

PURIFICAÇÃO E ATIVIDADE DE GLUCANASE DE *Paracoccidioides brasiliensis*

PIRES, Lorena Gonçalves Pires¹; **SILVA**, Christielly Rodrigues²; **SANTANA**, Lidiane Aparecida da Penha³; **PEREIRA**, Maristela⁴

Palavras chave: *Paracoccidioides brasiliensis*, atividade enzimática e 1,3- β -glucanase

1. INTRODUÇÃO

O fungo *Paracoccidioides brasiliensis* é o agente etiológico da micose humana paracoccidioidomicose. Segundo FRANCO *et al.* (1987), a inalação pelo hospedeiro humano de micélios e/ou propágulos do fungo é a principal via de entrada do parasita, propiciando o início da infecção pelos pulmões e a disseminação para outros órgãos onde se estabelece na forma de levedura (LACAZ *et al.*, 1991). A parede celular de fungos é uma estrutura essencial, altamente dinâmica e participa de vários processos fisiológicos. Em sua composição esta a glucana, o principal componente estrutural que fortalece a parede celular de fungos. Nesse trabalho, o objetivo é isolar a 1,3- β -glucanase de *P. brasiliensis* e avaliar sua atividade, visando sua utilização na busca de antifúngicos.

2. METODOLOGIA

2.1 Condições de crescimento

Foram realizadas duas formas de crescimento do isolado Pb01 de *P. brasiliensis*. Para avaliar a presença de 1,3- β -glucanase no meio de cultivo, a forma miceliana e leveduriforme foram cultivadas, a uma temperatura de 22°C e 37°C, respectivamente, em meio Sabouraud líquido contendo glicose nas concentrações de 0; 0,5; 1 e 2%, sob agitação de 120 – 150 r.p.m. Os cultivos foram realizados durante cinco dias. Para a análise da parede celular e da porção intracelular, o crescimento foi similar ao anterior, entretanto a concentração de glicose utilizada foi de 4%.

2.2 Extração de 1,3- β -glucanase extracelular e de 1,3- β -glucanase da parede celular e fração intracelular

Para extração de 1,3- β -glucanase extracelular foi retirada uma alíquota de 5mL do meio de cultivo e centrifugada a 10.000 r.p.m. por 10 min à 4°C. O precipitado e o sobrenadante foram armazenados à -20°C. Para extração da parede celular e da fração intracelular todo o meio de cultura foi filtrado a vácuo e os materiais celulares de micélio e levedura foram macerados. A massa celular obtida foi ressuspensa em tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,0, e ainda centrifugado por 15 min a 10.000 r.p.m. O sobrenadante (porção intracelular) e o precipitado foram armazenados à -20°C.

2.3 Dosagem de açúcar redutor, diálise e ensaio de atividade de 1,3- β -glucanase

A quantidade de açúcar redutor das amostras do meio de cultura, da parede celular e da porção intracelular foi dosada no espectrofotômetro. As amostras com alta concentração de açúcar redutor sofreram diálise com três trocas, utilizando água e tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,0. A atividade foi determinada medindo-se a quantidade de açúcar redutor liberado após incubação das amostras com laminarina 0,5% por 12 horas. A atividade da enzima foi estimada após a quantificação espectrofotométrica, a 550nm, do açúcar redutor liberado.

2.4 Eletroforese desnaturante, determinação da atividade enzimática em gel de poli(acrilamida) e teste de temperatura

Para análise do perfil de proteínas da extração foi utilizado o sistema de eletroforese em gel de poli(acrilamida) a 12%, em condições desnaturantes. O gel foi

corado em solução corante azul de coomassie. Para determinação da atividade a eletroforese ocorreu em condições não desnaturantes. O gel foi corado pela solução reveladora de TTC (0,3g de 2,3,5-trifenil tetrazólio cloreto em 200 mL de NaOH 1,0 M) em banho fervente. Testes de ensaio enzimático com temperaturas de 35, 40 e 45°C foram realizados.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise das amostras após o crescimento e ensaio enzimático

A alta concentração de açúcar nas amostras dificulta a leitura da atividade de 1,3- β -glucanase no espectrofotômetro. Portanto, após o crescimento, todo o material sofreu o processo de diálise. A atividade da enzima foi avaliada pela quantidade de açúcar redutor produzido. Nas amostras do meio de cultura, os resultados obtidos foram zero. Portanto, para poder detectar a enzima no meio extracelular, as amostras foram liofilizadas e concentradas cinco vezes. Um novo ensaio foi realizado e apenas as amostras de micélio 72, 96 e 120 horas apresentaram absorvância significativa (0,20; 0,33; 0,55; respectivamente). Evidenciando que a enzima em questão, possivelmente não é secretada.

