

CROMATOGRAFIA DE FILTRAÇÃO EM GEL PARA A PURIFICAÇÃO DE MOLÉCULAS PROTEICAS E GLICÍDICAS A PARTIR DE NEMATOIDES FITOPATOGÊNICOS

Edilaine Della Valentina Gonçalves^{1*}; José Renato Stangarlin²; Sidiane Coltro-Roncato¹; Omari Dangelo Forlin Dildey¹; Cristiane Claudia Meinerz¹; Odair José Kuhn²

SAP 16-OU Data envio: 15/08/2014 Data do aceite: 02/10/2014
Scientia Agraria Paranaensis – SAP; ISSN: 1983-1471
Marechal Cândido Rondon, v. 13, n. suplemento, dez., p. 353-357, 2014

RESUMO - Fêmeas de nematoides formadores de galhas podem apresentar compostos capazes de ativar mecanismos de defesa no vegetal. Nesse intuito, a técnica de cromatografia baseia-se na purificação de moléculas como proteínas, glicoproteínas, ácidos nucleicos e polissacarídeos, as quais podem apresentar características eliciadoras. O objetivo do trabalho foi determinar a metodologia de purificação de eliciadores, a partir de nematoides fitopatogênicos, pela cromatografia de filtração em gel (CFG). Fêmeas de nematoides de *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne javanica* foram extraídas, maceradas, e posteriormente submetidas à cromatografia de filtração em gel. Para *M. incognita* foram obtidos cinco picos proteicos e sete picos glicídicos, com massas moleculares variando de 8,80 a 285,95 KDa e 65,09 a 7,47 µg de glicose mL⁻¹, respectivamente. Para *M. javanica* obteve-se quatro picos proteicos, cujas massas variaram de 304,99 a 108,73 KDa. Por meio da CFG foi possível purificar frações proteicas e glicídicas a partir de fêmeas de *M. incognita* e *M. javanica*, que serão utilizadas posteriormente para ensaios de indução de resistência em plantas.

Palavras-chave: *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne javanica*, eliciadores.

Gel filtration chromatography for the purification of protein and glucosidic molecules from phytopathogenic nematodes

ABSTRACT - Female root-knot nematode can present compounds able to activate defense mechanisms in the vegetable. With this end, the chromatographic technique is based on the purification of molecules such as proteins, glycoproteins, nucleic acids and polysaccharides, which may present eliciting characteristics. The aim of this paper was to determine the elicitors purification methodology, from phytopathogenic nematodes, by gel filtration chromatography (GFC). Nematodes females of *Meloidogyne incognita* and *Meloidogyne javanica* were extracted, macerated, and subsequently subjected to gel filtration chromatography. For the *M. incognita* five protein peaks and seven glucosidic peaks, with molecular masses ranging from 8.80 to 285.95 KDa and from 65.09 to 7.47 µg glucose mL⁻¹, respectively, were obtained. For the *M. javanica* it was obtained four protein peaks, which masses ranged from 304.99 to 108.73 kDa. By GFC was possible to purify protein and glucosidic fractions from female *M. incognita* and *M. javanica* that will be used later for resistance induction assays in plants.

Key words: *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne javanica*, elicitors.

¹Discentes do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE, Rua Pernambuco 1777, Caixa Postal 91, CEP 85960-000, Marechal Cândido Rondon, PR. E-mail: edilainevalentina@gmail.com. *Autor para correspondência

²Docentes do Programa de Pós-Graduação da Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE, Rua Pernambuco 1777, Caixa Postal 91, CEP 85960-000, Marechal Cândido Rondon PR

INTRODUÇÃO

O método de separação de substâncias a partir de amostras com possível presença de moléculas de interesse iniciou-se com os trabalhos realizados pelo botânico Mikhail Semenovitch Tswett, considerado o pai da cromatografia, cujo objetivo era separar moléculas a partir de extratos de plantas (ETTRE, 2003). A técnica cromatográfica é conhecida como um método físico-químico de separação de moléculas, cujos componentes de uma amostra são separados diferencialmente devido à interação destas com a fase móvel e fase estacionária da coluna (COLLINS, 2006).

