTRODUÇÃO

A utilização de processos enzimáticos está intrinsecamente ligada ao homem desde os primórdios da civilização. Gregos, Egípcios e outros povos já produziam queijos, pães, bebidas fermentadas, entre outros materiais que, embora sem o conhecimento do real agente nesses processos, já aplicavam conceitos enzimáticos (HAKI; RAKSHIT, 2003). Louis Pasteur (1822-1895) foi um dos pioneiros nos estudos da ação enzimática, muito embora tenha erroneamente atrelado essa atividade à necessidade de células vivas. Apenas em 1897, foi que o bioquímico alemão Eduard Buchner (1860-1917) promoveu o isolamento de algumas enzimas catalizadoras da fermentação alcoólica desvinculando a necessidade de células de levedura (KIELING, 2001). No entanto, o estudo dos parâmetros enzimáticos se iniciou apenas por volta de 1960, quando avanços tecnológicos permitiram o isolamento, identificação das propriedades gerais e caracterização cinética de enzimas provenientes de várias fontes animais, vegetais ou de microrganismos (KIELING, 2001)

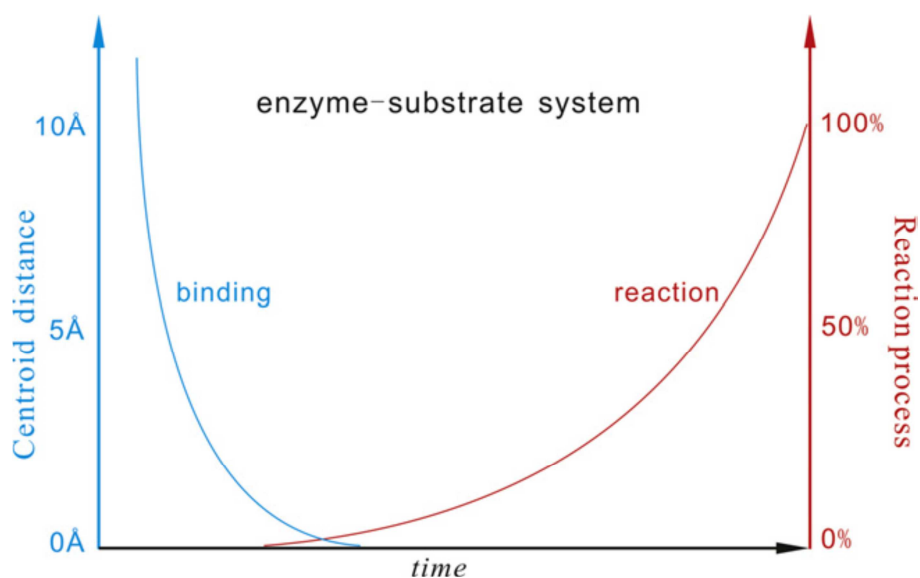
Os estudos das características enzimáticas permitem um melhor entendimento da ação dessas moléculas, bem como potencializam sua aplicação na ciência, indústria e outras áreas. Com um número maior de enzimas purificadas e conhecimento mais abrangente sobre elas, o número de aplicações cresceu consideravelmente (HAKI; RAKSHIT, 2003). Um bom exemplo está atrelado aos estudos de termoestabilidade das enzimas, os quais possibilitaram o surgimento de processos industriais distintos, partindo-se da utilização e compreensão do maquinário enzimático de organismos termófilos (DEMIRJIAN; MORÍS-VARAS; CASSIDY, 2001).

Um aspecto importante a ser considerado em relação às enzimas é sua interação com o(s) substrato(s), pois a partir daí é que se inicia o processo catalítico (FIGURA 1). Durante essa interação, energia de ligação é liberada, que é fundamental tanto para promover a associação dos componentes reacionais no estado fundamental, como para estabilizar o estado de transição, favorecendo à formação do(s) produto(s) (GUO *et al.*, 2012). Além do substrato, há outros fatores a serem considerados quando está em questão a atividade enzimática, incluindo

temperatura, pH, presença de inibidores ou cofatores e adjuvantes. Todos os fatores citados são imprescindíveis para a compreensão do comportamento cinético das enzimas.

O grupo das peroxidases de plantas classe III, ou simplesmente POX, merece destaque quando enfatizadas suas propriedades catalíticas. A ampla gama de substratos que podem ser metabolizados por essas enzimas implica em uma série de aplicações fisiológicas e biotecnológicas que, para muitas espécies, ainda não foi bem estudada (HAMID; REHMAN, 2009; ZIPOR; SHAMIR, 2013; MOHAMED *et al.*, 2013). A peroxidase de rábano selvagem (*horseradish peroxidase* ou simplesmente HRP), cientificamente chamado de *Armoracia rusticana*, é um exemplo excelente de como o conhecimento aprofundado dos parâmetros enzimáticos pode proporcionar ferramentas úteis na ciência e sociedade. A HRP já vem sendo estudada há mais de um século e, nos últimos anos, novas informações acerca de sua estrutura tridimensional, intermediários catalíticos, mecanismo de catálise e funções específicas de alguns aminoácidos foram reveladas (NIGEL; VEITCH, 2004; HAMID; REHMAN, 2009; KRISHNA *et al.*, 2013). Essas informações, em conjunto, permitiram a aplicação dessa peroxidase, possibilitando o seu uso em kits científicos, na remoção de poluentes fenólicos, em indústrias têxteis e alimentícias, entre diversos outros empregos (HAMID; REHMAN, 2009). De fato, as peroxidases parecem ser as enzimas mais adequadas para utilização nas preparações enzima-anticorpos conjugados, usados em testes como ELISA (*Enzyme-Like Immunsorbent Assay*), graças à sua capacidade de produzir compostos cromogênicos mesmo a baixas concentrações (HAMID; REHMAN, 2009). Em adição, a combinação de peroxidases com outras enzimas provedoras de peróxido de hidrogênio é amplamente utilizada na determinação indireta de diversos compostos, como exemplo glicose sanguínea, que devido à sua capacidade oxidativa, apresentam potencial para substituir diversas técnicas envolvendo reações de oxidação (HAMID; REHMAN, 2009).

FIGURA 1 - Representação esquemática do processo de ligação enzima-substrato (ES) e da reação. Primeiro, a molécula do substrato se liga ao sítio ativo da enzima partindo de uma distância infinita para sua localização final e, em seguida, a reação catalítica é iniciada, no momento em que a interação ES está quase concluída



Fonte: Guo *et al.*, 2012

Em consonância com o exposto, é que o presente capítulo foi formatado, o qual tem como foco o estudo aprofundado das propriedades enzimáticas da *Mm-POX*, uma vez que apenas os conhecimentos de parâmetros físico-químicos e estruturais não são suficientes para se caracterizar uma enzima, particularmente se houver pretensão de avaliar o seu papel fisiológico, ou mesmo de propor sua utilização.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

- Caracterizar a atividade enzimática da peroxidase purificada do látex de *M. megalantha* (*Mm*-POX).

2.2 Específicos

- Calcular os parâmetros cinéticos ($V_{máx}$ e K_m) da *Mm*-POX referentes aos seus substratos padrões: guaiacol e H_2O_2 ;
- Determinar os valores ótimos de pH e temperatura para a atividade da *Mm*-POX e avaliar sua estabilidade térmica;
- Avaliar a influência de diferentes íons na atividade da *Mm*-POX;
- Testar a capacidade da *Mm*-POX em utilizar outros compostos como substratos;
- Avaliar a influência de diferentes inibidores de peroxidases em geral sobre a atividade da *Mm*-POX;
- Analisar a existência de relação ou não entre a atividade enzimática da *Mm*-POX e concentrações crescentes de ácido salicílico.

3. MATERIAIS

3.1 Reagentes

2-methoxyphenol (guaiacol), 3-amino-9-etil-carbazole, amino antipirina, azida, colesterol, ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA), ditioneitol (DTT), metabissulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), o-dianisidina, fenilmetilsufonilfluoreto (PMSF), tirosina, triptofano, foram obtidos da Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA ou Invitrogen, Carlsbad, EUA.

Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico e obtidos comercialmente.

4. METODOLOGIA

4.1 Determinação da atividade enzimática de *Mm*-POX

Para determinação da atividade peroxidásica foi utilizada a metodologia descrita por Urbanek, Kuzniak-Gebarowska e Herka (1991). Foi utilizado como substrato doador de prótons o guaiacol e como acceptor o peróxido de hidrogênio. A reação catalisada pela peroxidase produz um composto colorido, 3,3'-dimetoxi-4,4'-bifenolquinona (DOERGE; DIVI; CHUCHWELL, 1997), que é medido por espectroscopia. Partindo-se de 100 μ L das frações, diluídas ou não, dependendo de sua concentração proteica, foram adicionados 500 μ L de guaiacol 0,02 M e 500 μ L de peróxido de hidrogênio 0,06 M para um volume final de ensaio de 2 mL, completados com tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2. A mistura foi incubada por 10 minutos, a 30 °C, e a absorbância medida a 480 nm. A variação de 1 unidade de absorbância por minuto foi assumida como sendo 1 unidade de atividade peroxidásica (1 UAP).

4.2 Determinação dos parâmetros cinéticos da *Mm*-POX

A constante de Michaelis-Menten (K_m) e a velocidade máxima (V_{max}) da *Mm*-POX para os substratos guaiacol e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foram determinadas. Para obtenção do K_m e V_{max} da *Mm*-POX em relação ao guaiacol, a concentração de H_2O_2 foi fixada em 0,06 M (de acordo com a metodologia descrita no tópico anterior), enquanto a concentração de guaiacol variou de 0,0008 - 0,1 M. Já nos cálculos de K_m e V_{max} da *Mm*-POX relativos ao H_2O_2 , o guaiacol foi mantido a 0,02 M e o H_2O_2 teve sua concentração variando entre 0,00016 - 0,06 M. Para determinação dos parâmetros cinéticos citados, o gráfico de duplo-recíproco de Lineaweaver-Burk foi utilizado.

4.3 Avaliação da influência do pH na atividade enzimática da *Mm*-POX

Para determinação do pH ótimo da *Mm*-POX, foram utilizados diferentes tampões, incluindo: acetato de sódio 0,05 M; citrato de sódio 0,05 M; fosfato de sódio 0,05 M; glicina-HCl 0,05 M; glicina-NaOH 0,05 M e Tris-HCl 0,05 M. Os valores de pH variaram de acordo com o tampão utilizado e seus respectivos pKa, compreendendo a faixa de 2,0 a 9,0. O ensaio enzimático foi realizado conforme descrito anteriormente.

4.4 Avaliação da influência da temperatura na atividade enzimática da *Mm*-POX

As curvas cinéticas da *Mm*-POX em resposta a temperaturas distintas foram obtidas seguindo-se o ensaio colorimétrico para peroxidase de guaiacol (URBANEK; KUZNIAK-GEBAROWSKA; HERKA, 1991). Para tanto, amostras contendo a mistura reacional (guaiacol, H₂O₂ e tampão acetato de sódio 0,05 M) foram incubadas por 10 minutos a 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90 °C e, em seguida, adicionada uma alíquota de 10 µL da *Mm*-POX (0,4 µg/mL), a cada temperatura analisada, sendo imediatamente realizada a leitura espectroscópica a 480 nm, por 5 minutos, em intervalos de 30 segundos.

4.5 Avaliação da estabilidade térmica da *Mm*-POX

Para a obtenção dos dados de estabilidade térmica da atividade catalítica da *Mm*-POX, alíquotas da enzima foram incubadas a 60, 65, 70 e 75 °C nos tempos de 10, 20, 30 e 60 minutos. Após o período de incubação, foi procedido o ensaio colorimétrico para peroxidase de guaiacol (URBANEK; KUZNIAK-GEBAROWSKA; HERKA, 1991).

4.6 Avaliação da influência da concentração do tampão acetato de sódio na atividade enzimática da *Mm*-POX

A avaliação do efeito da concentração do tampão acetato de sódio pH 5,2 sobre a atividade catalítica da *Mm*-POX foi avaliada conforme a metodologia já

descrita nesse trabalho, incluindo concentrações variadas (0,002 a 1 M) do referido tampão, que é usado na mistura reacional.

4.7 Avaliação da influência de íons metálicos na atividade enzimática da *Mm*-POX

Para analisar os efeitos da adição de íons metálicos na atividade catalítica da *Mm*-POX, NaCl, MgCl₂, MnCl₂ ou CaCl₂ foram adicionados à mistura reacional do ensaio colorimétrico para peroxidase de guaiacol, nas seguintes concentrações: 0,01; 0,05; 0,10; 0,20 e 0,50 M e o ensaio conduzido conforme descrito previamente.

4.8 Investigação do efeito de inibidores de peroxidases sobre a atividade enzimática da *Mm*-POX

Para avaliação do efeito de inibidores específicos de peroxidases sobre a atividade catalítica da *Mm*-POX, NaN₃ (azida), DTT, Na₂S₂O₅, EDTA e PMSF a 0,001 M foram adicionados ao meio reacional no ensaio de atividade peroxidásica, como descrito por Johri *et al.* (2005). Após a reação química, a atividade enzimática residual foi determinada.

4.9 Avaliação da capacidade da *Mm*-POX em utilizar outros compostos como substratos

Ácido ascórbico (290 nm), *o*-dianisidina (460 nm), aminoantipirina (510 nm), colesterol (500 nm), tirosina (260 nm) e triptofano (280 nm) foram utilizados como agentes redutores análogos ao guaiacol, para testar a capacidade da *Mm*-POX em utilizar outros substratos específicos de peroxidases em geral. Esses compostos foram utilizados de acordo com a metodologia descrita por Johri *et al.* (2005), com ligeiras modificações, de modo a se adequar à atividade da enzima, na concentração final de 0,02 M, em tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2, adicionado de H₂O₂ 0,06 M. A atividade específica foi descrita como o aumento da

absorbância em decorrer do tempo, à exessão do ácido ascórbico, o qual foi determinado pela diminuição de absorbância.

4.10 Avaliação da influência do ácido salicílico sobre a atividade enzimática da *Mm*-POX

Para analisar o efeito do ácido salicílico sobre a atividade catalítica da *Mm*-POX, esse composto (variando de 5×10^{-5} a 0,1 M) foi adicionado à mistura reacional do ensaio colorimétrico para peroxidase de guaiacol (URBANEK; KUZNIAK-GEBAROWSKA; HERKA, 1991), seguindo a metodologia descrita por Johri *et al.* (2005).

4.11 Análise estatística

Na análise estatística foi utilizado o programa GraphPad Prism, versão 5.0 para Windows (*GraphPad software*), estando os resultados expressos com média \pm erro padrão da média. A avaliação estatística dos dados foi realizada através de ANOVA, testes paramétricos e não paramétricos, sendo considerados significativos valores de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Parâmetros cinéticos da *Mm*-POX

5.1.1 Valores de K_m e V_{max} da *Mm*-POX com o guaiacol como substrato

A Figura 2 mostra o gráfico de Michaelis-Menten e a posterior linearização dos dados no gráfico duplo-recíproco de Lineaweaver-Burk quando utilizado o substrato guaiacol, a partir do qual foi construída a equação da reta, apresentando coeficiente de determinação (R^2) de 0,9795. Os valores de K_m e V_{max} estimados a partir dessa equação foram $0,0061 \pm 0,0006$ M e $0,109 \pm 0,003$ UAP min^{-1} , respectivamente.

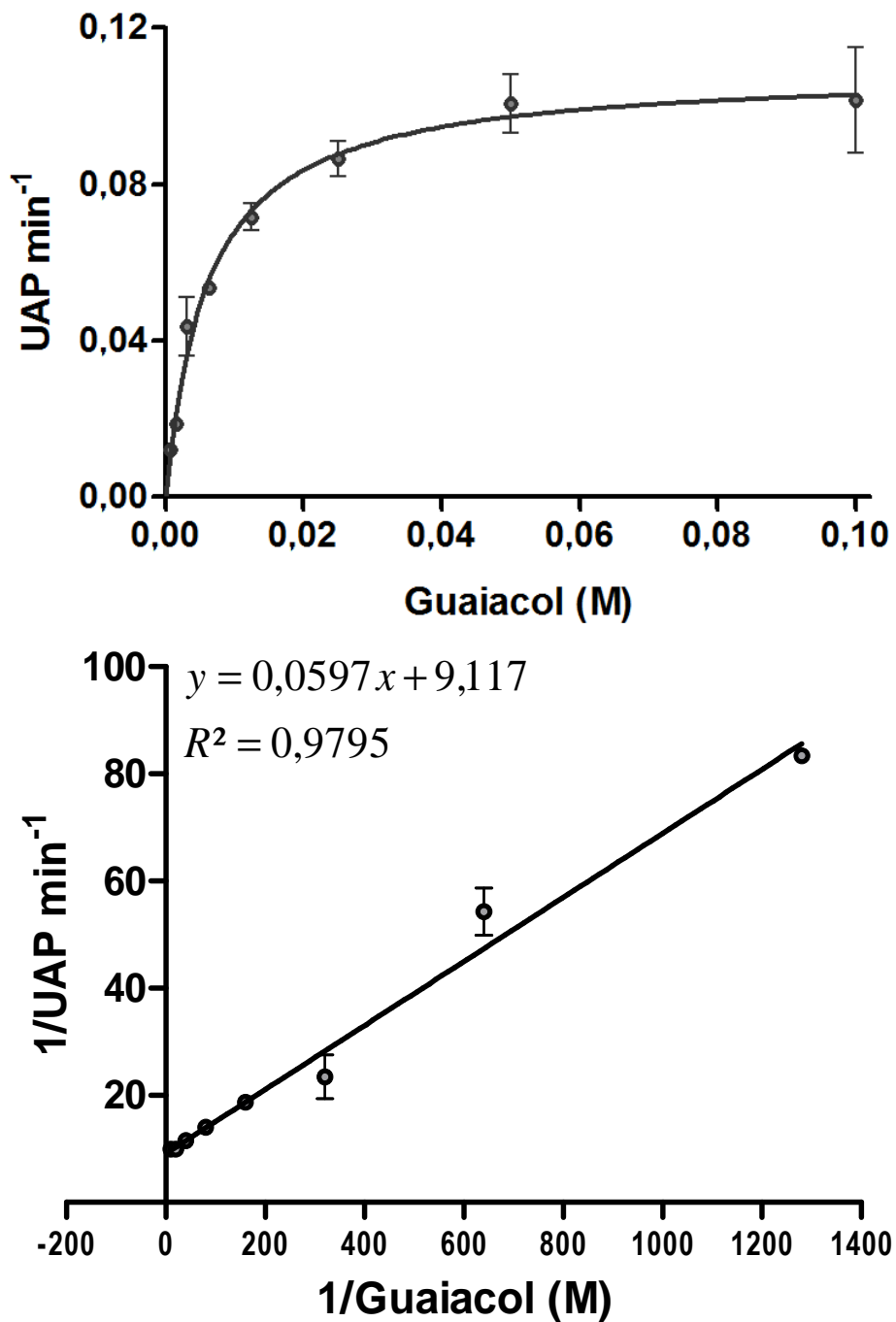
5.1.2 Valores de K_m e V_{max} da *Mm*-POX com o peróxido de hidrogênio como substrato

A Figura 3 exhibe o gráfico de Michaelis-Menten e a linearização dos dados obtidos no gráfico duplo-recíproco de Lineaweaver-Burk frente ao substrato H_2O_2 . Para a equação da reta definida, foi calculado um valor de R^2 de 0,9896, Com base nessa equação, foi estimado um valor de K_m de $0,0126 \pm 0,0011$ M e de V_{max} como sendo $0,096 \pm 0,003$ UAP min^{-1} .