Diante da ausência de atividade no meio de cultivo, análises da atividade na parede celular e na porção intracelular de micélio e levedura foram feitas. A partir dos valores de absorvância encontrados foram calculados os valores da atividade enzimática em unidade de atividade enzimática (U), definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1nmol de açúcar redutor por minuto. A tabela 02 mostra a atividade da 1,3- β -glucanase de seis extrações com diferentes gramas de células.

Tabela 02 – Atividade em unidade de atividade enzimática em nanomol por minuto das amostras da parede celular e porção intracelular de *P. brasiliensis*.

Amostras	Levedura (1g)	Micélio (1g)	Levedura (2g)	Micélio (2g)	Levedura (2g- novo)	Micélio (3g)
Parede celular	3,809	9,727	17,015	26,230	9,477	34,443
Porção Intracelular	2,016	4,811	4,560	4,909	7,800	15,549

3.2 Eletroforese e testes de temperatura

Para verificarmos quantas 1,3- β -glucanases existiam no material extraído, e para delinear o processo de purificação, foi realizado um gel de atividade. Anterior a realização deste gel, uma primeira eletroforese em condição desnaturante foi realizada para avaliar a conservação e qualidade das amostras (figura 01). Observou-se então que o material estava adequado para os procedimentos posteriores.

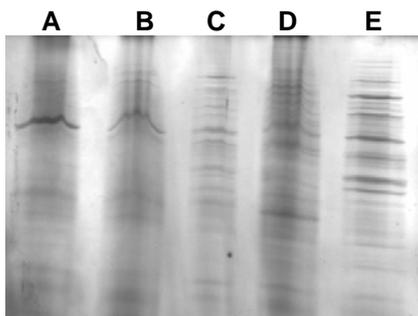


Figura 01 – Análise da extração de proteínas em gel de poli-acrilamida. A e B - parede celular de micélio. C - porção intracelular de micélio. D - parede celular de levedura. E - porção intracelular de levedura.

Posteriormente, ensaios enzimáticos com diferentes temperaturas - 35, 40 e 45°C - foram realizados com a finalidade de se encontrar uma

atividade maior que a já encontrada e melhorar a determinação da atividade enzimática em gel de poliacrilamida. Foi evidenciada maior atividade da 1,3- β -glucanase a 35°C na amostra de parede celular de levedura e para as demais amostras a maior atividade foi encontrada a 40°C. Após testes de temperatura, dois novos testes de atividade em gel de poliacrilamida, a 40°C, foram realizados. Entretanto o padrão de bandas visualizadas no gel era de difícil visualização e distinção. O gel foi aplicado em duplicata, sendo uma porção corada com azul coomassie (figura 02) e a outra corada com TTC. Este padrão de bandas anormal pode ser atribuído a não desnaturação das proteínas ou ainda atribuído a grande concentração de carboidratos na amostra.

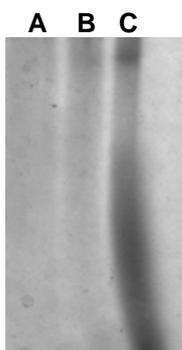


Figura 02 – Análise da extração de proteínas em gel de poliacrilamida a partir de eletroforese não-desnaturante. A - parede celular de micélio. B - parede celular de levedura. C - intracelular de micélio.

4. CONCLUSÃO

No experimento realizado podemos concluir que a atividade de 1,3- β -glucanase foi maior nos extratos de parede celular. Podemos concluir ainda que tal enzima possivelmente não é secretada e que encontra-se presente na porção intracelular. Quanto às diferentes formas do fungo, conclui-se que a 1,3- β -glucanase apresenta maior atividade na forma miceliana, principalmente no extrato de parede celular. Já conseguimos avaliar a atividade de 1,3- β -glucanase do isolado *Pb01* de *P. brasiliensis*. Entretanto não conseguimos identificar quantas 1,3- β -glucanases com diferentes pesos moleculares estão presentes nesse isolado. Infelizmente as eletroforeses não-desnaturantes, apresentavam géis com bandas de difícil distinção.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FRANCO, M.; MONTENEGRO, M.R.; MENDES, R.P.; MARQUEZ, S.A.; DILLON, N.L.; MOTA, N.G.S. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 20, p.129-132, 1987.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C. Paracoccidioidomicose. In: *Micologia Médica*, 8^a ed., São Paulo : Sarvier, 1991. p.248-292.

FONTE DE FINANCIAMENTO – CNPq

¹Bolsista de iniciação científica. Instituto de Ciências Biológicas II – LBM – Laboratório de Biologia Molecular, lorenag@yahoo.com.br

²Voluntária de iniciação científica. Instituto de Ciências Biológicas II – LBM – Laboratório de Biologia Molecular, kristie@yahoo.com.br

³Colaboradora. Instituto de Ciências Biológicas II – LBM – Laboratório de Biologia Molecular, lidiasantas@yahoo.com.br

⁴Orientador/ Instituto de Ciências Biológicas II/ UFG, mani@icb.ufg.br