

c(D-Tyr-L-Leu) na inibição de multiplicação de *Colletotrichum gloeosporioides*

c(D-Tyr-L-Leu) in the multiplication inhibition of *Colletotrichum gloeosporioides*

Cláudia Moreira Santa Catharina

Cmsc1996@gmail.com

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil.

Alessandra Machado Lunkes

amachado@utfpr.edu.br

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil.

RESUMO

A fruticultura tem papel de destaque no agronegócio brasileiro. Uma dificuldade encontrada no setor, são as perdas no pós colheita. Dados trazem o mamão como a terceira fruta mais produzida no Brasil. O fruto apresenta deteriorações no período de pós colheita principalmente por ser acometido por antracnose. A antracnose pode ser causada por vários microrganismos, destacando-se o *C. gloeosporioides*. Por essa questão estuda-se os peptídeos antimicrobianos (AMPs) com fins de atuar reduzindo essas perdas. Os AMPs proporcionam baixa resistência, podem ser isolados de fontes naturais ou sintetizados. O c(D-Tyr-L-Leu) foi isolado de *Bacillus sp.* Foram utilizados conhecimentos químicos e biológicos, realizando reações de síntese e purificação, seguindo com caracterização química e então desenvolvimento de ensaios biológicos. O principal intuito é testar o potencial fungicida do c(D-Tyr-L-Leu). Foi cultivado o microrganismo em dois meios de cultivo diferentes: MEA – extrato de malte e BDA – batata, dextrose, malte. Pois utilizava-se MEA e a literatura traz relatos de uso de BDA. Sendo inoculado 100 µL de solução contendo o microrganismo, pela técnica *spread plate*. Então foi acrescentado um disco estéril nas placas de Petri e nesses foi pipetado 10 µL do peptídeo diluído aplicando o método de disco-fusão. Foi aferido a eficiência do ensaio em meio sólido por medições do halo de inibição. Testou-se dez diferentes concentrações do peptídeo. O esperado é a formação de halos menores onde testou-se concentrações menores. Do mesmo modo, maiores concentrações do peptídeo deverá originar halos maiores. O dipeptídeo c(D-Tyr-L-Leu) não formou halo de inibição da proliferação de *C. gloeosporioides*. No momento em que for confirmada a ação antifúngica do c(D-Tyr-L-Leu) será avaliado em ensaios antifúngicos in vivo.

PALAVRAS-CHAVE: Peptídeo. Microrganismo. Síntese química

Recebido: 31 ago. 2018.

Aprovado: 04 out. 2018.

Direito autoral:

Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



ABSTRACT

Fruticulture plays a prominent role in Brazilian agribusiness. One difficulty encountered in the sector is post-harvest losses. Data bring papaya as the third most produced fruit in Brazil. The fruit presents deteriorations in the post-harvest period mainly due to being affected by anthracnose. Anthracnose can be caused by several microorganisms, especially *C. gloeosporioides*. This is why antimicrobial peptides (AMPs) are studied in order to reduce these losses. The AMPs provide low resistance, can be isolated from natural sources or synthesized. C (D-Tyr-L-Leu) was isolated from *Bacillus sp.* Chemical and biological knowledge was used, carrying out reactions of synthesis and purification, followed with chemical characterization and then development of biological assays. The main aim is to test the fungicidal potential of c (D-Tyr-L-Leu). The microorganism was cultured in two different culture media: MEA - malt extract and BDA - potato, dextrose, malt. Because MEA was used and the literature brings reports of BDA use. 100 µL of solution containing the microorganism was inoculated by the spread plate technique. A sterile disk was then added to the Petri dishes and 10 µL of the diluted peptide was pipetted using the disc-fusion method. The efficiency of the assay on solid medium was measured by measurements of the inhibition halo. Ten different concentrations of the



peptide were tested. Smaller halos are expected to form where smaller concentrations were tested. Likewise, higher concentrations of the peptide should give rise to larger halos. The dipeptide c (D-Tyr-L-Leu) did not form a halo of inhibition of *C. gloeosporioides* proliferation. At the time the antifungal action of c (D-Tyr-L-Leu) is confirmed, it will be evaluated in in vivo antifungal trials.

KEYWORDS: Peptide. Microorganism. Chemical synthesis.