5.2 Efeito do pH na atividade enzimática da *Mm*-POX

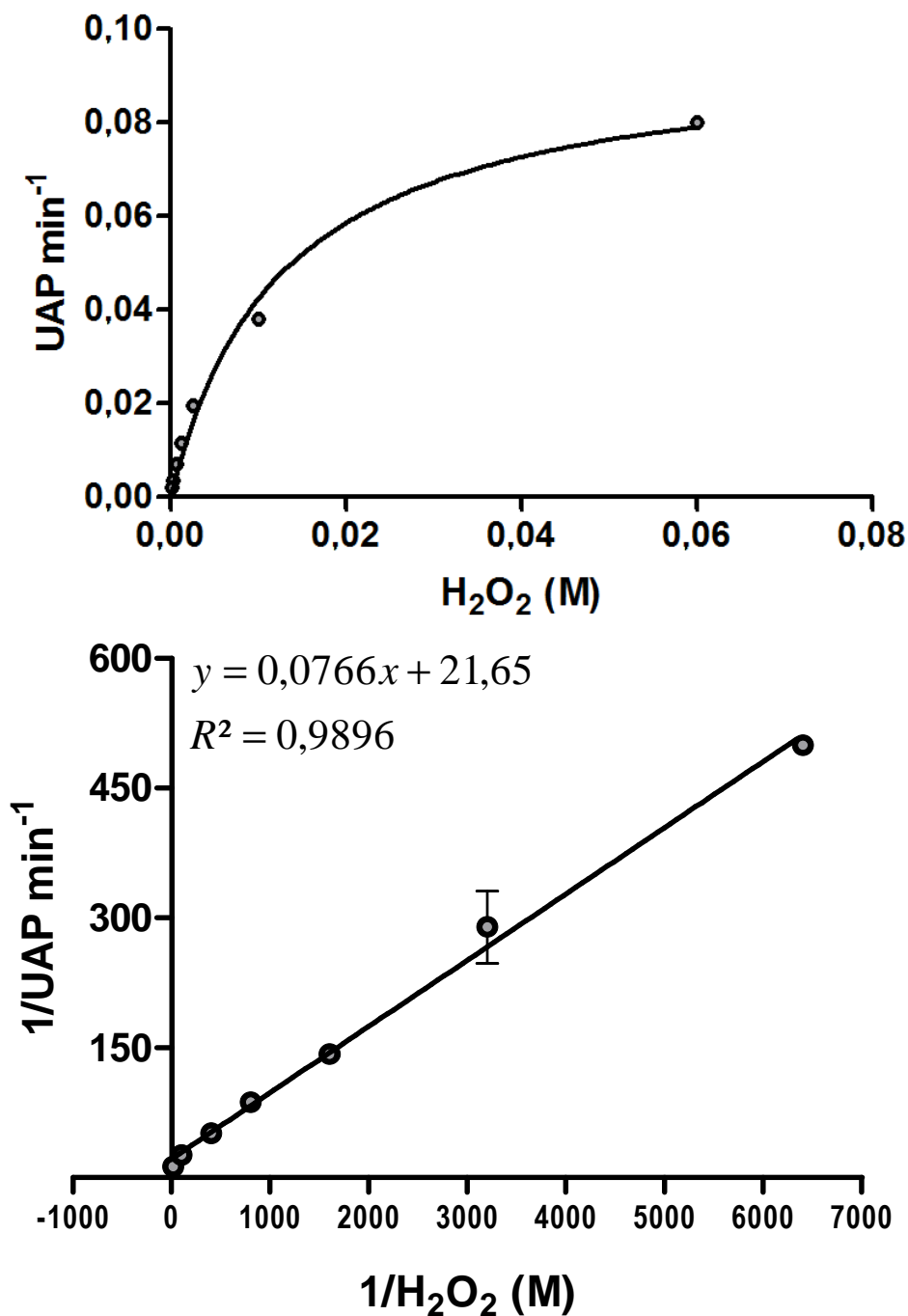
A influência da concentração dos íons hidrogênio do meio sobre a atividade enzimática da *Mm*-POX está demonstrada na Figura 4. Os resultados obtidos levaram à construção de uma curva em forma de sino, onde é observado que a atividade peroxidásica aumenta a partir do pH 4, atinge valores máximos no intervalo de pH entre 5 e 7 e decai em pHs mais elevados. Em valores extremos de

FIGURA 2 - Cinética enzimática da *Mm*-POX variando-se o guaiacol e fixando-se o peróxido de hidrogênio. (A) Gráfico de Michaelis-Menten; (B) Gráfico duplo recíproco de Lineaweaver-Burk



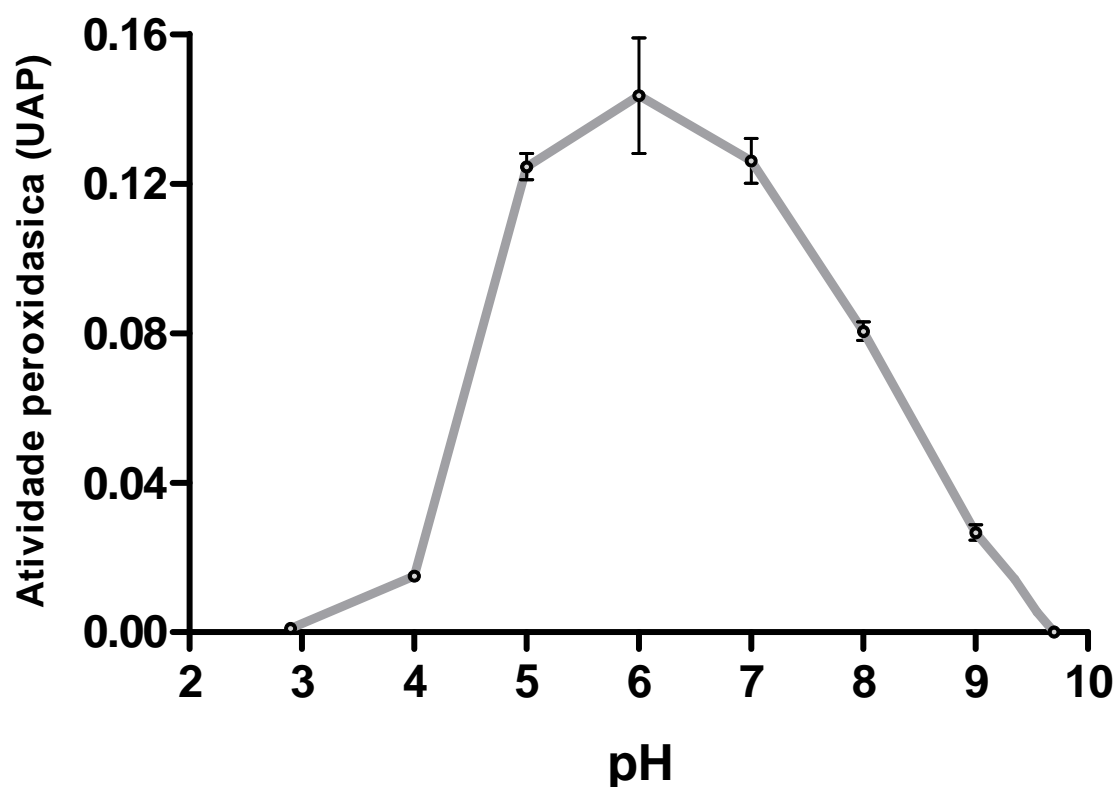
Fonte: Elaborada pelo autor.

FIGURA 3 - Cinética enzimática da *Mm*-POX variando-se o peróxido de hidrogênio e fixando-se o guaiacol. (A) Gráfico de Michaelis-Menten; (B) Gráfico duplo recíproco de Lineaweaver-Burk.



Fonte: Elaborada pelo autor.

FIGURA 4 – Efeito do pH sobre a atividade enzimática da *Mm*-POX. A atividade peroxidásica (UAP) foi mensurada na presença de diferentes tampões com valores de pH distintos. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$).



Fonte: Elaborada pelo autor.

pH, seja muito ácido (abaixo de 3) ou muito básico (acima de 8), a atividade enzimática da *Mm*-POX foi totalmente perdida.

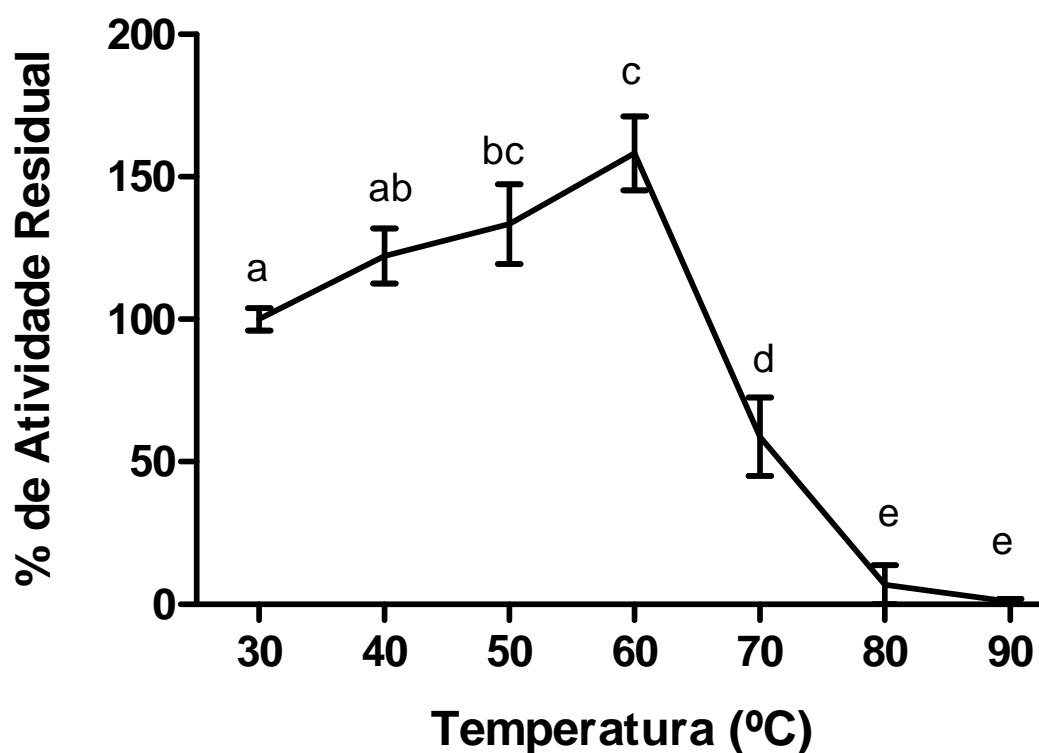
5.3 Efeito da temperatura na atividade enzimática da *Mm*-POX

O efeito da temperatura sobre a atividade catalítica da *Mm*-POX está demonstrado na Figura 5. À medida que a temperatura do ensaio aumenta de 30 a 60 °C, um incremento gradual na atividade peroxidásica ocorre, atingindo um valor máximo em torno de 60 °C. Após essa temperatura, ocorre um decréscimo substancial da atividade, com uma queda de 50% da atividade original em torno de 70 °C e perda total de atividade a 80 °C.

5.4 Estabilidade térmica da atividade enzimática da *Mm*-POX

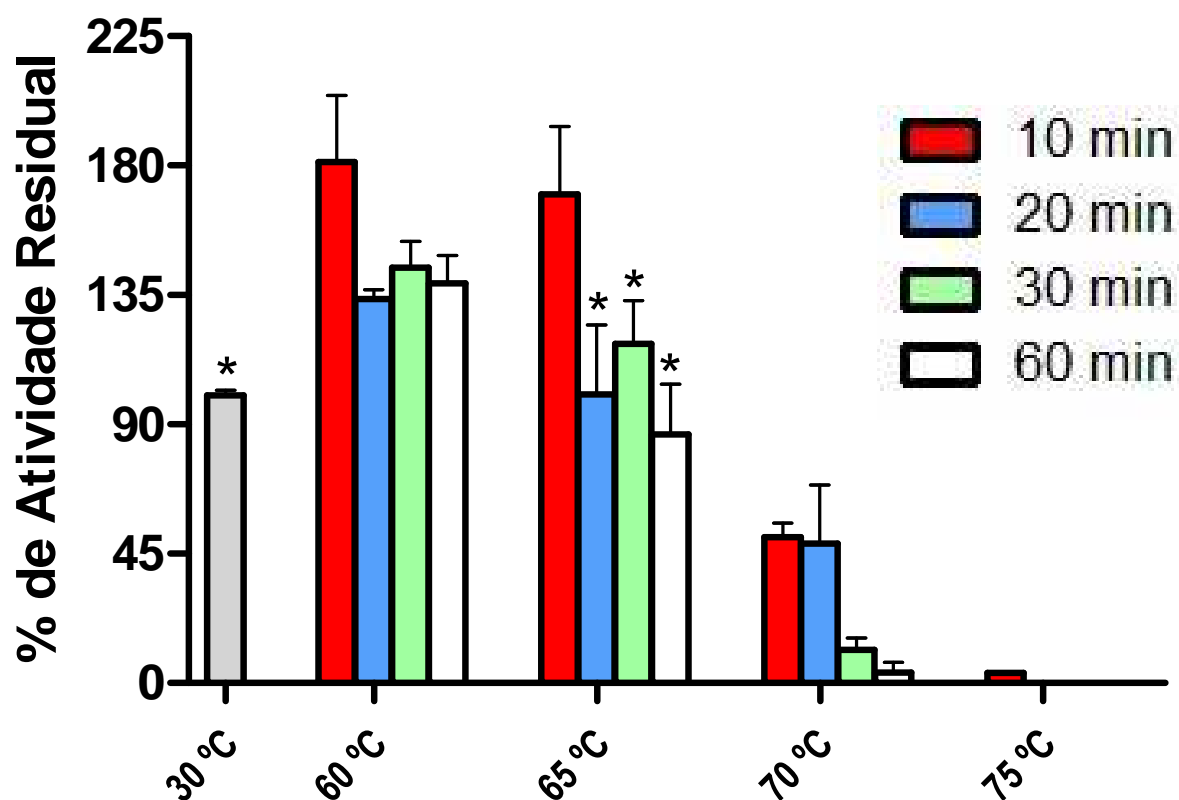
A Figura 6 demonstra o comportamento da atividade enzimática da *Mm*-POX na sua temperatura ótima, quando considerados diferentes intervalos de tempo de incubação do meio reacional. A 60 °C, a atividade peroxidásica se manteve mais elevada do que a que foi determinada em condições padrão (30 °C, incubação por 10 minutos), mesmo após 60 minutos de incubação. Porém, com 10 minutos de incubação nessa temperatura, é que foi verificado um incremento máximo, o qual correspondeu a um acréscimo de 50% em relação à atividade original. Esse mesmo aumento na atividade foi verificado a 65 °C, porém essa estabilidade térmica apenas foi detectada no tempo de incubação por 10 minutos, pois em intervalos maiores, a atividade peroxidásica se manteve igual ou menor àquela determinada em condições padrão. Instabilidade térmica também foi constatada a 70 e 75 °C. Em apenas 10 minutos de incubação da enzima, reduções da ordem de 50% e de quase 100% da atividade peroxidásica foram observadas a 70 °C e 75 °C, respectivamente. O binômio temperatura x tempo em que a *Mm*-POX parece perder totalmente sua atividade catalítica foi encontrado como sendo 30 minutos de incubação a 70 °C.

FIGURA 5 – Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática da *Mm*-POX. A atividade enzimática (UAP) foi mensurada em diferentes temperaturas e expressa em relação à atividade originalmente determinada para a *Mm*-POX, em condições padrão (incubação com acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2, por 10 minutos, a 30 °C). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$).



Fonte: Elaborada pelo autor.

FIGURA 6 – Estabilidade térmica da atividade enzimática da *Mm*-POX. A atividade enzimática (UAP) foi mensurada a 60 °C, previamente determinada como sendo a temperatura ótima e, também, em temperaturas próximas a esta, em diferentes tempos de incubação. Os resultados estão expressos em relação à atividade originalmente determinada para a *Mm*-POX, em condições padrão (incubação com acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2, por 10 minutos, a 30 °C). Asteriscos indicam ausência de diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação à atividade determinada em condições padrão.



Fonte: Elaborada pelo autor.

5.5 Efeito da concentração do tampão acetato de sódio na atividade enzimática da *Mm*-POX

Os resultados relativos à avaliação da influência da concentração do tampão acetato de sódio na atividade catalítica da *Mm*-POX estão apresentados na Figura 7. Baixas concentrações (abaixo da concentração padrão para o ensaio, isto é, 0,05 M) induzem um incremento significativo da atividade peroxidásica, aumentando em até 15%, conforme verificado na concentração em torno de 0,004 M. Com o aumento da concentração do tampão, o efeito observado é o inverso, tendo sido detectadas reduções na atividade da enzima em torno de 25, 50 e 70%, com 0,25, 0,5 e 1 M de acetato de sódio, respectivamente.

5.6 Efeito da presença de íons metálicos na atividade enzimática da *Mm*-POX

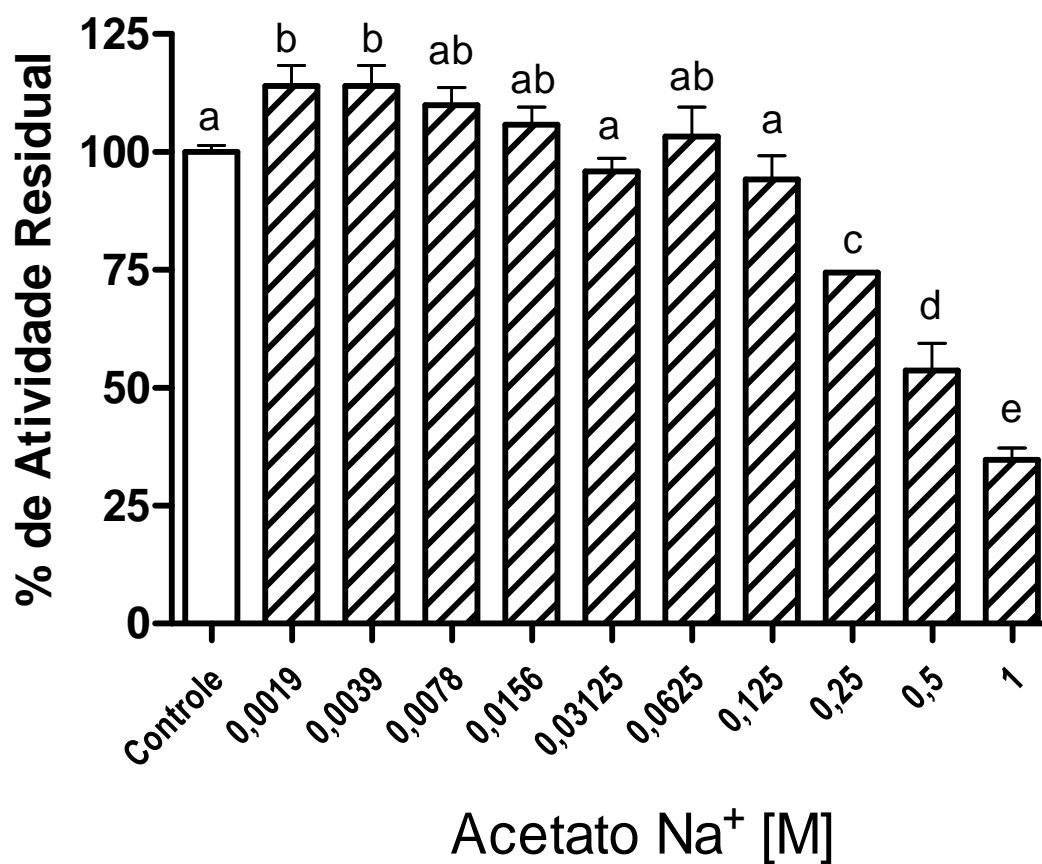
Os efeitos de íons metálicos sobre a atividade catalítica da *Mm*-POX foram avaliados, através da adição dos sais NaCl, MgCl₂, MnCl₂ e CaCl₂ na mistura reacional.

A Figura 8 mostra o efeito da adição do íon sódio na mistura reacional. Em concentrações próximas àquela do ensaio (0,05 M) e 0,1 M, esse íon não alterou a atividade catalítica da *Mm*-POX. Entretanto, na concentração de 0,2 M, uma diminuição da atividade em torno de 25% foi observada. Essa redução aumentou para 50% na concentração máxima utilizada, que foi 0,5 M.

Os efeitos do íon magnésio estão mostrados na Figura 9. Com MgCl₂ a 0,01 M, nenhuma alteração significativa na atividade da enzima foi observada em relação ao controle. Porém, em concentrações mais elevadas (0,05 a 0,5 M), um aumento, em torno de 30%, da atividade enzimática da *Mm*-POX foi detectado.

