

PATRÍCIA BARBOSA PELEGRINI

PEPTÍDEOS VEGETAIS: NOVAS FERRAMENTAS NO  
CONTROLE DE PATÓGENOS HUMANOS E DE  
PLANTAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação "Strictu Sensu" em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília, como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciências Genômicas e Biotecnologia.

Orientador: Octávio Luiz Franco

Brasília, 2007

P381p Pelegrini, Patrícia Barbosa.

Peptídeos vegetais: novas ferramentas no controle de patógenos humanos e de plantas / Patrícia Barbosa Pelegrini. – 2007.

xxv, 340f.: il. ; 30 cm

Dissertação (doutorado) – Universidade Católica de Brasília, 2007.

Orientação: Octávio Luiz Franco.

1. Peptídeos. 2. Bioquímica. 3. Moléculas - Modelos. I. Franco, Octávio Luiz, orient. II. Título

CDU 577.1

À minha família pelo apoio e incentivo em todas  
as horas.

III

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Octávio Luiz Franco por sempre acreditar em meu potencial como aluna e pesquisadora.

À pesquisadora Dra. Eliane Ferreira Noronha pelo apoio e incentivo ao meu trabalho, bem como aos ensinamentos na área de Bioquímica.

Ao pesquisador Dr. Tatsuya Nagata pelo auxílio e dedicação na área de Biologia Molecular.

À pesquisadora Dra. Betânia Quirino pelos ensinamentos na área acadêmica, auxílio e paciência na correção de artigos científicos.

À pesquisadora Dra. Marilyn Anderson, por me receber em seu laboratório, proporcionando-me amplo aprendizado na área de Biologia Molecular.

Ao pesquisador Dr. Fung Lay pelos ensinamentos em defensinas de planta, ajuda em experimentos e auxílios nas dúvidas sobre Biologia Molecular.

Ao pesquisador Dr. Carlos Bloch pelo auxílio com experimentos de cromatografia de fase-reversa e espectrometria de massa.

À pesquisadora Dra. Ilka Vasconcelos pelo seqüenciamento de proteínas por Edman.

Ao pesquisador Dr. Luciano Paulino Silva, pelo auxílio com experimentos de espectrometria de massa e microscopia de força atômica.

A Sueli Soares Felipe e André do Amaral Correa pelo auxílio na realização dos bioensaios contra fungos leveduriformes.

À minha amiga Luciana Ramalho de Farias pela companhia nas horas boas e difíceis, pela ajuda nos experimentos laboratoriais, pelas discussões construtivas e apoio nos momentos de dúvidas.

Ao amigo André Melro Murad pelos ensinamentos em modelagem molecular e ajuda em escrita de artigos científicos.

Aos amigos Fábio Teles, Michele Muniz, Luciana Costa, Rachel Cristiane dos Santos, Mariana Cherobim, Paula Durante e Isabel Moreira por toda ajuda durante a minha pesquisa.

Aos amigos Jackeline, Andrea, Caroline, Débora, Erivaldo, Krishna, Diogo, Luiz Antonio, Luiz Eduardo, Marcelo, Renato, Simone, Thaís, Thaina, Beth, Míriam, Bernardo, Juliah, Priscila, Luciana Bernardes e Anderson por compartilhar as

bancadas, os momentos bons e ruins, nem que tenha sido por pouco tempo.

As colegas de trabalho Rosemary, Barbara, Amanda, Nicole, Jackie e Kate, por terem me acolhido no laboratório e me auxiliado sempre nos momentos em que precisei.

Ao primo e amigo Marcelo Barbosa da Costa, ouvido de todas as horas, por sempre me incentivar a não desistir de meus objetivos e lutar pelos meus ideais e sonhos.

Ao meu irmão Guilherme Barbosa Pelegrini pelo exemplo de disciplina e esforço na conquista de seus ideais.

À cunhada Karina de Freitas Gomes pelas ótimas conversas e incentivo em minha pesquisa.

Ao Eduardo Machado do Vale pela compreensão e apoio em diversos momentos durante minha pesquisa.

Ao meu pai Marcos Pelegrini pela forma com que sempre me apoiou durante minha pesquisa, incentivando-me a buscar novos horizontes, alcançar os mais altos degraus e nunca desistir diante de um obstáculo.

À minha mãe Maria Aparecida Barbosa Pelegrini por estar sempre ao meu lado em todos os momentos da vida, por ser a pessoa que me fez ser o que sou, que me ajudou de todas as formas a chegar onde estou hoje profissionalmente, por ser a melhor mãe que qualquer pessoa poderia querer ter no mundo.

Finalmente, dedico esta tese a Deus, pois sem ele não teria conseguido conquistar todos os meus objetivos, como também me proporcionou o apoio espiritual que tanto me foi importante durante os quatro anos de minha pesquisa.



## RESUMO

Diversos peptídeos de plantas têm sido descritos como uma importante ferramenta no combate a agentes patogênicos humanos e de plantas. A ineficácia de agrotóxicos nas lavouras e de antibióticos nos hospitais tem levado pesquisadores a estudarem moléculas orgânicas produzidas naturalmente no intuito de se reduzir a resistência de fungos e bactérias patogênicas aos produtos sintéticos comercializados. Neste trabalho, dois peptídeos foram isolados de sementes de maracujá (*Passiflora. Edulis*) e goiaba (*Psidium guajava*) e caracterizados bioquimicamente. Um peptídeo isolado de sementes de maracujá apresentou atividade inibitória contra fungos filamentosos, causadores de infecções pulmonares e fitopatogênicos. O peptídeo isolado de sementes de goiaba foi capaz de inibir o crescimento de bactérias gram-negativas causadoras de infecções hospitalares e do trato gastro-intestinal, tais como *Klebsiella* sp e *Proteus* sp. Ambos mostraram similaridades em suas seqüências primárias com grupos de proteínas do tipo 2S albuminas e proteínas ricas em glicina, respectivamente, que não são usualmente moléculas de defesa de plantas. Além disso, uma defensina de sementes de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*) teve seu mRNA clonado e expresso neste trabalho. O peptídeo apresentou identidade com defensinas de plantas e foi capaz de inibir a atividade de  $\alpha$ -amilase digestiva de bruquídeos de feijão. O peptídeo isolado de sementes de goiaba pode ser utilizado como nova fonte no controle de resistência bacteriana a medicamentos, bem como no tratamento de infecções hospitalares e do trato gastro-ins

## ABSTRACT

Several plant peptides could be used as important tools against human and plant pathogens. The inefficiency of agrochemicals on plant cultivars and the enhancement of antibiotic resistance by pathogenic bacteria have lead researchers to study organic compounds in order to reduce bacteria and fungi resistance towards the products commercialized. In this work, two peptides from fruit seeds (*P. edulis* and *P. guajava*) were isolated and biochemically characterized. One peptide isolated from passion fruit seeds showed inhibitory activity against filamentous fungi causing pulmonary infections and also against phytopathogens. Furthermore, guava seeds proteins were able to inhibit gram-negative bacteria growth, causing hospital and gastro-intestinal infections. Both proteins showed similarities to storage molecules that usually are not related to plant defence. Hence, we suggest that some peptides can present more than one *in vivo* function, being required for plant defence when in presence of some pathogen attack. Moreover, a peptide from cowpea (*V. unguiculata*) had its mRNA cloned and the sequence expressed in this work. This peptide showed similarities to plant defensins and was able to inhibit  $\alpha$ -amylases from insects. Therefore, the peptide isolated from guava seeds can be used as a novel source on control of bacteria resistance towards antibiotics, as well it can be used on treatment of hospital and gastro-intestinal infections. Furthermore, peptides from passion fruit and cowpea seeds, characterized in this report, could be used as novel biotechnological tools on the control of phytopathogens and insect-pests, decreasing crop losses in agriculture.

## SUMÁRIO

	Páginas
Lista de Figuras	XVI
Lista de Tabelas	XXIV
Abreviaturas e Definições	XXV
I. Introdução	1
1. Peptídeos antibacterianos: uma nova estratégia no combate a infecções causadas por microorganismos	1
1.1. Infecções hospitalares e bactérias resistentes: um problema a ser enfrentado	1
1.2. Enterobactérias causadoras de infecções hospitalares	6
1.2.1. <i>Klebsiella</i> sp	6
1.2.2. <i>Proteus</i> sp	9
1.3. Fungos antropo e fitopatogênicos: quem são os alvos escolhidos e como eles atuam	11
1.3.1. Fungos patogênicos ao homem	12
1.3.1.1. <i>Aspergillus</i> sp	13
1.3.2. Fungos fitopatogênicos	16
1.3.2.1. <i>Fusarium</i> sp	19
1.4. Peptídeos antimicrobianos: uma estratégia alternativa no controle de patógenos	21
2. Inibidores de enzimas digestivas: o uso da Biotecnologia na diminuição de perdas na lavoura	25

5  
9  
0  
0  
3  
3  
6  
8  
3  
3  
3  
3  
3  
4  
5  
5  
5  
5  
6  
6  
6  
7  
8  
9  
9  
0

1.9. Análises <i>in silico</i> e modelagem molecular	51
2. Defensinas de plantas – inibidores de amilase	52
2.1. Extração de RNA e clonagem	52
2.2. Expressão em células bacterianas	53
2.3. Purificação dos peptídeos expressos	54
2.4. Insetos	55
2.5. Ensaio enzimático contra $\alpha$ -amilases	56
2.6. Modelagem molecular	56
IV. Resultados e Discussão	58
1. Peptídeos antimicrobianos	58
1.1. <i>Pe</i> -AFP1 – uma nova albumina 2S de sementes de maracujá com atividade antifúngica	58
1.1.1. Purificação e análise de massa molecular	58
1.1.2. Seqüenciamento dos aminoácidos e alinhamento	62
1.1.3. Avaliação da atividade antifúngica	65
1.2. Proteína rica em glicina de sementes de goiaba ( <i>P. guajava</i> )	68
1.2.1. Purificação e análise de massa molecular	68
1.2.2. Seqüenciamento dos aminoácidos e alinhamento	73
1.2.3. Avaliação da atividade antibacteriana	77
1.2.4. Modelagem molecular	80
2. Inibidores enzimáticos	89
2.1. defensina de feijão-de-corda ( <i>Vigna unguiculata</i> ): um potencial bio-inseticida	89

2.1.1. Clonagem do gene de <i>VuD1</i>	89
2.1.2. Expressão heteróloga e purificação de <i>VuD1</i>	93
2.1.3. Ensaio enzimáticos	98
2.1.4. Ensaio enzimáticos adicionais	105
2.1.5. Análises <i>in silico</i> e modelagem molecular	107
V. Conclusões	119
VI. Perspectivas	121
VII. Referências Bibliográficas	124
VIII. Artigos	159
1. Peptídeos antimicrobianos	159
Resumo e Artigo 1: Isolamento de um peptídeo de sementes de maracujá ( <i>Passiflora edulis</i> ) com similaridades a proteínas do tipo albumina 2S	159
Resumo e Artigo 2: $\gamma$ -Tioninas de plantas: Novos tópicos para o mecanismo de ação de uma classe multifuncional de proteínas de defesa	160
Resumo do Artigo 3: Novas descobertas sobre defensinas e sua utilização na construção de plantas transgênicas	161
2. Inibidores enzimáticos	162
Resumo e Artigo 4: Propriedades estruturais e enzimáticas de $\alpha$ -amilase de <i>Zabrotes subfasciatus</i>	162
Resumo e Artigo 5: Isolamento de um novo inibidor de $\alpha$ -amilase de <i>Carica papaya</i> com atividade contra <i>Callosobruchus maculatus</i>	163
Resumo e Artigo 6: Identificação molecular de quatro inibidores	165

diferentes de  $\alpha$ -amilase de sementes de Baru (*Dipteryx alata*) com atividade contra enzimas de insetos.

IX. Trabalhos Anexos	166
1. Artigos submetidos	166
Artigo 1: Nova proteína rica em glicina com atividade antimicrobiana de sementes de goiaba ( <i>Psidium guajava</i> ): moléculas de defesa podem funcionar também como proteínas de defesa de plantas?	166
Artigo 2: Caracterização molecular de uma nova defensina inseticida de sementes de feijão-de-corda ( <i>Vigna unguiculata</i> ) com atividade inibitória de $\alpha$ -amilases	168
Artigo 3: Novo peptídeo antifúngico de sementes de <i>Crotalaria pallida</i>	169
Artigo 4: Ciclotídes de plantas: uma nova classe de compostos de defesas	170
2. Patente	171

## LISTA DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1. Lâmina de bactérias ilustrando microorganismos do gênero <i>Proteus</i> sp (bacilo gram-negativo) . BGN- bacilos gram-negativos; BGP- bacilos gram-positivos; CGP-cocos gram-positivos; CF- células leveduriformes (Fonte: <a href="http://www.saudetotal.com/microbiologia/index.htm">http://www.saudetotal.com/microbiologia/index.htm</a> ).	3
Figura 2. Representação numérica de resistência ao Ceftazedime, antibióticos do grupo das cefalosporinas, por bactérias da família Enterobacteriaceae, durante os anos de 1990 e 1991 (Figura modificada de Rice <i>et al.</i> , 1990).	7
Figura 3. Gráfico ilustrando uma comparação da resistência bacteriana da espécie <i>Klebsiella pneumoniae</i> contra antibióticos do grupo das cefalosporinas durante os anos de 1991 a 1999. Colunas em azul indicam comparação com pacientes em UTI. Colunas em vermelho indicam comparação feita com pacientes não-UTI. Eixo “x” indicam os anos em que cada comparação foi feita. Eixo “y” indica a porcentagem de resistência desenvolvida pela bactéria nos seguintes pacientes. (Figura modificada de Fridkin e Gaynes, 1999).	10
Figura 4. Ilustração de hifas de <i>A. fumigatus</i> retiradas de amostra pulmonar de paciente imunocomprometido com aspergilose. Grupamentos de hifas de <i>Aspergillus</i> (ilustrado em rosa), corados por método histoquímico. Abaixo: Grupamentos de hifas de <i>Aspergillus</i> , corados por método argêntico (metenamina prata de Gomori X 200). Fonte: França <i>et al.</i> , 1996.	14



- Figura 5. Efeitos do *F. oxysporum* no tomateiro, causando o aparecimento de folhas murchas e amareladas (Fonte:Embrapa Hortaliças, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliça, [http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Tomate/TomateIndustrial/doenca\\_fungo.htm](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Tomate/TomateIndustrial/doenca_fungo.htm)) 17
- Figura 6. Cultura de *Fusarium oxysporum*, ilustrando formação de esporos (A e B) e na forma filamentosa, com o desenvolvimento de hifas (C e D) (Fonte: Burdon *et al.*, 2007). 20
- Figura 7. *Acanthoscelides obtectus*. A) Ilustração do inseto-praga. B) Destruição de sementes de feijão pelo mesmo inseto. (Fonte: HYPP Zoology home page: <http://www.inra.fr/Internet/Produits/HYPPZ/RAVAGEUR/6acaobt.htm>). 26
- Figura 8: Estrutura tridimensional de BnIb de *Brassica napus*, uma proteína da família das albuminas 2S. Cores verde e azul ilustram elementos de fitas- $\beta$  e  $\alpha$ -hélices. (Fonte: Rico *et al.*, 1996). 35
- Figura 9. Estrutura tridimensional de defensinas de plantas, invertebrados (insetos e moluscos), e de vertebrados (mamíferos). As estruturas foram retiradas do banco de dados de proteínas (<http://www.resb.org/pdb>; Números de acesso para o PDB: A) MGD-1: 1FJN; B) defensina A: 1ICA; C) drosomicinai

proteínas retidas com adição de tampão Tris-HCl 0,15 M, pH 7,0 contendo NaCl 3,0 M e CaCl<sub>2</sub> a 0,05 M. B) Cromatografia de fase-reversa HPLC (Vydac C18-TP) da fração retida de Red-Sepharose. A linha diagonal representa o gradiente linear de acetonitrila. Gráfico no canto superior direito indica re-cromatografia das amostras presentes na fração protéica retida em 40% de acetonitrila.

Figura 11. Análise da purificação do peptídeo através de A) SDS-PAGE das proteínas retidas em coluna de Red-Sepharose (linha 1) e *Pe*-AFP1 purificada (linha 2 de sementes de maracujá. MM representa o marcador molecular (kDa). B) Espectrometria de massa MALDI-TOF dos peptídeos purificados a 40% de acetonitrila por HPLC em coluna Vyda C-18 TP. 61

Figura 12. Alinhamento da seqüência N-terminal de *Pe*-AFP1 com albuminas 2S. Resíduos de cisteína estão marcados por um asterisco 63

Figura 13.(A) Atividade antifúngica das proteínas da fração retida de Red-Sepharose (■) e da proteína pura (□). (■) corresponde a amostra bacteriana sem adição de proteínas. Barras verticais representam o desvio padrão. Cada ensaio foi feito em triplicata. (B) Ensaio *in vitro* de *Pe*-AFP1 contra os fungos filamentosos *T. harzianum*, *F. oxysporum* e *A. fumigatus*. Barras verticais representam o desvio padrão. Cada ensaio foi feito em triplicata. 67

Figura 14 A) Cromatografia em Red-Sepharose Cl-6B de amostras precipitadas com sulfato de amônio de sementes de goiaba (*P. guajava*). Seta preta indica início de eluição das proteínas retidas usando Tampão Tris-HCl pH 7,0 contendo NaCl 3,0M. B) Perfil da cromatografia de fase-reversa HPLC (Vydac C18-TP) da fração retida na Red-Sepharose gerada de sementes de goiaba (*P. guajava*). Linha diagonal indica gradiente linear de acetonitrila. Além disso, o gráfico no canto direito representa a re-cromatografia da fração protéica da mesma coluna. 70

Figura 15. A) SDS-PAGE de amostras da fração protéica retida em coluna de Red-Sepharose de sementes de maracujá (PR) (linha 2). Linha 1 corresponde ao marcador molecular. As setas indicam valores das massas moleculares das bandas 71

marcador molecular. As setas indicam valores das massas moleculares das bandas referentes à linha 1. B) SDS-PAGE de *Pg*-AMP purificada (linha 2). Linha 1 corresponde ao marcador molecular, sendo os valores das massas indicados por setas em kDa. MM indica marcador molecular (kDa).

Figura 16. Espectro de massa da fração 1 da Cromatografia de fase reversa - HPLC de proteínas de sementes de *P. guajava*. 72

Figura 17. Seqüenciamento do peptídeo de goiaba pelo Programa PepSeq. Linha em azul indica Seqüenciamento pela fase “b”. Linha vermelha indica sequenciamento pela fase “y”. 75

Figura 18 Alinhamento de *Pg*-AMP1 com outras proteínas ricas em glicina de plantas e Colicina E3 de *E. coli*. 76

Figura 19. Bioensaios bacteriano usando *Pg*-AMP1 purificada contra A) *Proteus* sp e B) *Klebsiella* sp. (■) indica o controle negativo, (▲) indica o controle positivo e (◆) indica o teste usando *Pg*-AMP1 78

Figura 20. Bioensaios bacteriano usando *Pg*-AMP1 purificada contra *Staphylococcus aureus* (■) indica o controle negativo, (▲) indica o controle positivo e (◆) indica o teste usando *Pg*-AMP1. 79

Figura 21. Comparação das estruturas tridimensionais de A) *Vu*D1 e B) Domínio A de Colicina E3. Ambas apresentam duas  $\alpha$ -hélices ligadas por um loop, indicando que esta estrutura pode ser importante para a atividade antibacteriana de peptídeos vegetais. 81

Figura 22. A) Estrutura dimérica de *Pg*-AMP1 mostrando os resíduos de arginina (rosa e amarelo). A-hélices e loops estão ilustrados em verde. B) 82

arginina (rosa e amarelo). A-hélices e loops estão ilustrados em verde. B) Diagrama mostrando somente os resíduos de arginina do peptídeo *Pg-AMP1* na forma dimérica. Os resíduos em rosa representam um dos monômeros, enquanto que os resíduos em amarelo correspondem ao segundo monômero.

Figura 23. A) Representação em forma de *Cartoon* de *Pg-AMP1*. Superposição de seis estruturas obtidas por dinâmica molecular em tempos diferentes de dinamização. Vista lateral e B) Superior. C) Vista lateral e D) Superior da camada eletrostática da molécula dimerizada. Regiões em azul representam presença de resíduos de aminoácidos carregados positivamente. Região em branco representa presença de resíduos de aminoácidos não-carregados. Região em vermelho representa presença de resíduos de aminoácidos carregados negativamente. 84

Figura 24 A) Extração de DNA de *VuD1*. MM corresponde ao marcador molecular de 500 pb. Linha 1 indica banda correspondente ao DNA de *VuD1*. Seta representa banda do marcador molecular referente à 200 pb. B) Gene de *VuD1* em vetor TOP 10. MM corresponde ao marcador molecular de 50pb. Os números 1, 2, 3 e 4 indicam as linhas onde se observa a banda correspondente ao vetor. 90

Figura 25 Alinhamento das seqüências de nucleotídeos e respectiva tradução para resíduos de aminoácidos dos clones de sementes de feijão-de-corda com o fragmento de DNA inicial descrito por Ishibashi *et al.*, (1990). Retângulos pretos indicam alteração na seqüência de nucleotídeos que levaram as alterações nos resíduos de aminoácidos. Cp10 original corresponde à seqüência de nucleotídeos descrita por Ishibashi (1990) e utilizada como modelo para os experimentos 91-92

descrita por Ishibashi *et al.* (1990) e utilizada como modelo para os experimentos de clonagem.

Figura 26. SDS-PAGE do complexo protéico VuD1-ubiquitina expresso em células BL21 (DE3) e purificado em resina de níquel (Ni-NTA). Seta preta indica banda correspondente à proteína recombinante. MM= marcador molecular; 1= parte solúvel da amostra após expressão e centrifugação; 2 = parte precipitada da amostra após expressão e centrifugação; 3= amostra não retida na resina de níquel; 4 = amostra obtida após lavagem da resina de níquel com tampão 2A; 5 a 9 = amostras da proteína recombinante após purificação em resina de níquel. Seta indica banda correspondente a proteína de interesse. MM representa o marcador molecular (kDa). 95

Figura 27. A) Cromatografia de fase-reversa em coluna Vydac C18-TP acoplada em sistema de HPLC, do complexo protéico VuD1-ubiquitina. Seta indica pico correspondente à eluição da proteína recombinante. Linha diagonal indica gradiente de acetonitrila B) Re-cromatografia da proteína recombinante (VuD1) em coluna de HPLC. Linha vertical indica gradiente de acetonitrila. 96

Figura 28. SDS-PAGE de VuD1 clivada e purificada. Linha 1 indica marcador molecular com massas em kDa. Seta indica o peptídeo purificado na linha 2. MM corresponde ao marcador molecular (kDa). 97

Figura 29. Bioensaios bacteriano usando VuD1 purificada contra A) *Proteus* sp e B) *Klebsiella* sp; (■) indica o controle negativo, (▲) indica o controle positivo e (◆) indica o teste usando Pg-AMP1. 99

Figura 30. Bioensaios bacteriano usando VuD1 purificada contra *Escherichia* ( ) indica o controle negativo, ( ) indica o controle positivo e ( ) 100

*coli*. (■) indica o controle negativo, (▲) indica o controle positivo e (◆) indica o teste usando *Pg*-AMP1

Figura 31. Teste de atividade de inibição de tripsina bovina por *Vu*D1. A primeira coluna representa a atividade da enzima sem a presença de *Vu*D1. A segunda coluna representa a atividade enzimática da tripsina bovina na presença de *Vu*D1. 101

Figura 32. Ensaio enzimático de *Vu*D1 a  $5,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  contra  $\alpha$ -amilases de diferentes fontes: CMA = enzima de *C. maculatus*; PPA = enzima de pâncreas de porco; Aasp = enzima de *A. fumigatus*; HA = enzima de saliva humana; AA= enzima de *A. obtectus*; ZSA= enzima de *Z. subfasciatus*; *Vu*D1 = peptídeo expresso de feijão-de-corda. 103

Figura 33. Gráfico ilustrando a curva de atividade de *Vu*D1 contra  $\alpha$ -amilase de *A. obtectus* em diferentes concentrações do inibidor (*Vu*D1). 104

Figura 34. Curva de atividade de *Vu*D1 contra  $\alpha$ -amilase de *Z. subfasciatus* em presença de diferentes concentrações de amido. 106

Figura 35. Alinhamento estrutural de *Vu*D1 com defensinas e tioninas de outras espécies vegetais. Psd1: defensina de *Pisum sativum*; PdF1: defensina antifúngica de *P. sativum*; VrD1: defensina de *V. radiata*; Cp-tionina1 e Cp-tionina2: tioninas de *V. unguiculata*. Resíduos de aminoácidos em caixas pretas indicam as cisteínas conservadas. Resíduos em caixas cinza indicam glicinas e argininas conservadas. Asteriscos indicam regiões conservadas de aminoácidos carregados positivamente. As estruturas secundárias estão representadas por setas, para fitas- $\beta$  e por cilindros, para  $\alpha$ -hélice. 109

Figura 36. Ramachandra plot da estrutura obtida por análises *in silico* de *VuD1*.

111

Pontos brancos representam os aminoácidos que formam a estrutura primária do peptídeo. Regiões circulares em amarelo e azul representam áreas consideradas aceitáveis para estabilidade dos aminoácidos quando na estrutura terciária. Os quatro quadrantes representam as regiões de  $\alpha$ -hélice e fitas- $\beta$ .

Figura 37. Modelo da estrutura tridimensional de *VuD1*, utilizando-s

## LISTA DE TABELAS

	Páginas
Tabela 1. Características dos principais grupos de antibacterianos: espectro de ação e indicações (Fonte: Trabulsi, 1998)	5
Tabela 2. Peptídeos antimicrobianos de plantas	23
Tabela 3. Defensinas e Tioninas do gênero <i>Vigna</i> .	108



## ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

1AYJ – Código no Protein Data Bank para proteína Rs-AFP1

1FD3 – Código no Protein Data Bank para proteína HBD-2

1HVZ – Código no Protein Data Bank para proteína RTD-1

1ICA - Código no Protein Data Bank para defensina de *Protophormia terraenovae*

1DFN – Código no Protein Data Bank para proteína HNP-3

1FJN – Código no Protein Data Bank para proteína de MGD-1

1MYN – Código no Protein Data Bank para drosomicina (*Drosophila melanogaster*)

Aasp-  $\alpha$ -Amilase de *Aspergillus fumigatus*

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (*Acquired Immunodeficiency Syndrome*)

AMPs – Proteínas antimicrobianas (*Antimicrobial Proteins*).

AOA –  $\alpha$ -Amilase digestiva de *A. obtectus*

Arg – Aminoácido arginina

Asp – Aminoácido aspartato

BIII – Inibidor enzimático de *Secale cereale*

BDA- Meio de cultura batata dextrose (*Potato Dextrose Agar*)

Ber e 1 – proteína alergênica de *Bertholletia esculsa*

BGN – Bacilos gram-negativos

BGP – Bacilos gram-positivos

Bnlb – Albumina 2S de *Brassica napus*

Ca<sup>2+</sup> - Íon cálcio

CaCl<sub>2</sub> – Cloreto de cálcio

CL – Células leveduriformes

CGP – Cocos gram-positivos

CMA -  $\alpha$ -Amilase digestiva de *C. maculatus*

Cis – Aminoácido cisteína

CW-1 – 2S albumina de *M. parviflora*

Da – Daltons (unidade de medida)

DNA – Ácido desoxirribonucléico (*Desoxirribonucleic acid*)

DNS – Ácido dinitrossalicílico (*Dinitrossalicylic acid*)

ESBL –  $\beta$ -Lactamases de espectro estendido.

ESI-Q-TOF - Electrospray-quadrupole-time of flight

Gln – Aminoácido glutamina

Glu – Aminoácido glutamato

$\gamma$ -H –  $\gamma$ -Hordotionina de *Hordeum vulgares*

HBD-2 –  $\beta$ -Defensina humana 2 (*human  $\beta$ -defensin 2*)

HCl – Ácido clorídrico

HNP-3 – Defensinas humanas em neutrófilos 3 (*Human neutrophil defensin 3*)

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography*)

HSA -  $\alpha$ -Amilase salivar humana (*Human salivary  $\alpha$ -Amylase*)

His – Aminoácido lisina

IgE – Imunoglobulina E

IPTG – isopropil-beta-D-tiogalactopiranosídeo

K<sup>1+</sup> - Íon potássio

kDa – Kilodaltons (unidade de medida)

LB – Meio de cultura Luria Bertani

LTP – Proteína transportadora de lipídeos (*Lipid Transfer Protein*)

Lys – Aminoácido lisina

MALDI-Imaging – *Matrix-assisted laser desorption/ionization Imaging*

MALDI-ToF - *Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight*

MGD-1 – Defensina de *Mytilus galloprovincialis* (*M. galloprovincialis defensin 1*)

MS/MS – *Mass spectrometry – mass spectrometry*

MYG – Meio Malte Yeast Glucose

Na<sup>1+</sup> - Íon sódio

NaCl – Cloreto de sódio

NaD1 – Defensina de *Nicotiana alata*

NaOH – Hidróxido de sódio

PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida (*Polyacrilamide Gel Electrophoresis*)

PCR – Reação em cadeia de polimerase (*Polymerase chain reaction*)

Phe – Aminoácido fenilalanina

PPA -  $\alpha$ -Amilase pancreática de porco (*Porcine Pancreatic  $\alpha$ -Amylase*)

Pe-AFP1 - Peptídeo antifúngico de sementes de maracujá (*Passiflora edulis*)

Pg-AMP1 - Peptídeo antimicrobiano de sementes de goiaba (*Psidium guajava*)

Pp-AMP1 – Peptídeo antimicrobiano de *Phyllostachys pubescens 1* (*P. pubescens antimicrobial peptide 1*)

Pp-AMP2 - Peptídeo antimicrobiano de *Phyllostachys pubescens 2* (*P. pubescens antimicrobial peptide 2*)

PIR – Proteínas inativadoras de Ribossomos

pH – Potencial de Hidrogênio

PR – Proteínas relaciona

VuD1 - Defensina de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*)

ZSA -  $\alpha$ -Amilase digestiva de *Z. subfasciatus*

# I. INTRODUÇÃO

## 1. PEPTÍDEOS ANTIBACTERIANOS: UMA NOVA ESTRATÉGIA NO COMBATE A INFECÇÕES CAUSADAS POR MICROORGANISMOS

### *1.1. Infecções hospitalares e bactérias resistentes: um problema a ser enfrentado.*

A comercialização dos primeiros antibióticos na saúde humana foi descrita em meados de 1940 e o surgimento da possibilidade de desenvolvimento de resistência a estes antibióticos por microorganismos foi rapidamente reconhecido com a emergência de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (Lipsitch *et al.*, 2000). Mais de cinquenta anos depois, a resistência a medicamentos tem se tornado um problema de preocupação mundial (Lipsitch *et al.*, 2000). De maneira idêntica, um dos principais problemas enfrentados pelo Sistema Único de Saúde brasileiro (SUS) vem sendo o uso indiscriminado de antibióticos pela população, o qual gera um aumento crescente de bactérias resistentes aos medicamentos mais frequentemente receitados. Como consequência, essa resistência favorece a elevação de morbidade e mortalidade na população, proporcionadas por doenças transmissíveis que levam, então, a uma diminuição da qualidade de vida e a um aumento das despesas com a saúde e os cuidados médicos. Dentre os mais comuns microorganismos responsáveis por tais infecções,

## I. Introdução

---

estão os pertencentes à família Enterobacteriaceae, que inclui bactérias dos gêneros *Proteus* sp. e *Klebsiella* sp., dentre outros (Figura 1).

Apesar de haver somente algumas estimativas da perda econômica causada pelo impacto da resistência bacteriana aos antibióticos em países em desenvolvimento, há indicações de que a situação seja preocupante. Estimativas do custo associado à perda de efetividade dos medicamentos em pacientes nos Estados Unidos alcançam US\$ 378 milhões (Elbasha, 1999). Informações do Instituto de Tecnologia dos Estados Unidos estimou que, em 1992, o custo anual associado à resistência de antibióticos em hospitais chegou a pelo menos US\$ 1.3 bilhões (Office of Technology Assessment, 1995).

Um dos maiores problemas para se estimar a mortalidade e morbidades causadas por patógenos resistentes reside no fato de que os pacientes infectados com cepas resistentes geralmente já foram infectados uma primeira vez por bactérias susceptíveis. Portanto, não se pode prever se um paciente está tendo a infecção pela primeira vez com bactérias já resistentes ou, se a infecção é o retorno de uma contaminação anterior que não foi tratada de forma adequada, produzindo cepas que não eliminadas com o uso dos medicamentos adequados (Trabulsi, 1998). Outro custo importante causado pelo aumento de bactérias resistentes consiste em um redirecionamento do tratamento para uma segunda linha de antibióticos, os quais geralmente são mais caros do que os usados em tratamentos de primeira instância. Conseqüentemente este fato leva a um aumento significativo de custos em tratamentos alternativos, havendo uma real necessidade de se providenciar novas estratégias para o tratamento de doenças infecciosas.

## I. Introdução

---



**Figura 1.** Lâmina de bactérias ilustrando microorganismo dos gêneros *Klebsiella* sp e *Proteus* sp . BGN- bacilos gram-negativos; BGP- bacilos gram-positivos; CGP-cocos gram-positivos; CF- células leveduriformes (Fonte: <http://www.saudetotal.com/microbiologia/index.htm>).



