

## Estudos Integrados de Biologia Estrutural e Química Medicinal para o Planejamento de Novos Defensivos Agrícolas para a Cultura da Cana-de-Açúcar

Gustavo M. A. de Lima (PG), Dayane E. B. Reis (IC), Rafael V. C. Guido\* (PQ)  
\*rvcguido@ifsc.usp.br

<sup>1</sup>Laboratório de Química Medicinal e Computacional – LQMC, Instituto de Física de São Carlos, IFSC – USP

Palavras Chave: albicidina, escaldadura das folhas, cristalização, purificação de proteínas, agroquímicos

### Introdução

Os benefícios ambientais provenientes da produção e do uso dos derivados de cana-de-açúcar fomentam o desenvolvimento de métodos e produtos que aumentem, de modo sustentável, a geração de bioenergia.<sup>1</sup> Dentre os diversos fatores limitantes para o aumento da produção de cana-de-açúcar, destaca-se a ocorrência e a severidade de fitopatologias como a escaldadura das folhas. Essa doença é causada pela bactéria *Xanthomonas albilineans*, sendo encontrada distribuída em praticamente todas as regiões do mundo onde a planta é cultivada. A escaldadura das folhas causa diminuição da produtividade, necessidade de reforma precoce dos canaviais e queda de qualidade do caldo extraído que determinam prejuízos econômicos significativos para os agricultores. Atualmente, não há alternativas disponíveis para o controle químico ou biológico dessa fitopatologia.

O processo de planejamento de substâncias bioativas baseia-se, principalmente, na investigação de vias bioquímicas essenciais do patógeno em estudo. Estudos de validação indicaram que a inibição da via de produção das fitotoxinas albicidinas torna a bactéria incapaz de causar a patogenia,<sup>2</sup> além disso, foram identificadas duas enzimas como essenciais desta via, i. fosfopanteteinil transferase (XaPPT) e ii. benzoato CoA ligase (XaBCL). Neste trabalho, estudos integrados em biologia estrutural e química medicinal foram empregados para a clonagem, expressão, purificação e cristalização dos alvos moleculares selecionados. A informação molecular detalhada dessas enzimas é fundamental para o desenvolvimento de novos agroquímicos através de métodos de planejamento baseado em estrutura.

### Resultados e Discussão

Cultura tipo de *X. albilineans* foi adquirida da coleção de fitopatógenos do Instituto Biológico (IBSBF 1374) e validadas por PCR. Os genes *xabE* (EMBL-Bank acesso n. ABL14104) e *xabA* (EMBL-Bank acesso n. AF191324) codificantes para as proteínas XaBCL e XaPPT) foram clonados em vetores de expressão pET-SUMO e pGEX, visando-se alta solubilidade e eficácia na purificação por afinidade (His-Tag e GST-Tag, respectivamente). As enzimas foram expressas em meio de autoindução a 22 °C (XaPPT) e 28 °C (XaBCL) a 200 rpm por 18h. Ambas as enzimas foram purificadas em dois passos cromatográficos: i. afinidade por resina de níquel e ii. exclusão molecular. Os dados cromatográficos para a enzima XaPPT, clonada no vetor pET-SUMO, indicaram um elevado grau de pureza (Figura 1). Os dados cromatográficos da etapa de exclusão molecular para a XaBCL indicaram um perfil de coexistência de monômeros e dímeros.

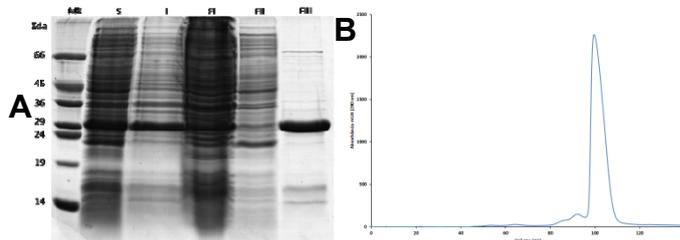


Figura 1. (A) Gel SDS-PAGE após aplicação na coluna de afinidade da proteína XaPPT (MK - Marcador de Peso Molecular; S - Fração Solúvel; I - Fração Insolúvel; FI, FII e FIII - Eluições com imidazol) (B) Cromatograma da Gel Filtração da proteína XaPPT (coluna Superdex 200 10/300 GL).

Visando-se a obtenção de uma população homogênea de proteína em solução, estudos de distribuição e homogeneidade encontram-se em andamento. Nesse estudo é verificado o estado de oligomerização da proteína através da adição de NaCl, caso a interação entre os dímeros seja de natureza iônica, e DTT ou  $\beta$ -mercaptoetanol, caso a interação entre os dímeros seja por ligações de dissulfeto. A obtenção de uma distribuição homogênea em solução é uma característica necessária para os estudos de cristalografia e difração de Raios-X.

Experimentos de cristalização com a fração pura da enzima XaPPT indicaram microcristais promissores na condição de cristalização 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 5,5; 20% (m/v) PEG 8.000; 10 mM acetato de sódio; XaPPT 5 mg/mL, 4 °C.

### Conclusões

A integração de estratégias modernas de biologia estrutural e química medicinal é extremamente útil para a descoberta e desenvolvimento de novos candidatos a agroquímicos. O estabelecimento de um protocolo robusto e reprodutivos de clonagem, expressão, purificação e cristalização é fundamental para estudos estruturais por difração de raios-X. Os resultados obtidos neste trabalho permitirão que novos estudos em biologia estrutural sejam realizados para a determinação das bases estruturais responsáveis pela estrutura e função dos alvos moleculares, bem como para guiar o planejamento de novos agentes antibacterianos como defensivos agrícolas para a cultura de cana-de-açúcar.

### Agradecimentos

CAPES, FAPESP

<sup>1</sup> *Bioetanol combustível: uma oportunidade para o Brasil*; Centro de Gestão e Estudos Estratégicos - CGEE: Brasília, 2009.

<sup>2</sup> Birch, R. G. *Xanthomonas albilineans* and the antipathogenesis approach to disease control. *Mol. Plant Pathology*, 2001, 2, 1-11.