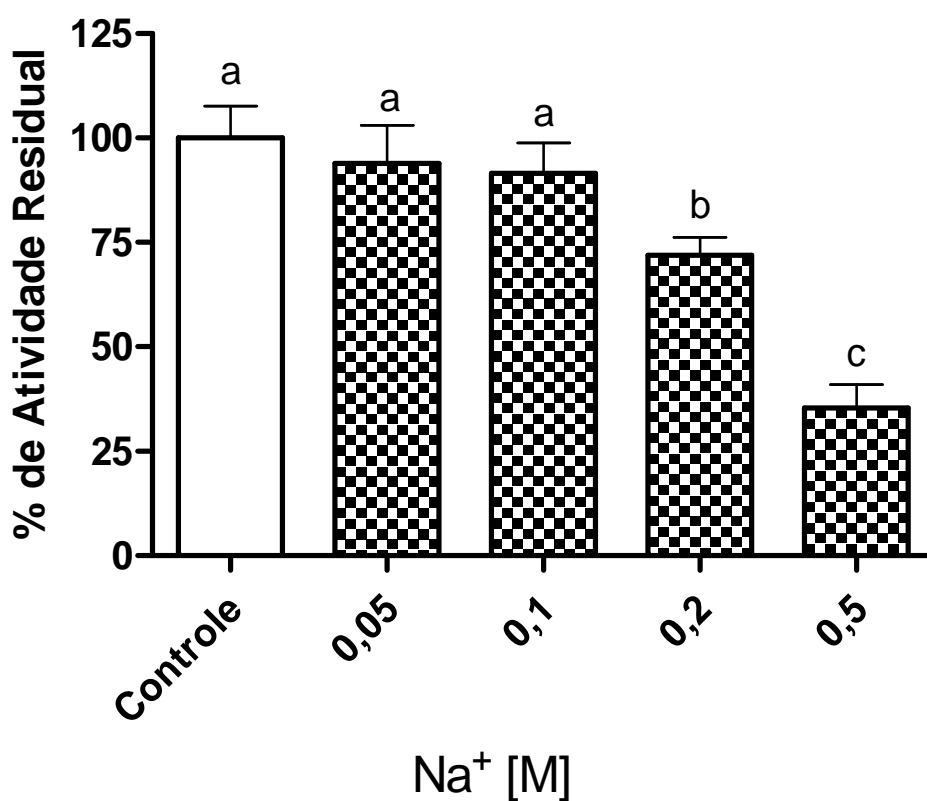
Em relação à presença do íon manganês na mistura reacional, um efeito indutor da atividade catalítica da *Mm*-POX foi observado na concentração de 0,01 M, cujo incremento foi da ordem de 20% (FIGURA 10). Entretanto, o Mn⁺⁺, quando presente na concentração de 0,05 M, acarretou uma inibição da atividade catalítica

FIGURA 7 – Efeito da concentração do tampão acetato de sódio sobre a atividade enzimática da *Mm*-POX. A atividade enzimática (UAP) foi mensurada em diferentes concentrações de acetato de sódio e expressa em relação à atividade originalmente determinada para a *Mm*-POX, em condições padrão (incubação por 10 minutos, a 30 °C). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$).



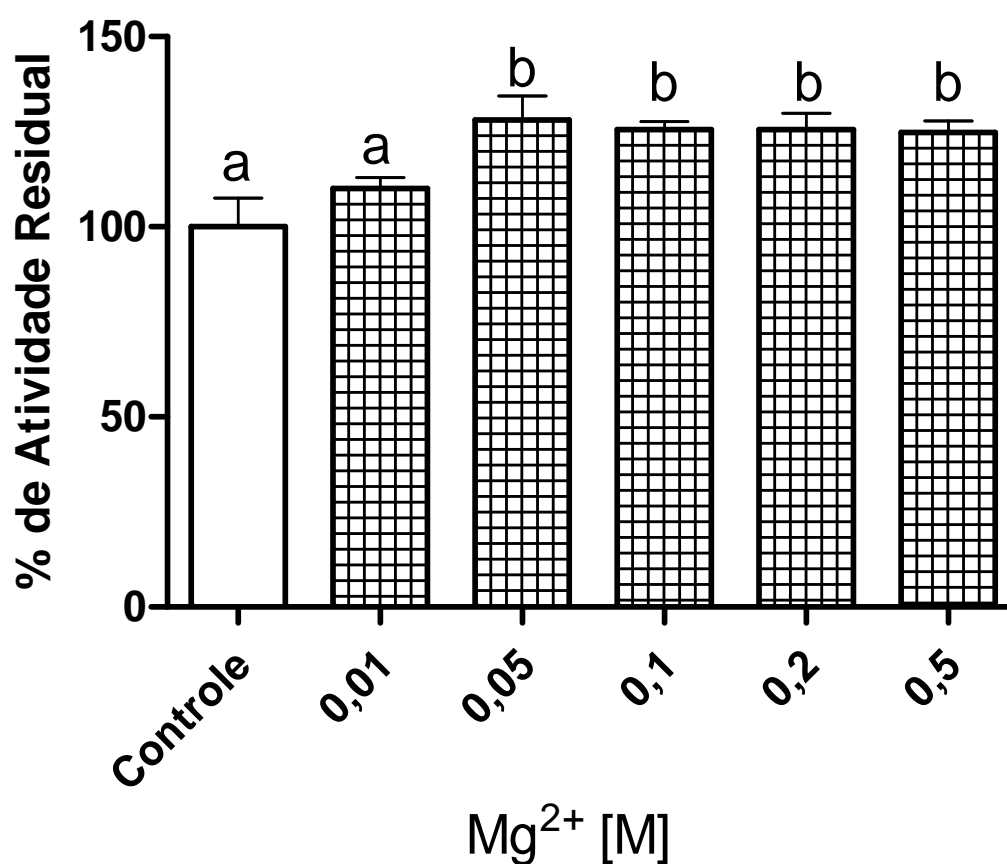
Fonte: Elaborada pelo autor.

FIGURA 8 – Efeito do íon sódio (Na^+) sobre a atividade enzimática da *Mm*-POX. A atividade enzimática (UAP) foi mensurada na presença de concentrações crescentes de NaCl, adicionado no tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2. Os resultados estão expressos em relação à atividade originalmente determinada para a *Mm*-POX, em condições padrão (incubação com acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2, por 10 minutos, a 30 °C). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$).



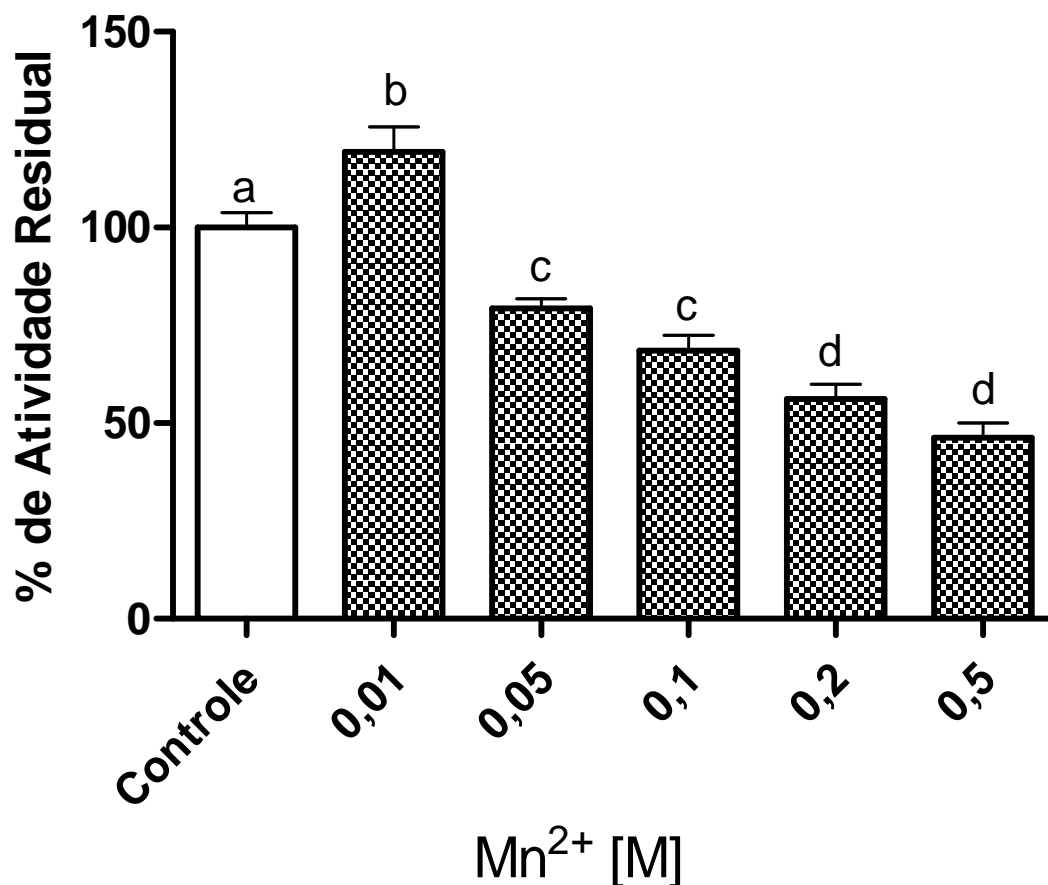
Fonte: Elaborada pelo autor.

FIGURA 9 – Efeito do íon magnésio (Mg^{2+}) sobre a atividade enzimática da *Mm*-POX. A atividade enzimática (UAP) foi mensurada na presença de concentrações crescentes de $MgCl_2$, adicionado no tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2. Os resultados estão expressos em relação à atividade originalmente determinada para a *Mm*-POX, em condições padrão (incubação com acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2, por 10 minutos, a 30 °C). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$).



Fonte: Elaborada pelo autor.

FIGURA 10 – Efeito do íon manganês (Mn^{2+}) sobre a atividade enzimática da *Mm*-POX. A atividade enzimática (UAP) foi mensurada na presença de concentrações crescentes de $MnCl_2$, adicionado no tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2. Os resultados estão expressos em relação à atividade originalmente determinada para a *Mm*-POX, em condições padrão (incubação com acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2, por 10 minutos, a 30 °C). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$).



Fonte: Elaborada pelo autor.

da *Mm*-POX em torno de 30% e, quando em concentrações maiores (0,2 e 0,5 M), essa redução atingiu 50%, em comparação ao controle.

Quanto ao íon cálcio, seu efeito sobre a atividade enzimática da *Mm*-POX está apresentado na Figura 11. Quando presente na reação, o cálcio se comportou como um indutor da atividade da *Mm*-POX. Mesmo na menor concentração utilizada, 0,01 M, um aumento da atividade em torno de 40%, em comparação ao controle (ausência de cálcio), já foi visualizado. Esse incremento chegou a ser maior, em torno de 85%, quando adicionado cálcio em concentrações mais elevadas.

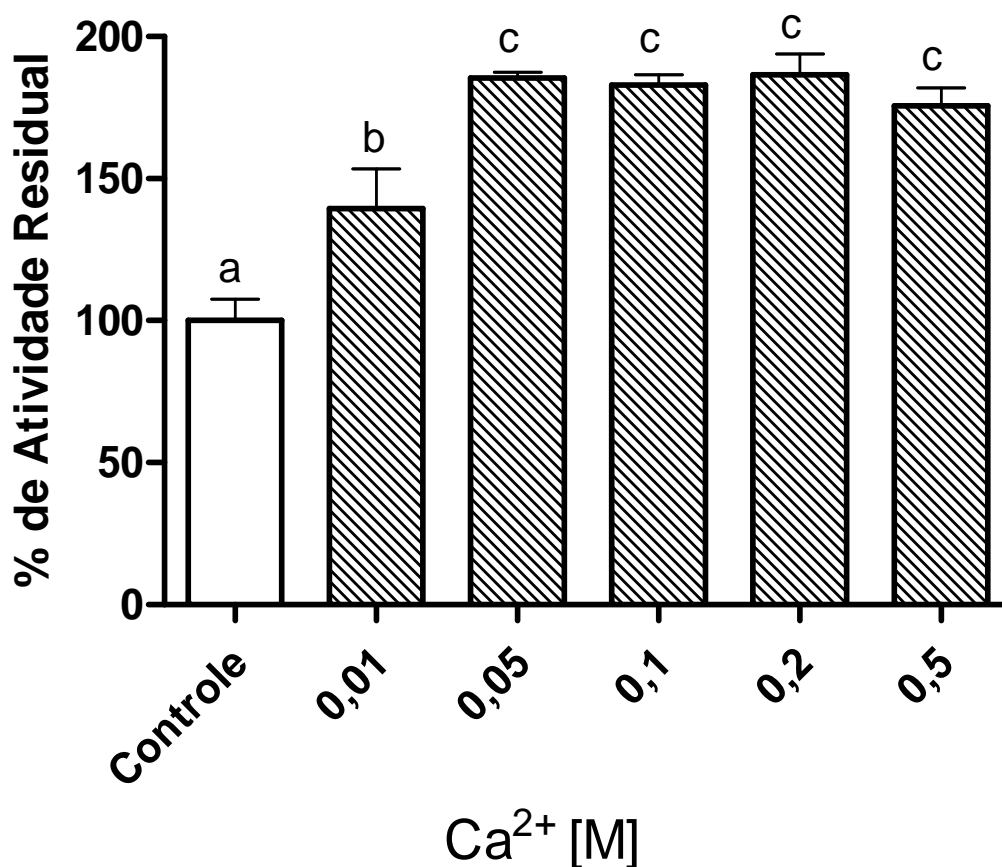
5.7 Inibidores da atividade enzimática da *Mm*-POX

A Figura 12 demonstra o efeito de inibidores conhecidos de peroxidases sobre a atividade enzimática da *Mm*-POX. Embora todos os compostos testados estivessem na mesma concentração (0,001 M), a interação deles com a *Mm*-POX parece ter sido distinta, dada às interferências diferenciadas na atividade enzimática. PMSF não causou efeito algum na atividade da *Mm*-POX, diferentemente do ocorrido na presença do $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ e EDTA, que promoveram inibições da atividade enzimática em torno de 60 e 70%, respectivamente. Com a azida e o DTT, os efeitos negativos foram mais proeminentes, uma vez que 100% da atividade catalítica da *Mm*-POX foi abolida.

5.8 Potencial de oxidação da *Mm*-POX utilizando diferentes substratos de peroxidases em geral

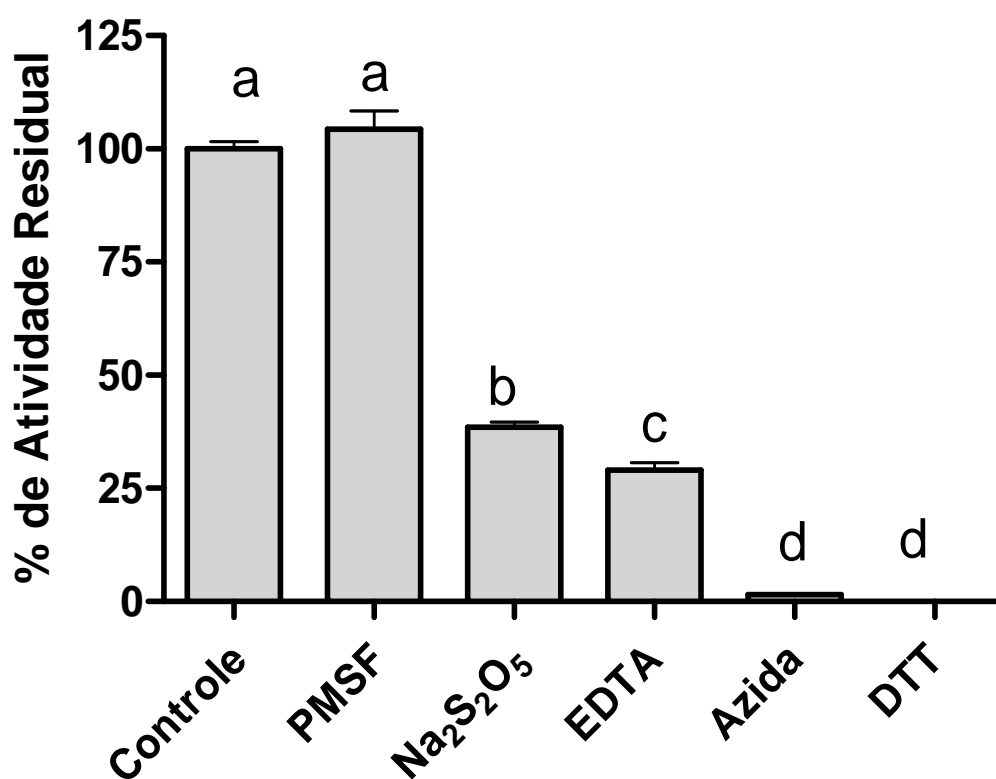
A capacidade da *Mm*-POX de usar outros substratos como doadores de prótons, oxidando-os e promovendo a redução do H_2O_2 está demonstrada na Figura 13. Dentre os compostos testados, nenhum foi tão eficiente em promover a degradação do H_2O_2 quanto o guaiacol. Assim, embora a enzima tenha sido também capaz de utilizar a *o*-dianisidina, tirosina e o ácido ascórbico, para tais compostos, as atividades enzimáticas da *Mm*-POX corresponderam a apenas 65, 35 e 20%,

FIGURA 11 – Efeito do íon cálcio (Ca^{2+}) sobre a atividade enzimática da *Mm*-POX. A atividade enzimática (UAP) foi mensurada na presença de concentrações crescentes de CaCl_2 , adicionado no tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2. Os resultados estão expressos em relação à atividade originalmente determinada para a *Mm*-POX, em condições padrão (incubação com acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2, por 10 minutos, a 30 °C). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$).



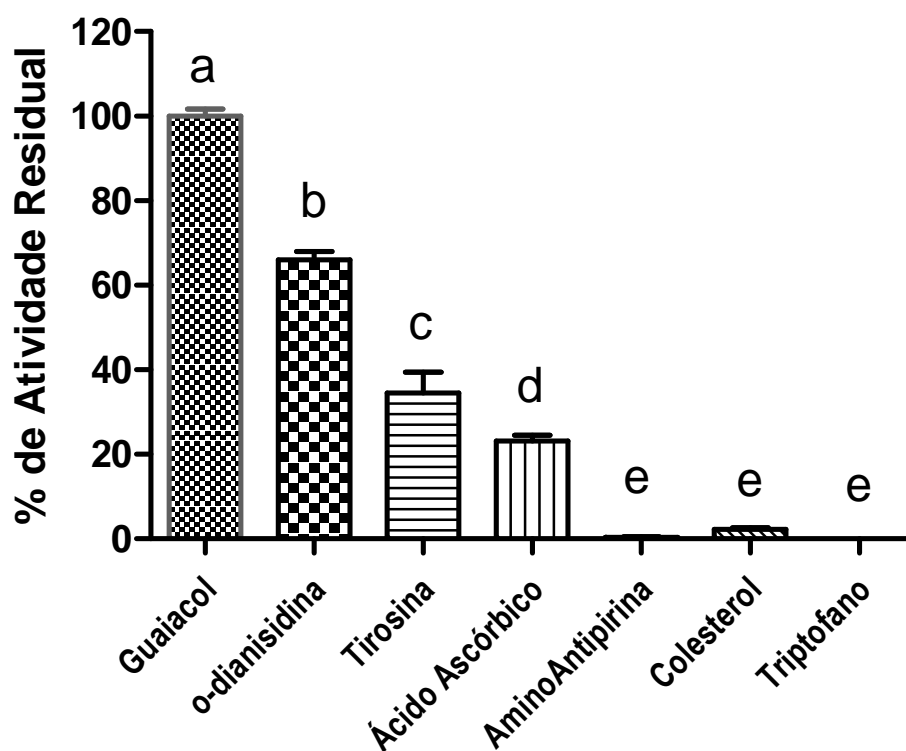
Fonte: Elaborada pelo autor.

