

Atividade antimicrobiana de extratos peptídicos de folhas de berinjela na inibição do crescimento de *Ralstonia solanacearum* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Hebréia Oliveira Almeida¹, Felipe Roberti Teixeira¹, Reginaldo da Silva Romeiro², Derly José Henriques da Silva³, Paulo Roberto Gomes Pereira³, Elizabeth Pacheco Batista Fontes¹, Maria Cristina Baracat-Pereira^{1*}

¹Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - BIOAGRO, ²Departamento de Fitopatologia, ³Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa (UFV), 36.570-000, Viçosa-MG, Brasil.

*Autor para correspondência. baracat@ufv.br

Data de chegada:20/05/2005. Aceito para publicação em:12/02/2007

1209

RESUMO

Almeida, H.O.; Teixeira, F.R.; Romeiro, R.S.; Silva, D.J.H.; Pereira, P.R.G.; Fontes, E.P.B.; Baracat-Pereira, M.C. Atividade antimicrobiana de extratos peptídicos de folhas de berinjela na inibição do crescimento de *Ralstonia solanacearum* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Summa Phytopathologica*, v.34, n.1, p.62-64, 2008

Compostos naturais, incluindo-se peptídios antimicrobianos, vêm se destacando como fontes de agentes de defesa contra fitopatógenos de importância comercial. Esse trabalho visou obter frações peptídicas a partir de extratos de folhas de berinjela e avaliar as atividades antimicrobianas contra duas bactérias fitopatogênicas. Os *pools* peptídicos catiônicos, PC1 e PC2 e o aniônico PA obtidos de extratos solúvel (ES) e de parede celular

(EP) foram analisados em duas concentrações. Para ES e EP, obteve-se inibição do crescimento da *Ralstonia solanacearum* e da *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* superior a 60%, sendo PC2-2X (maior concentração avaliada) a mais efetiva. Os resultados sugerem que extratos de folhas de berinjela apresentam peptídios com potencial aplicação como agentes de defesa de plantas.

Palavras chave: Peptídio antimicrobiano, solanáceas, defesa de plantas.

ABSTRACT

Almeida, H.O.; Teixeira, F.R.; Romeiro, R.S.; Silva, D.J.H.; Pereira, P.R.G.; Fontes, E.P.B.; Baracat-Pereira, M.C. Antimicrobial activity of peptide extracts of eggplant leaves in the inhibition of *Ralstonia solanacearum* and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* growth. *Summa Phytopathologica*, v.34, n.1, p.62-64, 2008

Natural compounds, such as antimicrobial peptides, have been potentially considered as sources of defense agents against commercially relevant phytopathogens. This work aimed to obtain peptide-enriched fractions from eggplant leaf protein extracts in order to evaluate their antimicrobial activities against two phytopathogenic bacteria. The resulting cationic pools, PC1 and PC2, and the anionic PA pool from

leaf soluble (ES) and cell wall (EP) extracts were analyzed in two concentrations. For ES and EP, growth inhibition of *Ralstonia solanacearum* and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* was higher than 60%, being PC2-2X (higher evaluated concentration) fraction the most effective. These results suggest that eggplant leaf extracts contain peptides with potential use as plant defense agents.

Additional keywords: Antimicrobial peptide, solanaceous, plant defense.

Os peptídios antimicrobianos (AMPs) são importantes componentes da defesa inata de plantas e de outros organismos, e sua ação corresponde a uma estratégia de defesa antiga, econômica e com amplo espectro de ação antimicrobiana (2, 5). No agronegócio, pesquisas visam obter novos defensivos agrícolas contendo tais compostos (7), já que podem apresentar atividades contra bactérias, fungos, vírus e/ou protozoários e atuam em baixas concentrações com baixa toxicidade e baixo impacto ambiental (2). Os AMPs poderiam contribuir para o controle da murcha e do cancro bacterianos (3, 4). O presente trabalho visou avaliar frações peptídicas de extratos solúvel (ES) e de parede celular (EP) de folhas de berinjela quanto à atividade contra fitopatógenos, e identificar princípios ativos para a produção de defensivos agrícolas naturais para uso comercial.