## I. Introdução

---

De modo geral, as enterobactérias são os microorganismos isolados em maior número a partir de eventos infecciosos; representando em torno de 70 a 80% das bactérias gram-negativas isoladas em rotina de laboratório (Trabulsi *et al.*, 1998). A frequência dos diferentes gêneros e espécies é fortemente influenciada pelo local onde a infecção foi adquirida, isto é, na comunidade ou no hospital. É importante mencionar que as enterobactérias são responsáveis por aproximadamente 50% das infecções hospitalares, causadas frequentemente por *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp e *Proteus* spp. A permanência destas bactérias nos hospitais é favorecida pelo uso constante de antibióticos e pela presença de pacientes com defesas orgânicas reduzidas em função do uso de medicamentos ou de outras formas de tratamento. Deve ser lembrado que antes do uso intensivo dos recursos modernos de terapêutica, as infecções hospitalares eram causadas, na maioria das vezes, por bactérias gram-positivas, destacando-se, entre elas, o *S. aureus*. Na realidade este fato em particular indica que a microbiota infecciosa hospitalar foi amplamente substituída nos últimos trinta anos, devido provavelmente a um uso massivo de medicamentos e métodos de higienização tradicionais.

Algumas propriedades dos coliformes enterobacterianos podem ser importantes na epidemiologia das infecções hospitalares. Gêneros como *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Serratia*, apresentam um aumento na resistência de anti-sépticos e desinfetantes (Baron *et al.*, 1996). Outras espécies, como *Proteus* sp. e *E. coli*, apresentam capacidade de se proliferar rapidamente em temperatura ambiente e em líquidos parenterais contendo glicose (Baron *et al.*, 1996). Por outro lado, a maioria das enterobactérias é geralmente sensível a diversos antibióticos, como ampicilinas,

## I. Introdução

**Tabela 1.** Características dos principais grupos de antibacterianos: espectro de ação e indicações.

Grupos de Antibióticos	Espectro de Ação e Indicações	
<b>Antibacterianos</b>		
PENICILINAS	Penicilina G	Contra cocos e bacilos gram-positivos, cocos gram-negativos e espiroquetas
	Ampicilina e Amoxicilina	Efeito sobre cocos e bacilos gram-positivos e negativos
	Isoxazolilpenicilinas	Resistentes à ação beta-lactamases estafilocócicas, mas não contra bacilos gram-negativos
	Carboxipenicilinas	Ativas sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Proteus</i> spp
	Azlocilina	Ação contra bactérias gram-negativas, especialmente <i>Klebsiella</i> spp, <i>Enterobacter</i> spp e <i>Proteus</i> spp
CEFALOSPORINAS	1ª Geração: cefalotina, cefaloridina, cefazolina, cefalexina, cefradina, cefaclor.	Ativas contra bactérias gram-positivas e gram-negativas causadoras de infecções respiratórias, cirúrgicas e estafilocócicas.
	2ª Geração: Cefoxitina, Cefomandol, Cefuroxima.	Boa atividade contra enterobactérias e <i>Haemophilus influenzae</i>
	3ª Geração: Cefotaxima, Ceftriaxona, Cefoperazona, Ceftazidima.	Resistentes à inativação pelas beta-lactamases das bactérias gram-negativas. Boa ação contra <i>Haemophilus influenzae</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
AMINOGLICOSÍDEOS	Estreptomicina, Caramicina, Gentamicina, Neomicina, Espectinomina, Tobramicina, Amicacina, Netilmicina	Ativas contra bactérias gram-negativas e estafilococos. Apresentam atividade sobre <i>Mycobacterium tuberculosis</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .
TETRACICLINAS	Tetraciclina	Indicadas em infecções provocadas por clamídias, riquetsias, micoplasmas, brucelas, borrelíias, e calymatobacterium.
CLORANFENICOL	Cloranfenicol	Indicado para tratamento da febre tifóide e na meningite provocada por <i>Haemophilus influenzae</i> .
COTRIMOXASOL	Cotrimoxazol	Tratamento e prevenção da pneumonia causada pelo protozoário <i>Pneumocystis carinii</i> em pacientes aidéticos.
QUINOLONAS	Ácido nalidíxico, Ácido oxolínico, Ácido piromídico, Cinoxacina, Ácido pipemídico,	Ação contra bactérias gram-negativas das famílias Enterobacteriaceae.

## I. Introdução

---

cefalosporinas, aminoglicosídeos, tetraciclina, cloranfenicol, cotrimoxazol e aos derivados quinolônicos (Tabela 1). No entanto, estas bactérias têm mostrado a habilidade de adquirir resistência a qualquer uma das drogas anteriormente descritas. Microorganismos da família Enterobacteriaceae já mostraram resistência contra aminoglicosídeos e medicamentos da família das cefalosporinas. Infecções causadas por membros desta família parecem provir de bactérias resistentes a medicamentos mal administrados em infecções anteriores. A Figura 2 revela um trabalho realizado por Rice *et al.* (1990), mostrando a resistência ao antibiótico ceftazedime, uma cefalosporina de terceira geração (nome comercial; Cefazima) durante o ano de 1990. Observa-se que, em primeira instância, há uma elevada resistência ao medicamento. No entanto, esta resistência claramente decresce ao longo dos meses devido, principalmente, ao uso paralelo de outros medicamentos como penicilinas, cefalosporinas, aminoglicosídeos e tetraciclina (Tabela 1). Isso indica que, o uso de mais de um medicamento em paralelo pode auxiliar na diminuição da resistência bacteriana aos antibióticos, embora esta estratégia não seja completamente eficiente.

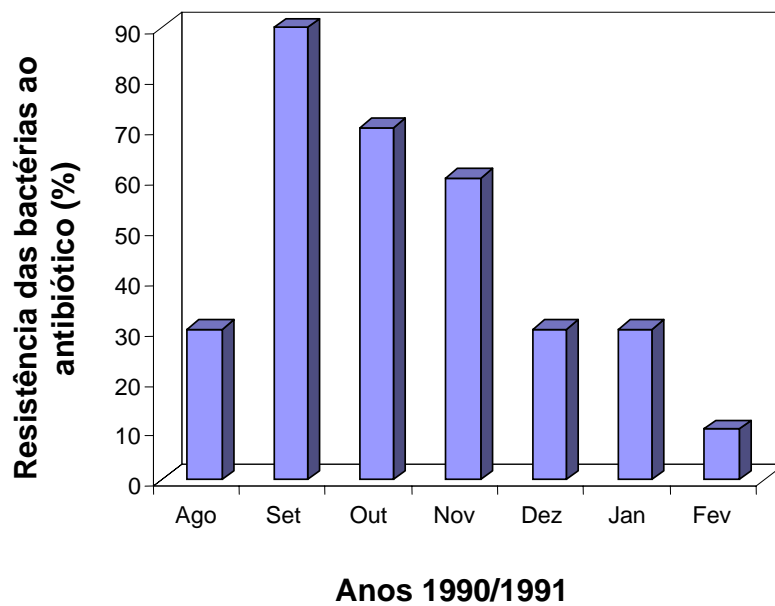
### ***1.2. Enterobactérias causadoras de infecções hospitalares.***

#### ***1.2.1. Klebsiella spp.***

O gênero *Klebsiella* apresenta três principais espécies que agrupam cerca de 72 sorotipos.

## I. Introdução

---



**Figura 2.** Representação numérica de resistência ao Ceftazedime, antibióticos do grupo das cefalosporinas, por bactérias da família Enterobacteriaceae, durante o ano de 1990 (Figura modificada de Rice *et al.*, 1990).

## I. Introdução

---

Deste modo, classifica-se a *Klebsiella rhinoschleromatis* como sorotipos 4, 5 e 6, a *Klebsiella ozaenae*, como sorotipo 3 e a *Klebsiella pneumoniae*, como qualquer um dos outros 72 sorotipos, sendo os sorotipos 1 e 2 os mais frequentes. As bactérias do gênero *Klebsiella* sp podem causar pneumonia em pacientes debilitados, dentre os quais são incluídos comumente indivíduos alcoólatras com mais de 40 anos de idade. Dentre as espécies pertencentes a este gênero, a *K. pneumoniae* é um dos poucos bacilos gram-negativos capazes de causar pneumonia lobar (Feldman *et al.*, 1991). Não obstante, esta bactéria também pode ser associada a infecções no aparelho urinário, endocardites e vários tipos de infecções pós-cirúrgicas. Algumas estatísticas demonstram que a *K. pneumoniae* pode ser responsável por 10% das infecções hospitalares (French *et al.*, 1996; Trabulsi, 1998). Além disso, *K. pneumoniae* são capazes de causar infecções pulmonares hospitalares por aspiração, prostatites aguda e crônica principalmente em indivíduos acima de 35 anos, e até infecções no Sistema Nervoso Central. Além disso, a *K. rhinoschleromatis* pode causar escleroma, um típico processo granulomatoso crônico que atinge as mucosas e seios paranasais, faringe, ouvido médio e até os brônquios (Lim *et al.*, 2003.). Finalmente, a *K. ozaenae* tem sido isolada de indivíduos que sofreram casos graves de septicemia (Murray *et al.*, 1981). Esta bactéria também vem sendo considerada a principal causadora de rinite atrófica de origem infecciosa. Neste caso, a infecção é caracterizada por ser de evolução crônica e por se manifestar pela perda da arquitetura de mucosa nasal e secreção mucopurulenta fétida (Stoor *et al.*, 1999).

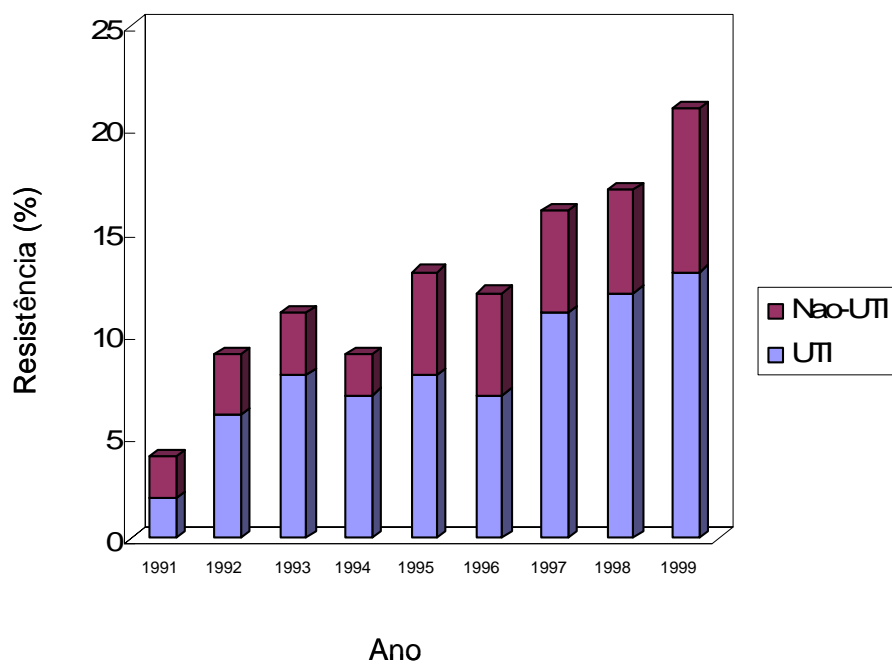
## I. Introdução

---

Algumas cepas pertencentes ao gênero *Klebsiella* sp, primariamente da espécie *K. pneumoniae*, têm-se mostrado produtoras eficientes de  $\beta$ -lactamases e, por isso, resistentes a antibióticos da família das penicilinas (French *et al.*, 1996; Senda *et al.*, 1996). Este grupo de bactérias é denominado de ESBL ( $\beta$ -lactamases de espectro estendido) e vem se tornando um desafio para os estudiosos da área de saúde, uma vez que desenvolvem mecanismos que desativam a ação de antibióticos (Figura 3).

### 1.2.2. *Proteus* sp.

Na nova classificação destas enterobactérias, o gênero *Proteus* passou a incluir somente *Proteus mirabilis* e *Proteus vulgaris* (Trabulsi, 1998). O *Proteus morganii*, que antes também fazia parte do gênero *Proteus* é agora classificado no gênero *Morganella* e o *Proteus rettgeri* passou a integrar o gênero *Providencia*. As infecções urinárias são as mais comuns patologias relacionadas a estas bactérias, devendo ser notado que, enquanto o *P. mirabilis* ocorre em infecções adquiridas na comunidade, as outras espécies estão quase sempre associadas à infecção hospitalar (Sabbuba *et al.*, 2003). Como *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *M. morganii* e *P. rettgeri* hidrolisam a uréia formando amônia, a urina de pacientes cronicamente infectados por estas bactérias pode se tornar muito alcalina, favorecendo a formação de cálculos, uma vez que o aumento do pH reduz proporcionalmente à solubilidade do cálcio. Além de enfermidades no trato urinário, bactérias do gênero *Proteus* sp podem causar infecções no Sistema Nervoso Central e prostatites, bem como pielonefrites e outros tipos de infecções urinárias (Sabbuba *et al.*, 2003; Faus *et al.*, 2003).



**Figura 3.** Gráfico ilustrando uma comparação da resistência bacteriana da espécie *Klebsiella pneumoniae* contra antibióticos do grupo das cefalosporinas durante os anos de 1991 a 1999. Colunas em azul indicam comparação com pacientes em UTI. Colunas em vermelho indicam comparação feita com pacientes não-UTI. Eixo “x” indica os anos em que cada comparação foi feita. Eixo “y” indica a porcentagem de resistência desenvolvida pela bactéria nos seguintes pacientes. (Figura modificada de Fridkin e Gaynes, 1999).

## I. Introdução

---

O antigo método classificatório de espécies de *Proteus* em indol+ e indol-, tem uma conveniência de ordem terapêutica, uma vez que apenas *P. mirabilis* (indol-) parece ser sensível à ampicilina (Trabulsi *et al.*, 1999).

Entretanto, na classificação atual, os *Proteus* denominados indol+ incluem não apenas *P. vulgaris*, como também *M. morganii* e *P. rettgeri*. Com relação a medicamentos, se enfatiza uma característica comum às bactérias do gênero *Proteus* que consiste na resistência natural as polimixinas, um tipo de antibiótico nefrotóxico bastante ativo contra as demais enterobactérias e outros germes gram-negativos (Valdivieso *et al.*, 1999).

### ***1.3. Fungos antropo e fitopatogênicos: processos infecciosos e mecanismo de ação.***

Os fungos representam um grupo extremamente diverso de organismos, com cerca de 250.000 espécies distribuídas em todo o mundo. Estudos anteriores revelaram que o peso de fungos no planeta é maior do que o de seres humanos (Muller & Loeffler, 1976; Smith *et al.*, 1992). Além disso, os fungos constituem um reino que abriga um grupo numeroso de organismos bastante diversificados filogeneticamente e de grande importância ecológica e econômica. De acordo com a classificação taxonômica, o reino dos fungos é dividido em Mixomicota e Eumycota. Os Myxomycota incluem organismos que apresentam talo vegetativo plasmidial ou amebóide. A divisão Eumycota engloba os fungos propriamente ditos, cujo talo vegetativo é predominantemente micelial, às vezes unicelular, mas sempre dotado de parede celular. Quanto à sua classificação taxonômica, levam-se em consideração todas as características morfológicas, principalmente os tipos de frutificação sexuadas e assexuadas (Trabulsi, 1998).



## I. Introdução

---

Diversas espécies de fungos leveduriformes são conhecidas na área da micologia médica e veterinária, bem como na micologia industrial. Todavia, apenas poucos representantes demonstram essas características na área da Patologia Vegetal. Por isso, a maior parte dos fungos fitopatogênicos é diferenciada por apresentarem o sistema vegetativo filamentoso (hifas) e ramificado (conjunto de hifas = micélio). Em relação ao tipo de frutificação, os fungos fitopatogênicos podem ter duas naturezas: (i) uma forma teleomórfica, também conhecida como 'forma perfeita' ou sexuada e; (ii) forma assexuada ou clonal, antigamente denominada "forma imperfeita", mas hoje classificada como anamórfica. Na maioria das vezes, para cada espécie existe uma forma anamórfica e uma forma teleomórfica. Em países tropicais e subtropicais onde a variação de temperatura é menor do que em áreas temperadas, a grande maioria dos fungos fitopatogênicos se manifesta sob a forma assexuada ou anamórfica e apenas raramente alguns desses fungos manifestam a forma sexuada ou teleomórfica (Baron, 1996).

### **1.3.1. Fungos patogênicos ao homem**

Fungos podem ser grandes causadores de graves doenças em seres humanos (Kufe *et al.*, 2003). Desta forma, as infecções fúngicas normalmente emergem como um problema significativo em pacientes debilitados por doenças graves como câncer. Espécies como *Cândida* spp são responsáveis por grande parte das infecções fúngicas. Além destes, outros organismos, especialmente *Aspergillus* spp, têm sido também responsáveis pelo aumento da frequência de infecções deste gênero (Pianetti Filho *et al.*, 2005). Atualmente, pelo menos 40% a 50% das infecções fatais em pacientes com câncer são devidas ao ataque de fungos.

## I. Introdução

---

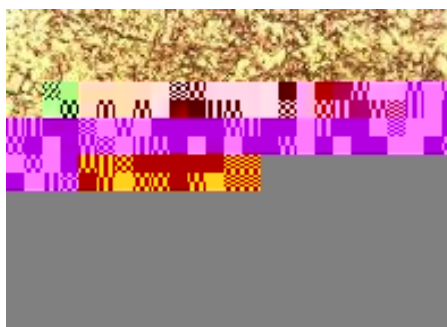
Ademais, tem-se observado um aumento considerável de infecções fúngicas sistêmicas em pacientes submetidos à quimioterapia (Kufe *et al.*, 2003). As infecções causadas em pacientes com câncer podem ser divididas em duas principais categorias: fungos patogênicos (*Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, e *Coccidioides immiti*) e fungos oportunistas (*Candida* spp, *Aspergillus* spp e outros fungos). Esses fungos costumam causar infecções recorrentes na população em geral, mas desenvolvem infecções disseminadas em pacientes imunodeprimidos (Kufe *et al.*, 2003). Os fungos oportunistas, em especial, normalmente causam infecções superficiais em hospedeiros imunocompetentes, mas são mais comuns como causa de infecções sistêmicas em pacientes com os mecanismos de defesa comprometidos (Kufe *et al.*, 2003). Além disso, as infecções fúngicas geralmente se estabelecem em locais com infecções prévias ou necrose. Por exemplo, mais de 70% dos casos de aspergilose pulmonar ocorrem em associação com pneumonias bacterianas prévias ou concomitantes (Kufe *et al.*, 2003). A Figura 4 ilustra uma lâmina contendo hifas de *A. fumigatus*, retiradas de amostra de paciente imunocomprometido com aspergilose pulmonar.

### 1.3.1.1. *Aspergillus* sp

Cerca de 200 espécies são extremamente patogênicas a mamíferos, sendo muitos destes microorganismos capazes de produzir toxinas nocivas ao homem (Almeida *et al.*, 2000). A maioria das exposições a fungos e infecções são autolimitáveis em hospedeiros animais.

## I. Introdução

---



**Figura 4.** Ilustração de hifas de *A. fumigatus* retiradas de amostra pulmonar de paciente imunocomprometido com aspergilose. Acima: Grupamentos de hifas de Aspergillus, corados por método histoquímico. Abaixo: Grupamentos de hifas de Aspergillus, corados por método argêntico (metenamina prata de Gomori X 200) (Fonte: França *et al.*, 1996).

## I. Introdução

---

No entanto, em pacientes imunodeprimidos, as infecções por fungos podem ser mortais. Este é o caso de pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) e pacientes com leucemia, cuja letalidade por infecção fúngica sistêmica chega a 50% dos casos. Infecções sanguíneas nosocomiais também apresentam a mesma porcentagem (Levitz, 1992; Lyman *et al.*, 1992; Selitrennikoff, 2001). As principais infecções são doenças causadas ao trato respiratório,



## I. Introdução

---



**Figura 5.** Efeitos do *F. oxysporum* no tomateiro, causando o aparecimento de folhas murchas e amareladas (Fonte:Embrapa Hortaliças, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliça, [http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Tomate/TomateIndustrial/doenca\\_fungo.htm](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Tomate/TomateIndustrial/doenca_fungo.htm))

## I. Introdução

---

Vários são os casos de resistência a fungicidas. Os primeiros produtos a entrar no mercado nas décadas de 60 e 70 foram os pertencentes ao grupo dos benzimidazóis. A sua atuação ocorria em diversos pontos do metabolismo dos fungos, chamados de produtos protetores ou convencionais e, por isso, o risco de resistência não era significativo. Todavia, com a introdução de fungicidas sistêmicos, os quais atuam em poucos passos do metabolismo do fungo, o risco de resistência foi gradativamente sendo reduzido, permitindo o desenvolvimento de linhagens resistentes (Ghini, 2001). O primeiro caso registrado foi observado nos Estados Unidos com oídio em pepino causado por *Sphaerotheca fugilinea* onde, após um ano de aplicação de fungicidas, observou-se uma redução nos efeitos do fungicida e uma elevação considerável no desenvolvimento de espécies resistentes. No Brasil há poucos estudos feitos com o intuito de se diminuir a resistência de fungos sob ação de fungicidas. A maioria dos trabalhos descreve apenas a ocorrência de resistência causada por fungos de diversas espécies, tais como *Alternaria dauci*, *Botrytis cinerea*, *B. squamosa*, *Cercosporidium personatum*, *Colletotrichum fragariae*, *Cylindrocladium scoparium*, *Drechslera teres*, *Fusarium subglutinans f.sp. ananas*, *Guinardia citricarpa*, *Glomerella cingulata*, *Monilinia fructicola*, *Mycosphaerella fragariae*, *Penicillium sp.*, *Phytophthora infestans*, *Plasmopara viticola* e *Venturia inaequalis* (Ghini, 2001).

### 1.3.2.1. *Fusarium sp*

O gênero *Fusarium* constitui um dos grupos de fungos filamentosos mais estudados, uma vez que é responsável por diversos tipos de infecções em várias espécies de plantas, causando perdas significativas em plantações (Brown *et al.*, 2006) (Figura 6).

## I. Introdução

---

De maneira idêntica, os membros do gênero *Fusarium* incluem numerosos patógenos de plantas que causam doenças destrutivas em algumas das espécies de plantas importantes para a agricultura, tais como milho, trigo, batata, banana, tomate, e numerosos outros vegetais (Brown *et al.*, 2006). Fungos deste gênero apresentam facilidade em formar diversas colônias nas plantas e, conseqüentemente, espalham-se rapidamente para o solo e outras plantas (Burgess, 1981). As infecções causadas por organismos do gênero *Fusarium* podem ocorrer em qualquer fase do desenvolvimento da planta, desde durante a germinação das sementes, até ao amadurecimento dos tecidos vegetativos, dependendo da espécie de fungo envolvida e da planta-hospedeira atacada (Paavanem-Huhtala *et al.*, 2000).

Espécies pertencentes ao gênero *Fusarium* estão distribuídas em vários países do mundo e encontra-se em abundância em alguns ambientes. Em determinados locais e campos de plantio, pode-se encontrar mais de 100.000 esporos de *Fusarium* por grama de solo (Snyder *et al.*, 1954). Na América como um todo, as espécies *F. solani* e *F. oxysporum* são capazes de predação inúmeras plantas agricultáveis como cevada, soja e mamão (Paavanem-Huhtala *et al.*, 2000).

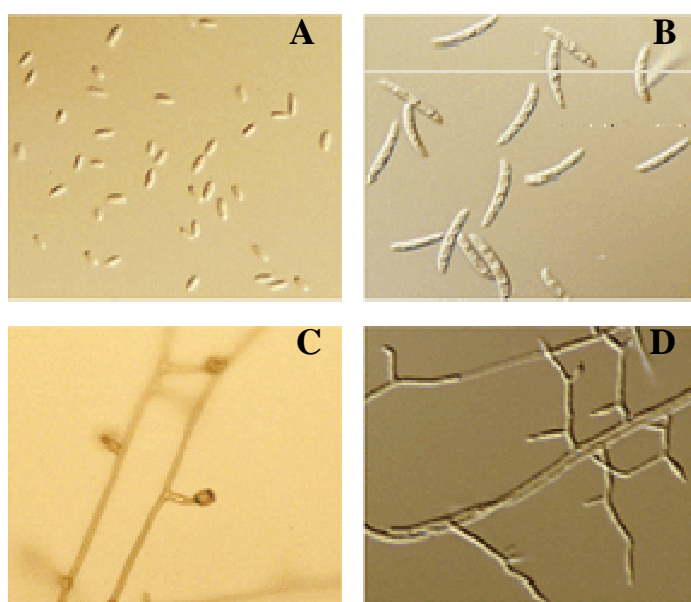
Estudos anteriores revelaram que nos Estados Unidos, no ano de 1993, o *Fusarium* causou uma perda de cerca de US\$ 1.000.000.000,00 (um bilhão de dólares) em plantios de trigo (Paavanem-Huhtala *et al.*, 2000). Além disso, na Europa, os indivíduos do gênero *Fusarium*



também são fitopatógenos perigosos para os cultivos de grãos e batata. O *F. avenaceum* é o principal agente da doença 'head blight' em grãos. Quando associado a outras espécies, o *F. avenaceum* também pode facilitar o desenvolvimento do caruncho de raiz ou de pé, uma vez que

## I. Introdução

---



**Figura 6.** Cultura de *Fusarium oxysporum*, ilustrando formação de esporos (A e B) e na forma filamentosa, com o desenvolvimento de hifas (C e D) (Fonte: Burdon *et al.*, 2007).

## I. Introdução

---

o fungo aumenta a sensibilidade da planta ao ataque de outros patógenos (Yli-Matilla *et al.*, 1996).

A Figura 5 ilustra os sintomas causados pela murcha-do-fusário em tomateiro. As folhas ficam murchas e geralmente de coloração amarelada, os frutos podem não se desenvolver ou amadurecer precocemente, inviabilizando-os para o consumo. Além disso, algumas espécies pertencentes ao gênero *Fusarium* são capazes de produzir micotoxinas, as quais são nocivas a seres humanos e animais, reduzindo significativamente o valor de produtos vegetais no mercado agroindustrial. Micotoxinas de *Fusarium* apresentam uma extensa diversidade estrutural de compostos que são produzidos durante o processo de infecção da planta. Estes compostos são de extrema preocupação econômica e na saúde humana, uma vez que, quando acumulados nos alimentos, podem torná-los tóxicos e impróprios para o consumo.

### ***1.4. Peptídeos antimicrobianos: uma estratégia alternativa no controle de patógenos.***

Plantas estão continuamente sendo expostas a um grande número de organismos patogênicos. Apesar de estas não apresentarem um sistema imunitário como nos mamíferos, as plantas têm desenvolvido, ao longo do processo de evolução, diversos mecanismos de defesa,

incluindo a síntese de componentes com baixo peso molecular, proteínas, e peptídeos com atividades antifúngicas e antibacterianas (Bull *et al.*, 1992; Tulasi & Nadimpali, 1997). Do mesmo modo, outros seres, como mamíferos, insetos, moluscos, e até mesmo bactérias e fungos

## I. Introdução

---

sintetizam compostos protéicos com atividade antimicrobiana (Moralejo *et al.*, 1999; Natori, 1994; Schmitt *et al.*, 1997). Centenas de proteínas com atividade antimicrobiana foram descobertas nos últimos anos, podendo estes ser classificados em diversos grupos, de acordo com sua massa molecular, atividade, carga e estrutura tridimensional. Dentre os principais grupos (Tabela 2), destacam-se: proteínas PR-1, (1,3)  $\beta$ -glucanases, quitinases, proteínas de ligação à quitina, defensinas e tioninas, proteínas semelhantes à taumatinas, proteínas semelhantes à ciclofilinas, proteínas ricas em glicina/histidina, proteínas inativadoras de ribossomos (PIRs), proteínas transferidoras de lipídeos (LTPs), proteínas ‘killer’ (*killer toxins*), inibidores de enzimas e outras proteínas (Selitrennikoff, 2001). A tabela abaixo mostra alguns destes peptídeos.

Os mecanismos de ação destas proteínas antimicrobianas são variados, podendo as mesmas atuar na degradação de polímeros, na formação de canais e poros de membrana, na destruição de ribossomos celulares, na inibição da síntese de DNA e na inibição do ciclo celular. Todavia, muitas das proteínas não apresentam mecanismo de ação conhecido e necessitam de estudos mais detalhados (Selitrennikoff, 2001).

Desta forma, os genes que codificam proteínas antifúngicas estão sendo utilizados na agro-indústria para modificação e melhoramento de plantas ao ataque de fungos. Além disso, estas proteínas também estão sendo testadas em larga escala, em indústrias farmacêuticas, no intuito de

se obter medicamentos que possam combater infecções humanas causadas por fungos. Ademais, algumas proteínas se especializaram na capacidade de inibir o crescimento de

## I. Introdução

---

**Tabela 2.** Peptídeos antimicrobianos de plantas. (Fonte: García-Olmedo *et al.*, 2001).

Família	Número de resíduos	Ligações dissulfeto	Tipos / Subfamília	Ativo contra
LTPs	90-95	3-4	I-II	Bactérias e fungos
Snakinas	61-70	6	I-III	Bactérias e fungos
Defensinas	45-54	4	I-IV	Bactérias e fungos
Tioninas	45-47	3-4	I-IV	Bactérias e fungos
Hevein-like	43	4	I	Bactérias Gram (+) e fungos
Knottin-like	36-37	3	I	Bactérias Gram (+) e fungos
Sheperdinas	28-38	0 (linear)	I-II	Bactérias e fungos
MBP-1	33	2	I	Bactérias e fungos
Peptídeos macrocíclicos	29-31	3	I-III	Bactérias Gram (+) e fungos
Ib-AMPs	20	2	I	Bactérias Gram (+) e fungos

## I. Introdução

---

determinadas espécies de bactérias, dificultando a invasão destes microorganismos no tecido, seja ele animal ou vegetal e, conseqüentemente, livrando os indivíduos de uma infecção (Kus *et al.*, 2002). De maneira idêntica, tem-se descrito a presença de  $\alpha$ - e  $\beta$ - defensinas e catelicinas encontradas na superfície epitelial de mamíferos, especialmente o homem, as quais apresentam atividade antibacteriana funcionando como barreira protetora do tecido, também podendo ser induzidas durante a infecção e inflamação (Niyonsaba *et al.*, 2003; Bolam, 2003).  $\beta$ -Defensinas de rato têm demonstrado um papel importante na proteção pulmonar, especialmente no controle de *Pseudomonas aeruginosa*, uma bactéria causadora de pneumonias (Zhou *et al.*, 2003). Além disso, estudos anteriores demonstraram que defensinas humanas e tioninas de plantas mostraram atividade inibitória para o crescimento da bactéria *Listeria monocytogenes*, um microorganismo patogênico encontrado em alimentos industrializados, o qual pode causar abortos, septicemia e meningoencefalites quando ingerido (Vázquez-Boland *et al.*, 2001; López-Solanilla *et al.*, 2003), sugerindo que estes peptídeos podem ser utilizados com eficiência pela indústria farmacêutica.

## **2. INIBIDORES DE ENZIMAS DIGESTIVAS: O USO DA BIOTECNOLOGIA NA DIMINUIÇÃO DE PERDAS NA LAVOURA**

### ***2.1 Insetos-pestes: perdas na agricultura e resistência a inseticidas***

Além de bactérias e fungos fitopatogênicos, insetos também são importantes agentes responsáveis pela destruição de grãos e lavouras em todo o mundo (Moreira, 2005). Sendo uma das principais fontes de alimentação em diversos países, o amido presente nas leguminosas e sementes fornece energia metabólica para a dieta humana. No entanto, outros predadores de tais plantas utilizam os mesmos nutrientes, competindo pelos cultivares para seu próprio consumo (Moreira, 2005). No Brasil, as perdas na colheita chegam a 10% na presença de agrotóxicos, sendo que um dos principais fatores destas perdas está associado ao ataque de insetos, tanto no campo como em sementes estocadas em armazéns (Moreira, 2005). Geralmente, as plantas apresentam certo grau de resistência, sendo resultado de um conjunto de mecanismos de defesa adquiridos pela planta durante o processo de evolução e co-evolução (Gatehouse et al., 1992; Schuler et al., 1998). Nos últimos anos, alguns compostos secundários e inúmeras proteínas têm sido descritos como associados à defesa de plantas. Essas defesas, porém, não são suficientes, uma vez que os insetos são capazes de infestar sementes e diferentes tecidos da planta,

independente da presença ou não de compostos de defesa (Hilder et al., 1987). Assim, dois fatores parecem estar ligados diretamente a este fenômeno. O primeiro consiste no fato de que várias plantas tiveram sua

## I. Introdução

---



**Figura 7.** *Acanthoscelides obtectus*. A) Ilustração do inseto-praga. B) Destruição de sementes de feijão pelo inseto.

(Fonte: HYPP Zoology home page: <http://www.inra.fr/Internet/Produits/HYPPZ/RAVAGEUR/6acaobt.htm>).

## I. Introdução

---

quantidade de compostos de defesa reduzida durante o processo de domesticação (Hilder et al., 1987).

Com isso, algumas características como um maior valor nutricional e um melhor sabor tiveram prevalência ao grau de resistência aos predadores. O segundo encontra-se na capacidade dos insetos em também desenvolverem mecanismos de defesa contra os compostos produzidos pelas plantas, existindo, então, uma co-evolução entre parasita e hospedeiro (Erlisch & Raven, 1964) (Figura 7).

Dentro deste enorme contexto e de um problema considerado global, larvas de alguns bruquídeos têm causado perdas consideráveis para a agricultura em todo o mundo. Estes besouros são extremamente dependentes de amido para sua sobrevivência, e utilizam  $\alpha$ -amilases para produção de energia em seu metabolismo (Vyjayanthi e Subramanyam, 2002). Estas enzimas catalisam o amido em oligossacarídeos, para depois serem quebrados em pequenas moléculas de carboidratos, que serão absorvidas pelo organismo. Larvas e insetos que se alimentam de grãos dependem das suas  $\alpha$ -amilases para sua sobrevivência, como é o exemplo do *Tenebrio molitor*, *Callosobruchus maculatus*, *Acanthoscelides obtectus* e *Zabrotes subfasciatus* (Campos et al., 1989; Grossi-de-Sá e Chrispeels, 1997; Strobl et al., 1998; Franco et al., 2005).