FIGURA 12 – Efeito de inibidores clássicos de peroxidases em geral sobre a atividade enzimática da *Mm*-POX. A atividade enzimática (UAP) foi mensurada na presença de inibidores de peroxidases a 0,001 M, adicionado no tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2. Os resultados estão expressos em relação à atividade originalmente determinada para a *Mm*-POX, em condições padrão (incubação com acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2, por 10 minutos, a 30 °C). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$).



Fonte: Elaborada pelo autor.

FIGURA 13 – Capacidade da *Mm*-POX de utilizar diferentes substratos de peroxidases como doadores de prótons na reação com o H_2O_2 . A atividade enzimática (UAP) foi mensurada na presença de diferentes substratos de peroxidases a 0,02 M, adicionado no tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2. Os resultados estão expressos em relação à atividade originalmente determinada para *Mm*-POX, na presença do guaiacol como doador de prótons. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$).



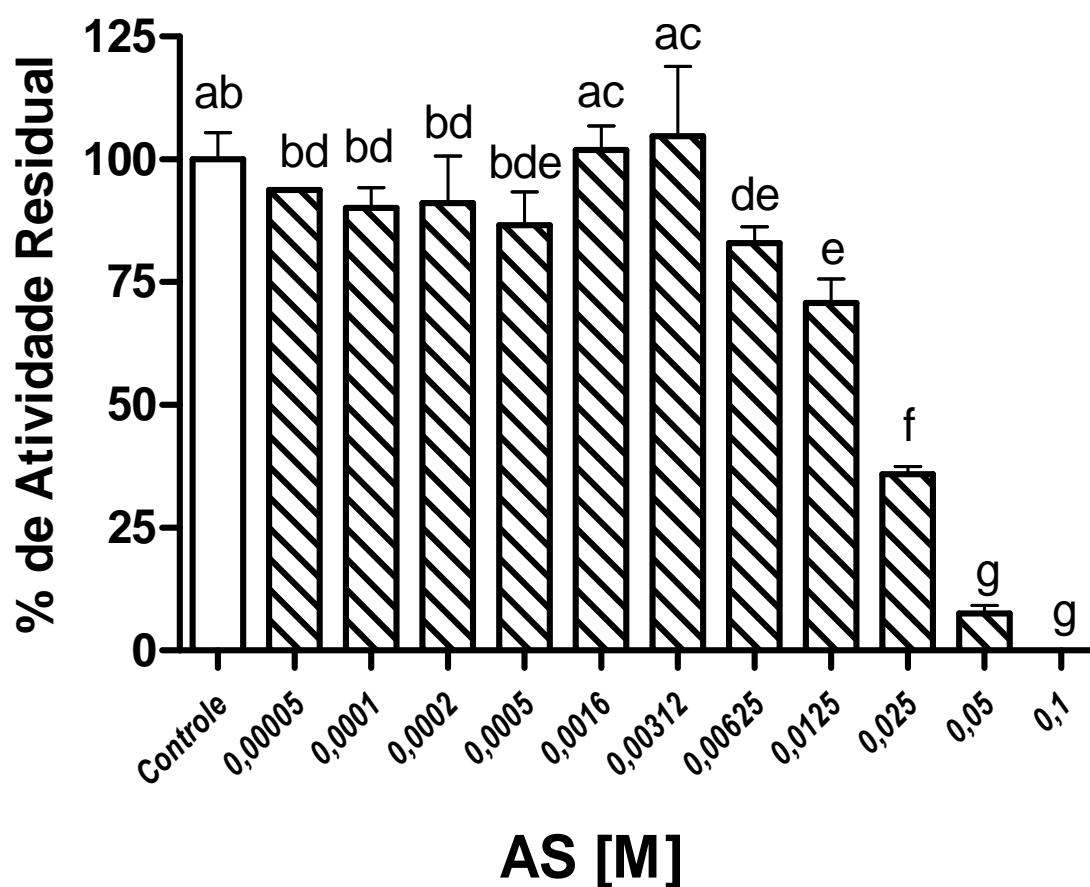
Fonte: Elaborada pelo autor.

respectivamente, daquela detectada com o guaiacol. Já com o uso de aminoantipirina, colesterol ou triptofano, a atividade enzimática da *Mm*-POX foi nula.

5.9 Influência do ácido salicílico sobre a atividade enzimática da *Mm*-POX

A Figura 14 demonstra o efeito do ácido salicílico sobre a atividade catalítica da *Mm*-POX. Até a concentração de 0,003 M, o ácido salicílico não causou alterações significativas na atividade da enzima. No entanto, em concentrações mais elevadas desse ácido, interferência na atividade catalítica da *Mm*-POX foi detectada. As reduções observadas corresponderam, em média, a 20, 30, 65 e 95%, com a adição do ácido salicílico nas concentrações de 0,006, 0,01, 0,02 e 0,05 M, respectivamente.

FIGURA 14 – Efeito do ácido salicílico (AS) sobre a atividade enzimática da *Mm-POX*. A atividade enzimática (UAP) foi mensurada sob as condições padrões, com adição do AS em diferentes concentrações no tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2. Os resultados estão expressos em relação à atividade. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$).



Fonte: Elaborada pelo autor.

6. DISCUSSÃO

Como continuidade dos estudos de caracterização da nova peroxidase purificada do látex de *M. megalantha*, um estudo abrangente com foco na atividade enzimática foi realizado, no intuito de entender o mecanismo de catálise da *Mm*-POX e, também, na perspectiva de colaborar para o conhecimento de seu papel fisiológico e de suas potenciais aplicabilidades.

A caracterização enzimática da *Mm*-POX foi iniciada com a determinação de seus parâmetros cinéticos K_m e V_{max} frente aos substratos guaiacol e H_2O_2 . Os dados obtidos são indicativos de que a *Mm*-POX se trata de uma enzima que segue a cinética de Michaelis-Menten (FIGURAS 2 e 3). O valor de K_m para o guaiacol ($6,1 \times 10^{-3}$ M ou 6,1 mM) sugere que a *Mm*-POX apresenta excelente afinidade por tal substrato, comparável à de outras peroxidases, tais como a VanPrx de *Viscum angulatum* e a POII de *Citrus jambhiri*, cujos valores de K_m foram 5,8 mM e 5 mM, respectivamente (MOHAMED *et al.*, 2008; DAS; SHARMA; MISHRA, 2011). No entanto, o K_m , em geral, é um parâmetro bastante variável nas peroxidases (PANDEY; DWIVEDI, 2011; MOHAMED; DARWISH; EL-SHISHTAWY, 2013). Por exemplo, a peroxidase classe III purificada do látex de *Ficus sycomora* mostrou K_m para o guaiacol um pouco maior (9,8 mM). Valores de K_m mais discrepantes foram encontrados para a *VuPox* e uma peroxidase catiônica, ambas de *Vigna unguiculata* (33,44 e 0,0048, mM, respectivamente), peroxidase de *Beta vulgaris* (98,6 mM) e JcGP1 de *Jatrophas curcas* (0,17 mM) (FERNANDES *et al.*, 2006; RUDRAPPA *et al.*, 2007; FREITAS, 2011; CAI *et al.*, 2012).

Quando considerado o outro substrato, isto é o H_2O_2 , uma afinidade menor da *Mm*-POX foi verificada (cerca de duas vezes), em comparação ao guaiacol. Quando o K_m da *Mm*-POX para o H_2O_2 foi comparado ao de outras peroxidases, evidencia-se uma heterogeneidade, sendo conferida à *Mm*-POX uma afinidade intermediária (FERNANDES *et al.*, 2006; RUDRAPPA *et al.*, 2007; MOHAMED *et al.*, 2008; FREITAS, 2011; DAS; SHARMA; MISHRA, 2011; CAI *et al.*, 2012). Algumas peroxidases classe III apresentam um fenômeno relacionado à

inibição de sua atividade por excesso de peróxido no meio, que está associada à oxidação do grupo heme para íon ferril, favorecendo a formação de oxiperoxidasas (OLSEN; LITTLE 1979; RANI; ABRAHAM, 2006). A *VuPox* foi inibida pela ação do H_2O_2 em concentrações acima de 10 mM (FREITAS, 2011). Inibição da peroxidase de rábano selvagem também foi demonstrada pelo excesso de H_2O_2 (MALOMO *et al.*, 2011). No entanto, nenhum efeito de inibição por excesso de H_2O_2 foi verificado para a *Mm-POX*, tendo sido utilizadas concentrações superiores a 60 mM e, ainda assim, sua atividade catalítica foi mantida (FIGURA 3). A ausência desse efeito é bastante promissora, em termos biotecnológicos, uma vez que a utilização dessa enzima em processos industriais, empregando quantidades elevadas de H_2O_2 , não prejudicaria sua função catalítica (MALOMO *et al.*, 2011).

A ação das POX, por ser um grupo de moléculas multifuncionais, está diretamente relacionada ao seu local de destino após sua síntese. Nas plantas, os diferentes compartimentos intra ou extracelulares, onde essas enzimas são encontradas, podem variar em diversos quesitos, incluindo aporte de nutrientes e de gases (CO_2 e O_2) e, principalmente, em relação ao pH (ZIPOR; SHAMIR, 2013). *Mm-POX* apresentou pH ótimo em torno de 6,0 (FIGURA 4). Esse pH ótimo está de acordo com o observado para a grande maioria das peroxidases, que costumam apresentar atividade máxima na faixa de pH de 5,0 a 6,0 (FLORIS; MEDDA; RINALDI, 1984; FREITAS, 2011; DAS; SHARMA; MISHRA, 2011; CAI *et al.*, 2012). É conhecido que a grande maioria das POX atua preferencialmente em ambientes levemente ácidos e que, ambientes mais alcalinos, podem culminar com a depleção do grupamento heme presente nessas proteínas (DAS; SHARMA; MISHRA, 2011; CAI *et al.*, 2012; ZIPOR; SHAMIR, 2013). Para a *Mm-POX*, que é uma enzima purificada do látex vegetal, essa questão é de alta relevância, dado ao fato de que um ambiente levemente acidificado é necessário para a coagulação das moléculas de isopreno, no momento em que o laticífero é rompido, o que coincide com a faixa de pH requerida para o ápice da atividade enzimática. Essa observação também se ajusta para outras peroxidases oriundas do látex vegetal (KEKWICK, 2001; MOHAMED; DARWISH; EL-SHISHTAWY, 2013).

Mm-POX mostrou aumento na atividade catalítica à medida que a temperatura foi elevada, apresentando temperatura ótima de atividade em torno de 60 °C (FIGURA 5). O incremento na atividade enzimática foi de quase duas vezes em relação àquela determinada a 30 °C. Essa atividade foi mantida mesmo após 1 hora de incubação a 60 °C (FIGURA 6). As peroxidases são proteínas conhecidas por possuírem estabilidade térmica elevada, pela presença de vários resíduos de cisteína na sua cadeia polipeptídica (HIRAGA *et al.*, 2001). A estabilidade térmica da *Mm*-POX pode ser fundamental para manutenção de suas propriedades, uma vez que a *M. megalantha* é uma espécie de ambientes de temperaturas elevadas, por longos períodos (GOYDER; MORILLO, 1994). Além disso, a estabilidade térmica da *Mm*-POX pode ter implicações biotecnológicas, tornando possível sua utilização em processos industriais que requeiram temperaturas mais altas, por períodos mais prolongados, a exemplo do que acontece com diversas peroxidases, ou mesmo com outras enzimas termoestáveis (HAKI; RAKSHIT, 2003; VEISH, 2004).

A ação catalítica da *Mm*-POX sofreu interferência decorrente da variação de concentração do tampão acetato de sódio na mistura reacional (FIGURA 7). Os resultados mostraram dualidade de efeito do tampão acetato de sódio. Concentrações baixas de acetato de sódio promoveram incremento da atividade enzimática, contrastando com a perda observada em concentrações elevadas desse tampão. Comportamento semelhante foi verificado para a peroxidase de rábano selvagem (MALOMO *et al.*, 2011). O efeito negativo sobre a atividade catalítica estaria relacionado ao fato de que o aumento da concentração de acetato de sódio na mistura reacional possivelmente estimularia uma reação cruzada com as moléculas de H₂O₂, promovendo a formação de compostos não reativos, os quais competiriam indiretamente com o substrato pela enzima (MALOMO *et al.*, 2011).

As POX são enzimas consideradas metaloproteínas, pois contêm o grupo heme em sua estrutura, cuja estabilização é dada por dois íons metálicos, como Ca²⁺, Mn²⁺, Na⁺, entre outros (BANCI, 1997; PANDEY; DWIVEDI, 2011). Os efeitos de íons metálicos (Na⁺, Mg²⁺, Mn²⁺ e Ca²⁺) também foram investigados sobre a atividade enzimática da *Mm*-POX. Na⁺ e Mn²⁺ apresentaram efeitos inibitórios para a *Mm*-POX, quando usados em concentrações mais altas (0,2 M e 0,05 M,

respectivamente) (FIGURAS 8 e 10). Por outro lado, Mg^{2+} e Ca^{2+} , já na concentração mais baixa (0,01 M), se mostraram capazes de potencializar a atividade enzimática da *Mm*-POX (FIGURAS 9 e 11). Esses resultados somam-se ao de outras peroxidases, no sentido de apresentar comportamento anômalo diante de diferentes íons metálicos. Pandey e Dwivedi (2011), analisando a peroxidase purificada de *Leucaena leucocephala*, demonstraram que o Na^+ , mesmo a 4 M, não exerceu influência em sua atividade catalítica. Quando relacionado ao efeito do Ca^{2+} sobre essa enzima, concentrações acima de 0,2 M de $CaCl_2$ promoveram diminuição da atividade, fato este não detectado com a *Mm*-POX. Para a *CCPP*, uma peroxidase purificada de *Euphorbia cotinifolia*, é constatada uma correlação similar a da *Mm*-POX, nos efeitos de Ca^{2+} e Mg^{2+} e, parcial, quando considerado o Na^+ , onde esse último íon foi capaz de promover ativação enzimática em concentrações baixas, mas que acima de 0,08 M causou redução da atividade catalítica (KUMAR *et al.*, 2011). Não obstante, a POII de *C. jambhiri* não sofreu qualquer tipo de efeito na atividade enzimática com a adição tanto de Ca^{2+} quanto de Mn^{2+} (MOHAMED *et al.*, 2008). Estudos estruturais das POX revelaram dois sítios de interação para íons Ca^{2+} , os quais podem levar à inativação da proteína com a sua remoção, pela alteração das propriedades redox do íon ferro no grupamento heme e, conseqüentemente, das taxas de redução dos compostos I e II (BANCI, 1997). Algumas POX podem apresentar compatibilidade com diferentes íons nas cavidades destinadas aos Ca^{2+} (BANCI, 1997) e isso poderia explicar a ativação da *Mm*-POX, ou mesmo de enzimas similares, por outros íons.

Dentre os diferentes inibidores testados para peroxidases, azida e DTT se apresentaram como os de maiores efeitos sobre a *Mm*-POX (FIGURA 12). A azida é considerada um inibidor clássico da atividade peroxidásica *in vitro*, sendo a sua atuação sobre o grupo heme das enzimas já bastante descrita (DAS; SHARMA; MISHRA, 2011). O DTT pode atuar principalmente reduzindo as pontes dissulfeto, formadas pelos resíduos de cisteína presentes ao longo da cadeia de aminoácidos e, assim, promover uma desestabilização da estrutura tridimensional da molécula. Também foi observada a inibição da atividade enzimática da *Mm*-POX pelo EDTA e $Na_2S_2O_5$ (FIGURA 12). O EDTA é um agente quelante conhecido, que pode sequestrar os íons metálicos presentes em solução ou acoplados às proteínas,

promovendo a inativação das peroxidases por sequestrar os Ca^{2+} essenciais para sua ação catalítica (BANCI, 1997). Já o $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ atua como antioxidante, impedindo que as reações de formação dos compostos I e II ocorram através da formação do complexo peroxidase-substrato (POULOS, 1993; BANCI, 1997). Johri *et al.* (2005) caracterizaram peroxidases presentes em *Withania somnifera*, cujos perfis de inibição foram extremamente parecidos com os da *Mm*-POX, em relação ao conjunto de inibidores analisados.

As POX são enzimas relacionadas a diversos fenômenos fisiológicos nas plantas, os quais estão, na maioria das vezes, relacionados às suas propriedades enzimáticas *in vitro*, evidenciadas pela multiplicidade de substratos passíveis de serem utilizados. Muitos estudos são realizados na tentativa de entender o verdadeiro papel dessas proteínas nos processos homeostáticos, mas, até o momento, essa função ainda é indefinida (Cosio; Dunand, 2009; HAMID; REHMAN, 2009; ZIPOR; SHAMIR, 2013). No entanto, a definição da especificidade de uma peroxidase é fundamental para a compreensão de seu papel fisiológico. A Figura 13 mostra alguns substratos capazes de serem utilizados pela *Mm*-POX, embora sua preferência pelo guaiacol tenha sido patente, mesmo quando considerada a *o*-dianisidina, que é outro substrato clássico de peroxidases. A POII, peroxidase de *C. jambhiri*, também possui preferência pelo guaiacol, em detrimento da *o*-dianisidina, não apresentando atividade frente à tirosina e o ácido ascórbico (MOHAMED *et al.*, 2008). Peroxidases de *W. somnifera* foram capazes de utilizar a aminoantipirina como substrato, embora com atividade enzimática reduzida, mas não o ácido ascórbico (JOHRI *et al.*, 2005). A utilização de ácido ascórbico por peroxidases classe III não é muito comum, pois esse é um substrato característico de peroxidases classe II (BANCI, 1997). Entretanto, algumas POX já foram descritas na literatura como sendo capazes de utilizar esse composto como substrato, contudo o mecanismo de ação ainda não é bem compreendido (VIANELLO *et al.*, 1997; MIKA; LU, 2003; DAS; SHARMA; MISHRA, 2011).


Por fim, é conhecido que as POX representam um grupo de proteínas vegetais relacionadas à patogênese, ou seja, são PR-proteínas enquadradas na família das PR-9 e, também, que o aumento de sua expressão nas plantas está

diretamente relacionado ao ataque de diversos patógenos, envolvendo a via de sinalização do ácido salicílico (FERNANDES *et al.*, 2006; VAN LOON; REP; PIETERSE, 2006). O ácido salicílico é um composto produzido pelas plantas, o qual está envolvido na sinalização da resposta sistêmica adquirida, portanto, na defesa vegetal, interferindo em várias enzimas da cascata de produção e depleção de H₂O₂, incluindo catalases, peroxidases de ascorbato e as POX (PANDEY; DWIVEDI, 2012). O ácido salicílico se mostrou capaz de inibir a ação catalítica da *Mm*-POX, quando em concentrações acima de 0,006 M (FIGURA 14). Efeito similar foi observado para a peroxidase de *L. leucocephala*, embora essa enzima tenha se mostrado muito mais sensível à ação do ácido salicílico do que a *Mm*-POX (PANDEY; DWIVEDI, 2011). Contudo, há estudos mostrando que o excesso de ácido salicílico promove uma redução da atividade enzimática das POX; esse evento reforça sua participação nos mecanismos de defesa vegetal (SRIVASTAVA; DWIVEDI, 2000; PANDEY; DWIVEDI, 2011).


7. CONCLUSÃO

Mm-POX é uma peroxidase classe III típica, que obedece à cinética de Michaelis-Menten, apresentando alta afinidade pelo guaiacol e H₂O₂, estabilidade térmica elevada (60 °C, 1 hora) e pH ótimo em torno de 6,0. A atividade catalítica da *Mm*-POX foi reduzida diante de inibidores clássicos de peroxidases, incluindo azida, DTT, EDTA e Na₂S₂O₅ e, também, na presença de concentrações elevadas Na⁺, Mn²⁺ e ácido salicílico. Por outro lado, os íons Ca²⁺ e Mg²⁺, mesmo em baixas concentrações, foram capazes de potencializar a atividade enzimática da *Mm*-POX. Os dados em conjunto colaboram na compreensão do papel fisiológico e aplicação biotecnológica da *Mm*-POX, uma vez que muitas das funções das peroxidases estão relacionadas às suas propriedades enzimáticas.

