



Atividade Antifúngica de Cistatinas Isoladas de Sementes de *Clitoria fairchildiana* R. Howard

Dayanni de Souza Padua, André de Oliveira carvalho, Olga Lima Tavares Machado, Valdirene Moreira Gomes, Antônia Elenir Amâncio Oliveira, Kátia Valevski Sales Fernandes.

Introdução: As fitocistatinas são inibidores competitivos e reversíveis de proteases cisteínicas das classes da papaína e catepsinas B, L, H, com capacidade para interferir com o crescimento de fungos fitopatogênicos. **Objetivos:** Pretendemos isolar cistatinas de sementes de *C. fairchildiana* por métodos cromatográficos, produzir cistatinas recombinantes por clonagem molecular e superexpressá-las em bactérias, para análise de seus potenciais antifúngicos. **Metodologias:** Proteínas de sementes foram extraídas, precipitadas com sulfato de amônio, cromatografadas em HPLC-C18, quantificadas e visualizadas por eletroforese. DNA de folhas foi extraído, quantificado, visualizado em gel de agarose e submetido à digestão com enzimas de restrição (Bam HI-HF, Bgl II, HPY F3I, Bpi I, Eco RI, Nrl, Stu I, Bse NI). **Resultados e discussão:** As frações precipitadas com sulfato de amônio (F0-60%, F60-90% e Sob II) foram submetidas a ensaios de atividade inibitória de papaína. Sob II apresentou maior atividade inibitória específica (3,03 UI / μ g), enquanto F0-60 = 1,50 UI / μ g de proteína e F60-90 = 1,40 UI / μ g. Foram observadas bandas de proteína entre 12 e 14 kDa no Sob II, que foi submetido a cromatografia de fase reversa HPLC-C18. Foram observados três picos principais (P1, P2, P3); P2 apresentou uma banda de proteína em torno de 12 kDa cuja sequência parcial de aminoácidos foi analisada por Edman (1950). O alinhamento da sequência mostrou similaridades com cistatinas de plantas: *Brassica napus* (CDY28922.1), *Coffea canephora* (CDO 16884.1), *Arabidopsis thaliana* (NP 200502-1) e *Brachypodium distachyon* (KQK 22990.1). Paralelamente, a enzima Bse NI produziu a melhor clivagem de DNA. Os fragmentos circularizados de DNA serão tratados com T4 DNA ligase e submetidos a PCR. Foi realizada uma pesquisa de banco de dados (Uniprot) para seqüências de fitocistatinas; os domínios conservados foram identificados e foram desenhados dois iniciadores reversos. **Conclusão:** O pico de interesse está sendo acumulado para teste contra o crescimento de fungos fitopatogênicos. A clonagem molecular da cistatina da semente está em andamento e após a obtenção de cistatina recombinante, serão analisadas suas atividades antifúngicas contra leveduras e fungos patogênicos de plantas e animais.

Palavras-chave: Fitocistatina, *Clitoria fairchildiana*, Antifúngica.
Instituição de fomento: CAPES, FAPERJ, UENF