Uma das características da cromatografia de exclusão molecular, denominada também como filtração em gel, é que as moléculas que apresentam maior volume hidrodinâmico são eluídas primeiramente quando comparadas com as de menor volume (WINZOR, 2003). Segundo Yu et al. (2006), as moléculas que podem ser purificadas pela cromatografia são proteínas, glicoproteínas, ácidos nucleicos e polissacarídeos.

Essas moléculas, que apresentam atividade eliciadora, podem ser endógenas ou exógenas, dependendo do modo de como atuam no vegetal (DÖRNENBURG; KNORR, 1995; PITTA-ALVAREZ et al., 2000), ou de origem biótica e/ou abiótica (BORSATO et al., 2010). Estas moléculas podem ser secretadas pelo metabolismo ou parte do organismo de fungos, bactérias, vírus, insetos e nematoides (DI PIERO et al., 2005).

Os agentes eliciadores exibem relevante importância dentro do contexto de indução de resistência das plantas, pois são considerados como ferramentas eficazes para o controle alternativo de doenças, tal como proposto por Stangarlin et al. (1999) em que essas moléculas estão envolvidas na ativação de mecanismos de defesa vegetal contra a ação de fitopatógenos. Borsato et al. (2010) ressaltam que as moléculas eliciadoras atuam na ativação dos mecanismos estruturais e/ou bioquímicos de defesa da planta, decorrente da sinalização e expressão de genes, culminando na indução de resistência local e sistêmica nas plantas (MÉTRAUX, 2001).

Considerando que moléculas possam ser separadas pela cromatografia de filtração em gel, o objetivo do trabalho foi determinar a metodologia de purificação de moléculas, a partir de nematoides fitopatogênicos, a fim de obter frações proteicas/glicídicas, visando sua utilização em pesquisas voltadas a indução de resistência em plantas a patógenos.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Nematologia da UNIOESTE localizada no *Campus* de Marechal Cândido Rondon, Paraná, Brasil.

Para a execução da cromatografia de filtração em gel, utilizou-se coluna de vidro (1,5 cm x 50 cm) preenchida com Sephacryl S-100-HR (SIGMA ALDRICH), formando um gel sedimentado (fase estacionária) de 41 cm de altura (72,45 cm³). A coluna foi equilibrada com tampão Tris-HCL 0,5 mM (pH 6,8) (fase

móvel), em um fluxo constante de 0,5 mL min⁻¹, sendo o processo conduzido em temperatura ambiente e monitorado por espectrofotômetro a 280 nm, considerando que o tampão foi deaerado antes do uso.

Para a calibração da coluna utilizou Blue Dextrana (2000 KDa) a fim de determinar o *void volume* (V_0): 5 mg dissolvido em 2 mL de tampão Tris-HCL 0,5 mM pH 6,8 e as proteínas padrão: tireoglobulina (670 KDa), globulina (158 KDa), ovalbumina (44 KDa), mioglobina (17 KDa) e vitamina B₁₂ (1,35 KDa), cujas proteínas foram solubilizadas em 500 µL de tampão Tris-HCL 5 mM pH 6,8. Cerca de 250 µL deste homogeneizado mais 1.250 µL de água destilada foram aplicados na coluna que se encontrava acoplada ao sistema BioLogic™ LP. A cromatografia das proteínas calibrantes foi realizada nas mesmas condições que a cromatografia da proteína (mesmo fluxo, absorção ótica, tampão e coluna).

A massa molecular relativa de cada fração detectada foi estimada utilizando-se a curva de calibração. A curva foi construída plotando-se em um gráfico o logaritmo das massas moleculares das proteínas padrão e o quociente do volume de eluição destas proteínas, pelo *void volume* sendo $y = 9909,2^{e-3,16x}$ ($R^2=0,9645$) (Figura 1), onde y é a massa molecular relativa e x é o quociente do volume de eluição das proteínas pelo *void volume* (V_e/V_0) (FIORI-TUTIDA, 2003).