Capítulo 4



*Ação da Mm-POX contra Fungos
Fitopatogênicos*



1. INTRODUÇÃO

Dentre os organismos vivos, as plantas desenvolveram formas eficazes de sobrepujar as pressões impostas pelo meio, seja através de estratégias que culminam com uma maior facilidade de obtenção de nutrientes, seja pela disseminação de seus descendentes, ou mesmo capacidade de produzir mecanismos de proteção e combate aos predadores e fitopatógenos. Essas características diferem entre os táxons vegetais, tornando algumas plantas mais aptas a resistirem a determinadas condições adversas em comparação a outras espécies, com relação ao clima ou ao ataque de herbívoros e patógenos. Em concordância com essa habilidade de resistir a agressores, sobressaem-se os mecanismos de defesa vegetal, incluindo a participação de compostos químicos constitutivos e/ou induzidos (VASCONCELOS *et al.*, 2001; LEE *et al.*, 2008; SELS *et al.*, 2008, TATSADJIEU *et al.*, 2009, GIMENEZ-IBANEZ; RATHJEN, 2010). Dentre as mais diferentes substâncias, estão aquelas de natureza proteica, onde muitas têm demonstrado potencial para proteger culturas economicamente importantes, resultando na redução do uso de produtos químicos na agricultura, pois esses além de se constituírem em uma prática dispendiosa, não são sempre efetivos para o controle de algumas pragas e doenças fúngicas (MELLO; SILVA-FILHO, 2003; VASCONCELOS *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2008, DE-XI *et al.*, 2010; CRUZ *et al.*, 2013; ZOTTICH *et al.*, 2013).

Uma proteína é dita antifúngica quando se mostra capaz de interferir no crescimento ou reprodução de determinadas espécies de fungos. Como mecanismo geral de ação, essas proteínas compartilham a capacidade de hidrolisar polímeros que constituem a parede celular, como quitinases e glucanases, ativar respostas celulares que interferem na formação direta da parede celular ou causar efeitos deletérios na própria membrana celular (NG, 2004; SVECOVÁ *et al.*, 2013). Proteínas capazes de promover alterações no metabolismo de fungos, desestabilizando a homeostase celular, através, por exemplo, da produção exagerada de espécies reativas de oxigênio (EROs) ou da variação da taxa de absorção de glicose pelas células, também despontam como fortes candidatas em pesquisas científicas (MELO *et al.*, 2005; MENDIETA *et al.*, 2006; PAGANO *et al.*, 2007).

As peroxidases vêm ganhando destaque quanto ao seu envolvimento direto na defesa do vegetal. Essas enzimas são conhecidas por atuarem de diversas formas na proteção da planta, seja promovendo o fortalecimento da parede celular, através da síntese de lignina e formação de ligações na parede celular ou mesmo ajudando no estabelecimento de um ambiente altamente tóxico para patógenos, através da produção exacerbada de EROs na explosão oxidativa (PASSARDI *et al.*, 2005; FERNANDES *et al.*, 2006). Um exemplo da atuação dessas enzimas pode ser observado durante a germinação, onde a camada de aleurona das sementes germinantes funciona como estrutura secretora e libera para a cavidade apoplástica, dentre inúmeros compostos, EROs e peroxidases classe III com a função de proteção contra patógenos. Esses compostos atuam em conjunto, compreendendo uma defesa constitutiva contra possíveis infecções (SCHOPFER; PLACHY; FRAHRY, 2001). No entanto, algumas peroxidases podem promover efeitos deletérios diretos sobre o crescimento de fungos fitopatogênicos. Ghosh (2006) apresentou em seu trabalho as propriedades antifúngicas de uma peroxidase classe III, purificada de *Acorus calamus*. Essa proteína está presente na epiderme foliar, bem como nos tecidos do xilema, e foi capaz de induzir efeitos deletérios diretos no crescimento dos fungos *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium moniliforme* e *Trichosporium vesiculosum*. Ye e Ng (2002) também já haviam relatado atividade antifúngica de uma peroxidase purificada de *Phaseolus vulgaris*, demonstrando o seu efeito sobre o crescimento de diversos fungos fitopatogênicos. Essa inibição pode ter sido causada por radicais livres de oxigênio liberados pelas peroxidases que, de forma indireta, são descritos como citotóxicos para fungos (LEVIN; HERRMANN; PAPINUTTI, 2008).

Um fator que pode ser decisivo na utilização de peroxidases como agente antifúngico é a seletividade com que essas proteínas interferem no crescimento de fungos, mesmo os mais próximos geneticamente. *VuPox*, a peroxidase de *V. unguiculata*, apresentou propriedades antifúngicas ao inibir a germinação dos conídios dos fungos *Coletotrichum gloeosporioides* e *F. oxysporum*, tanto nativa quanto tratada termicamente. Contudo, essa POX não foi capaz de inibir a germinação de esporos do fungo *F. solani*, sugerindo seletividade em sua atividade antifúngica (FREITAS, 2011).

Atualmente, um número expressivo de estudos, usando estratégias da genômica e proteômica, tem sido direcionado para a identificação de novas proteínas de origem vegetal com atividade antifúngica, dada às perdas agrícolas causadas por fungos fitopatogênicos (NG, 2004; AGUILETA *et al.*, 2012). Entretanto, o interesse por proteínas antifúngicas não está apenas relacionado ao contexto agroeconômico. Na medicina, apesar da existência de potentes antifúngicos, o surgimento de cepas fúngicas resistentes ou multirresistentes impõe a necessidade de uma busca permanente de novas drogas para esses tratamentos (NG, 2004; SCHMOURLO *et al.*, 2005; DUNCAN; O'NEIL, 2013). Portanto, a descoberta de novos vegetais como fontes proteicas com propriedades antifúngicas é um fator de grande importância na comunidade científica. Nesse contexto, entender a funcionalidade dessas proteínas no âmbito da planta e elucidar seus mecanismos de ação sobre o fungo são cruciais para um melhor aproveitamento biotecnológico dessas moléculas.

Em pesquisas com o látex de *M. megalantha*, Oliveira (2006; 2009) demonstrou o grande potencial antifúngico desse fluido sobre alguns fungos fitopatogênicos. Inicialmente, esse efeito foi atribuído a diversas proteínas presentes no látex, com atuação sobre os conídios e as hifas dos fungos (OLIVEIRA, 2006). Um fracionamento inicial dessas proteínas resultou em diferentes frações com propriedades enzimáticas não correlatas, algumas delas mostrando ação antifúngica. Dentre as frações enzimáticas bioativas, uma delas possuía forte atividade peroxidásica (OLIVEIRA, 2009), motivando os estudos envolvendo os testes contra fungos fitopatogênicos.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

- Avaliar a ação da peroxidase purificada do látex de *M. megalantha* (Mm-POX) sobre fungos fitopatogênicos de importância agrícola.

2.2 Específicos

- Avaliar a ação da Mm-POX sobre a germinação de conídios dos fungos *Fusarium oxysporum* e *F. solani*;
- Averiguar a viabilidade dos conídios pós-tratamento com a Mm-POX;
- Analisar os efeitos da Mm-POX sobre a membrana celular dos fungos citados;
- Buscar o modo de ação da Mm-POX sobre tais fungos.

3. MATERIAIS

3.1 Fungos

Os fungos fitopatogênicos *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum* foram obtidos da micoteca mantida pelo Laboratório de Toxinas Vegetais, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC. Abaixo segue a classificação dos referidos fungos segundo o site Index Fungorum (2013).

Reino: Fungi

Filo: Ascomycota

Classe: Sordariomycetes

Ordem: Hypocreales

Família: Nectriaceae

Gênero: *Fusarium*

Espécie: *Fusarium oxysporum*
Fusarium solani

3.2 Reagentes

Os meios de cultura Agar Batata Dextrose (PDA) e Agar Sabouraud Dextrose, assim como os nutrientes peptona e dextrose foram obtidos da HiMedia, Mumbai, Índia.

Iodeto de propídio e 3,3'-diaminobenzidina (DAB) foram obtidos da Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA.

Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico e obtidos comercialmente.

4. METODOLOGIA

4.1 Cultivo dos fungos e obtenção dos conídios

O cultivo dos fungos *F. oxysporum* e *F. solani* foi realizado em 25 mL de meio PDA, distribuídos em placas de Petri, com 10 cm de diâmetro, e mantidas em câmara de germinação do tipo B.O.D., a 25 °C, umidade de 70% e fotoperíodo de 12 horas. O meio de cultura foi constituído de 39 g de ágar batata-dextrose, dissolvidos em 1 litro de água, preparado em banho-maria com água em ebulição e autoclavado por 15 minutos, a 120 °C, 1,5 KGF. Os péletes repicados do meio de cultura foram colocados no centro das placas de Petri, que foram fechadas sob condições estéreis em capela de fluxo laminar.

Após os fungos terem tomado todo diâmetro da placa de Petri, cerca de 15 dias após o repique (cultura fresca), essas foram abertas em capela de fluxo laminar e adicionadas de 10 mL de água estéril. Com utilização de uma alça de Drigalski, manuseada suavemente sobre a superfície do micélio, foi obtida a suspensão de conídios. Esta foi imediatamente filtrada em malha de nylon, para remoção de resquícios de hifas, e denominada de solução padrão de conídios. Da solução padrão, foi promovido o ajuste da concentração para $2,0 \times 10^5$ conídios/mL, usada nos diversos ensaios (GIFONI, 2005; OLIVEIRA, 2006).

4.2 Avaliação da ação da Mm-POX sobre a germinação dos conídios

O efeito das proteínas sobre a germinação dos conídios foi avaliado conforme o método descrito por Ji e Kúc (1996), adaptado para uso de placas de polietileno reticuladas (OLIVEIRA, 2009; GIFONI *et al.*, 2012). Uma alíquota de 10 µL da suspensão de conídios ($2,0 \times 10^5$ conídios/mL) foi incubada com 10 µL das amostras em diferentes concentrações. Como controles foram utilizados água estéril e tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2. As placas de germinação foram mantidas a 37 °C, por 16 horas, na ausência de luz, conservando a umidade do local por meio de um papel de filtro embebido de água. Decorrido o tempo de germinação, o material foi visualizado em microscópio óptico (*Olimpus System Microscope BX 60*).

Foram considerados germinados os conídios que apresentaram tubo germinativo de, ao menos, duas vezes o seu comprimento.

4.3 Determinação da viabilidade conidial pós-tratamento com *Mm-POX*

Para avaliar a viabilidade conidial dos fungos depois do tratamento com a *Mm-POX*, foi utilizada a metodologia descrita por Batista (2013), com modificações, onde alíquotas de 100 μL da suspensão de conídios ($2,0 \times 10^5$ conídios/mL) foram acondicionadas em tubos Eppendorf e adicionadas de 100 μL das amostras testes. Após incubação por 16 horas, na ausência de luz, o material foi centrifugado a $3.000 \times g$, por 5 minutos, a 25°C e o sobrenadante descartado. As amostras com os conídios remanescentes foram lavadas com água destilada estéril e, novamente, centrifugadas nas mesmas condições, sendo o sobrenadante descartado. Após lavagem dos conídios, estes foram acrescidos de 100 μL de água destilada estéril, transferidos para placas de Petri contendo meio PDA e mantidos incubados por três dias a 27°C , quando os parâmetros de crescimento micelial foram avaliados. Como controle foi utilizado tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2.

4.4 Avaliação da permeabilidade da membrana dos conídios após incubação com a *Mm-POX*

O corante iodeto de propídio foi usado para avaliar a integridade das membranas dos fungos *F. solani* e *F. oxysporum* na presença da *Mm-POX*, seguindo a metodologia descrita por Oliveira (2009). Alíquotas de 100 μL da suspensão de conídios ($2,0 \times 10^5$ conídios/mL) foram acondicionadas em tubos Eppendorf e adicionadas de 100 μL da *Mm-POX* (0,2 $\mu\text{g/mL}$), os quais foram mantidos em incubação por 4 horas, na ausência de luz. Após esse período, 1 μM de iodeto de propídio foi adicionado aos eppendorfs, os quais foram incubados por 30 minutos, a 37°C . As suspensões foram transferidas para lâminas e visualizadas em microscópio óptico. Foram considerados esporos permeabilizados aqueles em que os núcleos se apresentaram fluorescentes. Como controle foi utilizado tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2.

4.5 Avaliação da indução da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) pela Mm-POX

A capacidade da Mm-POX de induzir a produção de EROs nos conídios dos fungos testados foi determinada em ensaio *in situ*, utilizando DAB, como descrito por Thordal-Christensen (1997), acrescido de modificações (MENDIETA *et al.*, 2006). Alíquotas de 100 μ L da suspensão de conídios ($2,0 \times 10^5$ conídios/mL) foram acondicionadas em tubos Eppendorf e adicionadas de 100 μ L da Mm-POX (0,2 μ g/mL), na presença de 0,5 mg/mL de DAB. Após incubação por 1 hora, na ausência de luz, o material foi colocado sobre lâminas e visualizadas em microscópio óptico. A presença de grânulos de coloração marrom ou esverdeados, resultante da reação do DAB com peroxidases endógenas do fungo, foi usada como indicativo da produção de EROs. Como controle, foi utilizado tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2.

5. RESULTADOS

5.1 Ação antifúngica da *Mm-POX* sobre a germinação dos conídios

A ação contra os fungos *F. oxysporum* e *F. solani* da *Mm-POX* está mostrada nas Figuras 1 e 2, respectivamente. As respostas inibitórias decorrentes da incubação com essa proteína foram distintas, quando avaliados os conídios das duas espécies testadas, tendo sido observada uma ação mais potente nos conídios de *F. solani*.

5.2 Viabilidade conidial pós-tratamento com a *Mm-POX*

A influência da *Mm-POX* sobre a viabilidade dos conídios de *F. oxysporum* e *F. solani* foi testada. A 0,2 µg/mL, a ação da *Mm-POX* sobre os conídios foi fungistática, uma vez que a viabilidade conidial foi mantida, conforme crescimento micelial observado após remoção da *Mm-POX* (FIGURA 3). Entretanto, quando comparado ao controle, uma redução da taxa de crescimento micelial, da ordem de 25%, foi observada para ambas as espécies de fungos analisadas.

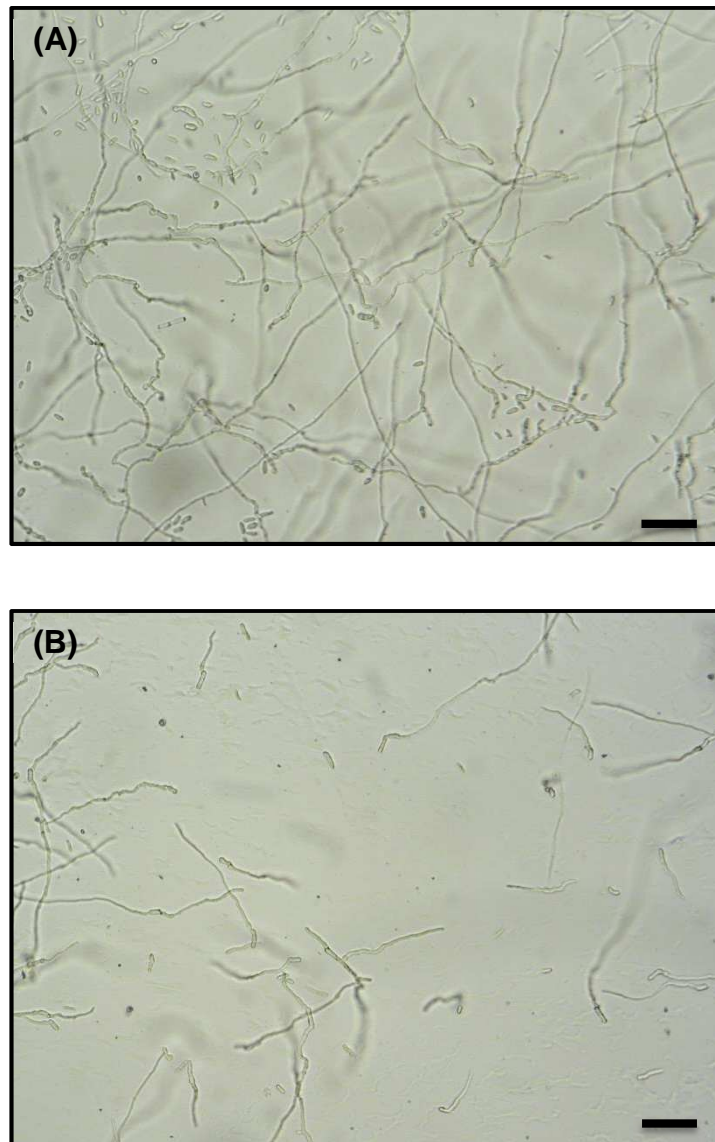
5.3 Alteração da permeabilidade da membrana dos conídios causada pela *Mm-POX*

Mm-POX mostrou ser capaz de alterar a permeabilidade da membrana dos conídios de *F. oxysporum* (FIGURA 4) e *F. solani* (FIGURA 5), possibilitando a entrada do iodeto de propídio no interior da célula e, assim, sua interação com as moléculas de ácido nucleico, liberando fluorescência. Diferentemente do observado com a *Mm-POX*, a incubação dos esporos com acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2 (controle) não resultou na emissão de fluorescência (FIGURA 4A e 5A).

5.4 Produção de EROs em conídios induzida pela *Mm-POX*

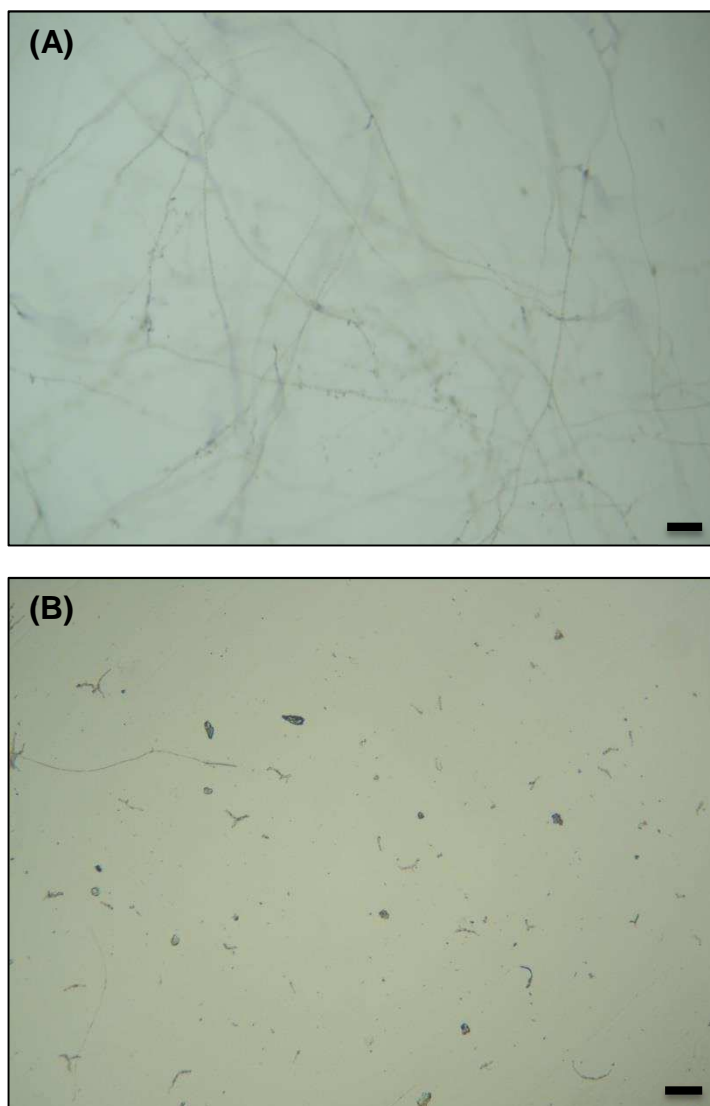
A produção de EROs nos conídios de *F. oxysporum* e *F. solani* foi avaliada e os resultados obtidos estão mostrados nas Figuras 6 e 7. Apenas nos conídios de *F.*

FIGURA 1 - Fotomicrografia em microscópio óptico da germinação de conídios de *F. oxysporum*. (A) - Incubação com tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2 (controle); (B) – Incubação com a Mm-POX (0,2 µg/mL). Barra = 5 µm.