Além das perdas consideráveis, atualmente, um problema adicional enfrentado pelos agricultores é o uso indiscriminado de agrotóxicos para o combate de insetos-praga. O uso em



excesso de inseticidas químicos causa problemas ambientais, bem como podem levar inúmeros consumidores à intoxicação. Além disso, a resistência destes insetos aos

## I. Introdução

---

mecanismos de defesa da planta têm aumentado os custos devido ao maior número de agroquímicos utilizado ano a ano, levando o agricultor a um ciclo vicioso de gastos. Com isso, diversos estudos têm sido desenvolvidos, no intuito de se obter novas ferramentas para o combate a insetos-praga, como a purificação de peptídeos de defesa e a síntese de compostos secundários (Moreira, 2005).

O *A. obtectus*, comumente conhecido como caruncho do feijão, é um inseto da família Bruchidae e um dos principais causadores da perda da qualidade de sementes de feijões armazenados por pequenos agricultores. Típico de climas tropicais e subtropicais, o *A. obtectus* é capaz de se multiplicar com facilidade dentro de grãos armazenados, podendo gerar até 63 ovos por dia (Botelho *et al.*, 2002). A ovoposição ocorre na superfície das sementes de forma aleatória, sendo que alguns ovos podem não se fixar nas sementes, não havendo seleção por parte da fêmea (Thierry *et al.*, 1994; Parsons *et al.* 2003). A larva do inseto se alimenta dos nutrientes contidos nas sementes, como carboidratos, proteínas e lipídeos, inviabilizando-as para o consumo. O dano causado por esse caruncho varia da diminuição da qualidade do feijão estocado a perda total dos grãos (Botelho *et al.*, 2002).

### 2.2. $\alpha$ -Amilases de insetos

Larvas de insetos-pestes de bruquídeos são extremamente dependentes de amido para sua sobrevivência, e utilizam amilases (R-1,4-glucano-4-glucanohidrolases: EC 3.2.1.1) para a produção de energia metabólica (Vyjayanthi e Sbramanyam, 2002; Franco *et al.*, 2005). Essas enzimas catalisam a hidrólise de amido em oligossacarídeos, os quais podem ser então,

## I. Introdução

---

assimiladas pelo organismo. Os insetos que se alimentam de grãos em seu estágio larval ou na fase adulta dependem de suas amilases para sobrevivência, como é o caso de *T. molitor*, *C. maculatus* e *Z. subfasciatus* (Grossi-de-Sá & Chrispeels, 1997; Franco *et al.*, 2005). Assim como na maioria dos insetos, as informações sobre o processo de digestão de amido em bruquídeos são escassas, em contraste ao conhecimento sobre os aspectos cinéticos das enzimas envolvidas neste mesmo processo (Podoler & Applebaum, 1971; Lemos *et al.*, 1990; Baker e Woo, 1992; Terra e Ferreira, 1994; Grossi-de-Sá & Chrispeels, 1997, Silva *et al.*, 2001).

Estudos recentes com enzimas digestivas de *Z. subfasciatus* demonstraram que suas larvas apresentam considerável quantidade de enzimas para quebra de amido (Silva *et al.*, 2001). Interessantemente, a larva de *Z. subfasciatus* apresenta capacidade de modular a concentração de  $\alpha$ -glucosidases e  $\alpha$ -amilases quando em presença de diferentes sementes, secretando uma alta quantidade de isoformas de amilases e uma de  $\alpha$ -glucosidase (Shade *et al.*, 1994; Schroeder *et al.*, 1995; Silva *et al.*, 2001). Além disso, as enzimas de insetos possuem uma estrutura tridimensional capaz de se ligar ao substrato e, por meio da ação de grupos catalíticos altamente específicos, promovem a quebra das ligações glicosídicas (Terashima e Katoh, 1996; Iulek *et al.*, 2000).

Dentre os insetos, somente as  $\alpha$ -amilases de *Tenebrio molitor* tem sua estrutura tridimensional estudada (Strobl *et al.*, 1998). Assim, a estrutura cristalizada da amilase de *T. molitor* (TMA) trouxe novas informações sobre o processo catalítico de enzimas de insetos (Mazur *et al.*, 1994; Davies & Henrissat, 1995; Pereira *et al.*, 1999). Desta forma, a estrutura final de TMA é composta por uma cadeia polipeptídica de 471 aminoácidos, um íon cálcio e um íon

## I. Introdução

---

cloro. E 261 moléculas de água (Strobl *et al.*, 1998). A enzima apresenta três domínios principais A (resíduos 1 ao 97, e 160 a 379), B (resíduos 98 a 159) e C (resíduos 380 a 471), sendo que as ligações dissulfetos ocorrem intra-domínios.

A presença do íon cálcio no domínio B parece ser importante para a integridade da estrutura da enzima, enquanto que o íon cloro no domínio A, diretamente ligado ao sítio ativo, parece atuar iniciando a quebra da cadeia do substrato. Estudos comparativos puderam determinar o sítio catalítico de TMA, o qual se encontra no domínio A, correspondendo a três resíduos acídicos Asp<sub>185</sub>, Glu<sub>222</sub> e Asp<sub>287</sub> (Strobl *et al.*, 1998). Dois resíduos de histidina, His<sub>99</sub> e His<sub>286</sub>, também mostraram ser importantes na interação com o substrato. Assim, a larva do *T. molitor* contém uma  $\alpha$ -amilase que constitui de uma proteína acida com pH ótimo para clivagem de amido em torno de 5,8 (Buonocore, 1976; Strobl *et al.*, 1997). A enzima encontra-se totalmente adaptada ao meio no qual é encontrada, o intestino do inseto, onde o pH é levemente ácido (Strobl *et al.*, 1997). As propriedades catalíticas do TMA com o substrato já têm sido relatadas (Strobl *et al.*, 1997). De maneira idêntica, foi demonstrado que a atividade de TMA pode ser reduzida por inibidores de planta de origem protéica.

## 2.3 Inibidores enzimáticos

### 2.3.1 Inibidores de $\alpha$ -amilases

Os bruquídeos são extremamente dependentes de amido para sobreviver. Por esta razão, eles usam suas enzimas  $\alpha$ -amilolíticas para clivar o amido em pequenas moléculas de carboidratos, como observado em intestinos de larvas de *T. molitor*, *C. maculatus*, *A. obtectus* e

#### I. Introdução

---

*Z. subfasciatus* (Grossi-de-Sá & Chrispeels, 1997; Strobl *et al.*, 1998; Franco *et al.*, 2005; Pelegrini *et al.*, 2006). No entanto, alguns estudos têm sido feitos com o intuito de se descobrir inibidores para estas enzimas digestivas.

Até o momento, tem-se descrito seis tipos diferentes de inibidores de amilase: lectina-like, knottin-like, cereal-type, Kunitz-like,  $\gamma$ -purotionina-like e thaumatina-like. Essas classes de inibidores apresentam estrutura tridimensional bastante diferentes entre si, levando a diferentes mecanismos de inibição, bem como perfis de especificidade e massas moleculares diferentes (Franco *et al.*, 2002).

Inúmeros estudos têm sido feitos com o intuito de se descobrir inibidores para  $\alpha$ -amilases. Até o momento, foram descritos seis tipos diferentes de inibidores de amilase: lectina-like, knottin-like, cereal-type, Kunitz-like,  $\gamma$ -purotionina-like e thaumatina-like. Essas classes de inibidores apresentam estrutura tridimensional bastantes diferentes entre si, levando a diferentes mecanismos de inibição, bem como perfis de especificidade e massas moleculares diferentes (Franco *et al.*, 2002).

A família de inibidores do tipo  $\gamma$ -purotioninas apresenta altas similaridades as defensinas, especialmente devido à alta especificidade a uma determinada enzima de insetos e baixa massa

molecular. A primeira defensina de planta descrita com atividade inibitória de  $\alpha$ -amilase foi um peptídeo isolado de sorgo (*Sorghum bicolor*). Ele foi capaz de inibir  $\alpha$ -amilases de insetos, tais como as de *Periplaneta americana* e *Shistocera americana*, mas não foi capaz de causar efeitos inibitórios em  $\alpha$ -amilases de mamíferos (Bloch & Richardson, 1991). Da mesma forma, um inibidor de  $\alpha$ -amilase de *Vigna unguiculata*, com propriedades bioquímicas semelhantes à de

## I. Introdução

---

defensinas de plantas, mostrou atividade contra  $\alpha$ -amilases de insetos (Melo *et al.*, 1999). Além disso, um outro peptídeo de sementes de mamão (*Carica papaya*), também semelhante à defensinas de planta, foi capaz de inibir  $\alpha$ -amilases de *C. maculatus*, conhecido como caruncho do feijão (Farias *et al.*, 2007). Ensaio utilizando sementes artificiais contendo 0,5-1,0% de inibidores de mamão (p:p) mostraram que o peptídeo foi capaz de inibir 50% do crescimento da larva do caruncho (Farias *et al.*, 2007).

Ademais, poucos trabalhos mostraram tantos detalhes como o descrito por Liu *et al.* (2006). Neste artigo, os autores demonstraram que uma defensina de *Vigna radiata*, chamada VrD1, foi capaz de inibir  $\alpha$ -amilases de *T. molitor* (TMA). Neste caso, o tamanho do Loop2 parece ser bastante importante para interação com as enzimas de insetos (Liu *et al.*, 2006). Assim, VrD1 é capaz de formar pontes de hidrogênio com três resíduos de aminoácidos do sítio ativo de *T. molitor* (Glu<sub>222</sub>, Asp<sub>287</sub>, e Asp<sub>332</sub>), bem como mostrou que o segundo Loop era realmente importante para a interação e inibição enzimática (Liu *et al.*, 2006). O mesmo mecanismo foi observado com uma  $\gamma$ -hordotionina ( $\gamma$ -H) de cevada (Mendez *et al.*, 1990). Pôde-se observar que o Loop2 de  $\gamma$ -H insere-se dentro do sítio ativo de TMA, impedindo a entrada do substrato. Ademais, demonstrou-se que resíduos carregados positivamente nos Loop1 e 2 (Lis<sub>12</sub> e Arg<sub>38</sub> in

VrD1, Arg<sub>39</sub> e Arg<sub>40</sub> in  $\gamma$ -H) eram importantes para a interação com a  $\alpha$ -amilase (Mendez *et al.*, 1990; Liu *et al.*, 2006), o que não ocorria com defensinas de plantas que apresentavam um Loop2 curto. O mecanismo de ação para defensinas de plantas inseticidas ainda não foi completamente estudado, mas outra hipótese para o mecanismo de ação contra amilases tem sido proposta (Pelegri *et al.*, 2006). Neste caso, alguns autores

## I. Introdução

---

sugerem que as defensinas são capazes de quelar o cálcio, desestabilizando a enzima, levando à sua inibição (Castro & Fontes, 2005; Pelegri e Franco, 2005).

## 3. PROTEÍNAS E PEPTÍDEOS BIOATIVOS CONTRA PESTES E PATÓGENOS.

### 3.1. Albuminas 2S

As proteínas do tipo albuminas 2S formam um grande grupo de moléculas de armazenamento em sementes, principalmente em espécies dicotiledôneas. Apesar das albuminas 2S mostrarem certo nível de polimorfismo, elas apresentam uma estrutura heterodimérica conservada constituída em subunidades de cerca de 30-40 e 60-90 resíduos, respectivamente, e unidas por ligações dissulfeto tipicamente encontradas nesta família de proteínas (Pandya *et al.*, 1999). As albuminas 2S estão se tornando de grande interesse para estudos clínicos e nutricionais, uma vez que têm sido descritas como conhecidos alergênicos de plantas (Monsalve *et al.*, 2001; Sathe *et al.*, 2005). Como exemplo tem-se a `Ber e1` e a `Ses i 1`, duas proteínas descritas como importantes agentes alergênicos isolados de castanha-do-pará (*Bertholletia*

*excelsa*) e sementes de gergelim (*Sesamum indicum*), respectivamente (Monsalve *et al.*, 2001; Sathe *et al.*, 2005). Elas estão associadas com a imunoglobulina E (IgE) e são uma das maiores causa de reações alérgicas severas (Pastorello *et al.*, 1998; Pastorello *et al.*, 2001).

As albuminas 2S são proteínas com uma massa molecular de até 15 kDa, geralmente contendo oito ou mais resíduos de cisteína que formam ligações dissulfeto. As funções

## I. Introdução

---

fisiológicas destas proteínas ainda não estão claras, mas o seu papel como doadores de nitrogênio e enxofre têm sido sugeridos com base em sua composição de aminoácidos, da abundância em sementes e de sua mobilização durante a germinação (Youle e Huang, 1979;

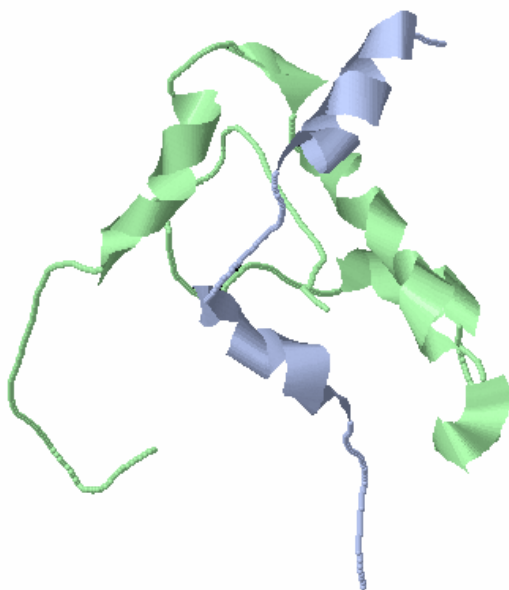
Barciszewski *et al.*, 2000). A maioria das albuminas 2S é sintetizada como proteínas precursoras com um ou mais passos de modificações pós-transcricionais. As napinas, por exemplo, constituem um grupo de albuminas 2S de *Brassica napus*, e são sintetizadas como precursores de 20 kDa, sendo subseqüentemente clivadas em quatro posições, resultando em duas subunidades de 4,5 kDa e 10 kDa, ligadas por pontes dissulfeto (Gehrig e Biemann, 1996; Muren e Rask, 1996; Muntz *et al.*, 1998). Os dados estruturais sobre as albuminas 2S têm sido obtidos por estudos com a BnIb, uma napina proveniente de sementes de *B. napus* (Rico *et al.*, 1996), com a RicC3, uma proteína de armazenamento de *Ricinus communis* (Pantoja-Uceda *et al.*, 2003), e com a estrutura de SFA-8 de sementes de *Helianthus annuus* (Pantoja-Uceda *et al.*, 2004). A figura 8 ilustra a estrutura tridimensional por ressonância magnética de BnIb, mostrando uma composição em  $\alpha$ -hélices e loops (Rico *et al.*, 1996).

Apesar de alguns estudos apontarem albuminas do tipo 2S como primariamente alergênicas, tais como as relatadas em castanha-do-pará (*Bertholletia excelsa*) e castanha de caju

(*Anacardium occidentale*) (Moreno *et al.*, 2004; Robotham *et al.*, 2005; Puumalainen *et al.*, 2006), alguns trabalhos descrevem a presença de proteínas deste grupo com atividades secundárias contra fungos filamentosos (Wang *et al.*, 2001; Agizzio *et al.*, 2003). No entanto, somente poucos relatos descrevem albuminas 2S como antifúngicas, tais como as isoladas de

## I. Introdução

---



**Figura 8:** Estrutura tridimensional de BnIb de *Brassica napus*, uma proteína da família das albuminas 2S. Cores verde e azul ilustram fitas- $\beta$  e  $\alpha$ -hélices. (Fonte: Rico *et al.*, 1996).



## I. Introdução

---

sementes de *Raphanus sativum* (Terras *et al.*, 1992), *Passiflora edulis* (Agizzio *et al.*, 2003), *Malva parviflora* (Wang *et al.*, 2001) e espécies de *Brassica* (Terras *et al.*, 1993).

### **3.2. Proteínas ricas em glicina**

Proteínas ricas em glicina (PRGs) aparecem como um novo grupo de moléculas de plantas com atividade contra o crescimento de bactérias. Elas foram primeiramente descritas como proteínas de armazenamento, sendo usadas como fontes essenciais de aminoácidos (Mousavi, 2005). Estudos anteriores revelaram que genes de proteínas ricas em glicinas podem ser encontrados em tecidos vasculares, principalmente no xilema (Ryser, 1992; Keller, 1988; Keller, 1989), apesar de também poderem ser encontrados em cotilédones e outras partes da planta (Ye, 1991).

As PRGs podem ser caracterizadas pelo alto conteúdo de resíduos de glicina na sua estrutura primária, mas a concentração deste aminoácido varia em cada organismo (Mousavi, 2005). As proteínas ricas em glicina podem ser classificadas dentro de três grupos principais, de acordo com o conteúdo de glicina e a presença de domínios conservados. Assim, o primeiro grupo contém proteínas que apresentam mais de 70% de sua seqüência com glicinas, tais como as

PRGs de *A. thaliana* e *B. napus* (Ringli, 2001; Mousavi & Hotta, 2005). Proteínas com domínios adjacentes aos domínios com quantidades menores de resíduos de glicina pertencem ao segundo grupo, como é o caso das PRGs de tomate (Ringli, 2001). Há também um terceiro grupo que inclui proteínas com conteúdo elevado de glicinas,

## I. Introdução

---

mas sem os domínios particularmente ricos em glicina (Ringli, 2001; Mousavi & Hotta, 2005).

A expressão de genes prg parece estar relacionada com indução de estresses sendo influenciada por alterações no meio ambiente, como ferimento, tratamentos com hormônios, baixa temperatura e desidratação (Keller, 1988; de Oliveira, 1990; Bergeron, 1994; Keister, 1995; Laberge, 1993; Condit; 1987). Além disso, estudos têm demonstrado que a atividade de proteínas ricas em glicina é elevada em condições de adaptação ao frio, aumentando a tolerância ao gelo, como também podem atuar como fatores de ligação ao RNA, sendo importantes no controle do seu processamento, transporte desta molécula no citoplasma, bem como na sua estabilidade (Shinozuka, 2006). Ademais, foi observado que proteínas deste grupo poderiam alterar o tempo de germinação e desenvolvimento da plântula sob condições de estresse, tais como aumento da concentração de sal e desidratação, uma vez que a produção de seu RNA aumenta, proporcionando também o aumento da síntese e expressão de RNAs ativos em diversos órgãos da planta (Kwak, 2005). Finalmente, proteínas ricas em glicina mostraram atividade contra fitopatógenos (Egorov, 2005). Estudos anteriores mostram que oito proteínas isoladas de sementes de *Triticum kiharae* não demonstraram atividade contra bactérias, mas mostraram

capacidade de inibir o crescimento de fungos filamentosos, tais como *Helmintrhospodium sativum* e *Fusarium culmorum* (Egorov, 2005).

## I. Introdução

---

### ***3.3. Defensinas e tioninas.***

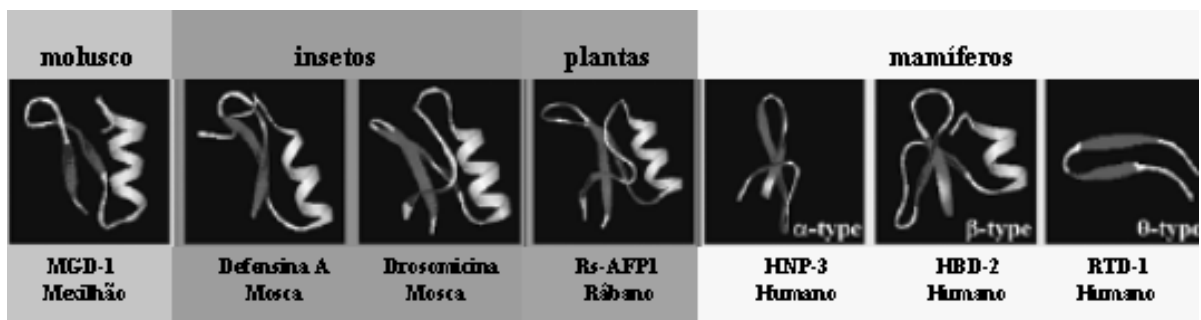
Defensinas de plantas são pequenas proteínas catiônicas, alcançando cerca de 45-54 resíduos de aminoácidos, estabilizados por quatro ligações dissulfeto, que formam uma macromolécula com peso molecular em torno de 5,0 kDa (Thomma *et al.*, 2002).

confusão no sentido de determinar se uma proteína é uma  $\gamma$ -tionina ou uma defensina, pois ambas apresentam diferenças estruturais mínimas.

As defensinas com atividade antimicrobiana podem ser tanto inibidoras do crescimento de fungos fitopatogênicos, quanto de bactérias nocivas a plantas, ou mesmo ao homem (Thomma *et al*, 2002). Não obstante, observa-se um maior número de defensinas contra fungos do que contra bactérias devido à ocorrência de um maior número de pesquisas

## I. Introdução

---



**Figura 9.** Estrutura tridimensional de defensinas de plantas, invertebrados (insetos e moluscos), e de vertebrados (mamíferos). As estruturas foram retiradas do banco de dados de proteínas (<http://www.resb.org/pdb>; Números de

acesso para o PDB: MGD-1: 1FJN, defensina A: 1ICA, drosomicina: 1MYN, Rs-AFP1: 1AYJ. HNP-3: 1DFN, HBD-2: 1FD3. RTD-1: 1HVZ). (Figura modificada de Thomma *et al.*, 2002)

## I. Introdução

---

direcionadas a atividades antifúngicas das defensinas em detrimento de suas funções antibacterianas.

Os peptídeos antifúngicos geralmente são ativos contra mais de uma espécie, como é o caso do peptídeo tipo-defensina de *Phaseolus vulgaris*, o qual apresentou atividade contra *F. oxysporum* e *Mycosphaerella arachidicola* (Wang & Ng, 2007), e do peptídeo de *Trigonella foenum-graecum*, o qual mostrou capacidade de inibir o crescimento de *Rhizoctonia solani* e *Phaeoisariopsis personata* (Olli & Kirti, 2006). Todavia, geralmente as defensinas de plantas também podem apresentar atividade específica contra um único patógeno, como é o caso da defensina de *Pisum sativum*, a qual apresentou atividade contra *Neurospora crassa* (Lobo *et al.*, 2007). Outro exemplo é a NaD1 de *Nicotiana glauca* que apresenta atividade contra *Fusarium oxysporum* (Lay, *et al.*, 2003).

As defensinas de planta com atividade antibacteriana podem ser encontradas principalmente como agentes fitopatogênicos como, por exemplo, dois peptídeos de bambu (*Phyllostachys pubescens*), *Pp-AMP1* e *Pp-AMP2*, que apresentaram atividade contra *Agrobacterium radiobacter*, *A. rhizogenes*, *Clavibacter michiganensis*, *Curtobacterium*

*flaccumfaiens* e *Erwinia carotovora* (Fujimura *et al.*, 2004). Ademais, algumas defensinas de plantas têm sido descritas por apresentar atividade contra bactérias patogênicas ao homem, como a sesquina, um peptídeo tipo-defensina isolado de *Vigna sesquipedalis*, a qual foi capaz de inibir o crescimento de *E. coli* (Wong & Ng, 2005).

## I. Introdução

---

Recentemente, uma tionina e feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*) denominada Cp-tionina II apresentou atividade contra bactérias patogênicas ao homem como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas syringae*, como também apresentou atividade inibitória do crescimento de fitopatógenos, tais como *Ralstonia solanacearum*, *Rathaybacter* sp e *Erwinia* sp (Franco *et al.*, 2006).

Uma defensina vegetal pode apresentar tanto uma função única, como duas ou mais funções, sendo uma principal e outra secundária, com relação à importância de atuação. Um exemplo é a defensina de *Vigna radiata* denominada VrD1, a qual demonstrou atividade antifúngica contra *Fusarium oxysporum*, *Pyricularia oryza*, *Rhizoctonia solani*, e *Trichophyton rubrum*, bem como atividade inibitória de  $\alpha$ -amilase de *T. molitor* (Chen *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2006). Um peptídeo homólogo às defensinas de plantas denominado phaseococina e isolado de *Phaseolus coccineus* mostrou atividade antifúngica contra *Botrytis cinerea*, *Coprinus comatus*, *F. oxysporum*, *Mycosphaerella arachidicola*, *Physalospora pircicola*, e *Rhizoctonia solani*, atividade antibacteriana contra diversas espécies de *Bacillus* sp, bem como foi capaz de inibir a proliferação de células de leucemia do tipo HL60 e L1210 (Nqai & Nq, 2005).

As defensinas de plantas também podem ser potentes inibidores enzimáticos, agindo na interação com  $\alpha$ -amilases e proteases. Assim, tem-se descrito a presença de peptídeos de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*) com capacidade para se interagir com tripsina bovina, causando inibição da sua atividade (Melo *et al.*, 2002).

## I. Introdução

---

Além disso, observou-se a presença de defensinas de *Vigna radiata* e *Hordeum vulgare* com atividade inibitória em  $\alpha$ -amilases de insetos (Bruix *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 2006).

Tem-se mostrado que a expressão constitutiva de defensinas de rabanete (*R. sativus*) aumenta evidentemente a resistência de plantas de tabaco (*N. tabacum*) contra fungos patogênicos, tais como *Alternaria longipes* (Terras *et al.*, 1995), o mesmo sendo observado em tomateiros, sendo que, neste caso, a resistência foi contra o fungo *Alternaria solani* (Parashina *et al.*, 2000; Thomma *et al.*, 2002). Portanto, as defensinas de plantas não somente podem atuar na defesa de seu organismo de origem, como também podem ter atividade inibitória contra patógenos de outras espécies de plantas, podendo ser usados em plantas geneticamente modificadas (Vigers, 1991; Thomma *et al.*, 2002). Com isso, torna-se também possível o desenvolvimento de bio-inseticidas a partir da construção de plantas transgênicas produtoras de proteínas de defesa.

## II. Objetivos

---

## II. OBJETIVOS

Caracterizar bioquímica e molecularmente diferentes peptídeos de sementes de frutas e grãos (*P.edulis*, *P. guajava* e *V. unguiculata*) com atividades antimicrobianas ou inseticidas.

### 1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

#### *1.1. Objetivos específicos as atividades antimicrobianas:*

- Isolar e purificar peptídeos de sementes de maracujá (*P. edulis*) e goiaba (*P. guajava*) por cromatografia de Red-Sepharose seguida por cromatografia de fase reversa em HPLC;
- Analisar a massa molecular dos peptídeos obtidos por espectrometria de massa (MALDI-TOF e Eletrospray);
- Sequenciar os respectivos peptídeos;



- Modelar a estrutura tridimensional a partir das seqüências primárias dos respectivos peptídeos;
- Avaliar o mecanismo de ação destes peptídeos por meio de análise da estrutura tridimensional;
- Testar os peptídeos contra bactérias gram-negativas patogênicas ao homem;

## II. Objetivos

---

- Testar os peptídeos contra fungos fitopatogênicos;
- Testar os peptídeos contra fungos patogênicos ao homem.

### ***1.2. Objetivos específicos as atividades inseticidas:***

- Clonar o gene de interesse que codifica uma defensina em feijão-de-corda;
- Expressar o gene em células bacterianas;
- Testar a ação desta proteína contra enzimas digestivas de insetos;
- Obter a estrutura tridimensional *in silico* da defensina de feijão-de-corda;
- Analisar *in silico* a interação entre a defensina e enzimas de inseto;
- Testar a competitividade da defensina de feijão-de-corda com o substrato por meio de ensaios enzimáticos.

### III. Material e Métodos

---

## III. MATERIAL E MÉTODOS

### 1. Proteínas de Reserva: albuminas 2S e proteínas ricas em glicina

#### 1.1. Extração e isolamento dos peptídeos antimicrobianos

As sementes de maracujá (*P. edulis*) e goiaba (*P. guajava*) foram secas e trituradas e suas proteínas foram extraídas utilizando solução de HCl 1% contendo NaCl a 0,6M (1:3 m/v). Este extrato foi centrifugado a 5.000 rpm em 4°C, e o sobrenadante submetido à precipitação com sulfato de amônio (0-100%). Após a precipitação, o material foi dialisado e novamente centrifugado a 5000 rpm por 20 min a 4°C sendo o precipitado colocado em diálise contra água destilada. Após nova centrifugação, o sobrenadante foi liofilizado. A fração precipitada com sulfato de amônio foi aplicada em coluna de Red-Sepharose equilibrada com tampão Tris-HCl 0,15 M contendo CaCl<sub>2</sub> 5,0 mM. A fração não retida foi removida com o tampão de equilíbrio, e o pico retido foi eluído com único passo de NaCl 3,0 M dissolvido no mesmo tampão. Após a diálise e liofilização, 1,0 mg da fração retida foi dissolvida com o pareador iônico ácido trifluoracético 0,1% e aplicado em cromatografia de fase reversa em coluna analítica de HPLC

(Vydac C-18TP 522). As proteínas retidas foram eluídas com um gradiente linear de acetonitrila (0-100%), liofilizadas e armazenadas a 20°C.

### III. Material e Métodos

---

#### ***1.2. Análises de massa molecular por SDS-PAGE***

As massas moleculares dos peptídeos purificados por HPLC foram analisadas por SDS-PAGE de acordo com Laemmli *et al.* (1970). O gel concentrador utilizado foi a 4,5% (0,42 ml de acrilamida 30%; 1,75 ml de água destilada; 25 µl de persulfato de amônio 10%; 3 µl de TEMED (N, N, N', N'- Tetrametiletilenediamina), 0,34 ml de tampão Tris-HCl pH 6, 8, com SDS 10%). O gel separador usado foi manufaturado a uma concentração de 15% (2,5 ml de acrilamida 30%; 1,2 ml de água destilada; 50 µl de persulfato de amônio 10%; 3µl TEMED; 1,25 ml de tampão Tris-HCl pH 8, 8, com SDS 10%). . Tampão de amostra 1x (Tris-HCl pH 6.8 0,08M; SDS 2,0%; β-mercaptoetanol 2,0%; Sacarose 12%; Azul de bromofenol 0,002%) foi adicionado às amostras e fervidas por 5 min antes de serem aplicadas no gel. O marcador de peso molecular foi utilizado segundo instruções do fornecedor (Sigma). As amostras correram no gel a 200 volts por 45 minutos e foram coradas com nitrato de prata (Blum *et al.*, 1987).

#### ***1.3 Analise de massa molecular por MALDI-TOF***

A amostra das frações obtida por HPLC foi analisada por espectrometria de massa de acordo com Franco *et al.* (2000). As amostras liofilizadas das frações de HPLC foram preparadas para análise de MALDI-TOF Voyager-DE STR Bioworkstation. As amostras foram diluídas em ácido trifluoracético 1.0% e a matriz foi adicionada. A matriz foi composta por ácido sinapínico (uma solução dissolvida de acetonitrila/ácido trifluoracético

### III. Material e Métodos

---

0.1% 1:1, v/v). A solução foi homogeneizada em vortex, sendo 1.0ml aplicado no Voyager Bioworkstation.

As amostras foram secadas a temperatura ambiente. O espectrômetro foi operado em modo linear. Os íons das amostras foram irradiados com um laser N2 em comprimento de onda de 337nm, e acelerado a um potencial de 23kV na fonte do íon com um atraso de 150ns. As amostras foram, então, ionizadas com 100-200 tiros em um pulso de laser de 3ns. O sinal foi digitalizado a uma fração de 500 MHz e os dados avaliados foram mostrados num sistema de dados padrão do Voyager para manipulação.

#### ***1.4 Análises de massa molecular por Electrospray***

A massa molecular dos peptídeos de semente de goiaba foram analisados por ESI-Q-TOF (Bruker). 2,0 mg.l<sup>-1</sup> da solução de peptídeos foi injetada numa coluna Vydac dC18, sendo o solvente A consistindo de ácido fórmico a 0,1% em água, e o solvente B de ácido fórmico a 0,1% em acetonitrila. Os peptídeos foram separados usando gradientes lineares de solvente B e,

posteriormente, inseridos no eletrospray do espectrômetro de massa Q-TOF, ajustados com uma fonte nanoLockSpray, numa velocidade de 250nl/min. O espectro de massa foi adquirida m/z de 300-1600 para 1s, seguidos por 3 escaneamentos de MS/MS de m/z de 50 a 1900 por 1s cada. A energia de colisão usada para o MS/MS variou de acordo com a massa e o estado da carga do peptídeo eluído. Leu-enk, um calibrante de massa, ou Lockmass, foi adicionado numa concentração de cerca de 250 nl/min e adquirido por 1<sup>a</sup> a cada 2 min através da corrida (Moraes & Lago, 2003).

### III. Material e Métodos

---

#### *1.5 Seqüenciamento dos peptídeos por espectrometria de massa*

As frações obtidas de HPLC de *Pg*-AMP1 foram liofilizadas pra remoção dos compostos voláteis (acetonitrila e o ácido trifluoracético). A seqüência do peptídeo foi determinada usando análise MS como descrito por Wang *et al.* (2000) com modificações. As amostras de proteínas foram incubadas com tripsina (Promega) 10 µg/ml em Tris-HCl 2,5 mM por 24 h a 37° C. Os fragmentos trípticos foram, então, eluídos em acetonitrila 50% e ácido trifluoracético 0,5% por difusão, facilitado por ultra-sonicação. As frações liofilizadas foram dissolvidas em água milliQ misturadas em uma solução saturada de uma matriz constituída por ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (1:3), depositada em uma placa do tipo Anchorchip com 600 mm e secas a temperatura ambiente. Os peptídeos que tiveram suas massas moleculares exatas determinadas utilizando um espectrômetro de massa MALDI-TOF/TOF UltraFlex II (Bruker Daltonics, Alemanha) foram devidamente seqüenciados, utilizando calibração externa sob modo de operação refletido e positivo. Íons que apresentaram relação sinal-ruído foram submetidos a

fragmentação (MS/MS) sob modo de operação LIFT. Os espectros foram obtidos num modo de extração com reflexão retardada sob uma faixa de massas variando de 1.000-7.000 Da.