Para a purificação de moléculas eliciadoras foram utilizadas fêmeas de nematoides de *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne javanica*, obtida de tomateiro cv. 'Santa Clara', cultivada e infectada com o nematoide proveniente de propriedade rural localizada no Município de Marechal Cândido Rondon.

As raízes das plantas foram coletadas e a partir destas, 150 fêmeas individuais foram extraídas e selecionadas. Após a separação das mesmas, para a obtenção da amostra, estas foram maceradas a 4°C em 200 µL de tampão Tris-HCl 0,5 mM e pH 6,8 em tubo para microcentrífuga com auxílio de um bastão de vidro, completando a amostra para um volume de 1 mL. Em seguida, a amostra foi previamente filtrada em filtro de seringa (membrana com 0,45 µm diâmetro de poro) e após, o filtrado foi completado para um volume de 2 mL com tampão 0,5 mM.

Um volume de 1,5 mL foi aplicado sobre o leito da coluna e eluído com o mesmo tampão de equilíbrio, a um fluxo de 0,5 mL min⁻¹. Para cada fração de 1 mL coletada, o conteúdo de proteínas foi determinado através da leitura de absorbância a 280 nm. A presença de carboidratos foi monitorada como descrito por Lever (1972), sendo $y = 0,0021x - 0,0017$ ($R^2=0,9905$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pela cromatografia de filtração em gel das fêmeas de *M. incognita* foram obtidos cinco picos proteicos e sete glicídicos (Figura 2 e Tabela 1). As massas moleculares das proteínas variaram de 8,80 a 285,95 KDa, enquanto que as concentrações de glicose variaram de 65,09 a 7,47 µg mL⁻¹.

Os resultados expressados pelo cromatograma (Figura 2) explicam a característica da cromatografia de filtração em gel, cujo pico I, por apresentar maior massa molecular (282,95 KDa), foi a primeiro a ser eluído, seguido dos picos II, III, IV e V, que também diferem quanto os valores de massa (Tabela 1). Isso pode ser

explicado por Winzor (2003), Yu et al. (2006) e Farnan et al. (2009), pois as moléculas de maior volume hidrodinâmico não penetram nos poros da matriz percorrendo o caminho de eluição mais rapidamente, enquanto que as moléculas menores interagem com a matriz.

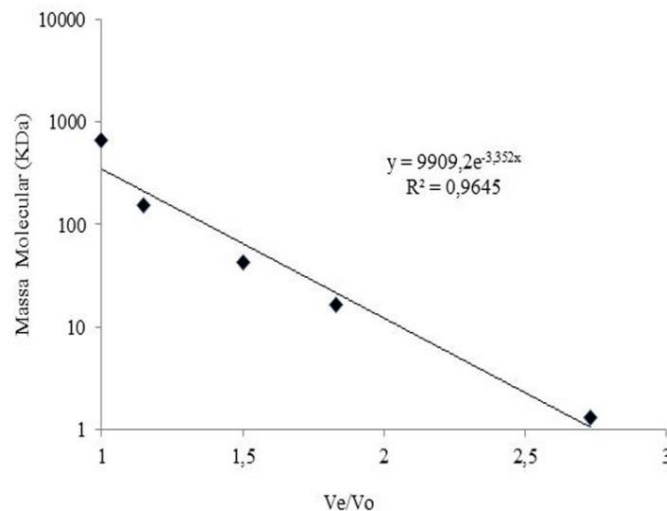


FIGURA 1 - Curva padrão para a determinação de massa molecular. Padrões moleculares: tireoglobulina (670 KDa), globulina (158 KDa), ovalbumina (44 KDa), mioglobina (17 KDa) e vitamina B₁₂ (1,35 KDa).