Plantas de berinjela (*Solanum melongena*, var. Florida Market, Dpto. Fitotecnia, UFV) foram cultivadas em sistema hidropônico e as folhas totalmente expandidas (18 g) foram coletadas e maceradas (1:4, p:v) com Tris-HCl 100 mM pH 7, EDTA, PMSF, benzamidina e tiouréia (9). Após centrifugação, o sobrenadante foi reservado, o

precipitado lavado (água, 3 vezes), centrifugado, e os sobrenadantes misturados com o reservado anteriormente, sendo a amostra denominada extrato solúvel bruto (ESB). O precipitado foi ressuspendido em LiCl 1,5 M (1:2,5, p:v), EDTA, PMSF, benzamidina e tiouréia. O homogenato foi agitado, centrifugado e o sobrenadante denominado extrato de parede celular bruto (EPB). As centrifugações foram a 20.300 g por 30 min a 4°C.

ESB e EPB foram separadamente fracionados com sulfato de amônio (35% sat.), centrifugados, aquecidos (80°C, 15 min) e centrifugados. Os sobrenadantes ES e EP, respectivamente, foram dialisados (1.000 Da) e cromatografados por troca aniônica (CTA) (DEAE-Sepharose, GE), em equipamento FPLC (BioRad). A coluna (15 mL) foi equilibrada em Tris-HCl 25 mM, pH 7,0, e as amostras fracionadas a 1,0 mL/min, na solução de equilíbrio, na ausência (obter a fração catiônica) e na presença (obter a fração aniônica) de NaCl 1 M. Dois *pools* catiônicos (PC1 e PC2) e um aniônico (PA) foram obtidos, dialisados e concentrados a 270 mL. Parte de cada pool (89%) foi utilizada para testes antimicrobianos em microplacas e parte (11%)

Tabela 1. Atividade antimicrobiana contra *Ralstonia solanacearum* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* de extratos (ES e EP) de folhas de berinjela totalmente expandidas, após fracionamento por cromatografia de troca iônica.

Extrato	Fração parcialmente purificada	<i>Ralstonia solanacearum</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>
		Porcentagem média de inibição* ± DP	
Extrato Solúvel (ES)	Controle da cultura	0,0 ± 0,034	0,0 ± 0,000
	Controle do meio	100,0 ± 0,010	100,0 ± 0,025
	PC1-1X	90,5 ∂ 0,004	76,8 ∂ 0,008
	PC1-2X	85,3 ∂ 0,000	59,8 ∂ 0,003
	PC2-1X	100,0 ∂ 0,003	81,0 ∂ 0,001
	PC2-2X	100,0 ∂ 0,001	96,5 ∂ 0,003
	PA-1X	92,9 ∂ 0,000	80,4 ∂ 0,001
	PA-2X	100,0 ∂ 0,005	93,9 ∂ 0,011
Extrato de Parede Celular (EP)	Controle da cultura	0,0 ± 0,034	0,0 ± 0,000
	Controle do meio	100,0 ± 0,010	100,0 ± 0,025
	PC1-1X	0,0 ∂ 0,001	37,9 ∂ 0,013
	PC1-2X	29,5 ∂ 0,029	26,0 ∂ 0,017
	PC2-1X	10,4 ∂ 0,019	73,3 ∂ 0,006
	PC2-2X	88,5 ∂ 0,006	100,0 ∂ 0,010
	PA-1X	64,6 ∂ 0,006	59,5 ∂ 0,005
	PA-2X	82,0 ∂ 0,018	65,9 ∂ 0,008

* Os testes foram desenvolvidos em microplacas com capacidade para 96 amostras, avaliando-se os valores de absorvância a 560 nm (A_{560}) após 21 h de cultivo. Para cada ensaio, foram adicionados 50 μ L de meio LB concentrado duas vezes (2X), 10 μ L da suspensão bacteriana ($A_{560} = 1,0-1,2$) e 40 μ L da fração peptídica a ser testada (amostras) ou de água ultrapura (controle da cultura). O controle do meio de cultivo consistiu de 50 μ L de meio LB 2X e 50 μ L de água ultrapura.