### III. Material e Métodos

---

Isoformas encontradas por alguma proteína foram analisadas pelas ferramentas FindMod e Peptide Mass em ExPaSy para prever possíveis modificações das mesmas. Homologia de sequência foi feita usando-se os programas BioEdit e FASTA3 (Pearson, 1990; Pearson e Lipman, 1998).

#### ***1.6 Seqüenciamento por Edman***

As amostras obtidas de HPLC (Vydac C-18) de *Pe*-AFP1, usando um gradiente linear de 0-100% de acetonitrila em ácido trifluoracético 0.1% (v/v), foram utilizadas para dessalinizar as amostras. A seqüência de aminoácidos do N-terminal ao C-terminal das proteínas de sementes de maracujá foi determinada, usando uma degradação automática padrão de Edman, de 2 a 5 pmol de amostra alquilada, num seqüenciador PPSQ-23 de Shimadzu (Gray & Smith, 1970; Gray, 1967a,b). As seqüências foram comparadas com o banco de dados SWISSPROT, utilizando o programa FASTA3 (Pearson & Lipman, 1988).

### ***1.7 Bioensaios contra bactérias***

Os testes contra as bactérias foram realizados em meio líquido LB (50% Bactotripton, 25% Extrato de levedura e NaCl 5.0g.l<sup>-1</sup>, diluídos em água destilada), utilizando como controle negativo água destilada e como controle positivo cloranfenicol 40µg.ml<sup>-1</sup>. Os peptídeos foram avaliados em diferentes concentrações padrões, variando de 2,0 a 100,0 µg. ml<sup>-1</sup>. As bactérias foram previamente incubadas em meio LB (Luria Bertani) a 37°C a 4000 rpm por 18 h. Após este período, elas foram transferidas para outro frasco

### **III. Material e Métodos**

---

contendo meio LB, onde foram acrescentados os peptídeos a serem testados bem como os controles acima descritos.

A solução foi incubada novamente a 37°C sob agitação por períodos de 1, 2, 3 e 4 horas. O crescimento bacteriano foi determinado por espectrofotometria em leituras temporais consecutivas utilizando um comprimento de onda de 595 nanômetros. Os ensaios foram feitos com dois gêneros de bactérias gram-negativas causadoras de infecções urinárias na população brasileira, *Klebsiella* sp e *Proteus* sp.

### ***1.8 Bioensaios contra fungos***

Os testes contra fungos foram realizados de duas formas: um teste inicial qualitativo e outro, quantitativo. Ambos foram realizados com *Pe*-AFP1 e *Pg*-AMP1. O primeiro teste foi feito através de inoculação de 50 µl de amostra a uma concentração de 13.6 µg/ml (pico retido da Red-Sepharose) em discos de papel de filtro sobre meio sólido BDA (Agar batata dextrose: 1.0 g de

glicose, 10g de batata e 2.5g de Agar, água destilada). Os fungos foram inoculados no centro da placa (*Aspergillus* sp, *Fusarium* sp e *Trichoderma* sp), e os discos de papel nas laterais, margeando o inóculo do fungo. Os meios foram mantidos em temperatura ambiente (25° C) por sete dias. A análise foi feita medindo-se o tamanho dos halos em volta dos discos.

O efeito quantitativo de *Pe*-AFP1 e *Pg*-AMP1 sobre o crescimento dos três fungos filamentosos testados inicialmente foram realizados de acordo com *et al.* (2004) com pequenas modificações. Os fungos cresceram em 20 ml de meio MYG (extrato de malte

### III. Material e Métodos

---

0,5%; extrato de levedura 0,25%; glicose 1,0%; pH 6,0) por 48 h a 25°C na presença e ausência dos peptídeos antimicrobianos nas concentrações de 10, 20, 50 e 100 µg mL<sup>-1</sup>.

Água destilada foi usada como controle negativo e capitan 0,5%, como controle positivo. A avaliação da inibição do crescimento em comparação com ambos os controles foi obtida por mensuração do peso seco dos fungos após 48 h de incubação a 28° C. Cada ensaio foi feito em triplicata.

#### ***1.9 Análise in silico e modelagem molecular***

As seqüências de aminoácidos de *Pe*-AFP1 e *Pg*-AM1 foram comparadas com outras proteínas no NCBI Protein Data Bank ([www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov)). Um alinhamento usando os programas ClustalW (Thompson, 1994) e BioEdit (Hall, 1999) foi utilizado para os peptídeos com o objetivo de se analisar similaridades entre as seqüências primárias dentro do grupo das proteínas ricas em glicina.



Para o modelo proposto em 3D de Pg-AMP1, um alinhamento contra o banco de dados de estruturas de proteína foi executado. Para tal, o Bionfo Meta Server (Ginalski *et al.*, 2003) foi usado, mas não indicou nenhuma estrutura provável. Então, técnicas de predição de estrutura protéica por *ab-initio* foram executadas. Para isso, o pacote de dinâmica molecular Gromacs (Lindahl *et al.*, 2001) foi usado. Primeiramente uma estrutura primária foi construída usando o programa Deep View Swiss PDB Viewer (Guex *et al.*, 1997). Em seguida, essa estrutura foi colocada em uma caixa cúbica, centralizada e preenchida com moléculas de água. Uma simulação parcial de minimização de energia foi executada usando

### III. Material e Métodos

---

2000 passos de Steepest Descent com o intuito de remover possíveis impedimentos estereoquímico. Em seguida uma simulação completa foi executada usando temperatura e pressão de acoplamento de 300 k e 1 atm respectivamente, equações de movimento de Newton (MD) como método de dinâmica em 60.000 pico segundos. Toda a simulação foi executada em uma Workstation Sun AMD Opteron biprocessada. A trajetória e o modelo final foram visualizados utilizando o programa Pymol (DeLano, 2002).

## 2. Defensinas de plantas - inibidores de amilase

### 2.1 Extração de RNA e clonagem

O RNA total que codifica a defensina *Vu*D1 foi isolado de sementes de feijão-de-corda usando kit de extração em sementes de plantas (SIGMA – XNA-SS), seguindo instruções do fabricante. O cDNA foi obtido usando um produto de PCR gerado com primer de

oligonucleotídeos correspondentes ao clone de cDNA da planta cultivada (*V. unguiculata*) previamente descrito por Ishibashi *et al.* (1990). Direção sense: 5' ATGGAGAAGAAATCAATCG 3'. Direção anti-sense: 5' TTAACAGTTTCTGGTGCAC. O PCR foi realizado com 30 ciclos, seguindo os seguintes perfis: 94° C, 1 min; gradiente de temperatura (38° C – 48° C), 1 min; 72° C, 1 min, com o ciclo final modificado para incluir um tempo de extensão de 10 min a 72° C. O fragmento obtido por PCR foi analisado em gel de agarose a 1,8% e, então, transferido para células TOP

### III. Material e Métodos

---

10, e incubado *overnight* a 37° C sob agitação. Após nova amplificação, o produto de PCR foi purificado das células, utilizando-se kit para Miniprep (QIAprep Spin-Qiagen), seguindo instruções do fabricante. O fragmento de DNA purificado foi seqüenciado e comparado com fragmentos previamente clonados de defensinas de feijão-de-corda (Ishibashi *et al.*, 1990).

#### **2.2 Expressão em células bacterianas**

O cDNA completo de *VuD1* foi subclonado em vetor pHUE contendo seqüência para codificação de His-tag e ubiquitina, e transferido para células BL21 (DE3) usadas para expressão, como descrito por Catanzariti *et al.* (2004). As células foram cultivadas a 37° C em meio LB líquido (extrato de levedura 5g.l<sup>-1</sup>; triptona 10g.l<sup>-1</sup>; NaCl 10g.l<sup>-1</sup>) com adição de ampicilina (100 µg.ml<sup>-1</sup>), tetraciclina (10µg.ml<sup>-1</sup>) e cloranfenicol (10 µg.ml<sup>-1</sup>). As células foram incubadas por 3 horas e a expressão induzida por adição de IPTG a 0,4 mM. A expressão ocorreu durante incubação de mais 4 horas a 37° C sob agitação. As células foram então lisadas com tampão de

lise ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50mM; NaCl 300mM; Imidazol 10 mM), centrifugadas a 12000 rpm por 12 min e o sobrenadante, contendo o complexo protéico expresso, foi separado e congelado a  $-80^\circ\text{C}$ .

### III. Material e Métodos

---

#### ***2.3 Purificação dos peptídeos expressos***

O complexo protéico recombinante foi purificado por cromatografia de afinidade em coluna de níquel sob condições nativas, seguindo protocolo do kit *QIAexpress* (Qiagen). Inicialmente, foram adicionados 12 mg de lizosima às células e incubadas no gel por 5-12 minutos. As células foram, então, lisadas por sonicação (3 x 1 min a  $0^\circ\text{C}$ ) e a fração protéica solúvel foi obtida por centrifugação a  $4^\circ\text{C}$  (15 min a  $\sim 15.300\text{g}$ ). 0.75-1.5 ml de resina de níquel - ácido nitrilotriacético a 50% (Ni-NTA) em tampão A foi adicionado ao sobrenadante e colocado sob leve agitação por 1 h a  $4^\circ\text{C}$ . A mistura lisado/Ni-NTA foi centrifugada (5 minutos a  $\sim 550\text{g}$ ) e o sobrenadante coletado para análise em SDS-PAGE.

O precipitado remanescente da coluna de Ni-NTA foi lavado 4-6 vezes com 50 ml de tampão 2A. O complexo protéico foi eluído da resina em frações de 1ml com adição de tampão A contendo 50-250 mM de imidazol. Essas frações foram dializadas por 8-16 h a  $4^\circ\text{C}$ . Após clivagem do complexo protéico com Usp2-cc, uma pequena fração da resina Ni-NTA foi lavada

com uma solução contendo  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50mM (pH 8,0), NaCl 300mM, sendo o tampão removido a fim de decantar a resina em uma coluna de cromatografia. A reação completa de clivagem foi feita com adição de NaCl 300mM para inibir possíveis interações iônicas inespecíficas com a resina Ni-NTA, incubando-se a mistura a 4° C por 30 min sob leve agitação. A proteína de interesse clivada foi obtida após centrifugação da solução proteína/Ni-NTA e coleta do sobrenadante.

### III. Material e Métodos

---

#### **2.4. Insetos**

Larvas de *A. obtectus* e *Z. subfasciatus* foram gentilmente doadas pelo Laboratório de Interação Planta-Patógeno (Embrapa-Cenargen, Brasília, Brasil). As larvas foram incubadas a 28°C com umidade relativa de 70% ± 10%, com fotoperíodo de 12h. Os insetos foram constantemente mantidos num recipiente contendo sementes de feijão (*P. vulgaris*). As larvas que se desenvolveram foram transferidas para um recipiente imerso em gelo e os intestinos foram macerados e misturados a uma solução de NaCl 0,6%. Centrifugou-se a amostra por 10 minutos a 12000g, sendo o precipitado descartado. As enzimas de intestino retidas no sobrenadante foram avaliadas por meio de ensaios enzimáticos. Desta forma, concentrações variadas das enzimas foram incubadas com amido 1% por 20 minutos a 37° C.

A reação enzimática foi interrompida com adição de 500 ml de 3,5 DNS (ácido dinitrossalicílico a 1 % dissolvido em NaOH 0,2 M e tartarato de sódio-potássio 30%) e a solução fervida por 10 min. A avaliação da atividade enzimática foi feita por leitura de densidade óptica a

530nm. Considerou-se condição satisfatória de atividade enzimática valores com O.D. entre 0,300 e 0,600 a 530nm.  $\alpha$ -Amilases de pâncreas de porco (PPA), de saliva humana e de *Aspergillus fumigatus* foram obtidas comercialmente da Sigma Co.

### III. Material e Métodos

---

#### **2.5 Ensaio enzimático contra $\alpha$ -amilases**

A atividade dos peptídeos contra amilases foi realizada de acordo com Bernfeld (1955), com pequenas modificações. As proteínas foram testadas a concentrações variando de 5 a 100  $\mu\text{g/ml}^{-1}$ , diluídas em tampão acetato de sódio 0,05M, pH 6,0. As enzimas testadas foram  $\alpha$ -amilases de *C. maculatus*, *A. obtectus*, *A.s fumigatus*, *salivar humana*, pancreática de porco e de cevada e de *Z. subfasciatus*. Como substrato foi utilizado amido solúvel 1% . Cada fração foi incubada por 20 min a 37° C. A reação enzimática foi interrompida com adição de 500 ml de 3,5 DNS (ácido dinitrossalicílico a 1,0% dissolvido em NaOH 0,2 M e tartarato de sódio-potássio 30%) e a solução fervida por 10 min. A avaliação da atividade enzimática foi feita por leitura de densidade óptica a 530nm. Cada ensaio foi feito em triplicata.

## 2.6 Modelagem molecular

A modelagem molecular de *Vu*D1 foi feita inicialmente, fazendo-se um alinhamento da seqüência deste peptídeo no BioInfo Meta Server (Ginalski *et al.*, 2003) a fim de se obter um modelo para sua estrutura terciária. A melhor identidade obtida em FFAS03 (-37.900) foi usada, indicando uma defensina antifúngica de *P. sativum* (1jkz; Almeida *et al.*, 2000). A obtenção da estrutura tridimensional de *Vu*D1 foi feita com base na superposição com estrutura cristalizada da defensina de *ervilha*. Os resíduos foram sobrepostos utilizando-se o programa Modeller v8 (Marti-Renom *et al.*, 2000). Para um refinamento nos modelos das

### III. Material e Métodos

---

estruturas, um esquema de minimização de energia e visualização da dinâmica das moléculas foi usado, por meio do programa VMD (Humphrey *et al.*, 1996).

A interação entre *Vu*D1 e ZSA pôde ser visualizada utilizando-se estratégias de dockagem *in silico* por meio do Programa HEX (Ritchie, 2003). O modelo foi validado utilizando-se o Programa VADAR Web Server (Williard, 2003), e os resíduos de interação foram detectas por meio do Protein-Protein Interaction Server (Jones & Thornton, 1995).

## **IV. Resultados e Discussão**

---

### **IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **1. PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS**

##### ***1.1. Pe-AFP1 – uma nova albumina 2S de sementes de maracujá com atividade antifúngica.***

###### **1.1.1. Purificação e análises de massa molecular**

Primeiramente, o extrato bruto obtido a partir de sementes de maracujá (*Passiflora edulis*), foi precipitada com sulfato de amônio (100%) e, posteriormente dialisado e submetido em cromatografia de afinidade em coluna de Red-Sepharose Cl-6B. Esta coluna tem sido comumente utilizada para purificação de proteínas hidrofóbicas carregadas positivamente. As

proteínas retidas na coluna foram eluídas (Figura 10A), utilizando um único passo contendo NaCl 3M. A amostra do pico-retido apresentou diversas proteínas diferentes, com várias massas moleculares, variando de 5,0 a 80,0 kDa (Figura 11A, linha 1). Além disso, ensaios contra fungos mostraram que esta fração foi extremamente ativa contra *A. fumigatus* e *F. oxysporum*. Por outro lado, a fração não-retida não apresentou nenhuma atividade antimicrobiana. A fração retida na coluna de afinidade foi dialisada e aplicada em uma cromatografia de fase-reversa HPLC (Vydac C18-TP), onde a proteína de interesse foi

#### IV. Resultados e Discussão

---

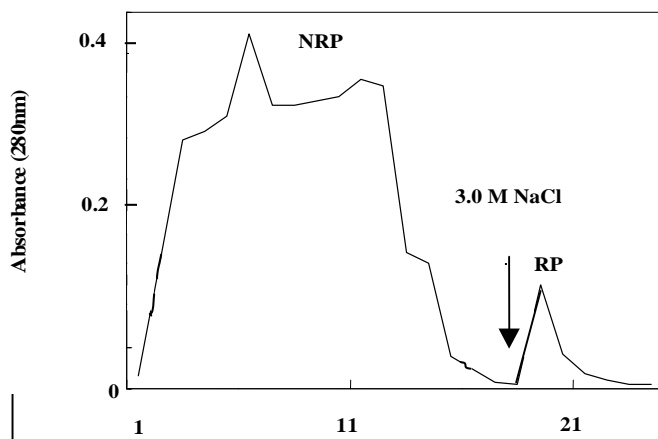
eluída a uma concentração de 40% de acetonitrila (Figura 10B). O cromatograma gerado a partir do HPLC mostrou diversos picos, eluídos em concentrações crescentes de acetonitrila variando de 6 a 70%. Contudo, somente as proteínas do pico eluído com 40% de acetonitrila apresentaram atividade antimicrobiana contra fungos filamentosos das espécies *F. oxysporum* e *A. fumigatus*. Este pico foi re-cromatografado na mesma coluna, utilizando um gradiente não-linear de acetonitrila (20-50%) (Figura 10B, canto superior direito), onde um peptídeo totalmente purificado, com aproximadamente 5,0 kDa foi obtido (Figura 12A, linha 2). Análises de espectrometria de massa desta fração mostraram a presença de um peptídeo com massa molecular de 5.336,79 Da. Este peptídeo foi denominado *Pe-AMP1* (Figura 11B).

Estes passos de purificação, que incluem a cromatografia de afinidade Red-Sepharose seguida de cromatografia de fase-reversa em coluna Vydac C18-TP, são similares aos métodos



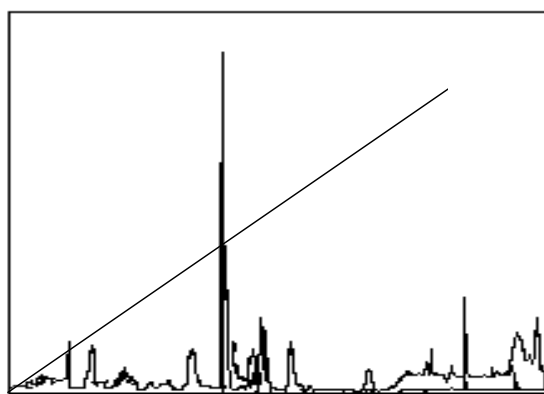
empregados para purificação de proteínas de defesa de plantas (Bloch & Richardson, 1991; Melo *et al.*, 1999; Melo *et al.*, 2002). Ademais, concentrações semelhantes de acetonitrila em colunas de fase reversa têm sido utilizadas para eluição de peptídeos com atividade antimicrobiana como os isolados de bambu (*Phyllostachys pubescens*), Pp-AMP1 e Pp-AMP2 eluídos a 41% de acetonitrila (Fujimura *et al.*, 2005). Além disso, defensinas de *N. alata* e *P. hybrida* foram eluídas a uma concentração de 30,7% e 29,5% de acetonitrila, respectivamente (Lay *et al.*, 2003). Além de defensinas, proteínas ligantes à quitina, isoladas de folhas de beterraba, também foram eluídas em concentrações semelhantes de acetonitrila em cromatografias de fase-reversa HPLC (Nielsen *et al.*, 1997).

#### IV. Resultados e Discussão



**A**

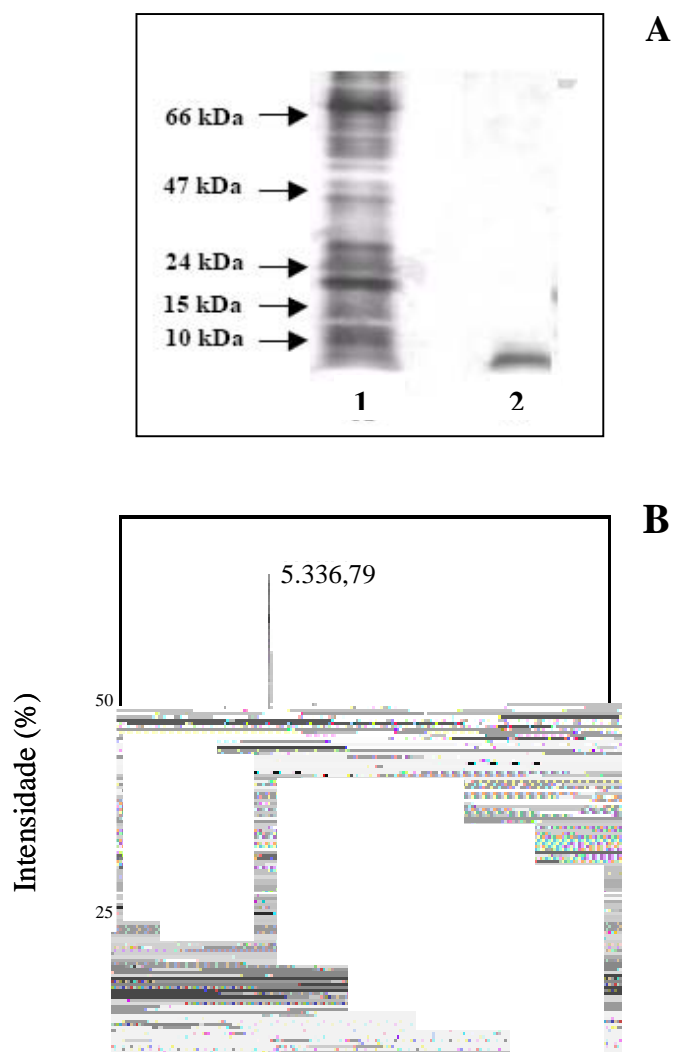
**B**



**Figura 10.** A) Cromatogramas provenientes da fração rica aplicada em resina de afinidade Red-Sepharose CI-6B NRP corresponde ao pico não-retido e RP corresponde ao pico retido. A seta indica eluição das proteínas retidas com adição de tampão Tris-HCl 0,15M, pH 7,0 contendo NaCl 3,0M e CaCl<sub>2</sub> a 0,05M. B) Cromatografia de fase-reversa HPLC (Vydac C18-TP) do pico retido de Red-Sepharose. A linha diagonal representa o gradiente linear de acetonitrila. Gráfico no canto superior direito indica re-cromatografia das amostras presentes no pico de 40% de acetonitrila.

#### IV. Resultados e Discussão

---



**Figura 11.** Análise da purificação do peptídeo através de A) SDS-PAGE das proteínas retidas em coluna de Red-Sepharose (linha 1) e *Pe*-AFP1 purificada (linha 2) obtida de sementes de maracujá. B) Espectrometria de massa MALDI-TOF dos peptídeos purificados a 40% de acetonitrila por HPLC em coluna Vydac C-18 TP.

#### IV. Resultados e Discussão

---

Neste estudo pôde-se verificar que a metodologia escolhida pode ser utilizada para purificação de diversos peptídeos de defesa de plantas pertencentes às mais variadas classes.

##### **1.1.2. Seqüenciamento dos aminoácidos e alinhamento**

O seqüenciamento parcial de *Pe*-AFP1 revelou um fragmento N-terminal de 25 resíduos na seguinte ordem: Q S E R F E Q Q M Q G Q D F S H D E R F L S Q A A (Figura 13). A seqüência *Pe*-AFP1, quando avaliada contra o banco de dados FASTA3 mostrou similaridades claras com albuminas 2S de inúmeras fontes vegetais, mostrando resíduos extremamente conservados (Figura 12). Utilizando-se o programa FASTA3 (Pearson & Lipman, 1988), *Pe*-AFP1 mostrou 86%, 84% e 83% de similaridade com proteínas do tipo albumina 2S de *P. edulis*,

*V. vinifera* e *S. indicum*, respectivamente (Tai *et al.*, 2001; Li & Gray, 2005). *Pe*-AFP1 também mostrou 50-70% de similaridade com albuminas 2S de *R. communis*, *B. excelsa* e *G. max* (Irwin *et al.*, 1990; Gander *et al.*, 1991; Jung *et al.*, unpublished) e baixa similaridade (menos de 45%) com albuminas de *M. parviflora*, *R. sativum*, *P. glauca* e *B. napus* (Terras *et al.*, 1992; Rico *et al.*, 1996; Dong & Dunstan, 1999; Wang & Bunkers, 2000; Wang *et al.*, 2001; McInnis *et al.*, unpublished). Além disso, *Pe*-AFP1 também foi comparado a outra albumina 2S de *P. edulis*, apresentando 50% de resíduos de aminoácidos idênticos. Apesar do peptídeo 2S de *P. edulis* previamente descrito por Agizzio *et al.* (2003) apresentar Cis<sub>5</sub> e Cis<sub>13</sub> conservados, típicos de albuminas 2S, *Pe*-AFP1 mostra diferentes aminoácidos nestas posições (Phe<sub>5</sub> e Glu<sub>13</sub>) (Figura 12, asteriscos).



#### IV. Resultados e Discussão

---

Esta particularidade foi compartilhada somente com CW-1 de *M. parviflora*, que mostrou o resíduo Phe<sub>5</sub> e um resíduo ácido, Glu, na posição 13. Estes dados sugerem que padrões diferentes de formação de ligações dissulfeto podem ser encontrados em albuminas 2S com atividade antifúngica.

De fato, o fragmento de aminoácidos seqüenciado de *Pe*-AFP1 provavelmente representa a primeira e a segunda hélice da proteína 2S, em comparação com estruturas de proteínas do tipo napina (Puumalainen *et al.*, 2006). Comparações adicionais com outras proteínas de plantas do tipo 2S, tais como a BnIb de *B. napus* e SFA-8 de *Helianthus annuus*, revelaram que a posição destas hélices é amplamente variada e com uma diversidade elevada de aminoácidos (Rico *et al.*, 1996; Pantoja-Uceda *et al.*, 2004). Ademais, *Pe*-AFP1 e a proteína previamente descrita de *P. edulis* mostram massas moleculares diferentes, sugerindo que esta planta apresenta, pelo menos, duas formas de proteínas antifúngicas pertencentes à família 2S albumina.

Do mesmo modo, membros deste grupo de proteínas de armazenamento estão presentes em diversas dicotiledôneas e tem sido comprovado o seu envolvimento em inúmeras reações alérgicas. Dentre estas podemos incluir as albuminas 2S de castanha-do-pará, castanha-de-caju, *B. napus* e *B. rapa* (Terras *et al.*, 1992; Breiteneder & Radauer, 2004; Robotham *et al.*, 2005; Koppelman *et al.*, 2005). *Pe*-AFP1 mostrou pouca similaridade com estas proteínas indicando que provavelmente estes peptídeos se enquadram na classe das albuminas 2S não alergênicas. Entretanto, a alergenicidade deste peptídeo de maracujá provavelmente será avaliada em estudos posteriores.

#### IV. Resultados e Discussão

---

Estudos prévios têm proposto que proteínas pertencentes a este grupo são primariamente moléculas de armazenamento, sendo o principal interesse para outros estudos, suas características como alergênicos (Breiteneder & Radauer, 2004). O primeiro membro da família das albuminas 2S, com atividade contra o cresciment

#### IV. Resultados e Discussão

---

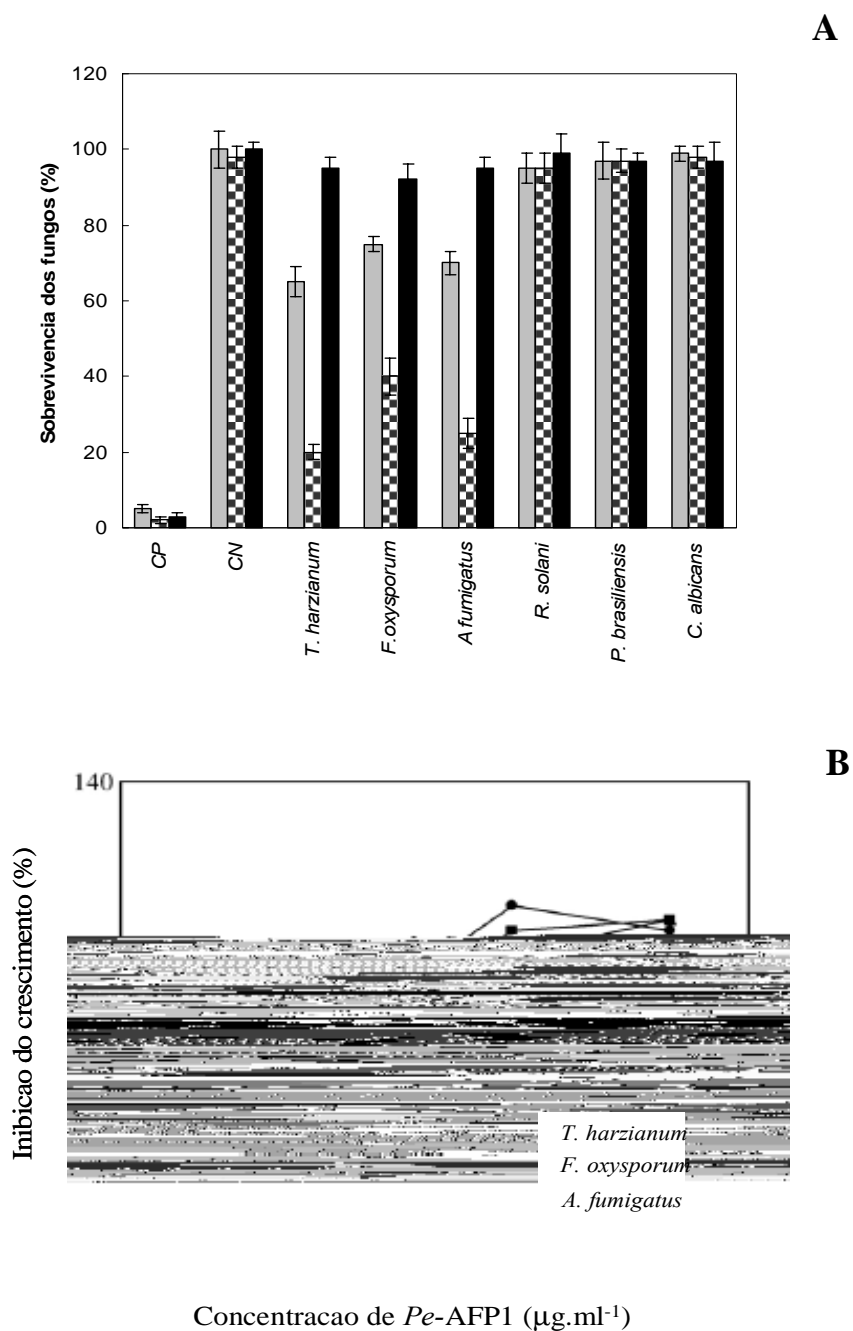
de *F. oxysporum*, mas foi incapaz de inibir o crescimento de *R. solani*, *P. brasiliensis* e de *C. albicans* (Figura 13A), quando comparado com os respectivos controles. As concentrações utilizadas de *Pe*-AFP1 para os ensaios contra *T. harzianum*, *F. oxysporum* e *A. fumigatus* foram 32, 34 e 40  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. *Pe*-AFP1 mostrou uma maior inibição do *A. fumigatus* e *F. oxysporum* a uma concentração de 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , enquanto que a inibição de *T. harzianum* ocorreu de forma mais intensa a uma concentração de 75  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Figura 13B).

Poucos foram os dados demonstrados para albuminas 2S relativas à atividade antimicrobiana, com algumas exceções para atividades contra fungos filamentosos (Agizzio *et al.*, 2003). Proteínas pertencentes a essa família foram isoladas de *M. parviflora*, mostrando efeitos inibitórios no crescimento de *F. graminearum* e *Phytophthora infestans* (Wang *et al.*, 2001). Outros poucos estudos utilizando albuminas 2S isoladas de espécies de *Brassica* também apresentaram propriedades antifúngicas e foram capazes de inibir o crescimento de *F. oxysporum*, *F. culmorum*, *Alternaria brassicola*, *Botrytis cinerea*, *Pyrularia oryzae* e *Verticillium dahliae* (Terras *et al.*, 1993).

Possivelmente, as albuminas 2S podem estar envolvidas num interessante mecanismo de defesa de plantas, uma vez que efeitos sinérgicos *in vitro* entre  $\gamma$ -tioninas e albuminas 2S já foram descritos e podem ser vistos na inibição de crescimento de fungos filamentosos (Terras *et al.*, 1993). Neste trabalho, a presença de um novo peptídeo de sementes de maracujá foi demonstrada, o qual apresenta similaridades com proteínas do tipo 2S e ao mesmo tempo atividade antifúngica contra fungos nocivos à saúde humana, como o *A. fumigatus*. Este patógeno é um importante agente causador de pneumonias e outras infecções no trato respiratório, principalmente em pacientes com câncer e AIDS (Levitz, 1992; Lyman *et al.*,



#### IV. Resultados e Discussão



**Figura 13.** (A) Atividade antifúngica das proteínas do pico retido de Red-Sepharose (□) e da proteína purificada (▣). (■) corresponde a amostra bacteriana sem adição de proteínas. Barras verticais representam o desvio padrão. Cada ensaio foi feito em triplicata. (B) Ensaio *in vitro* de *Pe*-AFP1 contra os fungos filamentosos *T. harzianum*, *F. oxysporum* e *A. fumigatus*. Barras verticais representam o desvio padrão. Cada ensaio foi feito em triplicata.

1992). Portanto, *Pe*-AFP1 poderia contribuir, num futuro próximo, para a produção de novas drogas antifúngicas para controle de infecções em humanos.