Trabalhando com cromatografia, Bailey (1995) purificou uma proteína com massa molecular de 22,5 KDa a partir do filtrado da cultura de *Fusarium oxysporum*. Além disso, Simões et al. (2005), avaliando a purificação de esporos do fungo saprófita *Mucor ramosissimus*, pela

cromatografia de troca iônica, verificaram nas frações eluídas, a presença de polissacarídeo do tipo mucorano, de carácter eliciador, efetivas na síntese de fitoalexinas em cotilédones de soja.

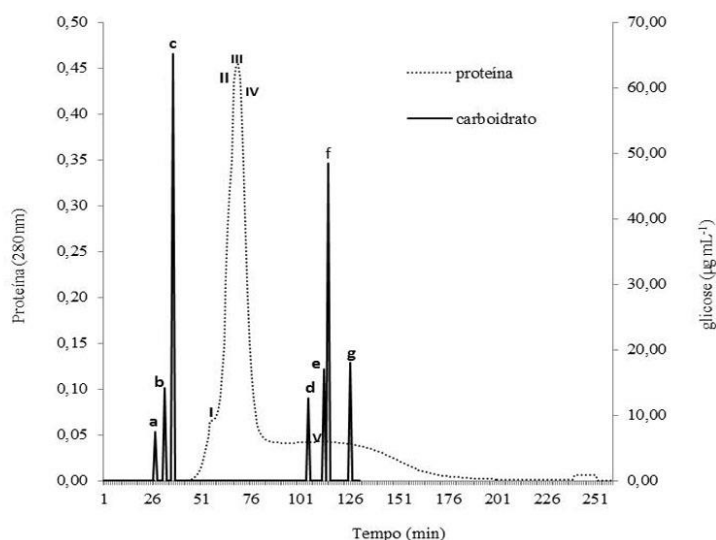


FIGURA 2 - Cromatografia de filtração em gel obtida a partir de fêmeas de *Meloidogyne incognita* em coluna de vidro (1,5 cm x 50 cm) preenchida com Sephacryl S-100- HR (Sigma), e eluída com tampão Tris-HCL 0,5 mM, pH 6,8, sendo coletadas frações de 1 mL (fluxo de 0,5 mL min⁻¹). Proteína determinada em 280 nm e carboidrato pelo método de Lever (1972).

TABELA 1. Massas moleculares (Mm) de frações obtidas por cromatografia de filtração em gel de *Meloidogyne incognita*.

Frações proteicas da CFG	Mm (KDa)*
I	285,95
II	131,93
III	123,70
IV	101,95
V	8,80

*Massas moleculares obtidas de acordo com a curva de calibração representada na Figura 1.

Os resultados de Fiori-Tutida (2003) mostraram 23 picos proteicos ao realizar cromatografia de troca iônica seguida de cromatografia de filtração em gel utilizando extratos de dois isolados de *Lentinula edodes*. Os resultados de Fiori-Tutida (2003) corroboram com os do presente trabalho, no que se refere à eficiência da técnica na purificação de proteínas.

Ao considerar as medidas de glicose, os picos (c) e (f) revelaram as maiores concentrações quando comparadas com os picos (a), (b), (d), (e) e (g), que mostraram menores teores.

A purificação de fêmeas de *M. javanica* mostrou quatro picos proteicos (Figura 3 e Tabela 2) variando de 108,73 e 304,99 KDa, indicando a presença de grupos de moléculas com elevadas massas moleculares, assim como observados para os picos proteicos de *M. incognita*.

Cabe ressaltar que os picos separados no presente estudo, evidenciaram grande quantidade e diversidade de proteínas nas frações obtidas, sugerindo que a purificação da amostra seja realizada inicialmente pela cromatografia de troca iônica seguida de cromatografia de filtração em gel, para uma melhor separação das moléculas, assim como reportado por Sena et al. (2011) na caracterização da β -1,3 glucanase produzida pela *Moniliophthora pernicioso*, e por Silva et al., (2001) na purificação de frações proteicas e globulina de grão de bico.