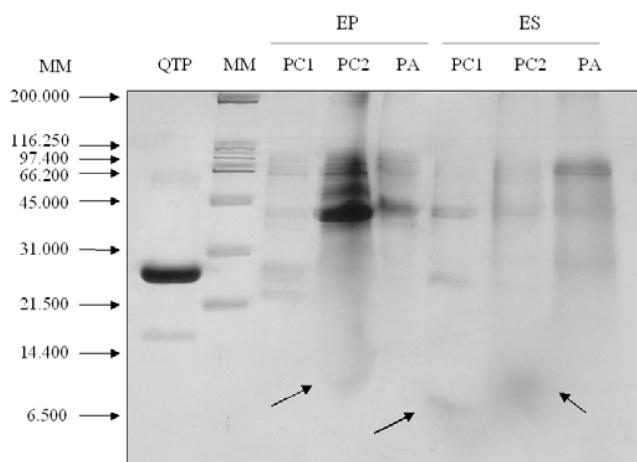


Figura 1. – Eletroforese em gel desnaturalante de três fases, em presença de Tricina (SDS-Tricina-PAGE), dos *pools* catiônicos (PC1 e PC2) e aniônico (PA) dos extratos de parede celular (EP) e solúvel (ES) de folhas de berinjela totalmente expandidas. O gel de três fases (separação, 16,5% T e 3,0% C, pH 8,9; intermediário, 9,9% T e 3,0% C, pH 8,9; concentração, 5,12% T e 2,6% C, pH 6,8), foi desenvolvido com tampão do catodo contendo Tris-base 0,1 M, Tricina 0,1 M e SDS 0,1 % (pH 8,25), e do anodo contendo Tris-base 0,2 M (pH 8,9). As amostras foram: QTP, 3 μ g de quimotripsinogênio (25.000 Da); MM, padrão de massa molecular de ampla faixa (BioRad), 5 μ L; e PC1, PC2 ou PA de EP ou de ES, 12,5 μ L após diálise, liofilização e ressuspensão em 270 μ L de água ultrapura. O gel foi revelado com Coomassie Brilliant Blue. As setas indicam a presença de peptídeos em PC2 de EP e em PC1 e PC2 de ES.

para a separação por SDS-Tricina-PAGE, em mini-gel de três fases (6). As bactérias *Ralstonia solanacearum* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Depto. Fitopatologia, UFV) foram cultivadas em meio LB líquido, a 28 °C. Os testes foram desenvolvidos em duplicata e em duas concentrações (1X e 2X, 7,4% e 14,8%, respectivamente) de PC1, PC2 ou PA.

Frações parcialmente purificadas de ES e EP apresentaram bandas peptídicas (Figura 1) e atividade antimicrobiana (Tabela 1). Nossos resultados mostraram que folhas totalmente expandidas de berinjela possuem peptídeos constitutivos com alta atividade antimicrobiana, ao contrário do sugerido por Broekaert et al. (1), que relataram que folhas maduras sadias, em geral, não são boas fontes desses compostos.

PC1-2X, PC1-1X e PA-1X, originadas de ES, inibiram o crescimento de *R. solanacearum* acima de 85%, enquanto que PC2-1X; PC2-2X e PA-2X promoveram inibição total (Tabela 1). As mesmas amostras promoveram inibições superiores a 60% para *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (Tabela 1). A maior inibição foi observada nas maiores concentrações de PC2 e PA, tanto para amostras de ES quanto de EP, indicando que a inibição foi dependente da concentração dos componentes da mistura, característica comum a agentes de defesa comerciais (7). Sugere-se que esses extratos têm potencial para a bioprospecção de agentes de defesa naturais, sendo PC2 a fração mais promissora. Os resultados evidenciaram ainda que PA (de ES ou EP) apresentou atividade antimicrobiana (Tabela 1), porém bandas peptídicas não foram observadas em gel (Figura 1). Peptídeos aniônicos podem ser membros da defesa inata de plantas (8).