Ademais, o peptídeo de sementes de maracujá também foi capaz de inibir o crescimento do fitopatógeno *F. oxysporum*. Este fungo causa infecções em diversas espécies de plantas agricultáveis, tais como tomateiro e algodoeiro (Gurgel *et al.*, 2005), podendo levar a perdas significantes na lavoura, e prejuízos na economia agrícola. Por isso, *Pe*-AFP1 também pode ser utilizado para o desenvolvimento de plantas transgênicas com resistência aumentada a fitopatógenos. Além disso, este estudo pode contribuir para o estabelecimento de um sistema de classificação consistente para as proteínas da família 2S albuminas, baseado nos padrões de ligações dissulfeto e para um melhor entendimento dos mecanismos de defesa de plantas.

### ***1.2 Proteína rica em glicina de sementes de goiaba (P. guajava)***

#### **1.2.1. Purificação e análise de massa molecular**

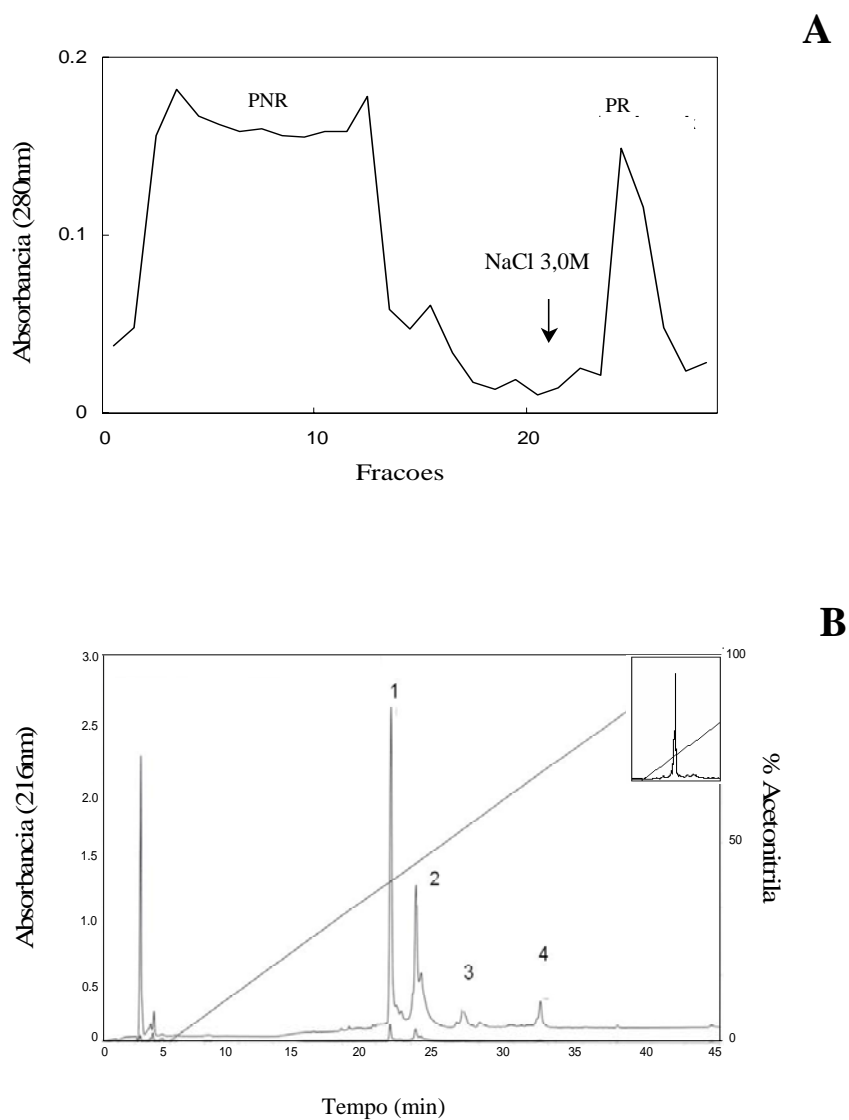
Como objetivo de se isolar peptídeos antimicrobianos, a fração precipitada com sulfato de amônio (100%) de sementes de goiaba (*P. guajava*) foi aplicada em uma coluna de afinidade Red-Sepharose Cl-6B, originando um pico retido (Figura 14A) que foi ativo contra bactérias patogênicas como *Klebsiella* sp e *Proteus* sp, ao passo que a amostra do pico não-retido não demonstrou atividade antibacteriana.

#### IV. Resultados e Discussão

---

A fração retida obtida em Red-Sepharose Cl-6B mostrou diversas proteínas quando analisado por SDS-PAGE, sendo que as massas moleculares observadas variaram entre 5.0 e 80.0 kDa (Figura 15A). Amostras do pico retido foram, então, submetidas a uma cromatografia de fase-reversa (HPLC), revelando um pico majoritário de 42% de acetonitrila (Figura 14B). Amostras deste pico foram re-cromatografadas usando um gradiente não linear de acetonitrila (20-50%), revelando um peptídeo purificado eluído em 42% de acetonitrila (dados não mostrados). Após a cromatografia, as amostras do pico de HPLC foram submetidas à análise de massa molecular por SDS-PAGE, mostrando um peptídeo com aproximadamente 6 kDa (Figura 15B). Análises de espectrometria de massa do pico 1 das amostras de HPLC mostraram quatro massas entre 4500 Da e 6200 Da. Este resultado sugeriu que, provavelmente, fragmentos do peptídeo de goiaba foram sendo perdidos ao longo da análise por espectrometria de massa, resultando em moléculas com massas variadas (Figura 16).

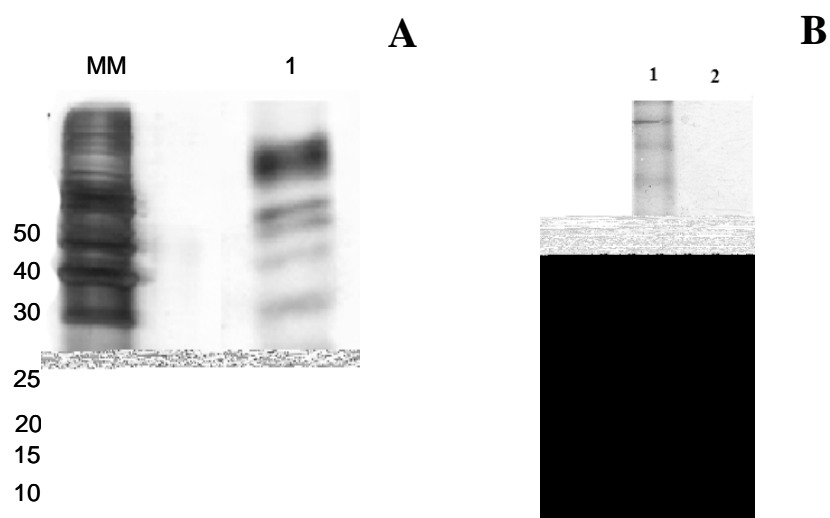
#### IV. Resultados e Discussão



**Figura 14 A)** Cromatografia em Red-Sepharose Cl-6B de amostras precipitadas com sulfato de amônio de sementes de goiaba (*P. guajava*). Seta preta indica início de eluição das proteínas retidas usando Tampão Tris-HCl contendo NaCl 3,0M. **B)** Perfil da cromatografia de fase-reversa HPLC (Vydac C18-TP) das frações retidas na Red-Sepharose geradas de sementes de goiaba (*P. guajava*). Linha diagonal indica gradiente linear de acetonitrila. Além disso, o gráfico no canto direito representa a re-cromatografia da fração protéica da mesma coluna.

#### IV. Resultados e Discussão

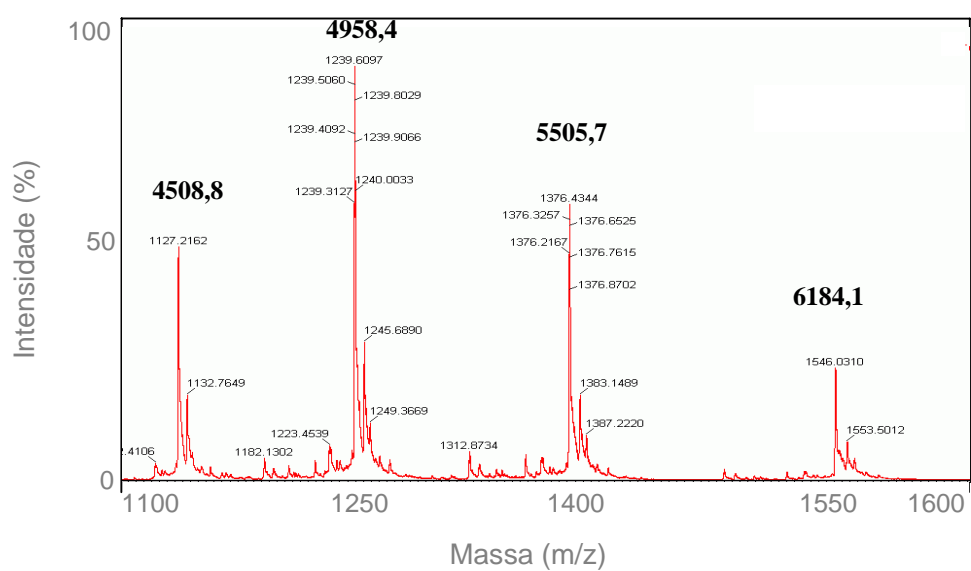
---



**Figura 15.** **A)** SDS-PAGE de amostras de pico-retido de sementes de maracujá (PR) (linha 2). Linha 1 corresponde ao marcador molecular. As setas indicam valores das massas moleculares das bandas referentes à linha 1. **B)** SDS-PAGE de *Pg*-AMP purificada (linha 2). Linha 1 corresponde ao marcador molecular, sendo os valores das massas indicados por setas em kDa. MM indica marcador molecular (kDa).

#### IV. Resultados e Discussão

---



**Figura 16.** Espectro de massa do Pico 1 da Cromatografia de fase reversa - HPLC de proteínas de sementes de *P. guajava*.

### 1.2.2. Seqüenciamento dos aminoácidos e alinhamento

O seqüenciamento completo da proteína de goiaba revelou um peptídeo de 55 resíduos de aminoácidos (Figuras 17 e 18). Um alinhamento usando o Programa FASTA3 mostrou que a seqüência obtida apresentava alta similaridade da *Pg*-AMP1 com proteínas ricas em glicina. Uma comparação da seqüência primária de *Pg*-AMP1 com outras nove proteínas ricas em glicina isoladas de plantas foi feita usando o Programa BioEdit (Hall, 1999). Neste alinhamento, pôde-se observar que, apesar da seqüência primária entre proteínas ricas em glicina seja, em geral, altamente diversificada, elas mostraram uma região conservada, onde os resíduos de glicina são predominantes (Figura 18). Além disso, *Pg*-AMP1 parece pertencer ao terceiro grupo das PRGs, pois esta apresentou um elevado conteúdo de resíduos de glicina, mas não continha nenhum dos domínios conservados, denominados de RRM (RNA *Recognition Motif*, mostrado em caixa preta), e conhecidos por serem importantes para ligação da proteína ao RNA (Nomata *et al.*, 2004). Esta classe foi observada nas proteínas de *P. pattens*, *B. napus*, *S. tuberosum*, *M. sativa*, *R. obtusifolius* e *E. esula* (Hovarth & Olson, 1998; Kevei *et al.*, 2002; Vermel *et al.*, 2002). Ademais, pôde-se observar que dois resíduos de arginina são conservados na maioria das seqüências analisadas (Figura 18, indicado por asteriscos), bem como um resíduo de tirosina (Figura 18, indicado por dois pontos).

A presença de resíduos de cisteína e formação de ligações dissulfeto não são conservadas entre proteínas ricas em glicina e este fato pode claramente ser constatado na Figura 20 (Fujimura *et al.*, 2003).

#### IV. Resultados e Discussão

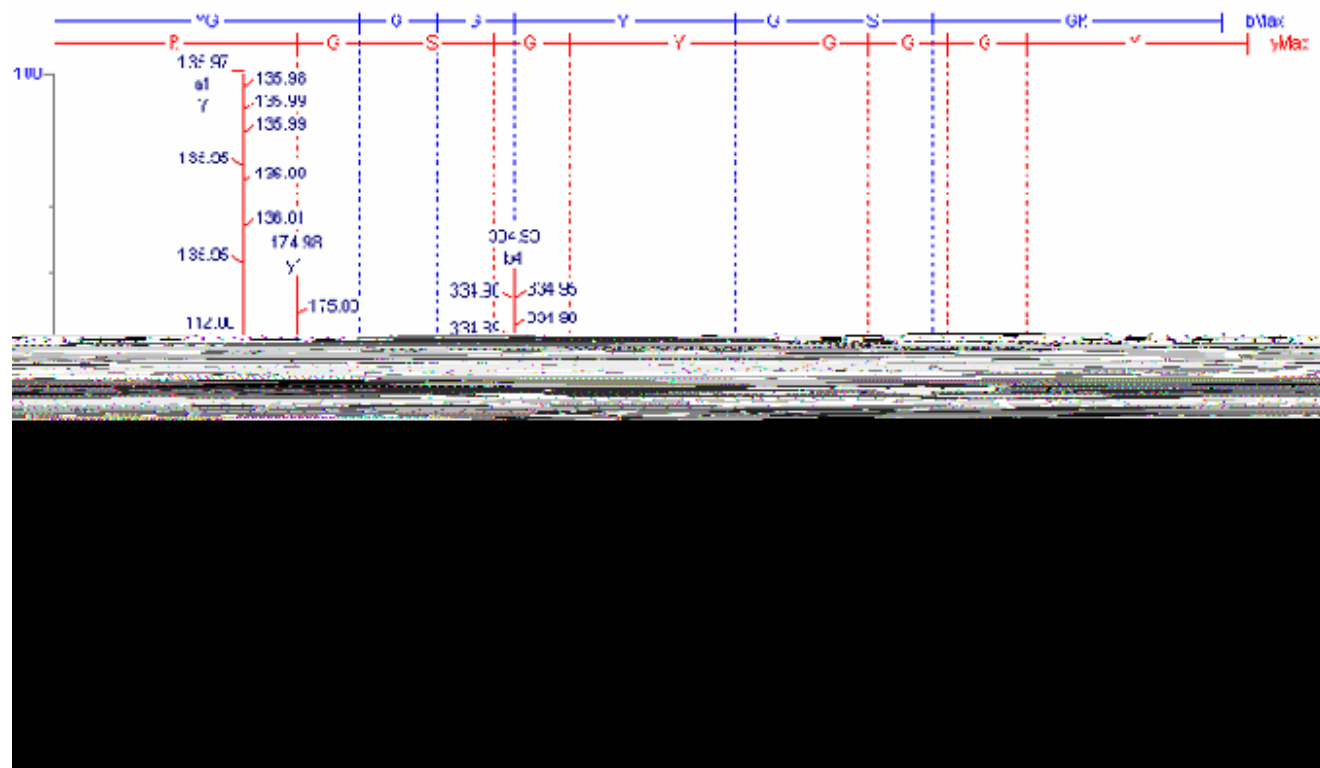
---

Assim, a principal característica das proteínas ricas em glicina reside na presença de mais de 60% de sua seqüência primária ser constituída por resíduos de glicina, mas elas podem ser classificadas em 3 diferentes grupos, de acordo com presença/ausência de outros domínios conservados (Mousavi, 2005; Ringli, 2001).

Proteínas ricas em glicina descritas na literatura mostraram diversas funções em plantas. Alguns autores relataram proteínas ricas em glicina atuando como reguladores pós-transcricionais sob condições de estresse e, conseqüentemente, no controle da expressão de genes em diversas espécies de plantas (Kim, 2005). Além disso, diversos autores sugerem que proteínas ricas em glicina possam atuar como moléculas de ligação ao RNA como observado em plântulas de arroz (Nomata, 2004).



#### IV. Resultados e Discussão



**Figura 17.** Seqüenciamento do peptídeo de goiaba pelo Programa PepSeq. Linha em azul indica seqüenciamento pela fase “b”. Linha vermelha indica seqüenciamento pela fase “y”.

#### IV. Resultados e Discussão

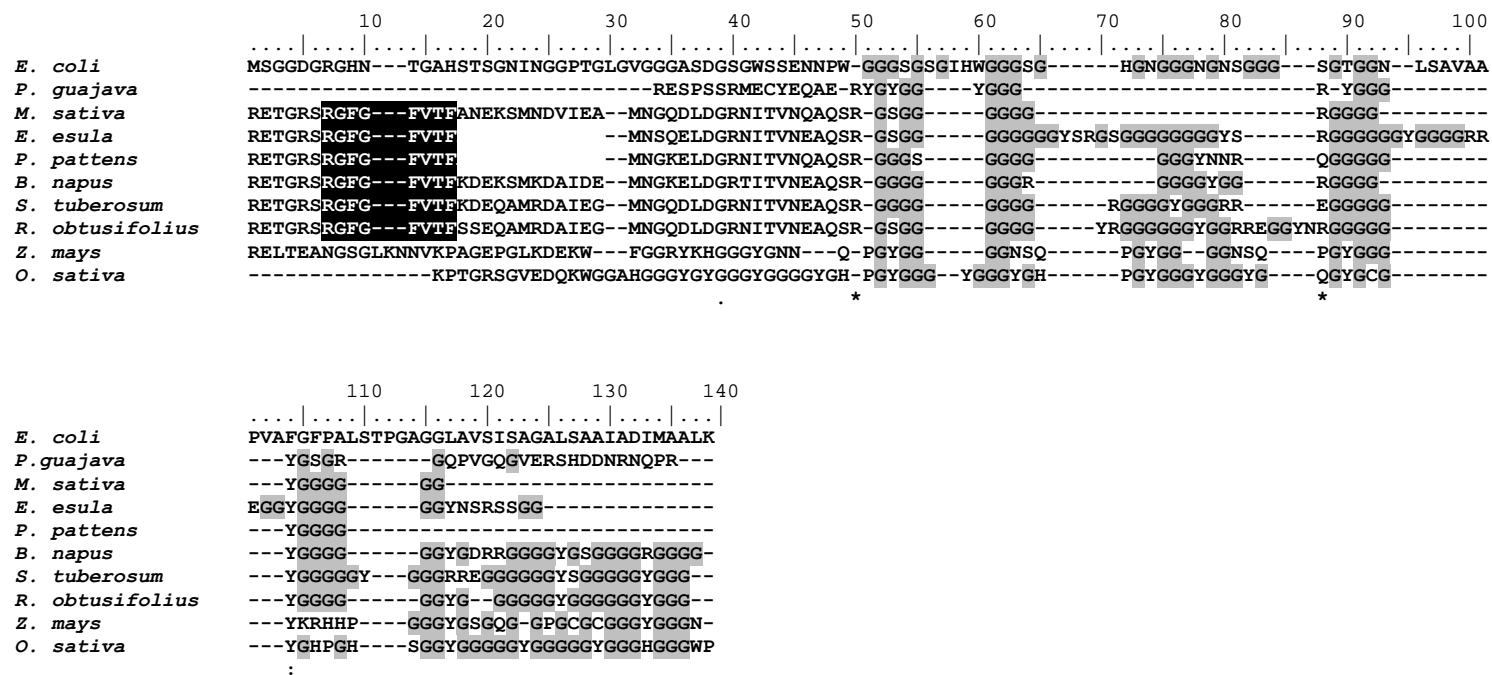


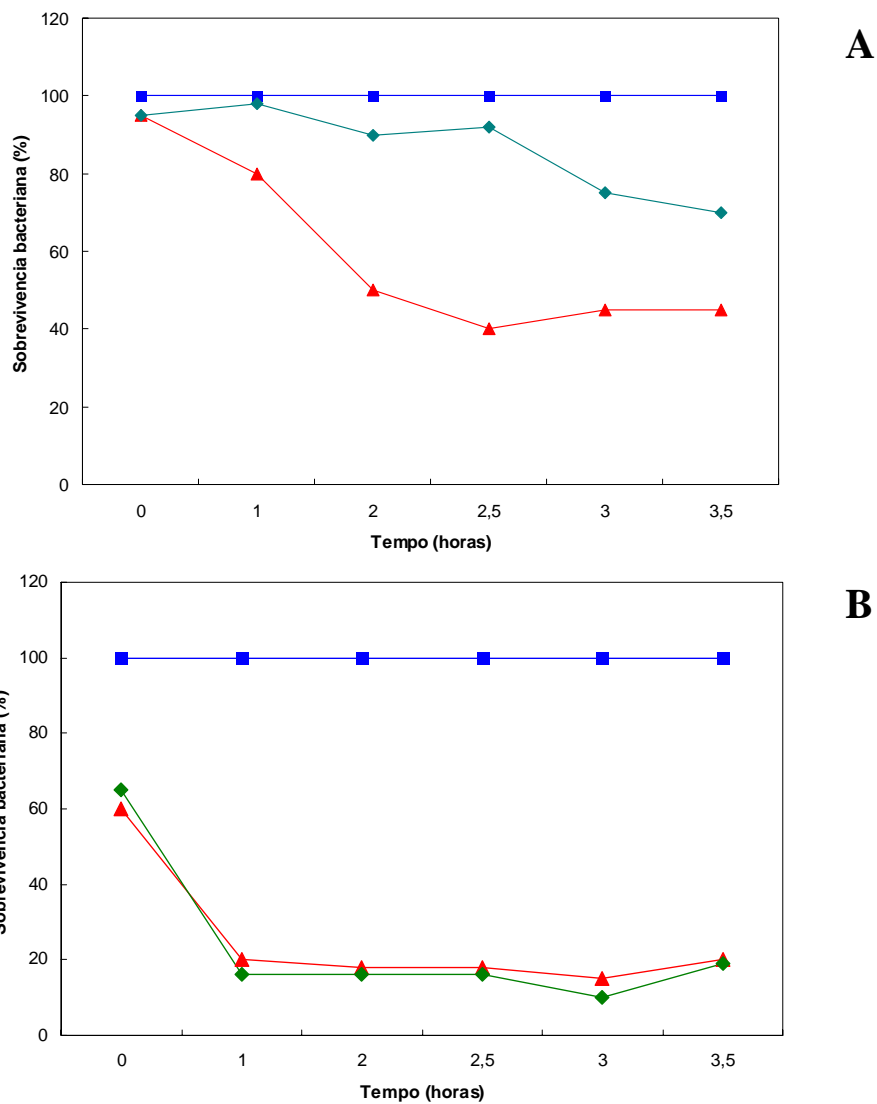
Figura 18. Alinhamento de *Pg*-AMP1 com outras proteínas ricas em glicina de plantas e Colicina E3 de *E. coli*.

### 1.2.3. Bioensaios contra bactérias gram-negativas

A Pg-AMP1 purificada foi usada para bioensaios *in vivo* contra bactérias gram-negativas e gram-positivas. Esta proteína revelou efeitos deletérios contra *Klebsiella* sp e *Proteus* sp, mostrando 90% e 30% de inibição, respectivamente, em concentrações micromolares de 40  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  (Figuras 19A e 19B).

Pg-AMP1 mostrou ser específica contra bactérias gram-negativas, uma vez que bioensaios preliminares contra bactérias gram-positivas, tais como *S. aureus* não revelaram nenhuma atividade inibitória (dados não mostrados). Há apenas poucos relatos na literatura de proteínas ricas em glicina relativas à defesa de plantas. Desta forma, foi observado que uma proteína rica em glicina de ligação à RNA isolada de *Nicotiana glutinosa* possa estar relacionada com a relação planta-patógeno, uma vez que a expressão de seu gene aumentava quando a planta era infectada com o vírus TMV (Naqvi *et al.*, 1998), indicando que a presença do patógeno é importante para o aumento da produção de proteínas deste grupo. Outra proteína rica em glicina, isolada de abóbora, denominada de curcumochina, apresentou atividade antifúngica contra *Botrytis cinerea*, *F. oxysporum* e *Mycosphaerella oxysporum* (Wang *et al.*, 2003). Além disso, algumas proteínas ricas em glicina apresentam um domínio de ligação à quitina, o que as tornam capazes de inibir o crescimento de fungos filamentosos, como é o caso de duas proteínas isoladas de aveia (*Avena sativa*) e de *Ginkgo biloba* (Huang *et al.*, 2000; Lii & Claeson, 2003).

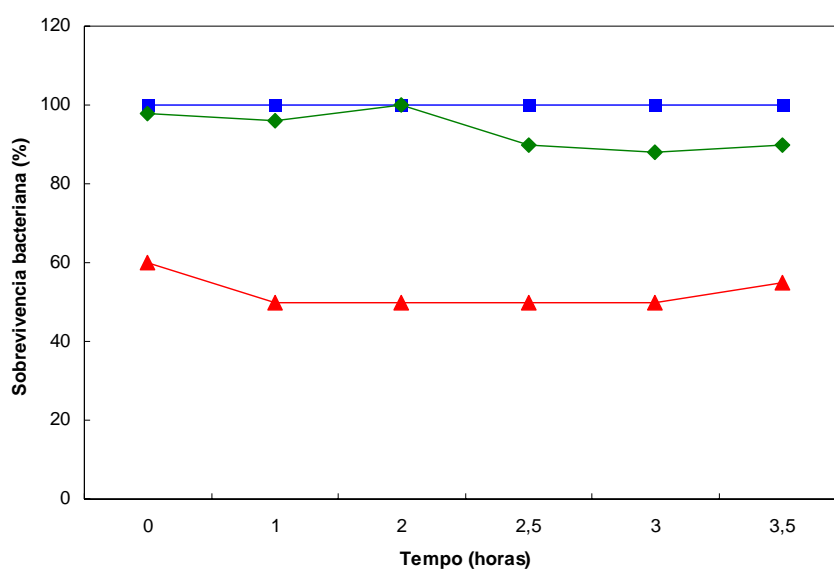
#### IV. Resultados e Discussão



**Figura 19.** Bioensaios bacteriano usando *Pg*-AMP1 purificada contra **A)** *Proteus* sp e **B)** *Klebsiella* sp. (■) indica o controle negativo, (▲) indica o controle positivo e (◆) indica o teste usando *Pg*-AMP1

#### IV. Resultados e Discussão

---



**Figura 20.** Bioensaios bacteriano usando *Pg*-AMP1 purificada contra *Staphylococcus aureus*. (■) indica o controle negativo, (▲) indica o controle positivo e (◆) indica o teste usando *Pg*-AMP1

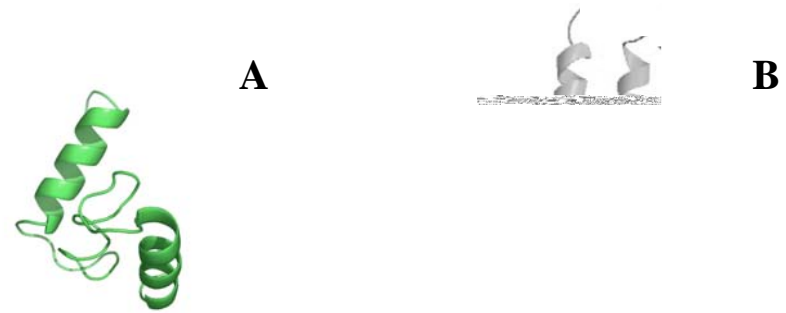
Todavia, não há relatos de que uma proteína rica em glicina isolada de plantas apresentasse atividade contra bactérias, especialmente às patogênicas ao homem. Portanto, esta é a primeira vez até o momento, que uma proteína rica em glicina apresenta atividade antimicrobiana contra bactérias gram-negativas patogênicas ao homem corroborando mais uma vez com a conclusão de que algumas proteínas de reserva podem ter atividade antimicrobiana.

### 1.2.4. Modelagem molecular

O modelo final é composto por duas  $\alpha$ -hélices, uma presente na porção N-terminal e a outra na região C-terminal com uma alça espiralada entre eles (Figura 21). Nessa alça encontra-se a maioria dos resíduos de glicina, conferindo a este peptídeo extrema flexibilidade. Nas pontas das  $\alpha$ -hélices encontram-se resíduos de arginina, conferindo carga positiva a essas regiões (Figura 20). Puderam-se observar alguns resíduos hidrofóbicos ao longo da estrutura, os quais poderiam ser importantes para a dimerização (Figura 21 e 23C), uma vez que os loops de *Pg*-AMP1 são compostos principalmente por resíduos de glicina. Além disso, pôde-se observar que, por meio de análises *in silico*, há a formação de uma ponte salina entre Arg<sub>7</sub> de um dos monômeros com Gln<sub>108</sub> do outro monômero. Além disso, uma interação mediada por moléculas de água pode ocorrer entre Arg<sub>45</sub> de um dos monômeros com S88 da outra molécula. Os outros resíduos de arginina parecem ter importância na ligação com a superfície da membrana da célula, atuando na atividade antimicrobiana e não, na formação do dímero (Figuras 22A e 22B)

#### IV. Resultados e Discussão

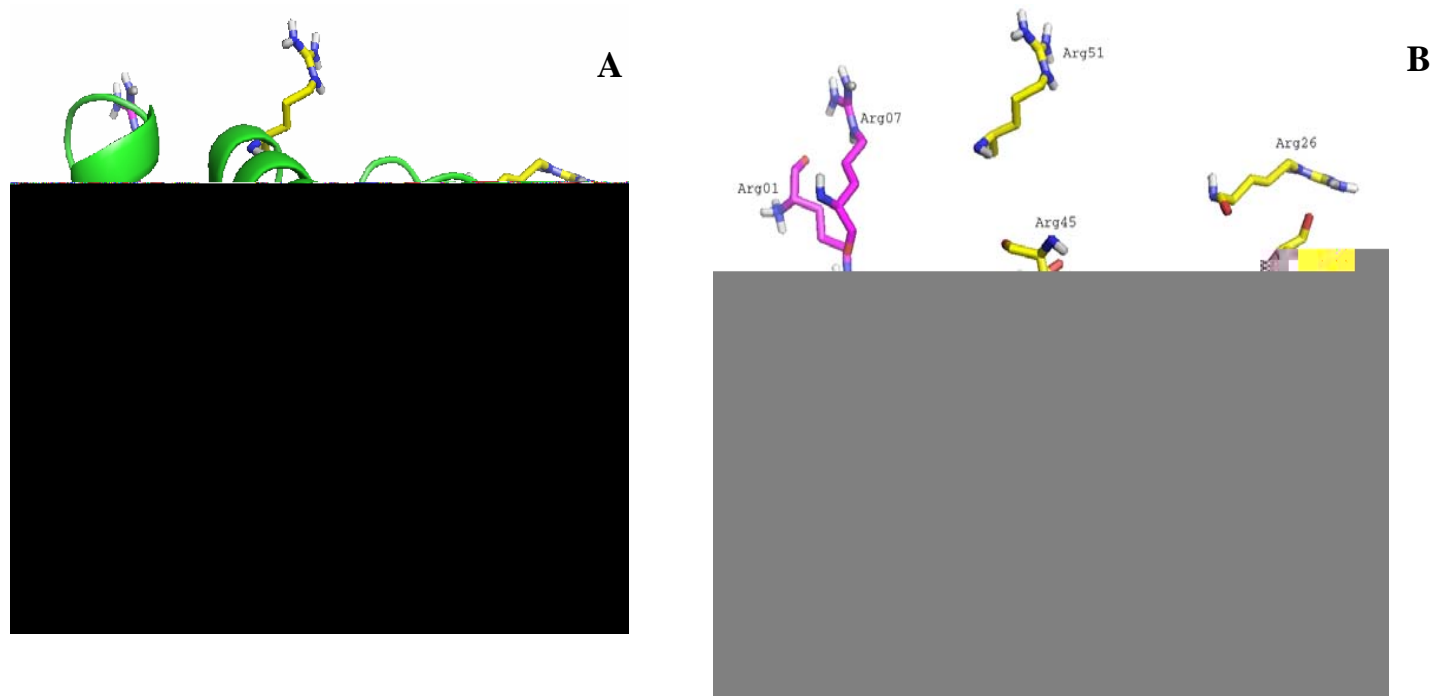
---



**Figura 21.** Comparação das estruturas tridimensionais de A) *Vu*D1 e B) Domínio A de Colicina E3.

#### IV. Resultados e Discussão

---



**Figura 22.** **A)** Estrutura dimérica de *Pg-AMP1* mostrando os resíduos de arginina (rosa e amarelo).  $\alpha$ -Hélices e loops estão ilustrados em verde. **B)** Diagrama mostrando somente os resíduos de arginina do peptídeo *Pg-AMP1* na forma dimérica. Os resíduos em rosa representam um dos monômeros, enquanto que os resíduos em amarelo correspondem ao segundo monômero.