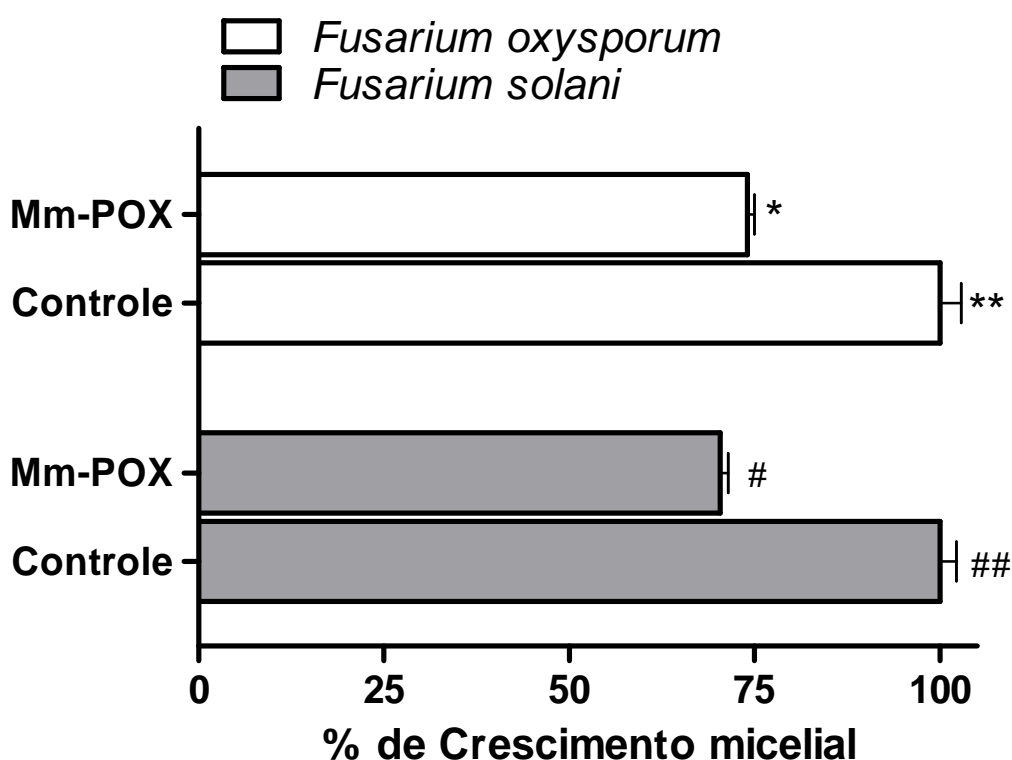
Fonte: Elaborada pelo autor.

FIGURA 2 - Fotomicrografia em microscópio óptico da germinação de conídios de *F.solani*. (A) - Incubação com tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2 (controle); (B) – Incubação com a Mm-POX (0,2 µg/mL). Barra = 5 µm.



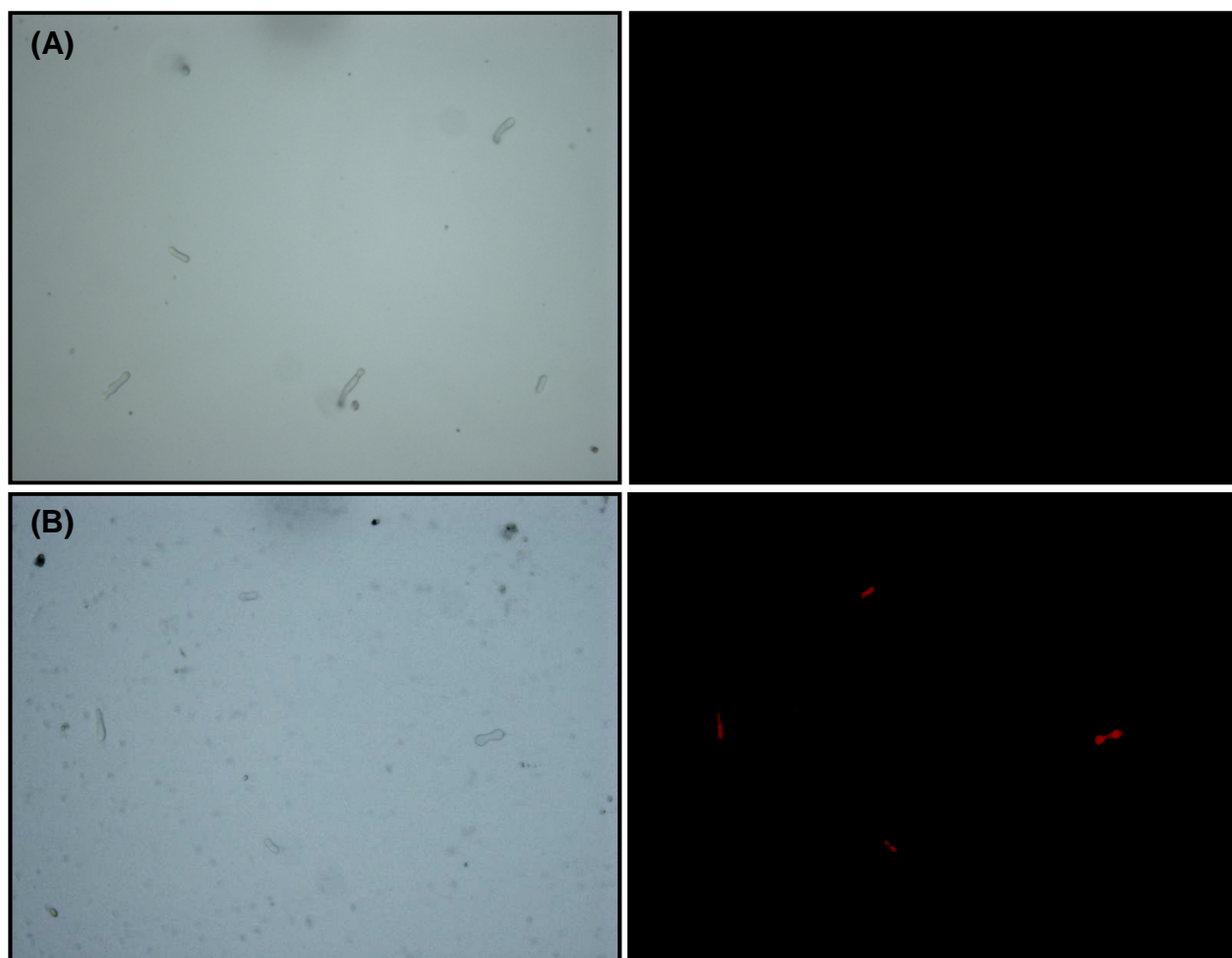
Fonte: Elaborada pelo autor.

FIGURA 3 – Efeitos da incubação da Mm-POX (0,2 µg/mL) sobre a viabilidade dos conídios de *F. oxysporum* e *F. solani*. Os valores expressos em percentual de crescimento micelial representam o desenvolvimento dos fungos avaliados, após a incubação prévia dos conídios com essa peroxidase na fase de germinação. Símbolos diferentes indicam diferenças significativas entre os percentuais de crescimento ($p < 0,05$).



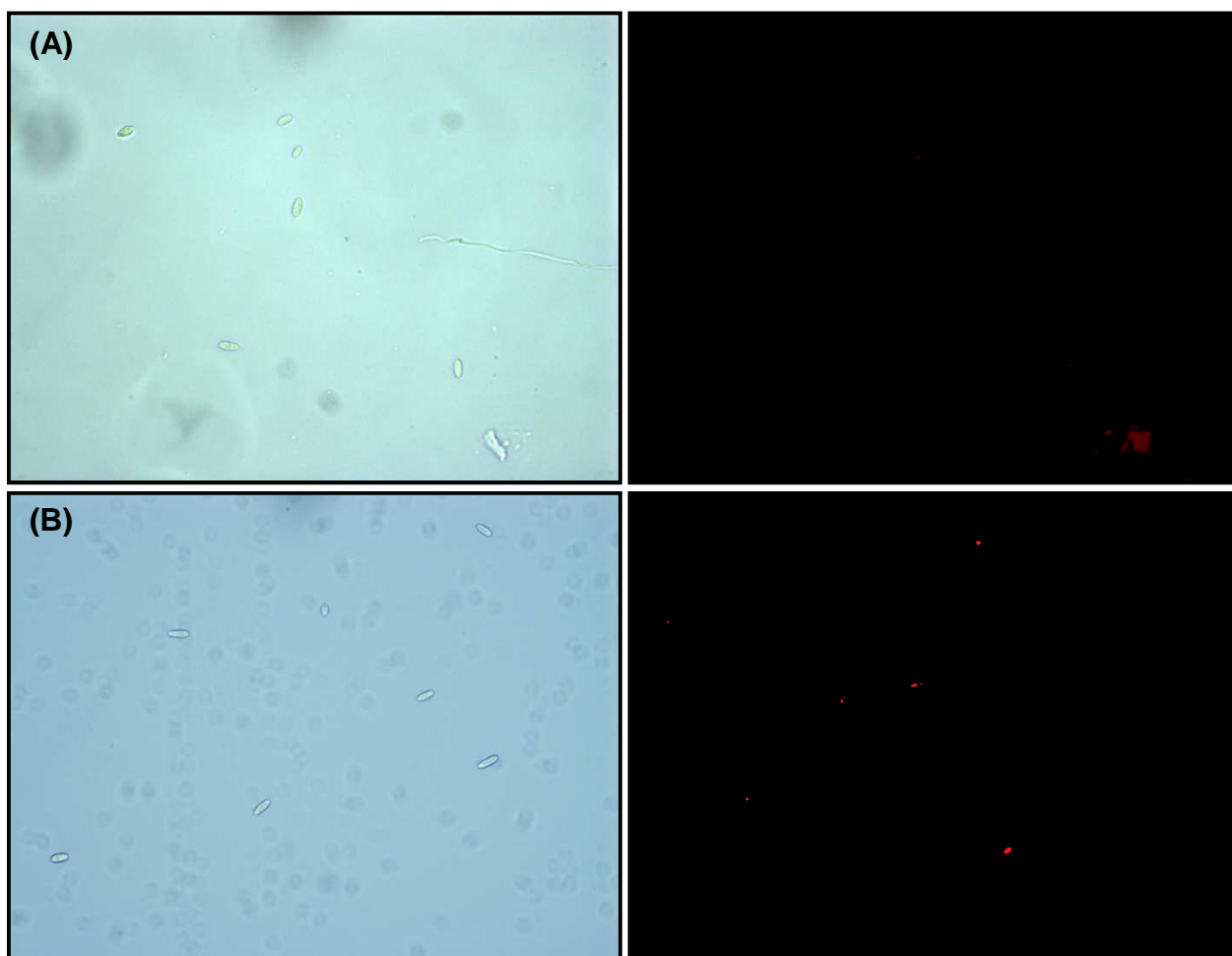
Fonte: Elaborada pelo autor.

FIGURA 4 - Fotomicrografia em microscópio óptico de esporos de *F. oxysporum* previamente incubados com amostras testes, seguida da adição de iodeto de propídio (IP) 1 μ M e incubação por 30 minutos. (A) Conídios na presença de tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2, e IP (controle); (B) Conídios na presença *Mm*-POX (0,2 μ g/mL) e IP. A coloração avermelhada indica alteração na permeabilidade da membrana do esporo. Aumento: 400X.



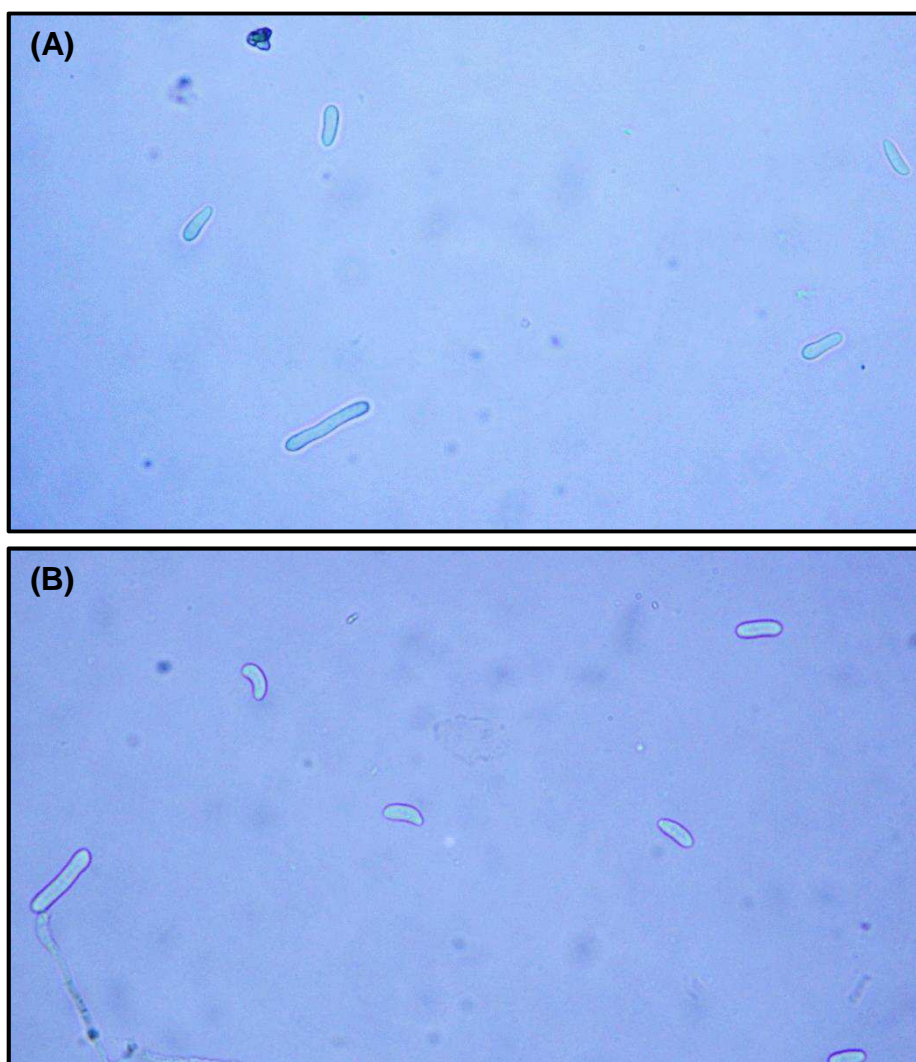
Fonte: Elaborada pelo autor.

FIGURA 5 - Fotomicrografia em microscópio óptico de esporos de *F. solani* previamente incubados com amostras testes, seguida da adição de iodeto de propídio (IP) 1 μ M e incubação por 30 minutos. (A) Conídios na presença de tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2, e IP (controle); (B) Conídios na presença *Mm*-POX (0,2 μ g/mL) e IP. A coloração avermelhada indica alteração na permeabilidade da membrana do esporo. Aumento: 400X.



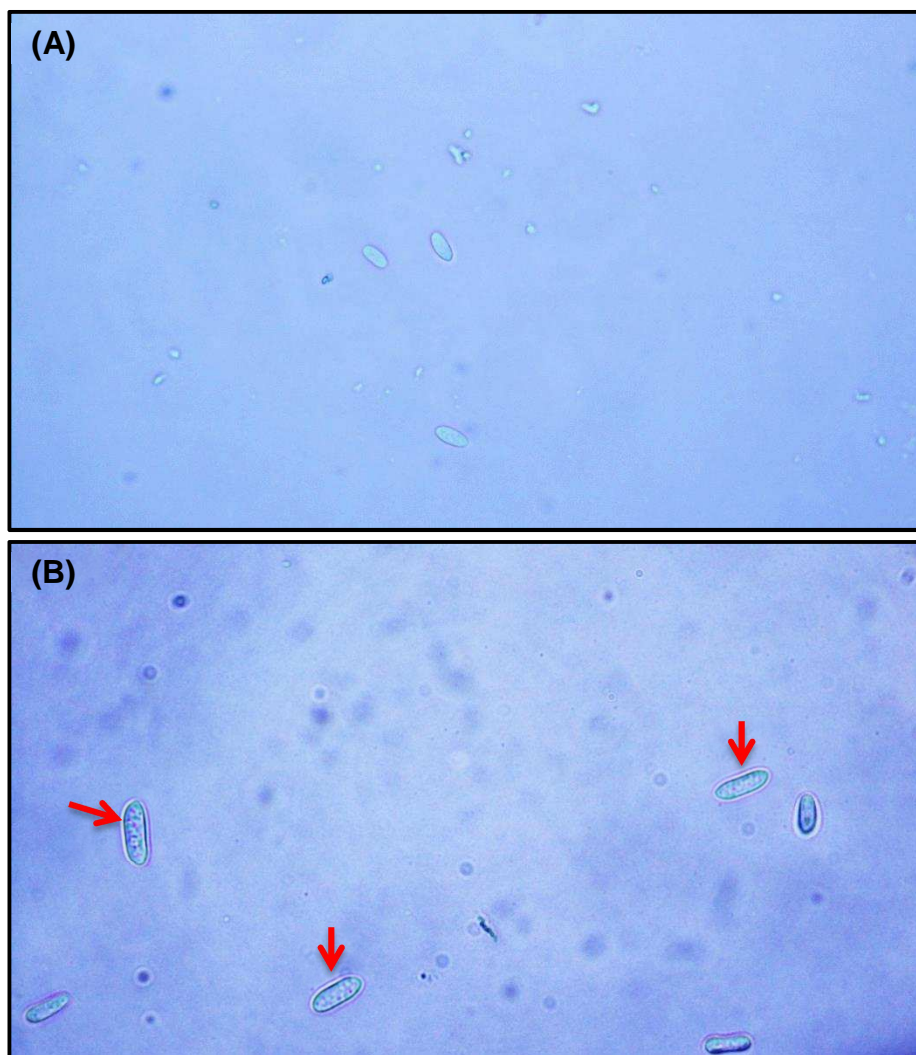
Fonte: Elaborada pelo autor.

FIGURA 6 - Fotomicrografia em microscópio óptico de conídios de *F. oxysporum*, previamente incubados com amostras testes, seguida da adição de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) 0,5 mg/mL e incubação por 1 hora. (A) Conídios na presença de tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2, e DAB; (B) Conídios na presença de Mm-POX (0,2 µg/mL) e DAB. Aumento: 600X.



Fonte: Elaborada pelo autor.

FIGURA 7 - Fotomicrografia em microscópio óptico de conídios de *F. solani*, previamente incubados com amostras testes, seguida da adição de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) 0,5 mg/mL e incubação por 1 hora. (A) Conídios na presença de tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2, e DAB; (B) Conídios na presença de Mm-POX (0,2 µg/mL) e DAB. As setas indicam a presença do precipitado escuro no interior dos esporos. Aumento: 600X.



Fonte: Elaborada pelo autor.

solani tratados com *Mm-POX* (0,2 µg/mL) foi detectada a produção endógena de EROs, conforme mostram as setas em vermelho, indicando a existência de precipitado de coloração marrom escura, proveniente da reação entre o composto DAB e as EROs (FIGURA 7A). Diferentemente, quando conídios desse mesmo fungo foram incubados com tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2 (FIGURA 8B) essa indução na produção de EROs não foi observada. Similarmente, não foi verificada produção de EROs nos conídios de *F. oxysporum*, mesmo após o tratamento da célula com *Mm-POX* (FIGURA 7A).

6. DISCUSSÃO

Diversos trabalhos apontam as POX como componentes fundamentais na defesa da planta contra patógenos, sendo, por vezes, destacadas como um grupo das chamadas PR-proteínas, ou proteínas relacionadas à patogênese (VAN LOON; REP; PIETERSE, 2006; ALMAGRO *et al.*, 2009; ZIPOR; SHAMIR, 2013). Elas estão agrupadas na família das PR-9 e, normalmente, são superexpressas após um evento de infecção local ou sistêmica da planta, onde podem desencadear diversas funções, com foco no preparo da planta contra o ataque dos patógenos. As principais atribuições fisiológicas das POX na defesa vegetal estão relacionadas ao reforço da parede celular, através da indução da lignificação, e à formação e depleção de um ambiente extremamente oxidativo, através da produção maciça de EROs, sendo a ativação dos genes envolvidos nesses processos decorrente do ataque da planta por diversos organismos, incluindo fungos, bactérias, vírus e viroides (PASSADI *et al.*, 2005; ALMAGRO *et al.*, 2009). Outro mecanismo proposto para ação das POX na defesa seria o de ação catalítica sobre determinados metabólitos fenólicos, gerando compostos com características antimicrobianas (MARTINEZ *et al.*, 2000).