Esta resposta pode ser explicada devido a uma das finalidades da cromatografia de troca iônica ser separar as moléculas em dois grandes grupos, os de cargas elétricas positivas e cargas negativas, e isso irá depender dos trocadores iônicos utilizados no momento da análise. Cabe ressaltar que este método contribuiu com a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados.

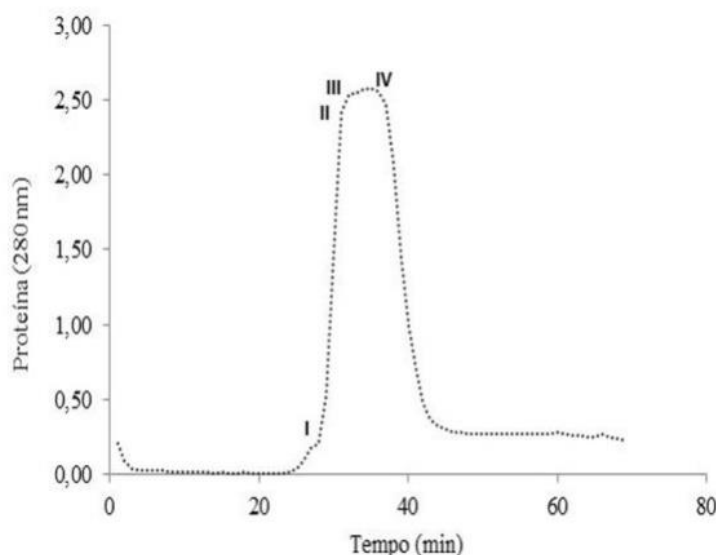


FIGURA 3 - Cromatografia de filtração em gel obtida a partir de fêmeas de *Meloidogyne javanica* em coluna de vidro (1,5 cm x 50 cm) preenchida com Sephacryl S-100- HR (Sigma), e eluída com tampão Tris-HCL 0,5 mM, pH 6,8, sendo coletadas frações de 1 mL (fluxo de 0,5 mL min⁻¹). Proteína determinada em 280 nm.

TABELA 2. Massas moleculares (Mm) de frações obtidas por cromatografia de filtração em gel de *Meloidogyne javanica*.

Frações proteicas da CFG	Mm (KDa)*
I	304,99
II	182,11
III	160,08
IV	108,73

*Massas moleculares obtidas de acordo com a curva de calibração representada na Figura 1.

De maneira complementar, Cavalcanti et al. (2007) ressaltam que a finalidade da purificação de eliciadores está baseada na utilização do princípio ativo das moléculas em um produto comercial, visando a produção da proteína purificada em larga escala.

Contudo, para dar continuidade ao presente trabalho, faz-se necessário a realização de novos estudos com o intuito de testar o poder eliciador das frações purificadas na indução de mecanismos de resistência, como exemplo, na atividade de síntese de fitoalexinas.

Diversos estudos já foram reportados na literatura utilizando moléculas purificadas a partir de microrganismos patogênicos visando o seu próprio controle, como no caso da β -1,3- β -1,6-glucana localizada na parede celular e a lipoglicoproteína, a partir de *Phytophthora infestans*, ambos considerados indutores bióticos de resistência pela síntese de fitoalexina (OZERETSKOVSKAYA, 1995).