#### IV. Resultados e Discussão

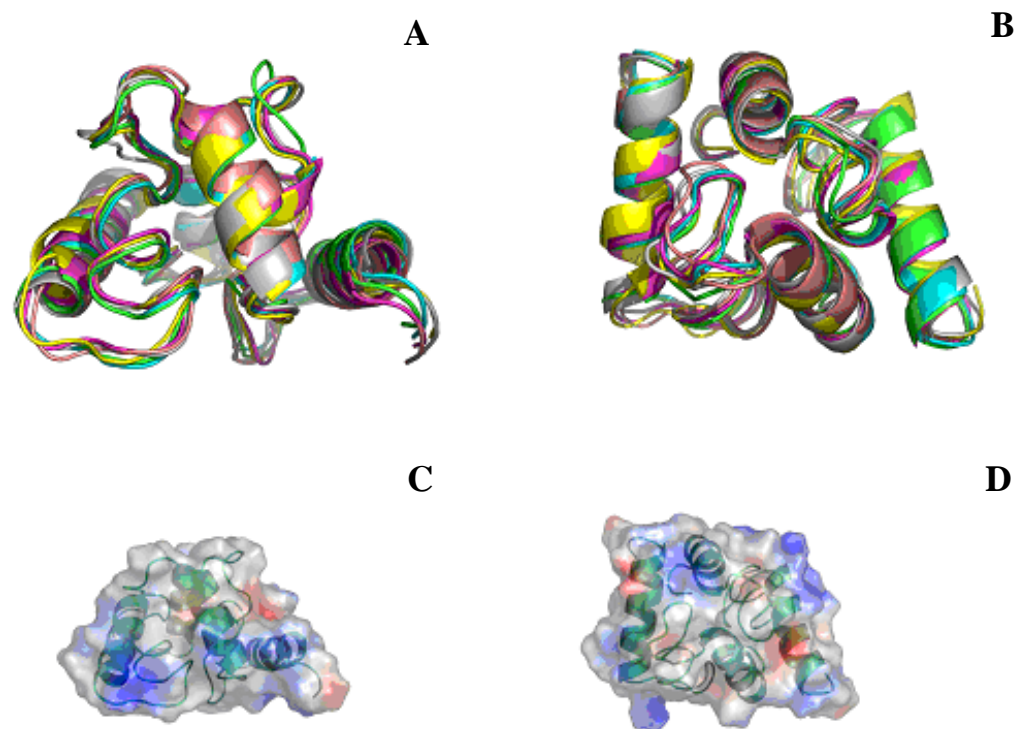
---

Estruturas semelhantes já foram encontradas em outras proteínas antimicrobianas como, por exemplo, a distinctina (D1), uma proteína isolada de *Phyllomedusa distincta* com atividade contra *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *Enterococcus faecalis* (Raimondo *et al.*, 2005). O mecanismo de ação desta proteína parece ocorrer por interação de alguns resíduos de aminoácidos com a camada lipídica das células, levando ao aumento da permeabilização e morte celular (Raimondo *et al.*, 2005). A estrutura de D1 obtida por ressonância nuclear magnética (RNM) em solução de água é composta por duas  $\alpha$ -hélices, mas a atividade antimicrobiana ocorre com a formação de um homodímero. Desta forma, análises das interações atômicas e da acessibilidade dos resíduos de superfície de D1 na forma dimérica mostraram que não há interações polares intracadeia muito fortes ou estáveis. Todavia, a dimerização em água parece ter proporcionado a minimização da exposição dos resíduos hidrofóbicos e estabilização da estrutura em  $\alpha$ -hélice (Raimondo *et al.*, 2005). Além disso, uma defensina isolada de *Pachyrrhizus erosus* denominada SPE10 também apresentou similaridades com Pg-AMP1 (Song *et al.*, 2005). A atividade contra *A. flavus*, *A. niger* e *Bipolaris maydis* parece ser mediada pela formação de um homodímero de SPE10, onde as ligações entre cada monômero ocorrem por meio de interações hidrofóbicas dos aminoácidos presentes no loop2 (Ala7, Phe<sub>10</sub>, Pro<sub>13</sub>, Phe<sub>15</sub> e Phe<sub>39</sub>) (Song *et al.*, 2005). Ademais, tem-se considerado que a estrutura dimérica é importante para a atividade antimicrobiana em defensinas de mamíferos (Schibli *et al.*, 2002).

Assim, a estrutura dimérica de Pg-AMP1 também foi analisada por dinâmica molecular e seis diferentes posições foram sobrepostas e comparadas entre si. As Figuras

#### IV. Resultados e Discussão

---



**Figura 23.** A) Representação em forma de *cartoon* da Pg-AMP1. Estruturas obtidas por dinâmica molecular em tempos distintos. Vista A) Lateral e B) Superior. C) Visão lateral e D) Superior da camada eletrostática da molécula dimerizada.

#### IV. Resultados e Discussão

---

23A e 23B ilustram seis diferentes possibilidades estruturais para o peptídeo dimérico de sementes de goiaba. Cada cor representa uma estrutura individual. Assim, pode-se observar que, quando exposta a um meio contendo moléculas de água, a estrutura de *Pg*-AMP1 comporta-se de maneira similar nos diferentes tempos de dinamização.

Analisando a camada eletrostática podem-se observar duas grandes regiões carregadas, uma positivamente no N-terminal e outra negativamente ao longo do C-terminal (Figuras 23C e 23D). Estas zonas permitiriam que duas moléculas se agregassem formando dímeros (Figuras 23A e 23B). Além disso, ao longo da estrutura se encontram vários resíduos não polares, conferindo hidrofobicidade da molécula, os quais parecem ser os responsáveis pela interação entre as duas moléculas de *Pg*-AMP1. A sequência primária de *Pg*-AMP1 contém resíduos de arginina que parecem ser tanto importantes para a formação de dímeros, quanto para a atividade antibacteriana. Assim, na figura 21, pode-se observar que há resíduos de arginina na região central da estrutura dimérica, como também nas extremidades da molécula (Figuras 23A e 23B).

Analisando a estrutura tridimensional de *Pg*-AMP1, observou-se enorme similaridade estrutural com a colicina E3, uma proteína isolada de *E. coli*, relacionada a um grupo de proteínas antibióticas capaz de matar bactérias (Figura 21) (Soelaiman *et al.*, 2001). O domínio A da Colicina E3 é composto por duas  $\alpha$ -hélices que interagem com a superfície da membrana das células, sendo partes-chave para a ação antimicrobiana desta molécula.

#### IV. Resultados e Discussão

---

As duas  $\alpha$ -hélices externas da estrutura dimérica de *Pg*-AMP1 também parecem agir de forma semelhante, atuando na ligação com os fosfolipídios presentes na membrana celular dos patógenos (Figura 21).

O mecanismo de ação da Colicina E3 baseia-se em uma forte interação com receptores, tais como o BtuB, o qual está relacionado à síntese vitamina B<sub>12</sub> em *E. coli*. As colicinas em geral agem ligando-se a esses receptores presentes na superfície da membrana da célula, levando a entrada da proteína no citoplasma e levando conseqüentemente a intoxicação celular (Soelaiman *et al.*, 2001). A estrutura tridimensional da colicina E3 é composta por um domínio A e dois domínios globulares T e C. O domínio A é caracterizado por uma longa *hairpin* helicoidal antiparalela, que é a região que penetra na superfície da célula do microorganismo (Soelaiman *et al.*, 2001).

Assim, comparando-se a colicina E3 com *Pg*-AMP e observando-se a posição dos resíduos de arginina na molécula dimérica, propuseram-se quatro mecanismos de ação para a atividade antimicrobiana deste peptídeo. A primeira hipótese baseia-se na interação dos resíduos de arginina presentes da região externa do dímero com a parte carregada negativamente das moléculas de fosfolipídios presentes na superfície da membrana das células bacterianas. Essa ligação levaria a uma exposição da parte hidrofóbica dos fosfolipídios, permitindo que as moléculas diméricas se dissociassem em monômeros para utilização de seus resíduos hidrofóbicos na interação com os resíduos fosfolipídios. Desta forma, os peptídeos seriam capazes de entrar no citoplasma da célula, causando intoxicação celular e conseqüente morte das células (Shai *et al.*, 2001; Jenssen *et al.*, 2006).

#### IV. Resultados e Discussão

---

A segunda teoria descreve a interação do dímero com canais de  $\text{Na}^{2+}$  e  $\text{K}^{2+}$ , levando a interrupção da entrada e saída destes íons, causando desbalanceamento osmótico e conseqüente morte celular. Uma vez que externamente a molécula dimérica de *Pg*-AMP1 é carregada positivamente, esta se ligaria nas regiões dos canais onde normalmente ocorre a interação dos íons  $\text{Na}^{2+}$  e  $\text{K}^{2+}$  (Jenssen *et al.*, 2006).

A terceira hipótese defende a interação dos resíduos de arginina presentes na região externa do dímero com a parte carregada negativamente das moléculas de fosfolipídios. Desta forma, com o auxílio do solvente presente no meio, os fosfolipídios seriam arrastados, levando a formação de poros. Conseqüentemente, um aumento da permeabilidade da membrana levaria à morte celular (Matsuzaki, 1996-1998; Jenssen *et al.*, 2006).

A última e não menos importante teoria para explicar o mecanismo de ação de *Pg*-AMP1 defende que, ao invés de intoxicação ou desestabilização osmótica como causa de morte celular, haveria a ligação da proteína dimérica com moléculas RNA. Esta interação inativaria a função do RNA, funcionando o *Pg*-AMP1 como um inibidor de síntese protéica (Soelaiman *et al.*, 2001).

Contudo, comparando-se os mecanismos e ação propostos com a Colicina E3 e outros peptídeos antimicrobianos que agem por formação de dímeros, sugere-se que o mecanismo de ação de *Pg*-AMP1 ocorra de maneira semelhante à terceira hipótese descrita neste trabalho. Por análises comparativas da seqüência de aminoácidos e estrutura terciária, bem como das similaridades funcionais, sugere-se que *Pg*-AMP1 seja capaz de se ligar a superfícies da membrana celular dos patógenos, levando à formação de poros.

#### IV. Resultados e Discussão

---

Assim, a formação de poros multiméricos íons-permeáveis seria o fator primordial para a morte celular. Entretanto, vale ressaltar que as outras hipóteses não podem ser descartadas.

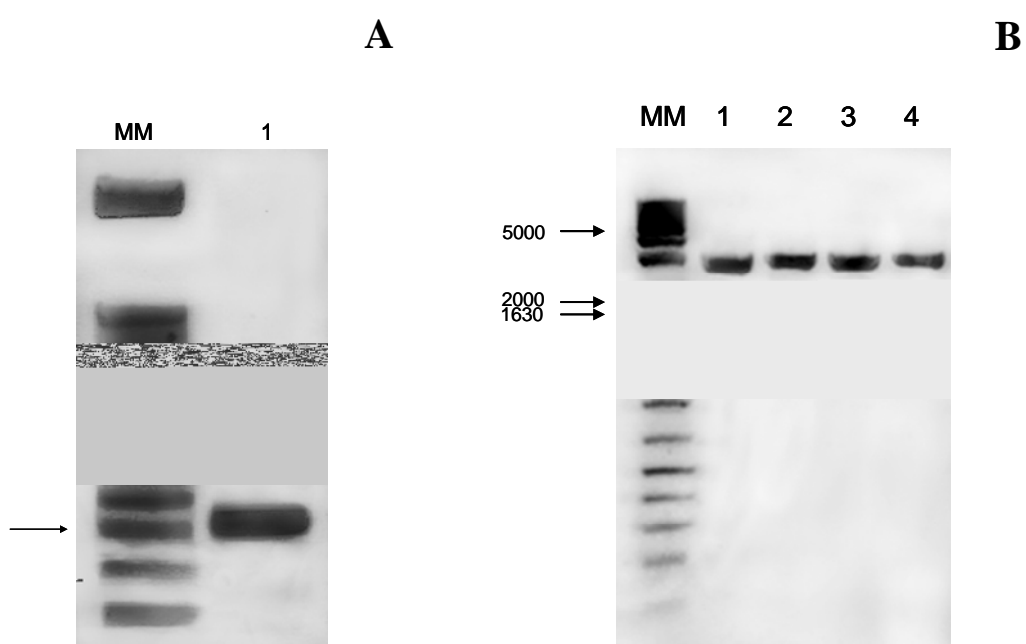
Na tentativa de se elucidar o modo de ação de *Pg*-AMP1 , experimentos por ressonância magnética nuclear e dinâmica molecular do complexo *Pg*-AMP1 e fosfolipídios deverão ser executados futuramente. Além disso, o descobrimento de novas proteínas ricas em glicina capazes de inibir o crescimento de bactérias gram-negativas pode trazer, em um futuro próximo, novas informações sobre seu mecanismo de ação e *modus operandi*. Por outro lado, proteínas bactericidas de sementes de goiaba poderão ser usadas como novas ferramentas biotecnológicas no controle de patógenos, por meio de engenharia genética. Uma nova porta se abre na descoberta de peptídeos antimicrobianos. O uso de proteínas de armazenamento, até então sem função antimicrobiana definida, demonstram esta capacidade secundária como mecanismos de defesa de plantas, tanto contra fungos filamentosos quanto contra bactérias gram-negativas. Provavelmente, diversas outras proteínas já descritas na literatura podem apresentar esta característica, mas suas atividades antimicrobianas ainda não foram testadas, mantendo esta função defensiva completamente desconhecida. O fato de que proteínas ricas em glicinas e da família 2S albuminas mostrarem membros com atividade antibacteriana e antifúngica pode levar a uma reclassificação destes grupos, uma vez que sua função como moléculas armazenadoras pode, na verdade, consistir de uma atividade secundária, quando não houver nenhum agente patogênico em ação na planta, levando, através deste trabalho, a uma nova perspectiva classificatória em peptídeos de defesa.

## **2. INIBIDORES ENZIMÁTICOS**

### ***2.1 Defensinas de feijão-de-corda (V. unguiculata): um potencial bioinseticida***

#### **2.1.1. Clonagem do gene da defensina de feijão-de-corda**

Após extração do RNA total de sementes de feijão-de-corda utilizando kit de extração em sementes de plantas (SIGMA – XNASS), o precipitado contendo material nucléico foi amplificado por RT-PCR usando-se primers específicos, seguindo protocolo previamente



**Figura 24.** A) Extração de DNA de *Vu*D1. MM corresponde ao marcador molecular de 500pb. Linha 1 indica banda correspondente ao DNA de *Vu*D1. Seta representa banda do marcador molecular referente à 200pb. B) Gene de *Vu*D1 em vetor TOP 10. MM corresponde ao marcador molecular. Os números 1, 2, 3 e 4 indicam as linhas onde se observa a banda correspondente ao vetor.



```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
Qp10 original -----ATGGAGAAGAAATCAATCGCTGGATTATGCTTCCTCTCCCTGGTTCCTTTGGTGTCTC-----
      M E K K S I A G L C F L F L V L F V A
Clone 1 ---GAATTCGCCCTTATGGAGAAGAAATCAATCGCTGGATTATGCTTCCTCTCCCTGGTTCCTTTGGTGTCTCCTGTAAGTCATTACTCTTTATGTTTCATTC
      M E K K S I A G L C F L F L V L F V A R K S L L F M F I
Clone 2 ---GAATTCGCCCTTATGGAGAAGAAATCAATCGCTGGATTATGCTTCCTCTCCCTGGTTCCTTTGGTGTCTCCTGTAAGTCATTACTCTTTATGTTTCATTC
      M E K K S I A G L C F L F L V L F V A R K S L L F M F I
Clone 3 ---GAATTCGCCCTTATGGAGAAGAAATCAATCGCTGGATTATGCTTCCTCTCCCTGGTTCCTTTGGTGTCTCCTGTAAGTCATTACTCTTTATGTTTCATTC
      M E K K S I A G L C F L F L A L F V A R K S L L F M F I
Clone 4 ---GAATTCGCCCTTATGGAGAAGAAATCAATCGCTGGATTATGCTTCCTCTCCCTGGTTCCTTTGGTGTCTCCTGTAAGTCATTACTCTTTATGTTTCATTC
      M E K K S I A G L C F L F L A L F V A R K S L L F M F I
Clone 5 CTTGAATTCGCCCTTATGGAGAAGAAATCAATCGCTGGATTATGCTTCCTCTCCCTGGTTCCTTTGGTGTCTCCTGTAAGTCATTACTCTTTATGTTTCATTC
      M E K K S I A G L C F L F L V L F V A R K S L L F M F I

      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
Qp10 original -----CAAGAAGTTGGTGGTGCAGAG---GTGAGGCAAAGACTTGGCAG-A
      Q E V V V Q S E A K T C E
Clone 1 TTCTGCATCTCTATCATATGAAATATAACCCCTATTTTATGACATCTATGACATGCAAGAAGTTGGTGGTGCAGAG---GTGAGGCAAAGACTTGGCAG-A
      L L H L Y H M K Y N P I L * H L * H A E E V V V Q S E A K T C E
Clone 2 TTCTGCATCTCTATCATATGAAATATAACCCCTATTTTATGACATCTATGACATGCAAGAAGTTGGTGGTGCAGAG---GTGAGGCAAAGACTTGGCAG-A
      L L H L Y H M K Y N P I L * H L * H A E E V V V Q S E A K T C E
Clone 3 TTCTGCATCTCTATCATATGAAATATAACCCCTATTTTATGACATCTATGACATGCAAGAAGTTGGTGGTGCAGAG---GTGAGGCAAAGACTTGGCAG-A
      L L H L Y H M K Y N P I L * H L * H A E E V V V Q S E A K T C E
Clone 4 TTCTGCATCTCTATCATATGAAATATAACCCCTATTTTATGACATCTATGACATGCAAGAAGTTGGTGGTGCAGAG---GTGAGGCAAAGACTTGGCAG-A
      L L H L Y H M K Y N P I L * H L * H A E E V V V Q S E A K T C E
Clone 5 TTCTGCATCTCTATCATATGAAATATAACCCCTATTTTATGACATCTATGACATGCAAGAAGTTGGTGGTGCAGAG---GTGAGGCAAAGACTTGGCAG-A
      L L H L Y H M K Y N P I L * H L * H A E E V V V Q S E A K T C E

      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
Qp10 original -----ACCTGGGATACATACAGGGTCCGTCCTCACCACITGGAGCTCGGATGATCACGGCAAGAACAAAGAACACTTGCCTG-----AGTGGCAGGTGCAGG
      N L V D T Y R G P C F T T G S C D D H C K N K E H L L S G R C R
Clone 1 ACCTGGGATACATACAGGGTCCGTCCTCACCACITGGAGCTCGGATGATCACGGCAAGAACAAAGAACACTTGCCTG-----AGTGGCAGGTGCAGG
      N L A D T Y R G P C F T T G S C D D H R K N K E H L L S G R C R
Clone 2 ACCTGGGATACATACAGGGTCCGTCCTCACCACITGGAGCTCGGATGATCACGGCAAGAACAAAGAACACTTGCCTG-----AGTGGCAGGTGCAGG
      N L A D T Y R G P C F T T G S C D D H R K N K E H L L S G R C R
Clone 3 ACCTGGGATACATACAGGGTCCGTCCTCACCACITGGAGCTCGGATGATCACGGCAAGAACAAAGAACACTTGCCTG-----AGTGGCAGGTGCAGG
      N L A D T Y R G P C F T T G S C D D H C K N K E H L L S G R C R
Clone 4 ACCTGGGATACATACAGGGTCCGTCCTCACCACITGGAGCTCGGATGATCACGGCAAGAACAAAGAACACTTGCCTG-----AGTGGCAGGTGCAGG
      N L A D T Y R G P C F T T G S C D D H C K N K E H L L S G R C R
Clone 5 ACCTGGGATACATACAGGGTCCGTCCTCACCACITGGAGCTCGGATGATCACGGCAAGAACAAAGAACACTTGCCTG-----AGTGGCAGGTGCAGG
      N L A D T Y R G P C F T T R S C D D H C K N K E H L L S G R C R

      310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
Qp10 original -----GATGATGTCGGTGTGGTGCACCCAGAAACTGTTAA-----
      D D V R C W C T R N C *
Clone 1 GATGATGTCGGTGTGGTGCACCCAGAAACTGTTAA-----
      D D V R C W C T R N C *
Clone 2 GATGATGTCGGTGTGGTGCACCCAGAAACTGTTAA-----
      D D V R C W C T R N C *
Clone 3 GATGATGTCGGTGTGGTGCACCCAGAAACTGTTAA-----
      D D V R C W C T R N C *
Clone 4 GATGATGTCGGTGTGGTGCACCCAGAAACTGTTAA-----
      D D V R C W C T R N C *
Clone 5 GATGATGTCGGTGTGGTGCACCCAGAAACTGTTAA-----
      D D V R C W C T R N C *

```

#### IV. Resultados e Discussão

---

**Figura 25.** Alinhamento das seqüências de nucleotídeos e respectiva tradução para resíduos de aminoácidos dos clones de sementes de feijão-de-corda com o fragmento de DNA inicial descrito por Ishibashi *et al.*, (1990). Retângulos pretos indicam alteração na seqüência de nucleotídeos que levaram as alterações nos resíduos de aminoácidos.

Além disso, foi observada a presença de isoformas da mesma seqüência, como a alteração de valinas para alaninas nas posições 18 e 66, e uma mutação semiconservativa de ácido glutâmico para glutamina na posição 51 (Figura 25).

Estes resultados sugerem a presença de uma família multigênica codificadora de proteínas do grupo das defensinas em sementes de feijão-de-corda. Este dado corrobora com as inúmeras defensinas encontradas em sementes de *Vigna* com múltiplas atividades como inibidores de  $\alpha$ -amilase (Liu *et al.*, 2006, Melo *et al.*, 1999), inibidores de proteinases (Melo *et al.*, 2002) e atividade antibacteriana (Franco *et al.*, 2006).

Defensinas parecem pertencer a uma família de pequenos multigenes. Enquanto em *A. thaliana* observam-se mais de 300 defensinas documentadas (Thomma *et al.*, 1998; Thomma *et al.*, 2002), seres humanos e camundongos apresentam menos de 50 (Schutte *et al.*, 2001). Além disso, 300 genes com similaridade a defensinas foram observadas em *Medicago trunculata* (Fedorova *et al.*, 2002; Mergaert *et al.*, 2003; Graham *et al.*, 2004). Todavia, estes números podem estar subestimados e novas descobertas poderão trazer maiores novidades neste campo.

#### **2.1.2. Expressão heteróloga e purificação de VuD1**

O clone 4 foi escolhido para expressão, uma vez que foi o fragmento de DNA que sofreu o menor número de modificações na seqüência de aminoácidos. O fragmento de DNA foi inserido em células BL21 (DE3) em uma região do plasmídeo imediatamente posterior à seqüência codificadora de ubiquitina, sendo a expressão induzida com adição de IPTG.

#### IV. Resultados e Discussão

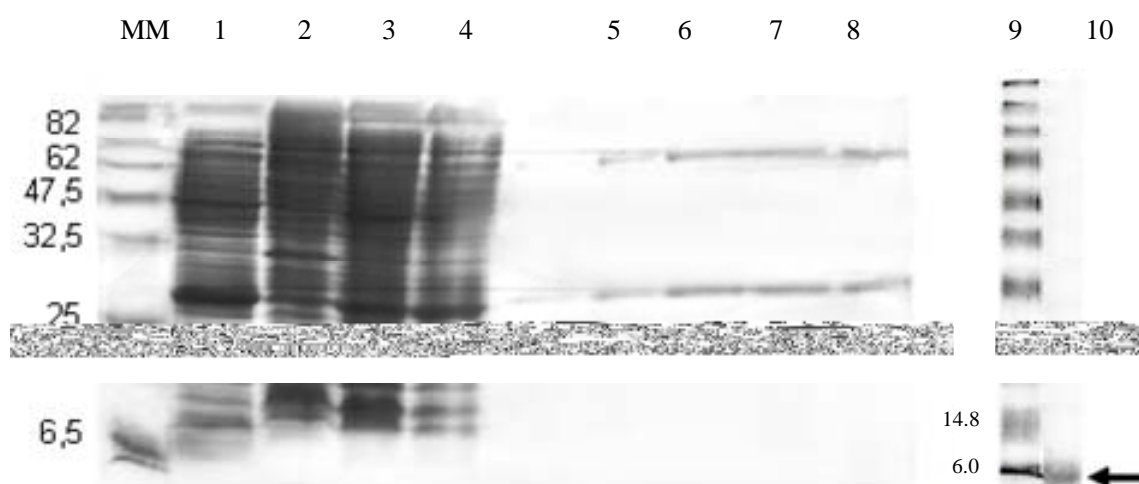
---

As células foram lisadas e o complexo 6his-ubiquitina-defensina foi purificado através da utilização de resina de afinidade contendo níquel (Ni-NTA / Qiagen). Análises de massa molecular em gel de SDS-PAGE a 12% revelou uma banda com cerca de 25 kDa, valor esperado para o complexo de proteínas expresso, onde aproximadamente 5,8 kDa corresponde a *VuD1*, 14,1kDa corresponde a ubiquitina ligada à cadeia de histidina e, cerca de 6kDa constitui o vetor pHUE (Catazaranti *et al.*, 2004; Figura 26).

O complexo protéico foi purificado por cromatografia de fase-reversa HPLC, sendo a eluição obtida utilizando um gradiente linear de acetonitrila (0-60%). O material de interesse foi eluído 25 minutos após início do procedimento, o equivalente a 35% de acetonitrila (Figura 26A). Após purificação, o complexo foi clivado com Usp2-cc, e as proteínas separadas novamente por meio de resina de níquel. A defensina totalmente purificada foi novamente purificada por cromatografia de fase-reversa HPLC, desta vez utilizando um gradiente linear de acetonitrila variando de 0 a 100%. A proteína de interesse foi eluída a 41% de acetonitrila (Figura 27). Esta concentração é comumente observada na eluição de defensinas vegetais, como descrito anteriormente para outras proteínas do mesmo grupo (Figura 27B; Melo *et al.*, 2002; Lay *et al.*, 2003; Franco *et al.*, 2006). A defensina purificada teve os aminoácidos seqüenciados e comparados com a seqüência de nucleotídeos original, revelando que, o fragmento de DNA clonado era equivalente a proteína expressa em células bacterianas. Com o objetivo de se confirmar a purificação da defensina, um novo SDS-PAGE foi feito, mostrando uma única banda de aproximadamente 6,0 kDa (Figura 28).

#### IV. Resultados e Discussão

---



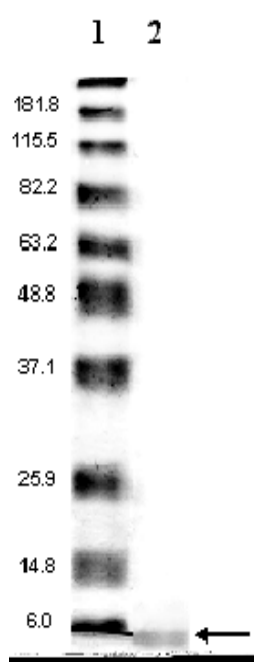
**Figura 26.** SDS-PAGE do complexo protéico VuD1-ubiquitina expresso em células BL21 (DE3) e purificado em resina de níquel (Ni-NTA). Seta preta indica banda correspondente à proteína recombinante. MW= marcador molecular; 1= parte solúvel da amostra após expressão e centrifugação; 2 = parte precipitada da amostra após expressão e centrifugação; 3= amostra não retida na resina de níquel; 4 = amostra obtida após lavagem da resina de níquel com tampão 2A; 5 a 9 = amostras da proteína recombinante após purificação com resina de níquel. Seta indica banda correspondente a proteína de interesse. MM representa o marcador molecular (kDa).

#### IV. Resultados e Discussão

---

#### IV. Resultados e Discussão

---



**Figura 28.** SDS-PAGE de *Vu*D1 clivada e purificada. Linha 1 indica marcador molecular com massas em kDa. Seta indica o peptídeo purificado na linha 2. MM corresponde ao marcador molecular (kDa).

##### 2.1.3. Ensaio enzimáticos

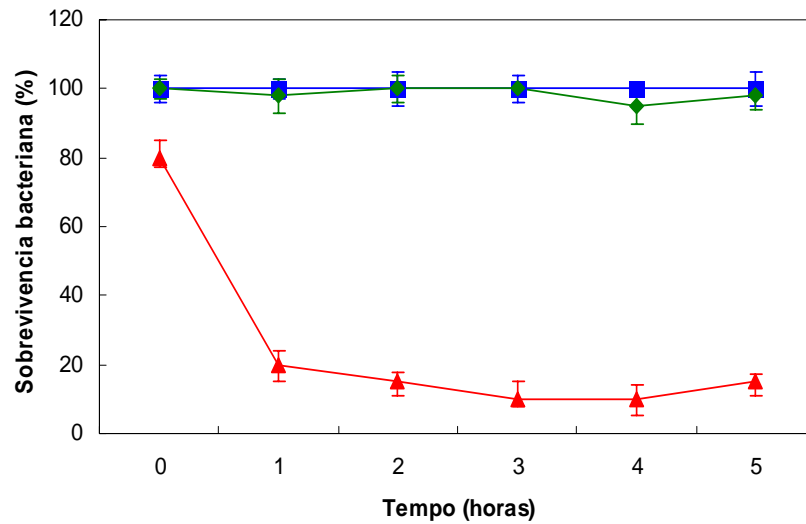
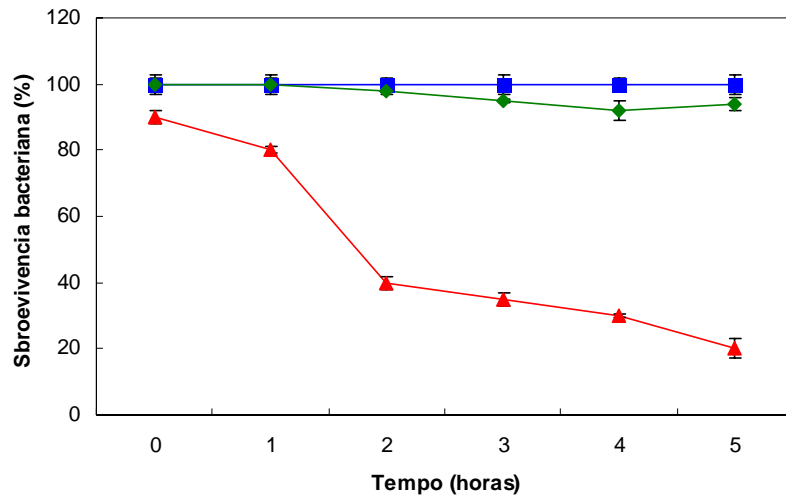
Objetivando analisar as diferentes funções de *VuD1*, esta defensina foi ensaiada contra bactérias, fungos e enzimas digestivas de insetos. Bioensaios usando a defensina purificada, agora nomeada *VuD1* contra fungos filamentosos, tais como *F. oxysporum* e *A. flavus* foram feitos. Porém nenhuma atividade inibitória foi observada sobre o desenvolvimento dos mesmos. Além disso, este peptídeo também não apresentou capacidade de inibir o crescimento de bactérias gram-negativas dos gêneros *Klebsiella* sp., *Proteus* sp e *Escherichia coli*, nem de bactérias gram-positivas da espécie *Staphylococcus aureus* (Figuras 29 e 30). Testes para análise de inibição de tripsina bovina também foram feitos com *VuD1*, mas esta foi incapaz de diminuir a atividade de proteinases (Figura 31).

Entretanto, *VuD1* foi extremamente ativa contra  $\alpha$ -amilases de *A. obtectus*, sendo capaz de inibir 60 % da atividade enzimática a uma concentração de  $5.0 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  (Figuras 31 e 32). Além disso, este peptídeo também foi capaz de inibir 60% da atividade enzimática de  $\alpha$ -amilase de *Zabrotes subfasciatus*. Por outro lado, ensaios mostraram que a mesma concentração foi capaz de inibir 40% da atividade de  $\alpha$ -amilase de saliva humana e apenas 10% de amilase de pâncreas de porco. Além disso, esta defensina não foi capaz de inibir  $\alpha$ -amilases de *C. maculatus* e *A. fumigatus* (Figuras 32 e 33).



#### IV. Resultados e Discussão

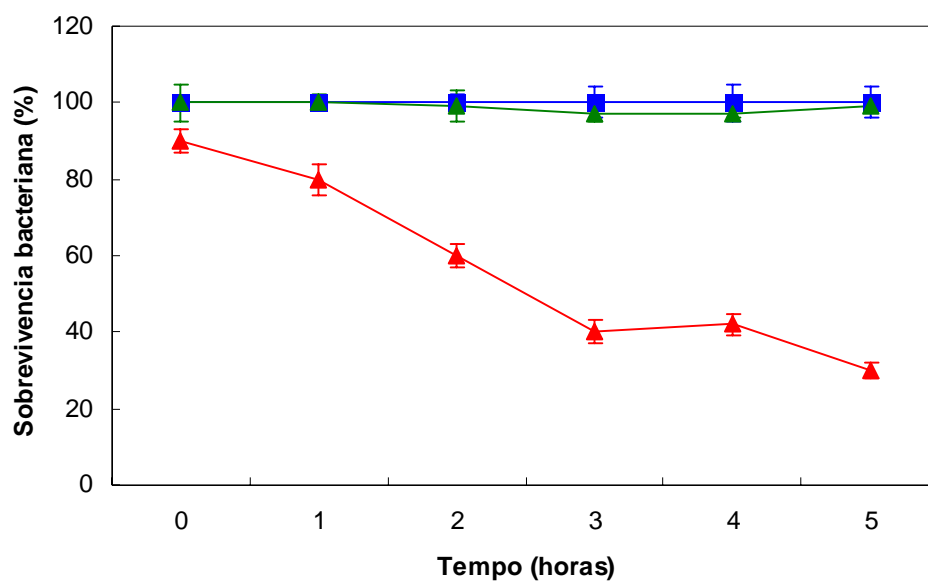
---



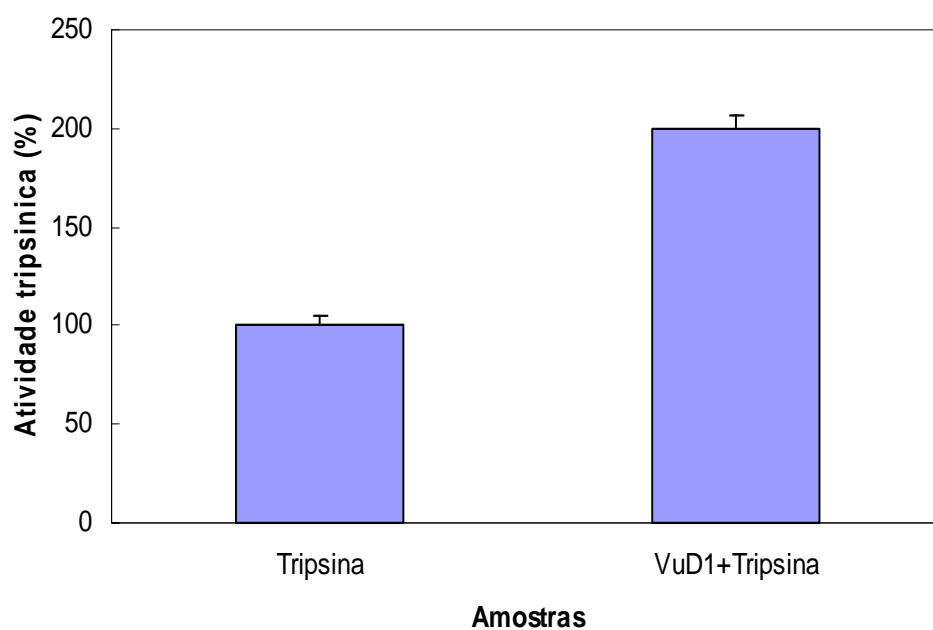
**Figura29.** Bioensaio bacteriano usando *Vu*D1 purificada contra **A)** *Proteus sp* e **B)** *Klebsiella sp.* (■) indica o controle negativo. (▲) indica o controle positivo. (◆) indica o teste usando *Vu*D1.