O perfil eletroforético de PC1, PC2 e PA de ES e EP indicou que a metodologia de enriquecimento dessas moléculas foi satisfatória, e permitiu a visualização de bandas peptídicas (Figura 1). No geral, os AMPs estão presentes em baixas concentrações nos tecidos vegetais

(1, 2). Ainda assim, foi possível observar bandas peptídicas em PC2 de ES e de EP (Figura 1), que são os *pools* com as maiores atividades antimicrobianas.

Algumas frações inibiram totalmente as culturas das duas bactérias analisadas, uma Gram-positiva e outra Gram-negativa, o que é relevante frente ao objetivo de se encontrar AMPs com amplo espectro de ação antimicrobiana, que atuem como moléculas-modelo para desenvolver produtos de defesa naturais. A alta atividade inibitória observada para *R. solanacearum* é de grande valia pois apenas quatro das dez classes descritas de AMPs de plantas inibem bactérias Gram-negativas (4).

Algumas variedades das solanáceas berinjela, pimentão e pimenta são mais resistentes a *Ralstonia solanacearum*. A expressão dos AMPs poderia explicar esse fato, por meio de uma defesa pré-existente e constitutiva, ou ainda de uma resposta induzida (2). Como vantagem dessa forma de defesa, observa-se que os AMPs, em função do seu tamanho pequeno, podem ser eficientemente sintetizados de modo rápido e econômico (1, 2) e poderiam representar uma nova estratégia na identificação de princípios ativos para o desenvolvimento de novas classes de defensivos para a agroindústria.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem às agências FAPEMIG e CNPq.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Broekaert, W.F.; Terras, F.R.G.; Cammue, B.P.A.; Osborn, R.W. Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. **Plant Physiology**, Sofia, v.108, n.4, p.1353-1358, 1995.
2. García-Olmedo, F.; Rodríguez-Palenzuela, P.; Molina, A.; Alamillo, J. M.; López-Solanilla, E.; Berrocal-Lobo, M.; Poza-Carrión, C. Antibiotic activities of peptides, hydrogen peroxide and peroxynitrite in plant defense. **FEBS Letters**, London, v.498, n.2/3, p.219-222, 2001.
3. Lopes, C.A.; Santos, J.R.M. **Doenças do tomateiro**. Brasília: EMBRAPA, CNPH, 1994. 61p.
4. Gerhardson, B. Biological substitutes for pesticides. **Trends in Biotechnology**, London, v.20, n.8, p. 338-343, 2002.
5. Giacometti, A.; Cirioni, O.; Kamysz, W.; Silvestri, C.; Licci, A.; Riva, A.; Lukasiak, J.; Scalise, G. In vitro activity of amphibian peptides alone and in combination with antimicrobial agents against multidrug-resistant pathogens isolated from surgical wound infection. **Peptides**, London, v.20, n.11, p.2111-2116, 2005.
6. Judd, R.C. Electrophoresis of peptides. In: Walker, J.M. (Ed.). **Methods in molecular biology: basic protein and peptide protocols**. Totowa: Humana Press, 1994. chap. 32, p. 49-57.
7. Knight, S.C.; Anthony, V.M.; Brady, A.M.; Greenland, A.J.; Heaney, S.P.; Murray, D.C.; Powell, K.A.; Schulz, M.A.; Worthington, P.A.; Youle, D. Rationale and perspectives on the development of fungicides. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 35, n.1, p.349-372, 1997.
8. Lai, R.; Lui, H.; Lee, W.H.; Zhang, Y. An anionic antimicrobial peptide from toad *Bombina maxima*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v.295, n.4, p.796-799, 2002.
9. Teixeira, F.R.; Lima, M.C.O.P.; Almeida, H.O.; Romeiro, R.S.; Silva, D.J.H.; Pereira, P.R.G.; Fontes, E.P.B.; Baracat-Pereira, M.C. Bioprospection of cationic and anionic antimicrobial peptides from bell pepper leaves for inhibition of *Ralstonia solanacearum* and *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* growth. **Journal of Phytopathology**, Göttingen, v.154, p.418-421, 2006.