A Mm-POX, quando incubada com conídios dos fungos *F. oxysporum* e *F. solani*, apresentou efeito inibitório sobre sua germinação (FIGURAS 1 e 2). Oliveira (2006), trabalhando com as proteínas totais do látex de *M. megalantha*, caracterizou pioneiramente esse material como possuidor de propriedades antifúngicas. Com os dados obtidos no presente estudo, é possível assumir que a Mm-POX seja um dos componentes do látex responsável na ação contra fungos, mas, certamente, não é o único, haja vista que frações proteicas com ausência de atividade peroxidásica também foram capazes de inibir a germinação dos esporos de fungos fitopatogênicos (OLIVEIRA, 2009). A concentração (0,2 µg/mL) de Mm-POX que foi capaz de inibir a germinação de conídios de *F. oxysporum* e *F. solani* é muito baixa, quando comparadas àquelas de outras proteínas antifúngicas (AGIZZIO *et al.*, 2003; GHOSH, 2006; LAM; NG, 2009; GIFFONI *et al.*, 2012). O efeito de peroxidases como proteínas antifúngicas ainda é pouco estudado, mas já há relatos

demonstrando claramente sua ação direta sobre fungos. Como exemplos, podem ser citadas as peroxidases classe III purificadas de *A. calamus*, que exibiu potente atividade contra os fungos *M. phaseolina*, *F. moniliforme* e *T. vesiculosum* (GHOSH, 2006) e de *P. vulgaris*, que mostrou atividade antifúngica contra *Coprinus comatus*, *Mycosphaerella arachidicola*, *F. oxysporum* e *Botrytis cinerea* (YE; NG, 2002).

Além da Mm-POX ter mostrado ação contra fungos em concentração muito baixa, outra característica dessa propriedade é que ela é distinta frente ao fungo considerado, visto que conídios de *F. solani* foram mais suscetíveis à ação dessa peroxidase do que aqueles de *F. oxysporum* (Figuras 1 e 2). Freitas (2011), caracterizando a ação antifúngica de VuPox, uma peroxidase de *V. unguiculata*, também observou ação diferenciada, tendo sido essa proteína capaz de inibir a germinação dos conídios de *F. oxysporum* e *Colletotrichum gloesporioides*, mas não os de *F. solani*.

Ao ser avaliada a viabilidade dos conídios após tratamento com a Mm-POX, os resultados apontam que a ação dessa proteína sobre os fungos testados foi fungistática (FIGURA 3). Esse efeito pode estar principalmente relacionado à concentração utilizada nos ensaios que, embora tenha sido eficaz em inibir a germinação, não foi suficiente para causar danos irreversíveis aos conídios. A proteína ligante à quitina de *M. oleifera*, Mo-CBP₃, apresentou comportamento similar ao observado para a Mm-POX, cuja ação fungistática, e não fungicida, foi atribuída à concentração proteica utilizada (GIFONI *et al.*, 2012).

Uma vez que a superfície celular representa um dos principais alvos das substâncias antifúngicas, foi investigado se a ação inibitória sobre a germinação dos conídios da Mm-POX estaria associada a alterações na integridade da membrana plasmática. Assim, foi observado que a Mm-POX alterou a permeabilidade de tal componente estrutural dos conídios de *F. oxysporum* (FIGURA 4) e *F. solani* (FIGURA 5). Essa conclusão decorre do aumento de permeabilidade verificada com auxílio do iodeto de propídio, um corante com alta afinidade para ácido nucléico (DNA), penetrando facilmente em células com a membrana plasmática comprometida. A permeabilidade das membranas biológicas é um fator crucial na manutenção das condições celulares. Alterações mínimas em sua estrutura acarretam grandes modificações no metabolismo e fisiologia das células (ABAD *et*

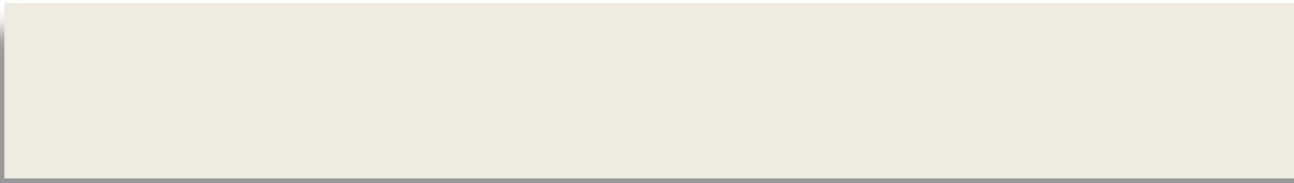
al., 1995), além de promover distorções na transdução de sinais do meio externo para o interior celular (DEACON, 1997). CpOsm, uma osmotina purificada do látex de *C. procera*, foi eficaz em causar danos nas estruturas membranosas dos fungos, tanto no evento de germinação, quanto nas hifas em crescimento e essa alteração é consequente da capacidade dessa proteína de formar poros nas membranas celulares (FREITAS *et al.*, 2011). Em alguns casos, alterações na membrana podem ser acarretadas por eventos de apoptose celular, mediados por proteínas específicas .

Contudo, *Mm-POX* é caracterizada como uma peroxidase classe III e, assim, sua atividade antifúngica pode estar associada a estresse oxidativo. As POX, em geral, possuem mecanismo reacional dividido em três etapas, na qual a primeira etapa está relacionada à redução do H_2O_2 em água, alterando o poder redox do ferro contido no grupo heme (POULOS, 1993; BANCI, 1997). Após esse evento, a proteína apresenta-se como um potente oxidante, podendo favorecer a formação de outras espécies reativas de oxigênio, promovendo, assim, um ambiente extremamente oxidativo ao seu redor. H_2O_2 é um composto produzido naturalmente pelos organismos vivos, o qual está envolvido em cascatas de sinalização celular e, nas células fúngicas, esse composto participa, principalmente, dos processos de sinalização fisiológica interna e desenvolvimento celular (GESSLER; AVER'YANOV; BELOZERSKAYA, 2007). O H_2O_2 , quando em excesso, também exerce efeitos oxidativos sobre proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, por vezes desestruturando suas funções, enquadrando a célula em um evento denominado de estresse oxidativo, que culmina com a morte celular (HANSBERG; AGUIRRE, 1990; NORDBERG; ARNER, 2001). De fato, a *Mm-POX* pode estar envolvida em eventos de alteração oxidativa em fungos, como mostram os resultados observados em conídios de *F. solani*, onde a produção de EROs foi induzida por essa peroxidase (FIGURA 7). Entretanto, evento semelhante não foi observado quando analisado *F. oxysporum* (FIGURA 8), podendo ser pelo fato de que esse fungo possui um mecanismo mais eficiente de depleção das EROs induzidas por *Mm-POX*, ou mesmo pelo seu metabolismo não ter sido afetado da mesma forma que o do *F. solani*, culminando com a produção de tais compostos. No entanto, esse paradigma pode estar realmente associado a uma maior resistência do *F. oxysporum*, em

comparação ao *F. solani*, à ação da *Mm-POX*, conforme resultados apresentados ao longo desse capítulo.

7. CONCLUSÃO

A *Mm-POX*, mesmo em concentração bem baixa, foi capaz de inibir a germinação de conídios de fungos fitopatogênicos de importância na agricultura. A ação inibitória sobre fungos provavelmente decorre de alteração na membrana celular e indução de estresse oxidativo causadas por essa peroxidase. Os dados obtidos contribuem para a inclusão da *Mm-POX* no rol das proteínas com possibilidade de serem usadas como ferramenta no controle de doenças vegetais ocasionadas por fungos, agregando valor biotecnológico a essa enzima.



Referências Bibliográficas



REFERÊNCIAS

ABAD, L. R.; D'URZO, M. P.; LIU, D.; NARASIMHAN, M. L.; REUVENI, M.; ZHU, J. K.; NIU, X.; SINGH, N. K.; HASEGAWAA, P. M.; BRESSAN, R. A. Antifungal activity of tobacco osmotin has specificity and involves plasma membrane permeabilization. **Plant Science**, 118:22-23, 1995.

AGIZZIO, A. P.; CARVALHO, A. O.; RIBEIRO, S. F. F.; MACHADO, O. L.T.; ALVES, E. W.; OKOROKOV, L. A.; SAMARÃO, S. S.; BLOCK, C.; PRATES, M. V.; GOMES, V. M. A 2S albumin-homologous protein from passion fruit seeds inhibits the fungal growth and acidification of the medium by *Fusarium oxysporum*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 416: 188–195, 2003.

AGRAWAL, A. A.; KONNO, K. Latex: a model for understanding mechanisms, ecology, and evolution of plant defense against herbivory. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, 40: 311–331, 2009.

AGUILETA, G.; LENGELLE, J.; CHIAPELLO, H.; TATIANA G.; MURIEL, V.; ELISABETH, F.; FRANÇOIS R.; MARTHEY, S.; DUCASSE A.; GENDRAULT A.; POULAIN J.; WINCKERE, P.; GOUT, L. Genes under positive selection in a model plant pathogenic fungus, Botrytis. **Infection, Genetics and Evolution**, 12: 987–996, 2012.

AITKEN, M. D. Waste treatment applications of enzymes: opportunities and obstacles. **The Chemical Engineering Journal**, 52: B49–B58, 1993.

ALMAGRO, L.; GÓMEZ ROS, L. V; BELCHI-NAVARRO, S.; BRU, R.; ROS BARCELO, A.; PEDREÑO, M. A. Class III peroxidases in plant defence reactions. **Journal of Experimental Botany**, 60: 377–390, 2009.

ARAÚJO, Eliane Silva. **Proteases do látex de *Calotropis procera*: Purificação, caracterização bioquímica, enzimática e molecular e atividades biológicas**. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

BAKALOVIC, N.; PASSARDI, F.; IOANNIDIS, V.; COSIO, C.; PENEL, C.; FALQUET, L.; DUNAND, C. PeroxiBase: A class III plant peroxidase database. **Phytochemistry**, 67: 534–539, 2006.

BANCI, L. Structural properties of peroxidases. **Journal of Biotechnology**, 53: 253–263, 1997.

BATISTA, Adelina Braga. **Caracterização estrutural e modo de ação contra fungos da Mo-CBP₃, uma proteína ligante à quitina de sementes de *Moringa oleifera* Lamarck.** Tese (Doutorado em Bioquímica) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

BERNAYS, E. A.; CHAPMAN, R. F. **Host-Plant Selection by Phytophagous Insects**, New York: Chapman & Hall, 1994.

BHARTI, S.; WAHANE, V. D.; KUMAR, V. L. Protective effect of *Calotropis procera* latex extracts on experimentally induced gastric ulcers in rat. **Journal of Ethnopharmacology**, 127: 440–444, 2010.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSSA, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, 8: 93-99, 1987.

BOUCHERIT, N.; ABOUSEOUD, M.; ADOUR, L. Degradation of direct azo dye by *Cucurbita pepo* free and immobilized peroxidase. **Journal of Environmental Sciences**, 25: 1235–1244, 2013.

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

CAI, F.; OUYANG, C.; DUAN, P.; GAO, S.; XUA, Y.; CHEN, F. Purification and characterization of a novel thermal stable peroxidase from *Jatropha curcas* leaves. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 77: 59–66, 2012.

CALLAHAN, D. L.; ROESSNER, U.; DUMONTET, V.; PERRIER, N.; WEDD, A. G.; O'HAIR, R. A.; BAKER, A. J.; KOLEV, S. D. LC-MS and GC-MS metabolite profiling of nickel(II) complexes in the latex of the nickel-hyperaccumulating tree *Sebertia acuminata* and identification of methylated aldaric acid as a new nickel(II) ligand. **Phytochemistry**, 69: 240-251, 2008.

CARUSO, C.; CHILOSI, G.; CAPORALE, C.; LEONARDI, L. BERTINI, L. MAGRO, P.; BUONOCORE, V. Induction of pathogenesis-related proteins in germinating wheat seeds infected with *Fusarium culmorum*. **Plant Science**, 140: 107-120, 1999.

CARUSO, C.; CHILOSI, G.; LEONARDI, L.; BERTINI, L.; MAGRO, P.; BUONOCORE, V. CAPORALE, C. A basic peroxidase from wheat kernel with antifungal activity. **Phytochemistry**, 58: 734-750, 2001.

CHEN, L.C.; CHUNG, Y. C.; CHANG, C. T. Characterisation of an acidic peroxidase from papaya (*Carica papaya* L. cv Tainung No. 2) latex and its application in the determination of micromolar hydrogen peroxide in milk. **Food Chemistry**, 135: 2529-2535, 2012.

COSIO, C. DUNAND, C. Specific functions of individual class III peroxidase genes. **Journal of Experimental Botany**, 60: 391-408, 2009.

CRUZ, A. C. B.; MASSENA, F. S.; MIGLIOLO, L.; MACEDO, L.L.P.; MONTEIRO N. K.V.; OLIVEIRA A. S.; MACEDO, F. P.; UCHOA, A. F.; GROSSI DE SÁ, M. F.; VASCONCELOS, I. M.; MURAD, A. M.; FRANCO, O. L.; SANTOS, E. A. Bioinsecticidal activity of a novel Kunitz trypsin inhibitor from Catanduva (*Piptadenia moniliformis*) seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, 70: 61-68, 2013.

D'AMATO, A.; BACHI, A.; FASOLI, E.; BOSCHETTI, E.; PELTRE, G.; SÉNÉCHAL, H.; SUTRA, J. P.; CITTERIO, A.; RIGHETTI, P. G. In-depth exploration of *Hevea brasiliensis* latex proteome and "hidden allergens" via combinatorial peptide ligand libraries. **Journal of Proteomics**, 73: 1368-1380, 2010.

DAMIEN, L. C.; UTE, R.; VINCENT, D.; NICOLAS, P.; ANTHONY, G. W.; RICHARD, A. J. O'HAIR, ALAN, J. M. B.; SPAS, D. K. LC-MS and GC-MS metabolite profiling of nickel (II) complexes in the latex of the nickel-hyperaccumulating tree *Sebertia acuminata* and identification of methylated aldaric acid as a new nickel (II) ligand. **Phytochemistry**, 69: 240-251, 2008.

DAS, M. K.; SHARMA, R. S.; MISHRA, V. A novel cationic peroxidase (VanPrx) from a hemi-parasitic plant (*Viscum angulatum*) of Western Ghats (India): Purification, characterization and kinetic properties. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 71: 63–70, 2011.

DEACON, Jim White. **Modern Micology**. London: Blackwell Science, 3a ed. 1997.

DECKER, G.; WANNER, G.; ZENK, M. H.; LOTTSPREICH, F.; Characterization of proteins in latex of the opium poppy (*Papaver somniferum*) using two-dimensional gel electrophoresis and microsequencing. **Electrophoresis**, 21: 3500–3516, 2000.

DEMIRJIAN, D. C.; MORÍS-VARAS, F.; CASSIDY, C. S. Enzymes from extremophiles. **Current Opinion in Chemical Biology**, 5: 144–151, 2001.

DE-XI, C.; XUE-WEI, C.; BING-TIAN, M.; YU-PING, W.; LI-HUANG Z.; SHI-GUI L. Genetic transformation of rice with *Pi-d2* gene enhances resistance to rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. **Rice Science**, 17: 19-27, 2010.

DIAZ-DE-LEON, F.; LAGRIMINI, M. Nucleotide sequence of the tobacco (*Nicotiana tabacum*) anionic peroxidase gene. **Plant Physiology**, 101: 1117–1118, 1993.

HAKI, G.; RAKSHIT, S. K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. **Bioresource Technology**, 89: 17–34, 2003.

DOERGE, D. R.; DIVI, R. L.; CHUCHWELL, M. I. Identification of the colored guaiacol oxidation product produced by peroxidases. **Analytical Biochemistry**, 250: 10-17, 1997.

DOMSALLA, A.; MELZIG, M. Occurrence and properties of proteases in plant latices. **Planta Medica**, 74: 699-711, 2008.

DUNCAN, V. M. S.; O'NEIL, D. A. Commercialization of antifungal peptides. **Fungal Biology Reviews**, 26: 156–165, 2013.

EVERT, Ray. F. **Internal secretory structures**. In Esau's Plant Anatomy. John Wiley & Sons, Inc, 3rd ed: 473–501, 2006.

FERNANDES, C. F.; MORAES, V. C. P.; VASCONCELOS, I. M.; SILVEIRA, J. A G.; OLIVEIRA, J. T. A. Induction of an anionic peroxidase in cowpea leaves by exogenous salicylic acid. **Journal of Plant Physiology**, 163: 1040–8, 2006.

FLORIS, G.; MEDDA, R.; RINALDI, A. Peroxidases from *Euphorbia characias* latex: purification and properties. **Phytochemistry**, 23: 953–956, 1984.

FREITAS, Cleverson Diniz Teixeira de. **Caracterização bioquímica parcial, atividade ovicida e larvicida contra o mosquito *Aedes aegypti* de uma fração do látex de *Calotropis procera***. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004.

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

FREITAS, C. D. T.; LOPES, J. L. S.; BELTRAMINI, L. M.; OLIVEIRA, R. S. B.; OLIVEIRA, J. T. A.; RAMOS, M. V. Osmotin from *Calotropis procera* latex: new insights into structure and antifungal properties. **Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes**, 1808: 1-7, 2011.

FREITAS, Jonnathan Amaral de. **Purificação e caracterização de uma peroxidase de raízes de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] e sua aplicação na remoção de fenóis**. Monografia (Graduação em Engenharia Química) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

GERALDO NETO, S. A; LIMA, J. M.; CÂMARA, A. C. L.; et al. Spontaneous and experimental poisoning by *Marsdenia megalantha* Goyder & Morillo in ruminants and a pig. **Toxicon**, 63: 116–9, 2013.

GESSLER, N. N.; AVER'YANOV, A. A.; BELOZERSKAYA, T. A. Reactive oxygen species in regulation of fungal development. **Biochemistry**, 72: 1091-1109, 2007.

GHOSH, M. Antifungal properties of haem peroxidase from *Acorus calamus*. **Annals of Botany**, 98: 1145–53, 2006.

GIFONI, Juliana Menezes. **Proteínas ligantes à quitina de sementes de *Moringa oleifera* Lamarck e seu papel na defesa da planta**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

GIFONI, J. M.; OLIVEIRA, T. A.; OLIVEIRA, H. D.; BATISTA, A. B.; PEREIRA, M. L.; GOMES, A. S.; OLIVEIRA, H. P.; GRANGEIRO, T. B.; VASCONCELOS, I. M. A novel chitin-binding protein from *Moringa oleifera* seed with potential for plant disease control. **Peptide Science**, 98: 406–415, 2012.

GIMENEZ-IBANEZ, S.; RATHJEN, J. P. The case for the defense: plants versus *Pseudomonas syringae*. **Microbes and Infection**, 12: 428-437, 2010.

GOYDER, D.; MORRILLO, G. A new species of *Marsdenia* (Asclepidaceae) from N.E. Brazil. **Asklepios**, 63: 18-23, 1994.

GUO, X.; HE, D.; HUANG, L.; LIU, L.; LIU, L.; YANG, H. Strain energy in enzyme–substrate binding: An energetic insight into the flexibility versus rigidity of enzyme active site. **Computational and Theoretical Chemistry**, 995: 17–23, 2012.

HAGEL, J. M.; YEUNG E. C.; FACCHINI P. J. Got milk? The secret life of laticifers. **Cell Press**, 13: 631–639, 2008.

HAMID, M.; REHMAN, K.; Potencial application of peroxidases. **Food Chemistry**, 115: 1177-1186, 2009.

HANSBERG, W.; AGUIRRE, J. Hyperoxidant states cause microbial cell differentiation by cell isolation from dioxygen. **Journal of Theoretical Biology**, 142: 201-221, 1990.