CONCLUSÕES

A metodologia de cromatografia de filtração em gel adotada foi eficiente para purificar frações proteicas e glicídicas a partir de fêmeas de *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne javanica*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAILEY, B.A. Purification of a protein from culture filtrates of *Fusarium oxysporium* that induces ethylene and necrosis in leaves of *Erythroxylum coca*. **Biochemistry and Cell Biology**, Ottawa, v.85, n.10, p.1250-1255, 1995.
- BORSATO, L.C.; DI PIERO, R.M.; STADNIK, M.J. Mecanismos de defesa eliciados por ulvana contra *Uromyces appendiculatus* em três cultivares de feijoeiro. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v.35, n.5, p.318-322, 2010.
- CAVALCANTI, F.R.; RESENDE, M.L.V.; OLIVEIRA, J.T.A. Peroxidases ativadas por frações proteicas de extrato biológico eficaz na proteção do tomateiro contra a mancha bacteriana. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.32, n.6, p.507-511, 2007.
- COLLINS, C.H. Princípios básicos de cromatografia. In: COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de Cromatografia**. Unicamp, Campinas, 2006. 17 p.
- DI PIERO, R.M.; GARCIA JUNIOR, D.; TONUCCI, N.M. Indutores bióticos. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO R.S. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. FEALQ, Piracicaba, 2005. p.29-50.
- DÖRNENBURG, H.E.; KNORR, D. Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant-cell cultures. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.17, n.8, p.674-684, 1995.
- ETTRE, L.S. M.S. Tswett and the invention of chromatography. **LCGC North America**, Iselin, v.21, n.5, p.458-467, 2003.
- FARNAN, D.; MORENO, G.T.; STULTS, J.; BECKER, A.; TREMINTIN, G.; GILS, M.V. Interlaced size exclusion liquid chromatography of monoclonal antibodies. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v.1216, n.51, p.8904-8909, 2009.
- FIORI-TUTIDA, A.C.G. **Uso de extrato dos cogumelos *Leninula edodes* (Berk.) Pegler e *Agaricus blazei* (Murril) ss. Heinem no controle in vitro de *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* e na indução de resistência em trigo à *Bipolaris sorokiniana***. 112f.: il. 2003. Tese (Doutorado-Agronomia) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá.
- LEVER, M.A. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. **Analytical Biochemistry**, Oxford, v.47, n.1, p.273-279, 1972.
- MÉTRAUX, J.P. Systemic acquired resistance and salicylic acid: current state of knowledge. **European Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v.107, n.1, p.13-18, 2001.
- OZERETSKOVSKAYA, O. Induced resistance in the solanaceae. In: HAMMERSCHMITDT, R.; KUC, J. (Ed.). **Induced resistance to disease in plants**. Kluwer Academic Publishers, Boston, 1995. cap.2, p.31-62.
- PITTA-ALVAREZ, S.I.; SPOLLANSKY, T.C.; GIULIETTI, A.M. The influence of different biotic and abiotic elicitors on the production and profile of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.26, n.2, p.252-258, 2000.
- SENA, A.R.; JÚNIOR, G.L.V.; NETO, A.G.; TARANTO, A.G.; PIROVANI, C.P.; CASCARDO, J.C.M.; ZINGALI, R.B.; BEZERRA, M.A.; ASSIS, S.A. Production, purification and characterization of a thermostable β -1,3-glucanase (laminarinase) produced by *Moniliophthora perniciosa*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.83, n.2, p.599-609, 2011.
- SILVA, M.A.da.; NEVES, V.A.; LOURENÇO, E.J. Frações proteicas e globulina principal de grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) cv. IAC-Marrocos. **Alimentos e Nutrição**, São Paulo, v.12, n.1, p.131-149, 2001.
- SIMÕES, K.; DIETRICH, S.M.C.; HAHN, M.G.; BRAGA, M.R. Purification and characterization of a phytoalexin elicitor from spores of the saprobe *Mucor ramosissimus*. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.28, n.4, p.735-744, 2005.
- STANGARLIN, J.R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.E.S.; NOZAKI, M.H. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biociência e Desenvolvimento**, Brasília, v.11, n.3, p.16-21, 1999.
- WINZOR, D.J. Analytical exclusion chromatography. **Journal of Biochemical Biophysical Methods**, Amsterdam, v.56, n.1, p.15-52, 2003.
- YU, C.M.; MUN, S.; WANG, N.H.L. Theoretical analysis of the effects of reversible dimerization in size exclusion chromatography. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v.1132, n.1, p.99-108, 2006.