INTRODUÇÃO

A fruticultura tem significativa representatividade no agronegócio brasileiro. Sabe-se que as perdas na pós-colheita chegam em torno de 30% (SEBRAE, 2015). O mamão é a terceira fruta mais produzida nacionalmente e é acometida pela doença antracnose causada por *Colletotrichum gloeosporioides*, que se manifesta na forma de um mofo de coloração marrom. A antracnose também pode ser decorrente de ação de outros microrganismos, a exemplo, *Fusarium solani*, *Alternaria alternata* e *Penicillium expansum* (FURTUNATO et al., 2015).

A fim de combater a deterioração microbiológica dos frutos, estuda-se a aplicação biológica de peptídeos antimicrobianos (AMPs). Sendo interessante a obtenção de AMPs por meio de síntese química (MACHADO et al., 2004). Os peptídeos antimicrobianos estão sendo estudados como alternativa aos antifúngicos comerciais, pois eles desencadeiam baixa resistência e serem isolados de fontes naturais (BAUTISTABAÑOS et al., 2013).

O dipeptídeo cíclico com potencial antifúngico c(D-Tyr-L-Leu) foi primeiramente isolado do microrganismo *Bacillus* sp (KUMAR et al., 2013). O c(D-Tyr-L-Leu) apresentou atividade antifúngica mais alta contra *Colletotrichum gloeosporioides* (Concentração Inibitória Mínima – CIM = 8 µg/mL) do que o fungicida comercial oligochitosana (CIM = 125 µg/mL) (KUMAR et al., 2013). Este estudo antifúngico mostrou como o c(D-Tyr-L-Leu) é mais potente contra fungos de importância agrícola do que os antifúngicos comercialmente disponíveis (bavistina e oligochitosana), apresentando potencial como um agente prospectivo para uso na agroindústria como fungicida.

Neste trabalho, objetivou-se avaliar o potencial antifúngico do dipeptídeo c(D-Tyr-L-Leu) na inibição da proliferação de *C. gloeosporioides* causador da antracnose em mamão para confrontar os resultados do peptídeo sintético com os já publicados na literatura por Kumar et al (2013) para o peptídeo nativo.

METODOLOGIA

A cepa de *Colletotrichum gloeosporioides* utilizada neste trabalho foi a da Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria – CBMAI, identificada pelo código CBMAI 864. Dois meios de cultivo foram utilizados o BDA – Batata Dextrose Ágar e MEA – Extrato de Malte e Ágar para o ensaio microbiológico do microrganismo *Colletotrichum gloeosporioides*. Os meios de cultivo foram preparados conforme recomendações presentes nos rótulos dos fabricantes.

Após a solidificação do meio de cultivo nas placas foi feita a adição de 100 µL de MO's (solução contendo 283 esporos a cada 10mm²) do *C. gloeosporioides* pela técnica *spread plate*, e após uma hora de secagem foram dispostos discos estéreis de papel filtro sobre as placas de Petri.

Foi adicionado 10 µL de solução do dipeptídeo cíclico c(D-Tyr-L-Leu). O peptídeo c(D-Tyr-L-Leu) foi testado usando dez concentrações diferentes de 3,9 a 2000 µg mL⁻¹. Essas diferentes concentrações foram obtidas por meio de diluição usando metanol (Vetec®, lote DCBB4595, Rio de Janeiro, Brasil) estéril como diluente utilizado (KUMAR, 2013). Foram realizados dois controles (negativo e positivo). A eficácia do produto, ou seja, a ação antifúngica foi expressa através da medida do tamanho do halo de inibição usando um paquímetro (Vernier®

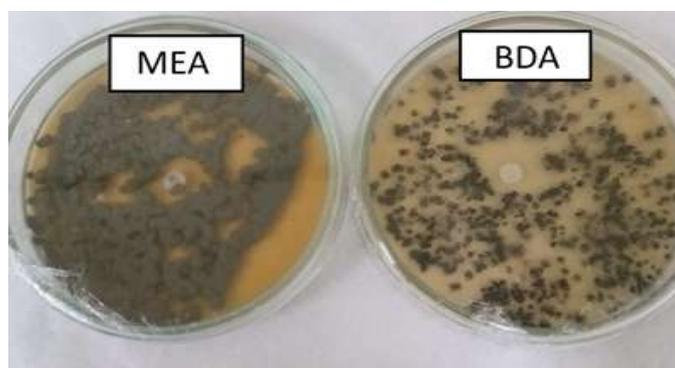
modelo RC). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de três medidas por halo.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foi aplicado conhecimentos da síntese química de peptídeos na síntese do c(D-Tyr-L-Leu), para dar-se início aos ensaios biológicos, trabalhando com a cepa CBMAI 864 do microrganismo *C. gloeosporioides*. Para execução dos ensaios microbiológicos, o preparo dos meios de cultivo foi efetuado de acordo com as recomendações dos fabricantes de cada reagente.