HELMUS, M. R.; DUSSOURD, D. E. Glues or poisons: which triggers vein cutting by monarch caterpillars?. **Chemoecology**, 15: 45–49, 2005.

HIRAGA, S.; SASAKI, K.; ITO, H.; OHASHI, Y.; MATSUI, H. A large family of class III plant peroxidases. **Plant Cell Physiol**, 42: 462–468, 2001.

JI, C.; KÚC, J. Antifungal activity of cucumber β -1,3-glucanase and chitinase. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 49: 257-265, 1996.

JOHRI S.; JAMWAL U.; RASOOL S.; KUMAR A.; VERMA V.; QAZI G. N. Purification and characterization of peroxidases from *Withania somnifera* (AGB 002) and their ability to oxidize IAA. **Plant Science**, 169: 1014–1021, 2005.

KEKWICK, R. G. Látex and laticifers. **Encyclopedia of Life Sciences**, 1-6, 2001.

KIELING, Dirley Diedrich. **Enzimas: Aspectos gerais**. Monografia (Graduação em Engenharia de Alimentos) – Centro de Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

KONNO, K. Plant latex and other exudates as plant defense systems: Roles of various defense chemicals and proteins contained therein. **Phytochemistry**, 72: 1510–1530, 2011.

KRISHNA, H.; NAGARAJA, P.; SHIVAKUMAR, A.; CHAMARAJA, N. A; ARADHANA, N. Quantification and evaluation of kinetic bio-catalytic pathway of horseradish peroxidase in an electron mediated reaction system and its applications in plant extracts. **Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 102: 75–81, 2013.

KUMAR, R.; SINGH, K. A.; SINGH, V. K.; JAGANNADHAM, M. V. Biochemical characterization of a peroxidase isolated from Caribbean plant: *Euphorbia cotinifolia*. **Process Biochemistry**, 46: 1350–1357, 2011.

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

LAM, S. K. ã.; NG, T. B. Passiflin, a novel dimeric antifungal protein from seeds of the passion fruit. **Phytomedicine**, 16: 172–180, 2009.

LEE, J. R.; LEE, S. S.; PARK, S.-C.; KANG, J. S.; KIM, S. Y.; LEE, K. O.; LEE, S. Y. Functional characterization of pathogen-responsive protein AtDabb1 with an antifungal activity from *Arabidopsis thaliana*. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1784: 1918–23, 2008.

LEVIN, L.; HERRMANN, C.; PAPINUTTI, V. L. Optimization of lignocellulolytic enzyme production by the white-rot fungus *Trametes trogii* in solid-state fermentation using response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**, 39: 207–214, 2008.

LIMA-FILHO, J. V.; PATRIOTA, J. M.; AYRLES F. B.; SILVA, A. F. B.; FILHO, N. T.; OLIVEIRA, R. S. B.; ALENCAR, N. M. N.; RAMOS, M. V. Proteins from latex of *Calotropis procera* prevent septic shock due to lethal infection by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Journal of Ethnopharmacology**, 129: 327-334, 2010.

LOPES, Karina Lucas Batista. **Adaptações morfo-anatômicas de *Marsdenia megalantha* Goyder & Morillo (Apocynaceae-Asclepidaceae) em afloramentos rochosos no Nordeste Brasileiro**. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004.

MALOMO, S. O.; ADEOYE, R. I.; BABATUNDE, L.; et al. Suicide inactivation of horseradish peroxidase by excess hydrogen peroxide: The effects of reaction pH, buffer ion concentration, and redox mediation. **Biokemistri** 23: 124–128, 2011.

MANU, B. T.; PRASADA RAO, U. J. S. Calcium modulated activity enhancement and thermal stability study of a cationic peroxidase purified from wheat bran. **Food Chemistry**.114: 66-71, 2009.

MARTINEZ, C.; BACCOU, J.; BRESSON, E.; BAISSAC, Y.; JEAN-LUC, J.; MONTILLET, J. L.; GEIGER, J. P.; ASSIGBETSÉ, K.; NICOLE, M. Salicylic Acid mediated by the oxidative burst is a key molecule in local and systemic responses of cotton challenged by an avirulent race of *Xanthomonas campestris* pv malvacearum. **Plant Physiology**.122: 757–766, 2000.

MCKEY, Doyle. **The distribution of secondary compounds within plants em herbivores: Their interactions with plant secondary metabolites**. Montpellier: Rosenthal, G.A. and Janzen, D.H.; eds, 1979.

MELLO, M. O.; SILVA-FILHO, M. C. Molecular evolution of Bowman-Birk type proteinase inhibitors in flowering plants. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 27: 103-112, 2003.

MELO, V. M. M.; VASCONCELOS, I. M.; GOMES, V. M.; CUNHA, M.; SOARES, A. A.; OLIVEIRA, J. T. A. A cotyledonary agglutinin from *Luetzelburgia auriculata* inhibits the fungal growth of *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium solani* and *Aspergillus niger* and impairs glucose-stimulated acidification of the incubation medium by *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Plant Science**. 169: 629-639, 2005.

MENDIETA, J. R.; PAGANO, M. R.; MUÑOZ, F. F.; DALEO, G. R.; GUEVARA, M. G. Antimicrobial activity of potato aspartic proteases (StAPs) involves membrane permeabilization. **Microbiology**. 152: 2039-2047, 2006.

MICHNIEWICZ, A.; LEDAKIWICZ, S.; RENÉ, U.; HOFRICHTER, M. Kinetics of the enzymatic decolorization of textile dyes by laccase from *Cerrena unicolor*. **Dyes and Pigments**. 77: 295–302, 2008.

MIKA, A.; LU, S. Properties of Guaiacol Peroxidase Activities Isolated from Corn Root Plasma Membranes 1. **Plant Physiology**. 132: 1489–1498, 2003.

MOHAMED, S. A.; EL-BADRY, M. O.; DREES, E. A.; FAHMY, A. S. Properties of a cationic peroxidase from *Citrus jambhiri*. **Applied Biochemistry Biotechnology**. 150: 127–137, 2008.

MOHAMED, S. A.; ABDEL-ATY, A. M.; HAMED, M. B.; EL-BADRY, M. O.; FAHMY, A. S. Ficus sycomorus latex: A thermostable peroxidase . *African Journal of Biotechnology* 10: 17532-17545, 2011.

MOHAMED, S. A.; DARWISH, A. A.; EL-SHISHTAWY, R. M. Immobilization of horseradish peroxidase on activated wool. **Process Biochemistry**. 48: 649–655, 2013.

MORCELLE, S. R.; CAFFINI, N. O.; PRIOLO, N. Proteolytic properties of *Funarium clausun* latex. **Fitoterapia**. 75: 480-493, 2004.

MOTA, H. R. O. **Identificação de proteínas de defesa vegetal com importância biotecnológica presentes no látex de *Ficus benjamina* L.** Fortaleza. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

MOURSY, L. E. Insecticidal activity of *Calotropis procera* extracts of the flesh fly, *Sarcophaga hemorrhoidalis* fallen. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, 27: 505-514, 1997.

MURA, A.; MEDDA R.; LONGU, S.; FLORIS G.; RINALDI, A. C.; PADIGLIA, A. A Ca²⁺/calmodulin-binding peroxidase from *Euphorbia* Latex: novel aspects of calcium–hydrogen peroxide cross-talk in the regulation of plant defenses. **Biochemistry**. 44: 14120–14130, 2005.

NG, T. B. Antifungal proteins and peptides of leguminous and non-leguminous origins. **Peptides**. 25: 1215-1222, 2004.

NIGEL C. VEITCH, N. C. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. **Phytochemistry** 65: 249–259, 2004.

NORDBERG, J.; ARNER, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine** 31: 1287–1312, 2001.

NORTON, G.; PAPPUSAMY, A.; YUSOF, F.; PUJADE-RENAUD, V.; PERKINS, M.; GRIFFITHS, D.; JONES, H. Characterisation of recombinant *Hevea brasiliensis* allene oxide synthase: effects of cyclooxygenase inhibitors, lipoxygenase inhibitors and salicylates on enzyme activity. **Plant Physiology and Biochemistry**. 45:129-138, 2007.

O'BRIEN, P. J. Peroxidases. **Chemico-Biological Interactions** 129: 113–139, 2000.

OLIVEIRA, Henrique Pinho. **Látex de *Marsdenia megalantha* [Goyder & Morillo, 1994.] como fonte de proteínas bioativas contra fungos fitopatogênicos.** Monografia (Graduação em ciências Biológicas) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

OLIVEIRA, Henrique Pinho. **Proteínas antifúngicas do látex de *Marsdenia megalantha* [Goyder & Morillo, 1994] – Caracterização bioquímica e mecanismos de ação.** Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

OLIVEIRA, Rosilane Ferreira. **Caracterização florística e estrutural de um inselberg no município de Quixadá, Ceará.** Monografia (Graduação em ciências Biológicas) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2002.

OLIVEIRA, Rute Medeiros de. **Avaliação da atividade anticoagulante, antioxidativa e antiproliferativa de extratos aquosos de *Marsdenia megalantha*.** Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2011.

OLSEN, R. L.; LITTLE, C. The peroxidase activity of rat uterus. **Journal of Biochemistry** 101: 333-339, 1979.

PAGANO, M. R.; MENDIETA, J. R.; MUÑOZ, F. F.; DALEO, G. R.; GUEVARA, M. G. Roles of glycosylation on the antifungal activity and apoplast accumulation of StAPs (*Solanum tuberosum* aspartic proteases). **International Journal of Biological Macromolecules**. 41: 512-520, 2007.

PANDEY, V. P.; DWIVEDI, U. N. Purification and characterization of peroxidase from *Leucaena leucocephala*, a tree legume. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. 68: 168–173, 2011.

PASSARDI, F.; COSIO, C.; PENEL, C.; DUNAND, C. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. **Plant Cell Reports**. 24: 255–265, 2005.

PASSARDI, F.; THEILER, G.; ZAMOCKY, M.; COSIO, C.; ROUHIER, N.; TEIXERA, F.; MARGIS-PINHEIRO, M.; IOANNIDIS, V.; PENEL, C.; FALQUET, L.; DUNAND, C. Update in bioinformatics - peroxiBase: The peroxidase database. **Phytochemistry**.68: 1605–1611, 2007.

PEREIRA, L. S.; GOMES, V. M.; FERNANDES, K. V. S.; SALES, M. P.; XAVIER-FILHO, J. Insectidal and antifungal proteins of the latex from *Manihot glaziovii* Muell. Arg. **Revista Brasileira de Botânica**. 22: 27-30, 1999.

PESSOA, C. R. M.; RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R. M. T.; SIMÕES, S. V. D.; RAPINI, A. Poisoning by *Marsdenia hilariana* and *Marsdenia megalantha* (Apocynaceae) in ruminants. **Toxicon** 58: 610–613, 2011.

POSCH, A.; CHEN, Z.; WHEELER, C.; BAUR, X. Characterization and identification of latexallergens by two-dimensional electrophoresis and protein microsequencing. **Journal of Allergy Clinical Immunology**. 99: 385-95, 1997.

POULOS, T. L. Peroxidases. **Current Opinion in Biotechnology**. 4: 484-489, 1993.

RANI, D. N.; ABRAHAM, T. E. Kinetics and thermal stability of two peroxidases isozymes from *Eupatorium odoratum*. **Applied Biochemistry Biotechnology**. 128: 215-235, 2006.

RUDRAPPA, T.; LAKSHMANAN, V.; KAUNAIN, R.; SINGARA, N.; NEELWARNE, B. Purification and characterization of an intracellular peroxidase from genetically transformed roots of red beet (*Beta vulgaris* L.). **Food Chemistry**. 105: 1312–1320, 2007.

SALVACHÚA, D.; PRIETO, A.; MATTINEN, M. L.; TAMMINEN, T.; LIITIÄB, T.; LILLET, M.; WILLFÖRC, S.; MARTÍNEZA, A. T.; MARTÍNEZ, M. J. Versatile peroxidase as a valuable tool for generating new biomolecules by homogeneous and heterogeneous cross-linking. **Enzyme and Microbial Technology**. 52: 303–11, 2013.

SANTOS, P. O.; SANTOS, I. S.; GOMES, V. M.; MACHADO, O. L. T.; FERNANDES, K. V. S.; XAVIER-FILHO, J.; OLIVEIRA, A.E.A. In vitro evaluation of antifungal activity of soybean (*Glycine max*) seed coat proteins. **Journal of Stored Product Research**. 44: 310-315, 2008.

SCHMOURLO, G.; MENDONÇA-FILHO, R. R.; ALVIANO, C. S.; COSTA, S. S. Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal and food plants. **Journal of Ethnopharmacology**. 96: 563–8, 2005.

SCHOPFER, P.; PLACHY, C.; FRAHRY, G. Release of reactive oxygen intermediates (superoxide radicals, hydrogen peroxide, and hydroxyl radicals) and peroxidase in germinating radish seeds controlled by light, gibberellin, and abscisic acid. **Plant Physiology**. 125: 1591–602, 2001.

ŚCIBIOR, D.; CZECZOT, H. Catalase: structure, properties, functions. **Postepy Hig Med Dosw**. 60: 170-180, 2006.

SELS, J.; MATHYS, J.; DE CONINCK, B. M. A.; CAMMUE, B. P. A.; DE BOLLE, M. F. C. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. **Plant Physiology and Biochemistry**. 46: 941-950, 2008.

SILVA, M. C.; TORRES, J. A.; VASCONCELOS DE SÁ, L. R.; CHAGAS, P. M. B.; FERREIRA-LEITÃO, V. S.; CORRÊA, A. D. The use of soybean peroxidase in the decolourization of Remazol Brilliant Blue R and toxicological evaluation of its degradation products. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. 89: 122–129, 2013.

SOEDJANAATMADJA, U. M. S.; SUBROTO, T. BEINTEMA, J. J. The effluent of natural rubber factories is enriched in the antifungal protein hevein. **Bioresource Technology**. 53: 39-41, 1995.

SONGULASHVILI, G.; ELISASHVILI, V.; WASSER, S. P.; NEVO, E.; HADAR, Y. Basidiomycetes laccase and manganese peroxidase activity in submerged fermentation of food industry wastes. **Enzyme and Microbial Technology**. 41: 57–61, 2007.

SRITANYARAT, W.; PEARCE, G.; SIEMS, W. F.; et al. Isolation and characterization of iso inhibitors of the potato protease inhibitor I family from the latex of the rubber trees, *Hevea brasiliensis*. **Phytochemistry**. 67: 15, p. 1644–50, 2006.

SRIVASTAVA, M. K.; DWIVEDI, U. N. Delayed ripening of banana fruit by salicylic acid. **Plant Science**. 158: 87–96, 2000.

SVECOVÁ, E.; PROIETTI, S.; CARUSO, C.; COLLA, G.; CRINÒ, P. Antifungal activity of *Vitex agnus-castus* extract against *Pythium ultimum* in tomato. **Crop Protection**. 43: 223-230, 2013.

TATSADJIEU, N. L. , JAZET DONGMO, P. M.; NGASSOUM, M. B.; ETO, F.; MBOFUNG, C. M. F. Investigations on the essential oil of *Lippia rugosa* from Cameroon for its potential use as antifungal agent against *Aspergillus flavus* Link ex. Fries. **Food Control**. 20: 161–166, 2009.

TAUROG, A. Molecular evolution of thyroid peroxidase. **Biochimie** 81: 557–562, 1999.

THORDAL-CHRISTENSEN, H.; ZHANG, Z.; WEI, Y.; COLLINGE, D. B. Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. **Plant Journal**. 11: 1187–1194, 1997.

TOGNOLLI, M.; PENEL, C.; GREPPIN, H.; SIMON, P. Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in *Arabidopsis thaliana*. **Gene**. 288: 129–138, 2002.

URBANEK, H.; KUZNIAK-GEBAROWSKA, E.; HERKA, K. Elicitation of defense responses in bean leaves by *Botrytis cinera* polygalacturonase. **Acta Physiologiae Plantarum**. 13: 43-50, 1991.

VAN DER HOORN, R. A. L.; JONES, J. D. G. The plant proteolytic machinery and its role in defense. **Current Opinion in Plant Biology**. 7: 400–407, 2004.

VAN LOON, L. C.; REP, M.; PIETERSE, C. M. J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Reviews of Phytopathology**, 44:135-62, 2006.

VASCONCELOS, I. M.; MAIA, A. A.; SIEBRA, E. A.; OLIVEIRA, J. T. A.; MELO, V. M. M.; CARLINI, C. R.; CASTELAR, L. I. Nutritional study of two Brazilian soybean (*Glycine max*) cultivars differing in the contents of antinutritional and toxic proteins. **Journal of Nutritional Biochemistry**. 12: 55-62, 2001.

VASCONCELOS, I. M.; MORAIS, J. K. S.; SIEBRA, E. A.; CARLINI, C. R.; SOUSA, D. O. B.; BELTRAMINI, L. M.; MELO, V. M. M.; OLIVEIRA, J. T. A. SBTX, a new toxic protein distinct from soyatoxin and other toxic soybean [*Glycine max*] proteins and its inhibitory effect on *Cercospora sojina* growth. **Toxicon**. 51: 952-963, 2008.

VIANELLO A, ZANCANI M, NAGY G, MACRI F. Guaiacol peroxidase associated to soybean root plasma membranes oxidizes ascorbate. **Journal of Plant Physiology** 150: 573–577, 1997.

WARBURG, O.; CHRISTIAN, W. Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase *Biochem. Z.*; 310: 384–421, 1941 (apud: ROMPEL, A.; ALBERS, M.; NASERI, J. I. Purification, cloning and characterization of a novel peroxidase isozyme from sweetpotatoes (*Ipomoea batatas*). **Biochemystri et biophysica acta**. 1774: 1422–30, 2007.

WASANO, N.; KONNO, K.; NAKAMURA, M.; HIRAYAMA, C.; HATTORI, M.; TATEISHI, K. A unique latex protein, MLX56, defends mulberry trees from insects. **Phytochemistry**. 70: 880–888, 2009.

WELINDER, K. G.; JUSTESEN, A. F.; KJAERSQÁRD, I. V.; JENSEN, R. B.; RASMUSSEN, S. K.; JESPERSEN, H. M.; DUROUX, L. Structural diversity and transcription of class III peroxidases from *Arabidopsis thaliana*. **European Journal Biochemistry**. 269: 6063–6081, 2002.

WITITSUWANNAK, R.; WITITSUWANNAK, D.; SA'ITAYSEVAN, B.; PASITKU, P. Peroxidase from *Hevea brasiliensis* bark: purification and properties. **Phytochemistry**. 44: 237-241, 1997.

WITITSUWANNAKUL, R.; PASITKUL, P.; KANOKWIROON, K.; WITITSUWANNAKUL, D. A role for a *Hevea* latex lectin-like protein in mediating rubber particle aggregation and latex coagulation. **Phytochemistry** 69: p. 339–347, 2008a.

WITITSUWANNAKUL, R.; RUKSEREE, K.; KANOKWIROON, K.; WITITSUWANNAKUL, D. A rubber particle protein specific for *Hevea* latex lectin binding involved in latex coagulation. **Phytochemistry**. 69: 1111–1118, 2008b.

YE, X. Y.; NG, T. B. Isolation of novel peroxidase from French bean legumes and first demonstration of antifungal activity of a non-milk peroxidase. **Life Science**. 71: 1667–1680, 2002.

YEANG, H. Y.; ARIF, S. A. M.; YUSOF, F.; SUNDERASAN, E. Allergenic proteins of natural rubber latex. **Methods** 27: 32–45, 2002.

YOSHIDA K.; KAOTHIEN P.; MATSUI T.; KAWAOKA A.; SHINMYO A. Molecular biology and application of plant peroxidase genes. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 60: 665–670, 2002.

ZIPOR, G.; SHAMIR, M. O. Do vacuolar peroxidases act as plant caretakers? **Plant Science** 199–200: 41–47, 2013.

ZOTTICH, U.; DA CUNHA, M.; CARVALHO, A. O.; DIAS, G. B.; CASARIN, N.; VASCONCELOS, I. M.; GOMES, V. M. An antifungal peptide from *Coffea canephora* seeds with sequence homology to glycine-rich proteins exerts membrane permeabilization and nuclear localization in fungi. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1830: 3509–3516, 2013.