#### IV. Resultados e Discussão

---



**Figura29.** Bioensaio bacteriano usando *VuD1* purificada contra *Staphylococcus aureus*. (■) indica o controle negativo. (▲) indica o controle positivo. (◆) indica o teste usando *VuD1*.



**Figura 31.** Teste de inibição de tripsina bovina por *VuD1*. A primeira coluna representa a atividade da enzima sem a presença de *VuD1*. A segunda coluna representa a atividade enzimática da tripsina bovina na presença de *VuD1*.

#### IV. Resultados e Discussão

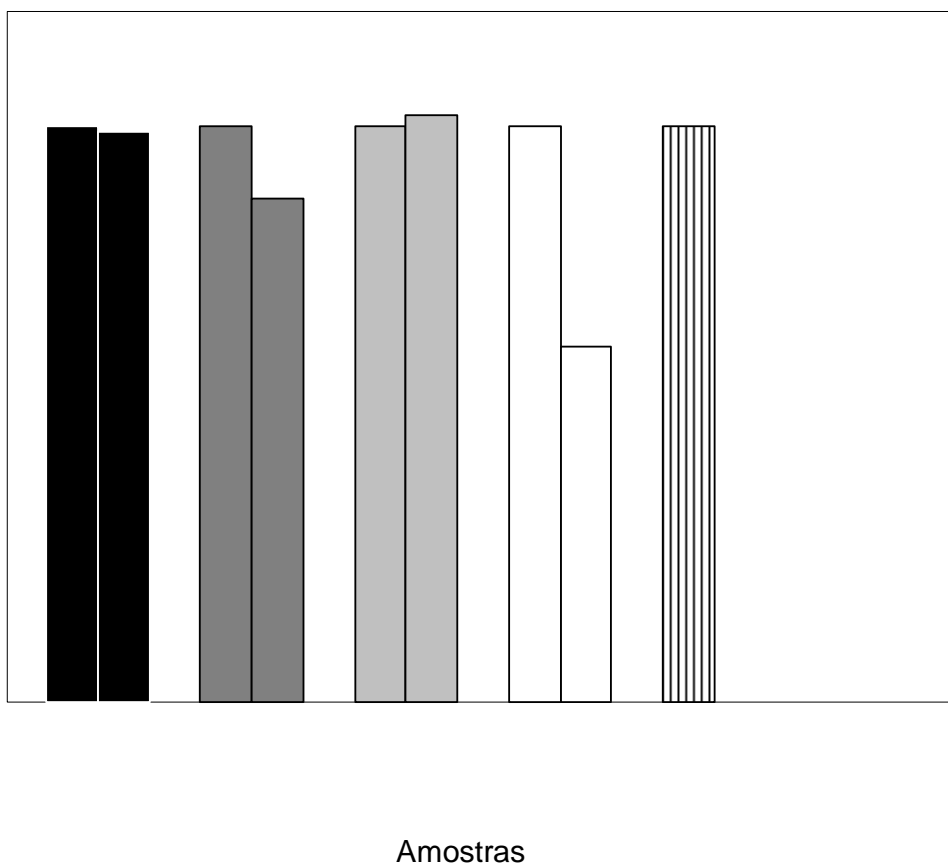
---

A partir dos experimentos feitos, pode-se observar que *Vu*D1 apresenta maior especificidade para  $\alpha$ -amilases de insetos, em especial de *A. obtectus*. Entretanto, também apresentou capacidade de inibir fracamente enzimas de saliva humana. Estudos anteriores descrevem proteínas de defesa de plantas com atividade inibidora de  $\alpha$ -amilases de várias espécies de planta. A primeira defensina de planta descrita com atividade inibitória de  $\alpha$ -amilases foi um peptídeo de sorgo (*S. bicolor*). Ela foi capaz de inibir  $\alpha$ -amilases de insetos das espécies *P. americana* e *S. americana*, mas não foi capaz de causar efeitos inibitórios em  $\alpha$ -amilases de mamíferos (Bloch & Richardson, 1991). Da mesma forma, um inibidor de *V. unguiculata* denominado  $\alpha$ AI-1 também demonstrou atividade inibitória contra  $\alpha$ -amilases de *Bacillus* sp, *Aspergillus oryzae*, *V. unguiculata* e *C. maculatus* a concentrações micromolares (Melo *et al.*, 1999).

Estudos recentes demonstraram que uma defensina de *V. radiata* também apresentava provável atividade inseticida, atuando contra  $\alpha$ -amilase de *Callosobruchus chinensis* (Chen *et al.*, 2004). Ensaio *in vivo* usando sementes com 0,01% da defensina de *V. radiata* (p/p) mostraram que o peso da larva diminuiu em um terço do peso normal após alimentar-se com as sementes artificiais (Chen *et al.*, 2004). Este peptídeo também foi capaz de inibir 80% da atividade de  $\alpha$ -amilase de *T. molitor* a uma concentração de 10 $\mu$ M (Liu *et al.*, 2006). Ademais, uma proteína isolada de sementes de mamão (*Carica papaya*) mostrou inibição da atividade de  $\alpha$ -amilase de *C. maculatus* (Farias *et al.*, 2006). Ensaio *in vivo*, utilizando sementes artificiais contendo 1,5% da proteína de mamão, demonstraram que larvas de *C. maculatus* apresentaram 50% de aumento de mortalidade e elevação de 50% da infertilidade

#### IV. Resultados e Discussão

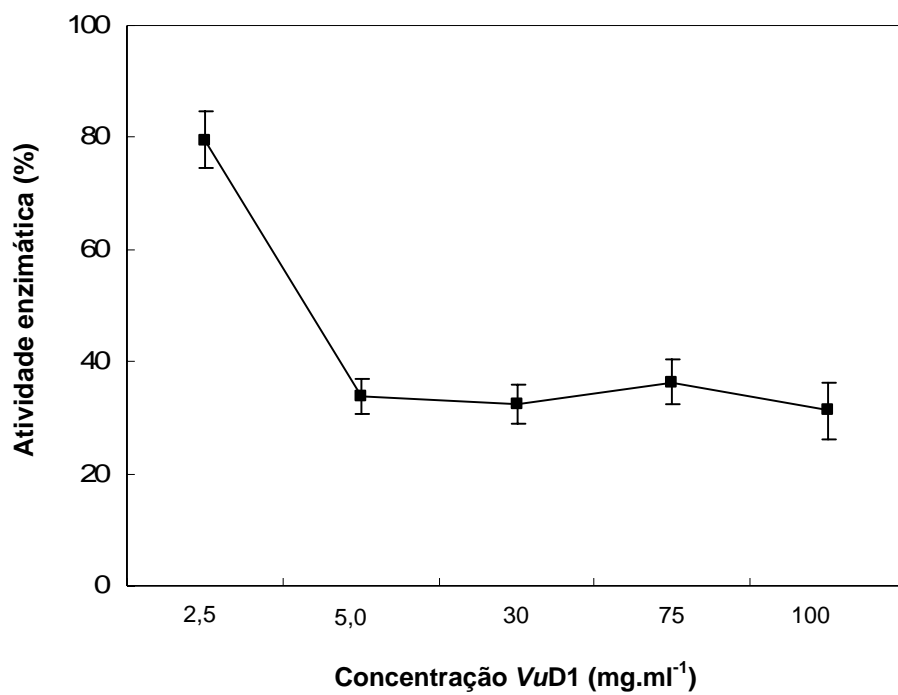
---



**Figura 32.** Ensaio enzimático de *VuD1* a  $5,0 \mu\text{g.ml}^{-1}$  contra  $\alpha$ -amilases de *C. maculatus* (CMA): CMA = *C. maculatus*; PPA = pâncreas de porco; Aasp = *A. fumigatus*; HA = saliva humana; AA= *A. obtectus*

#### IV. Resultados e Discussão

---



**Figura 33.** Curva de atividade de *VuD1* contra *A. obtectus*.

dos adultos após o consumo dos feijões artificiais (Farias *et al.*, 2006).

Outros inibidores  $\alpha$ -amilases de plantas tem sido descritos na literatura com atividade inseticida. Duas proteínas de trigo, denominadas 0.19 e 0.53 tem apresentado atividade inibitória contra diversas enzimas de insetos (Franco *et al.*, 2000). Foi demonstrado que ambas as proteínas foram capazes de inibir 100% da atividade de  $\alpha$ -amilases de *A. obtectus* e *C. maculatus*. 0.19 também foi capaz de inibir 90% da atividade enzimática de *Z. subfasciatus* e 80% das enzimas de pâncreas de porco, enquanto que 0.53 foi capaz de inibir 95% e 40% da atividade das respectivas  $\alpha$ -amilases (Franco *et al.*, 2000). Além disso, ensaios *in vivo* com essas mesmas proteínas mostraram que, a taxa de mortalidade de larvas de *A. obtectus* eleva-se em até 100% quando os insetos se alimentavam de sementes artificiais contendo 1,0% das proteínas (Franco *et al.*, 2005).

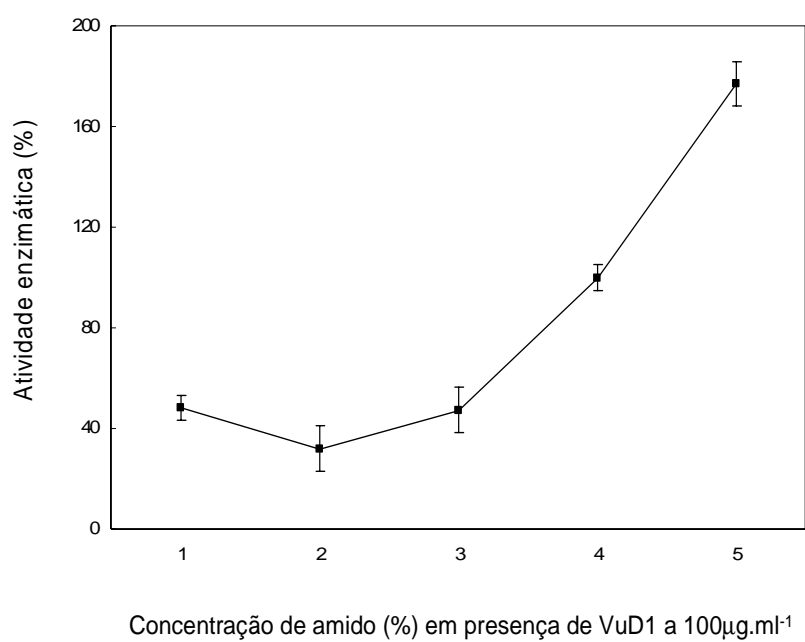
Ademais, uma proteína isolada de *Secale cereale* denominada de BIII foi capaz de inibir 85% da atividade de  $\alpha$ -amilase de *Z. subfasciatus* a uma concentração de  $25\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  (Iulek *et al.*, 2000). Nessa mesma concentração, BIII também inibiu 79% da atividade de  $\alpha$ -amilases de *A. obtectus* e 52% de pâncreas de porco (Iulek *et al.*, 2000).

#### **2.1.4. Ensaio enzimáticos adicionais**

Como o objetivo de se observar o potencial de inibição de *VuD1* em relação à ZSA, inferiu-se que, caso o inibidor fosse colocado em meio com uma concentração maior de substrato, sua atividade inibitória seria diminuída pela competição deste com o amido a ser

#### IV. Resultados e Discussão

---



**Figura 34.** Curva de atividade de *VuD1* contra  $\alpha$ -amilase de *Z. subfasciatus* em presença de diferentes concentrações de amido.



degradado pela enzima. Por isso, um experimento foi feito colocando *Vu*D1 purificada com ZSA em diferentes concentrações de amido. Ademais, o mesmo teste foi realizado com diferentes concentrações de inibidor e enzima. Pôde-se observar que, à medida que se aumentou a concentração do substrato, o inibidor diminuiu sua capacidade de interagir com a enzima até perder totalmente sua atividade inibitória (Figuras 30A e 30B). Em presença de 1, 2 e 3% de amido, houve inibição de ZSA por *Vu*D1 mas, a partir de 4% de amido, a atividade inibitória de *Vu*D1 não pôde ser mais observada. Portanto, pode-se inferir aqui que *Vu*D1 é dependente da concentração de substrato (amido) para inibição de amilase de *Zabrotes subfasciatus*.

##### **2.1.5. Análises *in silico* e modelagem molecular**

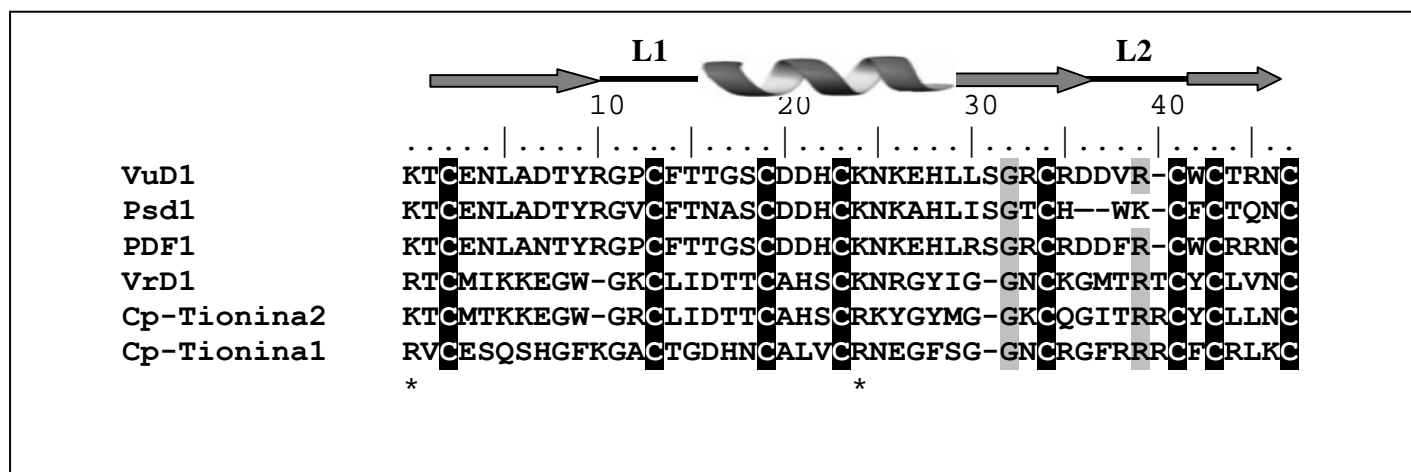
Um alinhamento com *Vu*D1 e cinco outras defensinas e tioninas de feijão mostrou que todos os membros dessas famílias são bastante similares entre espécies do gênero *Vigna*. *Vu*D1 apresentou alta identidade com as seqüências primárias de PDF1, uma defensina antifúngica de *V. radiata* (Tabela 3, Figura 35). No entanto, pôde-se observar que dentro da família das *Vigna* sp, a seqüência primária das defensinas é bastante similar, uma vez que os resíduos carregados positivamente encontram-se nas mesmas posições. Nas posições 1 e 25, há conservação de resíduos com carga positiva, uma vez que, quando não há argininas, observa-se a presença de lisinas. Assim, observa-se que os resíduos de cisteína também são conservados em todos os peptídeos analisados, bem como os aminoácidos glicina e arginina nas posições 33 e 40, respectivamente.

#### IV. Resultados e Discussão

**Tabela 3.** Defensinas e Tioninas do gênero *Vigna*.

Nome	Numero de acesso	Origem	Função	Identidade com VuD1	Similaridade com VuD1	Referencia
VuD1	-	<i>V. unguiculata</i>	Inibidora de $\alpha$ -amilase	-	-	Este trabalho
10kDa defensina	P189646	<i>V. unguiculata</i>	Inibidora de $\alpha$ -amilase	97,9%	97,9%	Ishibashi <i>et al.</i> , 1990
PDF1	BAB82453	<i>V. radiata</i>	Não relatada	91,5%	93,6%	Executo & Kaga, 2002
VrD1	AAR08912	<i>V. radiata</i>	Inibidora de $\alpha$ -amilase	31,2%	50%	Chen <i>et al.</i> , 2004
Cp-tionina 1	P83399					
Cp-tionina 2	P84920					

#### IV. Resultados e Discussão



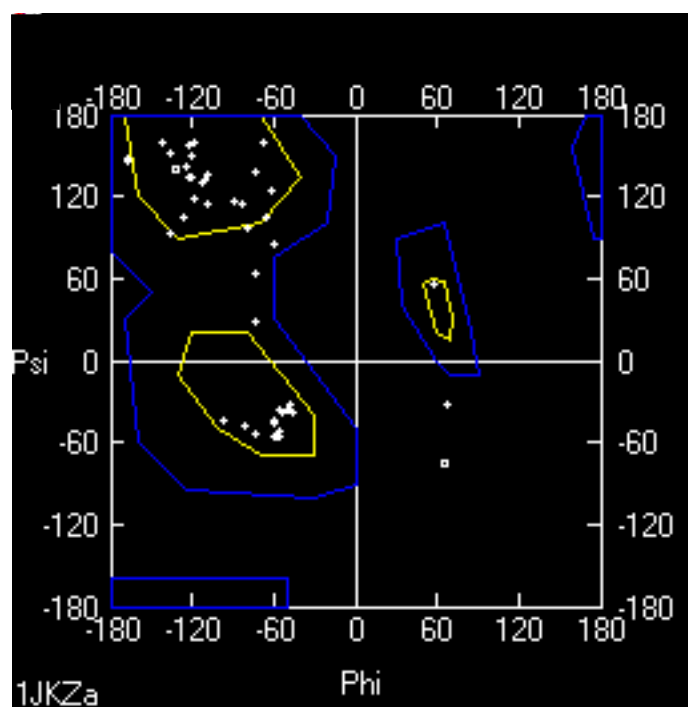
**Figura 35.** Alinhamento estrutural de *VuD1* com defensina antifúngica de *Pisum sativum*, Psd1 (PDB: 1jkz) e com outras defensinas de plantas e defensina e tioninas de planta da família Phaseolaceae. Os resíduos em caixas pretas indicam as cisteínas conservadas. Resíduos em caixas cinza indicam glicinas e argininas conservadas. Asteriscos indicam regiões conservadas de aminoácidos carregados positivamente. As estruturas secundárias estão representadas por setas, para fitas- $\beta$  e por cilindros, para  $\alpha$ -hélice.

#### IV. Resultados e Discussão

---

A glicina parece estar relacionada com a flexibilidade da estrutura dos peptídeos, o que auxilia também no desenvolvimento de suas funções (Pelegri e Franco, 2005). Com o intuito de se obter a estrutura tridimensional de VuD1, um alinhamento estrutural contra uma defensina de planta de *P. sativum*, foi realizado, uma vez que este peptídeo mostrou maior identidade com VuD1 no Programa BioInfo Meta Server, apresentando um score de -37,9 no Programa FFAS03 (Ginalski *et al.*, 2003). Pode-se observar uma alta conservação dos resíduos de aminoácidos, principalmente entre as cisteínas, como observado no alinhamento anterior (Figura 35). Após a sobreposição dos resíduos, o modelo gerado mostrou a presença de uma  $\alpha$ -hélice, seguido das três fitas- $\beta$  antiparalelas, estrutura esta típica de defensinas de plantas (Figura 37). Esta mesma estrutura já foi anteriormente obtida em defensinas de *V. radiata* (Liu *et al.*, 2006), *P. hybrida* (Janssen *et al.*, 2003), *P. sativum* (Almeida *et al.*, 2002), *N. alata* (Lay *et al.*, 2003) e *R. sativus* (Fans *et al.*, 1998). Análises no Ramachandran plot indicaram que apenas dois resíduos encontraram-se fora da região de aceitação, estando dentro dos limites considerados confiáveis para a modelagem molecular de VuD1 (92% dos resíduos aceitos) (Figura 36).

Como VuD1 apresentou atividade contra  $\alpha$ -amilase de insetos, uma dockagem *in silico* foi feita com o intuito de se observar quais resíduos do inibidor eram importantes para a interação com a enzima. Assim, a amilase escolhida foi a de *Z. subfasciatus* (ZSA) As figuras 33A e 33B ilustram a complexação entre enzima e inibidor. Pode-se observar que há uma interação entre os resíduos Lis<sub>1</sub> com os aminoácidos negativamente carregados do sítio catalítico de ZSA



**Figura 36.** Ramachandran plot da estrutura obtida por análises *in silico* de *VuD1*. Pontos brancos representam os aminoácidos que formam a estrutura primária do peptídeo. Regiões circulares em amarelo e azul representam áreas consideradas aceitáveis para estabilidade dos aminoácidos quando na estrutura terciária. Os quatro quadrantes representam as regiões da  $\alpha$ -hélice e fitas- $\beta$ .

#### IV. Resultados e Discussão

---

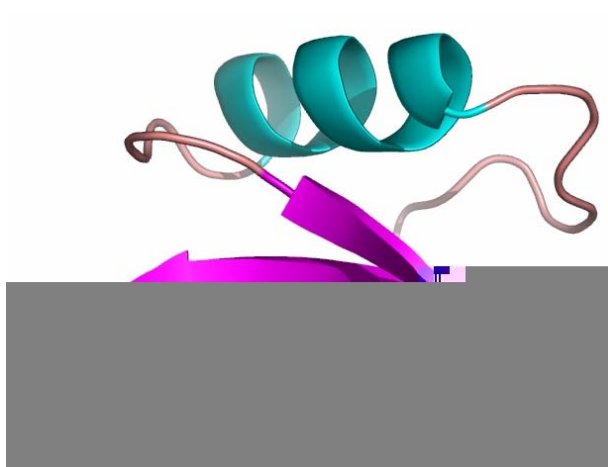
(Asp<sub>204</sub>, Glu<sub>240</sub>, Asp<sub>305</sub>). A interação de moléculas protéicas com estes três resíduos presentes no sítio ativo de  $\alpha$ -amilases, também conhecidos como tríade catalítica, parecem ser o ponto-chave na inibição eficaz de enzimas digestivas. Analisando-se a distância entre os resíduos do inibidor com os de ZSA, sugere-se que a ligação ocorra por formação de ponte salina entre Lis<sub>1</sub> de VuD1 e Glu<sub>240</sub> de ZSA, já que a distância entre eles foi de 3,6 Å. Além disso, pôde-se observar formação de pontes de hidrogênio mediadas por moléculas de água entre Lis<sub>1</sub> de VuD1 e Asp<sub>204</sub>, bem como entre este mesmo resíduo do peptídeo de feijão-de-corda com Asp<sub>305</sub> de ZSA, apresentando distâncias de 5,7 e 5,2 Å, respectivamente (Figura 39).

Não obstante, visualizando-se a camada eletrostática de VuD1 (Figura 33B), observa-se que a região de interação é representada em azul, indicando uma área positivamente carregada, o que pode ser confirmado pela presença dos resíduos de lisina na extremidade da molécula. Não obstante, a região central de VuD1 é composta por uma área branca correspondente a resíduos não-polares, sendo circundada por áreas carregadas positivamente e negativamente (em azul e vermelho, respectivamente, Figura 39).

Apesar de estudos anteriores descreverem a importância do Loop2 na atividade inibitória de enzimas digestivas (Liu *et al.*, 2006), VuD1 utiliza resíduos das extremidades C-e N-terminal para bloquear o sítio ativo de  $\alpha$ -amilases de insetos. Contudo, estudo

#### IV. Resultados e Discussão

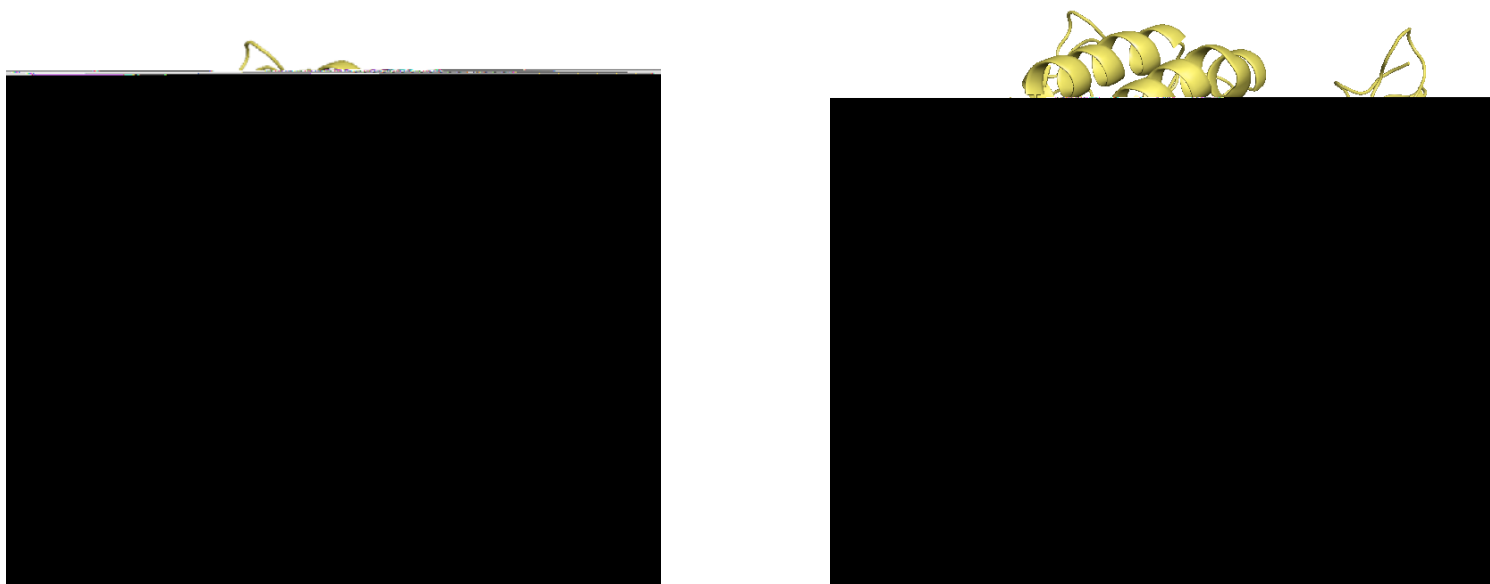
---



**Figura 37** . Modelo da estrutura tridimensional de *VuD1*, utilizando-se o Programa Pymol. Em verde:  $\alpha$ -hélice; em rosa: fitas- $\beta$ .

#### IV. Resultados e Discussão

---

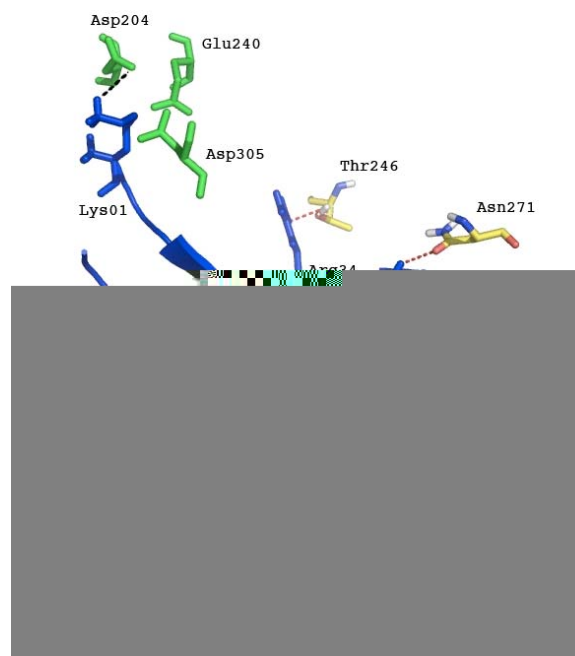


**Figura 38.** **A)** Interação entre *VuD1* (vermelho) e  $\alpha$ -amilase de *Z. subfasciatus* (amarelo). **B)** Interação enzima-inibidor mostrando camada eletrostática de *VuD1*, onde a região em vermelho indica presença de resíduos carregados negativamente, o azul corresponde à região carregada positivamente e o branco à região não polar.



#### IV. Resultados e Discussão

---



**Figura 39.** Interação entre os resíduos do inibidor (Lys<sub>1</sub> e Cis<sub>47</sub>) com os resíduos do sitio catalítico de ZSA (Asp<sub>204</sub>, Glu<sub>240</sub> e Asp<sub>305</sub>). *Vu*D1 está representado em vermelho; ZSA está representado em verde. Linhas amarelas indicam a distância em ângstroms da interação entre os resíduos da enzima com os resíduos do inibidor.

#### IV. Resultados e Discussão

---

anteriores também revelaram que a estrutura de ZSA é bastante similar à estrutura da  $\alpha$ -amilase de *T. molitor* (TMA) (Pelegriani *et al.*, 2006). O sítio ativo de ambas as enzimas são idênticos e, por isso, achava-se que o mecanismo de ação dos inibidores pudesse ocorrer de forma semelhante (Pelegriani *et al.*, 2006).

Estudos anteriores revelaram ligações semelhantes entre  $\alpha$ -amilases de insetos e inibidores de plantas. Assim um inibidor de cereal *Secale cereale*, denominado BIII, mostrou interação com amilase de *T. molitor* (TMA) na região do sítio catalítico (Dias *et al.*, 2005). Três segmentos de BIII apresentaram importância na inibição de amilases de insetos. Desta forma, a região N-terminal, correspondente aos resíduos Ser<sub>1</sub>, Glu<sub>2</sub> e Asp<sub>3</sub>, liga-se aos resíduos Glu<sub>221</sub> e Asp<sub>286</sub> de TMA, enquanto que a região do C-terminal forma uma barreira que impede o acesso do substrato (Dias *et al.*, 2005). Há ainda uma terceira região denominada “collar region”, que parece ser importante na estabilização do complexo enzima-inibidor (Dias *et al.*, 2005). Comparando-se então, ao mecanismo de inibição de BIII com *VuD1*, observa-se que o peptídeo de feijão-de-corda também interage com a  $\alpha$ -amilase de *Z. subfasciatus* por meio do resíduo Lis<sub>1</sub> presente no N-terminal. Pode-se propor que o resíduo Cys<sub>47</sub> do C-Terminal de *VuD1* esteja presente na região de ligação enzima-inibidor para também evitar o acesso do substrato, como o que ocorre em BIII-TMA.

Estudos adicionais observaram que BIII não era capaz de inibir amilases de mamíferos, ao contrário de outros inibidores, como o 0.19 de trigo, o qual apresenta atividade contra enzimas de pâncreas de porco (Franco *et al.*, 2000; Dias *et al.*, 2005). Não obstante, comparações entre a sequência primária de BIII e 0.19 mostraram que, enquanto a primeira apresentava um resíduo de

#### IV. Resultados e Discussão

---

histidina na posição 47, a segunda continha um resíduo de asparagina. A presença de His<sub>47</sub>, então, mostrou ser importante na capacidade de um inibidor se ligar a enzimas de mamíferos (Glu<sub>349</sub> de PPA) e causar inibição (Dias *et al.*, 2005). Portanto, observando a seqüência de *Vu*D1, há uma asparagina na posição 47, comprovando sua ineficácia na inibição de amilase de mamíferos, como também confirma a teoria de que mesmo apresentando 98% de identidade de seqüência, inibidores de plantas podem mostrar especificidade por enzimas de diferentes espécies (Franco *et al.*, 2000; Dias *et al.*, 2005).

Contudo, tem-se identificado diversos inibidores enzimáticos de plantas com mecanismos de ação variados. Do mesmo modo, uma defensina de *V. radiata* chamada *Vr*D1 apresentou habilidade de inibir amilases de *T. molitor* (TMA) (Liu *et al.*, 2006). Parece que o mecanismo de ação entre as defensinas de planta diferem somente pela parte da molécula do inibidor utilizada para bloquear o sítio ativo da enzima, ou seja, se este utilizara um loop, uma extremidade da estrutura, ou outra parte da molécula. Portanto, *Vr*D1 foi capaz de formar pontes de hidrogênio com três aminoácidos do sítio ativo de *T. molitor* (Glu<sub>222</sub>, Asp<sub>287</sub> e Asp<sub>332</sub>), como também mostrou que o segundo loop da estrutura apresentava-se importante para a interação e inibição enzimática (Liu *et al.*, 2006). Não obstante, o mesmo mecanismo foi observado com uma gamma-hordotionina ( $\gamma$ -H) de cevada (Liu *et al.*, 2006). Demonstrou-se mais uma vez que o Loop2 de  $\gamma$ -H era capaz de se inserir no sítio ativo de TMA, impedindo a entrada do substrato. Além disso, foi observado que resíduos carregados positivamente nos Loops1 e 2 (Lis<sub>12</sub> e Arg<sub>38</sub> em *Vr*D1, Arg<sub>39</sub> e Arg<sub>40</sub> em  $\gamma$ -H) eram importantes para a interação com as  $\alpha$ -amilases (Mendez *et al.*, 1990; Liu *et al.*, 2006), o qual não ocorre com defensinas de plantas que apresentam um Loop2

#### IV. Resultados e Discussão

---

curto. O mecanismo de ação para defensinas de plantas inseticidas ainda não foi completamente definido, mas outras hipóteses têm sido propostas.