Os resultados do ensaio evidenciam que o fungo filamentoso se prolifera mais intensamente em MEA do que em BDA conforme figura 1.

Figura 1 – Comparação da proliferação do *C. gloeosporioides* nos dois meios de cultivo trabalhados



Fonte: Autoria própria.

Após as placas de Petri estarem com o meio vertido e solidificado, foi iniciada a preparação da solução de inóculo (WIEGAND; HILPERT; HANCOOK, 2008). Foi adicionada em cada placa de Petri 100 μ L de MO's – solução padronizada analiticamente, para garantir que todas as placas estivessem o mesmo número de células fúngicas iniciais.

Após essa adição, foi aplicada a técnica do esfregaço objetivando que o volume de MO's fosse incorporado ao meio de cultivo. Então, os discos estéreis foram adicionados e, sobre eles, foi aplicado um volume de 10 μ L de c(D-Tyr-L-Leu), em cada placa, em uma diluição diferente. Foi utilizado esse volume do composto a ser testado, pois, empiricamente, sabe-se que é o volume máximo que o disco estéril absorveria.

A definição das concentrações de inóculo bem como de diluições seguiu protocolo de Kumar et al (2013). Espera-se que as menores concentrações gerem halos de inibição menores, e as concentrações mais elevadas proporcionassem halos com circunferências de maior diâmetro (COSTA et al., 2015). Contudo, este comportamento não foi observado no ensaio usando o peptídeo c(D-Tyr-L-Leu). Em geral quando houve formação de halos, estes apresentaram um diâmetro médio de $4,25 \pm 1$ mm. Assim, não é possível dizer que o peptídeo tem ação antifúngica contra *C. gloeosporioides*.



CONCLUSÃO

O dipeptídeo c(D-Tyr-L-Leu) não formou halo de inibição da proliferação de *C. gloeosporioides*. No momento em que for confirmada a ação antifúngica do c(D-Tyr-L-Leu) será avaliado em ensaios antifúngicos in vivo.

REFERÊNCIAS

ADRIA, A. et al. Estudo da inibição do crescimento de *Fusarium solani* usando carvacrol e peptídeos antimicrobianos. **XXII Seminário De Iniciação Científica e Tecnológica**, 7, p.1-4, 2017.

BAUTISTA-BAÑOS, S. et al. A review of the management alternatives for controlling fungi on papaya fruit during the postharvest supply chain. **Crop Protection**, v.49, p.8-20, 2013.

COSTA, J. P. et al. Antimicrobial peptides: an alternative for innovative medicines? **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.99, n.5, p.2023-2040, 2015.

FURTUNATO, T. C. S. et al. Característica físico-química e incidência de patógenos fúngicos em mamão 'Formosa' comercializado no sertão paraibano. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v.11, n.2, p. 09-14, 2015.

KUMAR, Nishanth; et al. Isolation and antifungal properties of cyclo(D-Tyr-L-Leu) diketopiperazine isolated from *Baillus* sp. Associated with rhabditid entomopathogenic nematode. **Natural Product Research**, v. 27, n. 23, p. 2168 – 2172, 2013.

MACHADO, Alessandra et al. Sínteses químicas e enzimática de peptídeos: princípios básicos e aplicações. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 781-789, 2004.

SISTEMA DE APOIO A MICRO E PEQUENA EMPRESA – SEBRAE. Boletim de Inteligência: Agronegócio Fruticultura. **SEBRAE**, 2015.

WIEGAND, I.; HILPERT K. & HANCOCK R. E. W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. **Nature Publishing**. 2008, V. 3, n. 2, p. 163-175.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos colegas Arnaldo Marques Junior, Felipe Bretschneider, graduandos da UTFPR – FB. À Francielly Standler, mestranda pelo Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos da UTFPR – Londrina. Aos professores Maria Terêsa Machini da Universidade de São Paulo – USP, Eder Santos e Alessandra Machado Lunkes, esses da UTFPR – FB.