Uma delas relaciona-se com a importância de íons  $\text{Ca}^{2+}$  para a atividade de algumas  $\alpha$ -amilases (Pelegri *et al.*, 2006). Neste caso, alguns autores sugerem que as defensinas são capazes de quelar o cálcio, desestabilizando a enzima e aumentando a potencia de inibição (Castro & Fontes, 2005; Pelegri & Franco, 2005). Contudo, *VuD1* mostrou ser um inibidor de  $\alpha$ -amilases com mecanismo de ação diferente dos descritos anteriormente. Apesar da forma de interação com a enzima ser bastante similar a outros peptídeos inibidores, esta defensina de feijão-de-corda parece não ser um quelante de cálcio e não se utiliza do Loop2 de sua estrutura para causar inibição do sítio ativo. Portanto, *VuD1* mostrou que as extremidades da molécula também podem ser importantes para atividade inseticida.

### V. CONCLUSÕES

1. O peptídeo antifúngico isolado de sementes de maracujá (*Pe-AFP1*) foi capaz de inibir o crescimento dos fungos filamentosos *A. fumigatus* e *F. oxysporum*, mostrando-se eficiente no controle de fungos causadores de infecções hospitalares, bem como de fitopatógenos. Este peptídeo apresentou similaridade com proteínas de armazenamento do tipo albuminas 2S, proporcionando novas evidências da participação de proteínas deste grupo no mecanismo de defesa de plantas contra agentes patogênicos.
2. O peptídeo antimicrobiano de sementes de goiaba (*Pg-AMP1*) demonstrou atividade antimicrobiana contra bactérias gram-negativas dos gêneros *Klebsiella* sp e *Proteus* sp, principais causadores de infecções hospitalares e gastro-intestinais, respectivamente. Este peptídeo apresentou similaridade com as proteínas ricas em glicina, evidenciando a existência de moléculas de defesa de planta dentro desta família de proteínas, com atividade antimicrobiana. A sua estrutura tridimensional revelou a necessidade de formação de dímeros para a atividade antimicrobiana, com interação nas regiões hidrofóbicas entre os monômeros, bem como a existência de resíduos carregados positivamente para interação com receptores presentes na superfície celular de patógenos.
3. A caracterização de *Pe-AFP1* e *Pg-AMP1* proporcionou evidências de que proteínas de armazenamento dos tipos albumina 2S e proteínas ricas em glicina também podem apresentar funções antimicrobianas envolvidas na defesa de plantas.

4. A clonagem da defesina de feijão-de-corda (*VuD1*) revelou a presença de uma possível família multigenica de peptídeos do mesmo grupo, podendo estes ser estudados como intuito de se obter novas ferramentas biotecnológicas no combate a insetos-praga. Este peptídeo mostrou ação inibitória de  $\alpha$ -amilases como fontes de resistência em plantas transgênicas de feijão. A sua seqüência primaria e estrutura tridimensional *in silico* foram similares a das defensinas de plantas, revelando que espécies de feijão são ricas neste tipo de peptídeo de defesa e que, provavelmente, apresentam diferentes funções na planta, além da inibidora de enzimas digestivas. A modelagem molecular da interação entre *VuD1* e  $\alpha$ -amilase de *Z. subfasciatus* (*ZSA*) demonstrou que a inibição enzimática pode ocorrer por meio de interações com o sítio ativo da enzima, confirmando o mecanismo proposto para outras amilases de insetos. A importância dos resíduos presentes nas extremidades estruturais de *VuD1* para a inibição enzimática e sua interação *in silico* com  $\alpha$ -amilase de *Z. subfasciatus* proporcionou novas evidências sobre o mecanismo de ação de inibidores de  $\alpha$ -amilase de insetos.

## VI. Perspectivas

---

### VI. PERSPECTIVAS

Peptídeos de sementes de plantas têm sido propostos como novas fontes úteis para utilização no desenvolvimento de plantas transgênicas resistentes a fitopatógenos, bem como a produção de novos medicamentos que diminuam a incidência de organismos resistentes (Selitrennikoff, 2001; Pelegrini e Franco, 2005). Nesse âmbito, diversos peptídeos têm sido isolados e caracterizados, com o propósito de serem utilizados na biotecnologia para melhoramento genético de plantas ou desenvolvimento de medicamentos de origem protéica (Franco *et al.*, 2002; Pelegrini e Franco, 2005). No entanto, nenhum peptídeo de sementes de goiaba (*P. guajava*) com atividade antimicrobiana havia sido purificado e caracterizado bioquimicamente. Com isso, demonstrou-se que esta fruta apresenta peptídeos ativos contra bactérias gram-negativas que podem ser utilizadas na produção de medicamentos que auxiliem no tratamento de infecções hospitalares e gastro-intestinais. Conseqüentemente, estes peptídeos também serão úteis no retardamento de resistência bacteriana, quando administrados em paralelo aos antibióticos sintéticos comercializados. A partir dos resultados obtidos, será possível estudar a seqüência primária deste peptídeo detalhadamente com o objetivo de se observar a importância de cada aminoácido para a atividade antimicrobiana. Para isso, experimentos com mutagênese sítio-dirigida poderão ser feitos, bem como ressonância magnética nuclear, a fim de se confirmar também a estrutura tridimensional obtida por meio de modelagem molecular.

## VII. Perspectivas

---

Além disso, a clonagem e expressão do gene que codifica *Pg*-AMP1 pode auxiliar na produção em larga escala deste peptídeo, favorecendo o desenvolvimento dos procedimentos acima citados.

Do mesmo modo, um peptídeo de sementes de maracujá (*P. edulis*) mostrou atividade contra fungos filamentosos, podendo ser usado para futuro desenvolvimento de plantas transgênicas resistentes ao ataque de *F. oxysporum*. Ademais, *Pe*-AFP1 poderá ser utilizado para a produção de fungicidas de origem protéica com capacidade de inibir o crescimento de *A. fumigatus*, auxiliando no tratamento de infecções pulmonares em pacientes imunodeprimidos. Como não foi possível obter a seqüência primária completa deste peptídeo, propõem-se novos experimentos a fim de se conseguir todos os aminoácidos pertencentes a *Pe*-AFP1. Com isso, será possível obter sua estrutura tridimensional, a qual poderá ser feita tanto por meio de modelagem molecular *in silico*, como por ressonância magnética nuclear. Além disso, o mecanismo de ação pode ser confirmado experimentalmente por meio de clonagem e expressão do gene que codifica *Pe*-AFP1. O isolamento do gene poderá permitir a realização de experimentos *in vivo* por meio da construção de plantas transgênicas e avaliação da expressão do peptídeo no campo.

Não obstante, diversos inibidores de enzimas de insetos têm sido descritos na literatura (Melo *et al.*, 1999; Morton *et al.*, 2000; Melo *et al.*, 2002; Franco *et al.*, 2005). Contudo, a descoberta de um inibidor de  $\alpha$ -amilases de sementes de feijão-de-corda (*V. unguiculata*) semelhante a defensinas de planta demonstra que esta leguminosa provavelmente apresenta uma família multigênica de peptídeos deste grupo com diversas funções, uma vez que já se tem descrito defensinas com atividade inibidora de tripsina e antibacteriana (Melo *et al.*, 2002;



## VII. Perspectivas

---

Franco *et al.*, 2006). Portanto, o isolamento e caracterização de *VuD1* podem evidenciar que o feijão-de-corda apresenta peptídeos de defesa de plantas com as mais variadas funções, sugerindo que outras plantas de diferentes espécies possam também apresentar esta característica. Futuros experimentos podem ser feitos utilizando a produção de sementes artificiais com *VuD1* em diferentes concentrações contra larvas de insetos-praga, a fim de se avaliar se o peptídeo é capaz de inibir o crescimento deste patógeno em diferentes estágios de desenvolvimento. Além disso, utilizando-se o gene que codifica *VuD1*, provavelmente poderá ser possível a construção de plantas transgênicas e assim desenvolver experimentos *in vivo* para avaliação da expressão deste peptídeo no campo, sob ataque de insetos-praga. A estrutura tridimensional de *VuD1* também deverá ser confirmada por meio de experimentos, usando ressonância nuclear magnética. Estudos com mutagênese sítio-dirigida serão importantes para avaliar a importância dos resíduos de aminoácidos para a atividade inibitória de enzimas, bem como para estabilidade estrutural do peptídeo.

## VII. Referências Bibliográficas

---

### VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agizzio, A. P., Carvalho, A. O., Ribeiro, F. F., Machado, O. L. T., Alves, E. W., Okorokov, L. A., Samarão, S. S., Bloch Jr., C. Prates, M. V., Gomes, V. M. (2003) A 2S albumin-homologous protein from passion fruit seeds inhibits the fungal growth and acidification of the medium by *Fusarium oxysporum*. **Arch. Biochem. Biophys.**, 416, 188–195.

Almeida, M. S., Cabral, K. M., Kurtenbach, E., Almeida, F. C., Valente, A. P. (2002) Solution structure of *Pisum sativum* defensin 1 by high resolution NMR: Plant defensins, identical backbone with different mechanisms of action. **J. Mol. Biol.**, 315, 749–757.

Baker, J. E., Woo, S. M. (1992) Digestion of starch by  $\alpha$ -amylases from the rice weevil *Sitophilus oryzae*: effect of starch type, fat extraction, granule size, mechanical damage, and detergent treatment. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, 22, 529-537.

Barciszewski, J., Szymanski, M. Haertle, T. (2000) Minireview: analysis of rape seed napin structure and potential. **J. Protein. Chem.**, 19, 249-254.

## VII. Referências Bibliográficas

---

Baron, S. M. D., Peake, R. C., James, D. A., Susman, M, Kennedy, C. A., Singleton, M. J. D., Schuenke, S. (1996) **Medical Microbiol.** 4<sup>a</sup> ed. The University of Texas Medical Branch at Galveston.

Bergeron, M. G., Bernier, M. (1994) Bactericidal activity of cefpirome (HR 810) against 513 gram-negative bacteria isolated from blood of septicemic patients. **Infection**, 22, 299-305.

Bernfeld, P. (1955) Amylase  $\alpha$  and  $\beta$ . **Methods Enzymol.**, 1, 149-154.

Bloch, C., Jr., Richardson, M. (1991) A new family of small (5 kDa) protein inhibitors of insect alpha-amylases from seeds of sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) have sequence homologies with wheat gamma-purothionins. **FEBS Lett.**, 279, 101–104.

Blum, H. Beier, H. Gross, H. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, 8, 93-99.

Bohlmann, H., Vignutelli, A., Hilpert, B., Miersch, O., Wasternack, C., Apel, K. (1998) Wounding and chemicals induce expression of the *Arabidopsis thaliana* gene *Thi2.1*, encoding a fungal defense thionin, via the octadecanoid pathway. **FEBS Lett.**, 437, 281–286.

## VII. Referências Bibliográficas

---

Boman, H. G. (2003) Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. **J. Inter. Med.**, 254, 197-215.

Botelho, A. C. G., Arthur, V., do Amaral Filho, B. F. (2002) Influencia de linhagens de feijão portadoras de variantes da proteína arcelina irradiadas sobre a reprodução de *Acanthoscelides obtectus* (SAY) (Coleoptera: Bruchidae). **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, 69, 95-98.

Brayer, G. D., Luo, Y., Withers, S. G. (1995) The structure of human pancreatic  $\alpha$ -amylase at 1.8 Å, resolution and comparisons, with related enzymes. **Prot. Sci.**, 4, 1730-1742.

Breiteneder, H., Radauer, C. (2004) A classification of plant food allergens, **J. Allergy Clin. Immunol.**, 113, 821–830.

Brown, D. W., Butchko, R. A., Proctor, R. H. (2006) *Fusarium* genomic resources: Tools to limit crop diseases and mycotoxin contamination. **Mycopathologia**, 162, 191-199.

Bruix, M., Jimenez, M. A., Santoro, J., Gonzales, C., Colilla, F. J., Mendez, E. (1993) Solution structure of gamma 1-H and gamma 1-P thionins from barley and wheat endosperm determined by 1H-NMR: A structural motif common to toxic arthropod proteins. **Biochemistry**, 32, 715–724.

## VII. Referências Bibliográficas

---

Bull, J., Mauch, F., Hertig, C., Rebmann, G., Dubler, R. (1992) Sequence and expression of a wheat gene that encodes a novel protein associated with pathogen defense. **Mol. Plant Microbe Interact.**, 5, 516-519.

Buonocore, V., Poeria, E., Silano, V., Tomasi, M. (1976) Physical and catalytic properties of alpha-amylase from *Tenebrio molitor* L. larvae. **Biochem. J.**, 153, 621-625.

Burdon, J. J. (2007) Origin and maintenance of variation in plant pathogens. **Department of the Environment and Water resources: Australian Government.**  
[www.anbg.gov.au/cpbr/programs/sc/path\\_vari.htm](http://www.anbg.gov.au/cpbr/programs/sc/path_vari.htm) [site informativo].

Burgess, L. W., Dodman, R. L., Pont, W., and Mayers, P. (1981) Fusarium diseases of wheat, maize, and grain sorghum in Eastern Australia. P. E. Nelson, T. A. Toussoun, and R. J. Cook (eds.). The Pennsylvania State University Press. University Park, PA, IN: **Fusarium: Diseases, Biology, and Taxonomy**, 64-76.

Campos, F. A. P., Xavier-Filho, J., Silva, C. P., Ary, M. B. (1989) Resolution and partial characterization of proteinases and R-amylases from midguts of larvae of the bruchid beetle *Callosobruchus maculatus* (F.). **Comp. Biochem. Physiol., Part B: Biochem. Mol. Biol.**, 92, 51-57.

## VII. Referências Bibliográficas

---

Castro, M. S., Fontes, W. (2005) Plant defence and antimicrobial peptides. **Prot. Pep. Lett.**, 12, 13-18.

Catanzariti, A-M., Soboleva, T. A., Jans, D. A., Board, P. G., Baker, R. T. (2004) An efficient system for high-level expression and easy purification of an authentic recombinant proteins. **Protein Sci** ,13, 1331-1339.

Chen, J. J., Chen, G. H., Hsu, H. C., Li, S. S., Chen, C. S. (2004) Cloning and functional expression of a mungbean defensin VrD1 in *Pichia pastoris*. **J. Agric. Food Chem.**, 52, 2256-2261.

Condit, C. M., Meagher, R. B. (1987) Expression of a gene encoding a glycine-rich protein in petunia. **Mol. Cell Biol.**, 7, 4273-4279.

Davies, G., Henrissat, B. (1995) Structures and mechanisms of glycosylhydrolases. **Structure**, 9, 853-859.

DeLano, W. L. (2002) Unraveling host in binding interfaces: progress and challenges. **Curr. Opin. Struct. Biol.** 12, 14-20.

## VII. Referências Bibliográficas

---

Dong, J.-Z., Dunstan, D.I. (1999) Cloning and characterization of six embryogenesis- associated cDNAs from somatic embryos of *Picea glauca* and their comparative expression during zygotic embryogenesis, **Plant Mol. Biol.**, 39, 859–864.

Egorov, T. A., Odintsova, T. I., Pukhalsky, V. A., Grishin, E. V. (2005) Diversity of wheat anti-microbial peptides. **Peptides**, 26, 2064-2073.

Elbasha, E. (1999) Deadweight Loss of Bacterial Resistance Due to Overtreatment. **U.S. Centers for Disease Control and Prevention**, Atlanta.

Erlish, P. R., Raven, P. H. (1964) Butterflies and plants: a study in co-evolution. **Evolution.**, 1, 18.

Faus, M. J., Fernández-Llimós, F. (2003) Problemas Relacionados con Medicamentos: como factores de riesgo. **Seguim Farmacoter**, 1, 147-148.

Farias, L. R., Costa, F. T., Souza, L. A., Pelegrini, P. B., Grossi-de-Sá, M. F., Bloch Jr., C., Laumann, R. A., Noronha, E. F., Franco, O. L. (2007). Isolation of a novel *Carica papaya*  $\alpha$  - amylase inhibitor with deleterious activity toward *Callosobruchus maculatus*. **Pesticide Biochem. Physiol.** 87, 255-260.

## VII. Referências Bibliográficas

---

Fedorova, M., van de Mortel, J., Matsumoto, P. A., Cho, J., Town, C. D., VanderBosch, K. A., Gantt, J. S., Vance, C. P. (2002) Genome-wide identification of nodule-specific transcripts in the model legume *Medicago trunculata*. **Plant Physiol.**, 130, 519-537.

Feldman, C., Kallenbach, J. M., Levy, H., Thorburn, J. R., Hurwitz, M. D., Koornhof, H. J. (1991) Comparison of bacteraemic community-acquired lobar pneumonia due to *Streptococcus pneumoniae* and *Klebsiella pneumoniae* in an intensive care unit. **Respiration**, 58, 265-270.

França, A. T., Abe, A. T., Reza, D. L., Bergter, E. B., Blanc, E. S., Serpa, F. S., Pires, G. V., Cintra, L. C., Valle, S. O. R. (1996) Aspergilose broncopulmonar alérgica. **Universidade Federal do Rio de Janeiro.**, cap. Patologia. [www.medstudents.com/imuno/asperg/patol.htm](http://www.medstudents.com/imuno/asperg/patol.htm) [site informativo].

Franco, O. L., Rigden, D. J., Melo, F. R., Bloch, C., Jr., Silva, C. P., Grossi-de-Sá, M. F. (2000) Activity of wheat R-amylase inhibitors towards bruchid R-amylases and structural explanation of observed specificities. **Eur. J. Biochem.**, 267, 1466-1473.

Franco, O. L., Rigden, D. J., Melo, F. R., Grossi-de-Sá, M. F. (2002) Plant  $\alpha$ -amylase inhibitors and their interaction with insect  $\alpha$ -amylases. Structure, function and potential for crop protection. **Eur. J. Biochem.**, 269, 397-412.



## VII. Referências Bibliográficas

---

Franco, O. L., Melo, F. R., Mendes, P. A. M., Paes, N. S., Yokoyama, M., Coutinho, M. V., Bloch Jr., C., Grossi-de-Sá, M. F. (2005) Characterization of two *Acanthoscelides obtectus* alpha-amylases and their interaction with wheat inhibitors. **J. Agric. and Food Chem.**, 53, 1585-1590.

Franco, O. L., Murad, A. M., Leite, J. R., Mendes, P. A. M., Prates, M. V., Bloch Jr., C. (2006) Identification of a cowpea  $\gamma$ -thionin with bactericidal activity. **FEBS J.**, 273, 3489-3497.

French, G. L., Shannon, K. P., Simmons, N. (1996) Hospital outbreak of *Klebsiella pneumoniae* resistant to broad-spectrum cephalosporins and beta-lactam-beta-lactamase inhibitor combinations by hyperproduction of SHV-5 beta-lactamase. **J Clin Microbiol.**, 34, 358-63.

Fridkin, S., K., Gaynes, R. P. (1999) Antimicrobial resistance in intensive care units. **Clin. Chest Med.**, 20, 303-316.

Fujimura, M., Minami, Y., Watanabe, K., Tadera, K. (2003) Purification, characterization, and sequencing of a novel type of antimicrobial peptides, Fa-AMP1 and Fa-AMP2, from seeds of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench.). **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, 67, 1636-1642.

## VII. Referências Bibliográficas

---

Fujimura, M., Ideguchi, M., Yugi, M., Watanabe, K., Tadera, K. (2004) Purification, Characterization and sequencing of novel antimicrobial peptides, *Tu*-AMP1 and *Tu*-AMP2, from bulbs of Tulip (*Tulipa gesneriana* L.). **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, 68, 571-577.

Fujimura, M., Ideguchi, M., Yugi, M., Watanabe, K., Tadera, K. (2005) Amino acid sequence and antimicrobial activity of chitin-binding peptides, Pp-AMP 1 and Pp-AMP 2, from Japanese bamboo shoots (*Phyllostachys pubescens*), **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, 69, 642–645.

García-Olmedo, F., Molina, A., Alamillo, J. M., Rodríguez-Palenzuela, P. (1998) Plant defence peptides. **Biopolymers**, 47, 479–491.

Gander, E.S., Holmstroem, K.O., De Paiva, G.R., De Castro, L.A., Carneiro, M., Grossi-de-Sá, M.F. (1991) Isolation, characterization and expression of a gene coding for a 2S albumin from *Bertholletia excelsa* (Brazil nut), **Plant Mol. Biol.**, 16, 437–448.

Gatehouse, A. M. R., Boulter, D. Hilder, V. A. (1992) Potential of plant-derived genes in the genetic manipulation of crops for insect resistance. In *Biotechnology in Agriculture*, **Plant Genetic Manipulation for Crop Protection.**, 7, 155-181.

## VII. Referências Bibliográficas

---

Gehrig, P. M., Biemann, K. (1996) Assignment of the disulfide bonds in napin, a seed storage protein from *Brassica napus*, using matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. **Pept. Res.**, 9, 308-314.

Ghini, R. (2001) Resistência de fungos a fungicidas. **Embrapa Meio Ambiente.**, [http://www.radiobras.gov.br/ct/artigos/2001/artigo\\_280901.htm](http://www.radiobras.gov.br/ct/artigos/2001/artigo_280901.htm).

Ginalski, K., Elofsson, A., Fischer, D., Rychlewski, L. (2003) 3D-Jury: a simple approach to improve protein structure predictions. **Bioinfo.**, 19, 1015-1018.

Graham, M. A., Silverstein, K. A., Cannon, S. B., VanderBosch, K. A. (2004) Computational identification and characterization of novel genes from legumes. **Plant Physiol.**, 135, 1179-1197.

Gray, W. R. (1967a) Dansyl chloride procedure. **Methods Enzymol.**, 11, 139-151.

Gray, W. R. (1967b) Sequential degradation plus dansylation. **Methods Enzymol.**, 11, 469-475.

Gray, W. R., Smith, J. F. (1970) Rapid sequence analysis of small peptides. **Anal. Biochem.**, 33(1), 36-42.

## VII. Referências Bibliográficas

---

Grossi-de-Sá, M. F.; Chrispeels, M. J. (1997) Molecular cloning of bruchid (*Zabrotes subfasciatus*) R-amylase cDNA and interactions of the expressed enzyme with bean amylase inhibitors. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, 27, 271-281.

Guex, N., Peitsch, M. C. (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. **Electrophoresis**, 18, 2714–2723.

Gurgel., L. M. S., de Oliveira, S. M. A., Coelho, R. S. B., da Silva, R. L. X. (2005) Protection of tomato *Fusarium* wilt with Acibenzolar-S-methyl and  $\beta$ -aminobutyric acid in field. **Fitopatol. Bras.**, 30, 655-657.

Hall, T. A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp. Ser.**, 41, 95-98.

Hilder, V., Gatehouse, A., Sheerman, S., Barker, R., Boulter, D. (1987) A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. **Nature**, 330, 160-163.

Hovarth, D. P., Olson, P. A. (1998) Cloning and characterization of cold-regulated glycine-rich RNA-binding protein genes from leafy spurge (*Euphorbia esula* L.) and comparison to heterologous genomic clones **Plant Mol. Biol.**, 38, 531-538.

## VII. Referências Bibliográficas

---

Huang, X., Xie, W., Gong, Z. (2000) Characteristics and antifungal activity of a chitin binding protein from *Ginkgo biloba*. **FEBS Lett.** 478, 123–126.

Humphrey, W., Dalke, A., Schulten, K., (1996) VMD - Visual Molecular Dynamics. **J. Molec. Graphics**, 14, 33-38.

HYPP Zoology home page. [www.inra.fr/internet/Produits/HYPPZ/RAVAGEUR/6acaot.htm](http://www.inra.fr/internet/Produits/HYPPZ/RAVAGEUR/6acaot.htm) [site informativo].

Irwin, S. D., Keen, J. N., Findlay, J. B. C., Lord, J. M. (1990) The *Ricinus communis* 2S albumin precursor. A single pre-pro-protein may be processed into two different heterodimeric storage proteins, **Mol. Gen. Genet.**, 222, 400–408.

Ishibashi, N., Yamauchi, D., Minamikawa, T. (1990) Stored mRNA in cotyledons of *Vigna unguiculata* seeds: nucleotide sequence of cloned cDNA for a stored mRNA and indication of its synthesis by precocious germination. **Plant Mol Biol** ,15, 59-64.

Ishimoto, M., Kaga, A. (2002) PDF1 (*Vigna radiata*) amino acid sequence [direct submission].

## VII. Referências Bibliográficas

---

Iulek, J., Franco, O. L., Silva, M., Slivinski, C. T., Bloch Jr., C., Rigden, D. J., Grossi-de-Sá, M. F. (2000) Purification, biochemical characterization and partial primary structure of a new  $\alpha$ -amylase inhibitor from *Secale cereale* (rye). **Intern. J. Biochem. Cell Biol.**, 32, 1195-1204.

Janssen, B. J. C., Schirra, H. J., Lay, F. T., Anderson, M. A., Craik, D. J. (2003) Structure of *Petunia hybrida* defensin 1, a novel plant defensin with five disulfide bonds. **Biochemistry**, 42, 8214-8222.

Jensen, H., Hamill, P., Hancock, R. E. W. (2006) Peptide antimicrobial agents. **Clin. Microbiol. Rev.**, 19, 491-511.

Jones, S., Thornton, J. M. (1995) Protein-Protein Interactions: A Review of Protein Dimer Structures. **In Progress in Biophys. Mol. Biol.**, 63, 31-165.

Jung, R., Hastings, C., Coughlan, S. J., Hu, W-N. (1996) Sulfur- and lysine-rich napin-type 2S albumins from soybean seed. Unpublished. (Swissprot direct submission).

Keller, B., Sauer, N., Lamb, C. J. (1988) Glycine-rich cell wall proteins in bean: gene structure and association of the protein with the vascular system. **EMBO J.**, 7, 3625-3633.

## VII. Referências Bibliográficas

---

Keller, B., Templeton, M. D., Lamb, C. J. (1989) Specific localization of a plant cell wall glycine-rich protein in protoxylem cells of the vascular system. **PNAS USA.**, 86, 1529-1533.

Kevei, Z., Vinardell, J. M., Kiss, G. B., Knodorosi, A., Knodorosi, E. (2002) Glycine-rich proteins encoded by a nodule-specific gene family are implicated in different stages of symbiotic nodule development in *Medicago* spp. **Mol. Plant Microbe Interact.**, 15, 922-931.

Koppelman, S. J., Nieuwenhuizen, W. F., Gaspari, M., Knippels, L. M. J., Penninks, A. H., Knol, E. F., Hefle, S. L., de Jongh, H. H. J. (2005) Reversible denaturation of Brazil nut 2S albumin (Bere1) and implication of structural destabilization on digestion by pepsin, **J. Agric. Food Chem.**, 53, 123–131.

Kufe, D. W., Pollock, R. E., Weichselbaum, R. R., Bast, R. C., Jr., Gansler, T. S., Holland, J. F., Frei III, E., (2003) **Cancer Medicine**, 6<sup>a</sup> ed. Canada: BC Descker Inc.

Kus, J. V., Zaton, K., Sarkar, R., Cameron, R. K. (2002) Age-related resistance in *Arabidopsis* is a developmentally regulated defense response to *Pseudomonas syringae*. **Plant Cell.**, 14, 479-490.

## VII. Referências Bibliográficas

---

Kwak, K. J., Kim, Y. O., Kag, H. (2005) Characterization of transgenic Arabidopsis plants overexpressing GR-RBP4 under high salinity, dehydration, or cold stress. **J. Experimental Botany**, 56, 3007-3016.

Laberge, S, Castonguay, Y., Vezina, L. P. (1993) New cold- and drought-regulated gene from *Medicago sativa*. **Plant Physiol.**, 101(4), 1411-1412.

Laemmli, U. K., (1970) Cleavage of structural proteins using assembly of the head of the bacteriophage T4, **Nature**, 227, 680–685.

Lay, F. T., Bruglieta, F. Anderson, M. A. (2003) Isolation and properties of floral defensins from ornamental tobacco and petunia. **Plant Physiol.**, 131, 1283-1293.

Lay F. T., Anderson, M. A. (2005) Defensins – Components of the innate immune system in plants. **Curr. Protein Pept. Sci.**, 6, 85-101.

Lemos, F. J. A., Campos, F. A. P., Silva, C. P., Xavier-Filho, J. (1990) Proteinases and amylases of larval midgut of *Zabrotes subfasciatus* reared on cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds. **Entomol. Exp. Appl.**, 56, 219-227.

Levitz, S. (1992) Overview of host defenses in fungal infections. **Clin. Infect. Dis.**, 14, 37–42.

VII. Referências Bibliográficas

---



Li, Z. T., Gray, D. J. (2005) Isolation by improved thermal asymmetric interlaced PCR and characterization of a seed-specific 2S albumin gene and its promoter from grape (*Vitis vinifera* L.). **Genome**, 48, 312–320.

Lii, S. S., Claeson, P. (2003) Cys/Gly-rich proteins with a putative single chitin-binding domain from oat (*Avena sativa*) seeds. **Phytochem.**, 63, 249-255.

Lim, S. W., Lee, E. J., Lee, S. W., Kim, S. M., Kim, J. H., Kim, B. J., Jang, B. I., Kim, T. N., Chung, M. K. (2003) Clinical significance of *Klebsiella pneumoniae* in liver abscess. **Korean J. Gastroenterol.**, 42, 226-31.

Lindahl, E., Hess, B., van der Spoel, D. (2001) A package for molecular simulation and trajectory analysis. **J. Mol. Mod.**, 7, 306-317.

Lipsitch, M., Bergstrom, C. T., Levin, B. R. (2000) The epidemiology of antibiotic resistance in hospitals: Paradoxes and prescriptions. **PNAS**, 97, 1938–1943.

Liu, Y. J., Cheng, C. S., Lai, S. M., Hsu, M. P., Chen, C.S., Lyu, P. C. (2006) Solution structure of the plant defensin VrD1 from mung bean and its possible role in insecticidal activity against bruchids. **Proteins**, 63, 777-786.

## VII. Referências Bibliográficas

---

Lobo, D. S., Pereira, I. B., Fragel-Madeira, L., Medeiros, L. N., Cabral, L. M., Faria, J., Bellio, M., Campos, R. C., Linden, R., Kurtenbach, E. (2007) Antifungal *Pisum sativum* defensin1 interacts with *Neurospora crassa* cyclin F related to the cell cycle. **Biochem.**, 30, 987-996.

Lopez-Solanilla, E., Gonzalez-Zom, B., Novella, S., Vázquez-Boland, J. A., Rodriguez-Palenzuela, P. (2003) Susceptibility of *Listeria monocytogenes* to antimicrobial peptides. **FEMS Microbiol. Lett.**, 226, 101-105.

Lyman, C. A., Walsh, T. J. (1992) Systemically administered antifungal agents: a review of their clinical pharmacology and therapeutic applications. **Drugs**, 44, 9–35.

Marti-Renom, M. A., Stuart, A., Fiser, A., Sánchez, R., Melo, F., Sali, A. (2000) Comparative protein structure modeling of genes and genomes. **Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.**, 29, 291-325.

Matsuzaki, M. (1996) An antimicrobial peptide, magainin 2, induced rapid flip-flop of phospholipids coupled with pore formation and peptide translocation. **Biochem.**, 35, 11361-11368.

Matsuzaki, K. (1998) Magainins as paradigm for the mode of action of pore forming polypeptides. **Biochim. Biophys. Acta**, 1376, 391-400.

## VII. Referências Bibliográficas

---

Mazur, A. K., Haser, R., Payan, F. (1994) The catalytic mechanism of  $\alpha$ -amylase based upon enzyme crystal structures and model building calculations. **Biochem. Biophys. Res. Com.**, 204, 297-302.

McInnis, S. M., Newton, C. H., Sutton, B. S. C. (1997) Molecular characterization of a white spruce (*Picea glauca*) 2S albumin gene and related pseudogene. Unpublished. (Swissprot direct submission).

Melo, F. R., Sales, M. P., Pereira, L. S., Bloch Jr., C., Franco, O. L., Ary, M. B. (1999)  $\alpha$ -Amylase inhibitors from cowpea seeds, **Prot. Peptide Letters**, 6, 385–390.

Melo F. R., Rigden, D. J., Franco, O. L., Mello, L. V., Ary, M. B., Grossi-de-Sá, M. F., Bloch Jr., C. (2002) Inhibition of trypsin by cowpea thionin: characterization, molecular modeling and docking. **Proteins**, 48, 311-319.

Mendez, E. Moreno, A. Colilla, F. Pelaex, F., Limas, G. G., Mendez, R., Soriano, F. Salinas, M. deHaro, C. (1990) Primary structure and inhibition of protein synthesis in eukaryotic cell-free system of a novel thionin, gamma-hordothionin, from barley endosperm. **Eur. J. Biochem.**, 12, 533-539.

## VII. Referências Bibliográficas

---

Mergaert, P., Nikovics, K., Kelemen, Z., Maunoury, N., Vaubert, D., Knodorosi, A., Kondorosi, E. (2003) A novel family in *Medicago trunculata* consisting of more than 300 nodule-specific coding for small, secreted polypeptides with conserved cysteine motifs. **Plant Physiol.**, 132, 161-173.

Monsalve, F., Estevez, J., Costa, L., Salas, M., Hernandez, M., Olaya, J., Rodriguez, E., Callejas, D. (2001) Expression of yellow jacket and wasp venom Ag5 allergens in bacteria and in yeast. **Rev. Med. Chil.**, 129, 247-252.

Moraes, C. B., Lago, C. L. (2003) Espectrometria de Massas com Ionização por “Electrospray” Aplicada ao Estudo de Espécies Inorgânicas e Orgânicas. **Química Nova**, 26, 556-563.

Moralejo, F. J., Cardoza, R. E., Gutierrez, S., Martin, F., (1999) Thaumatin production in *Aspergillus awamori* by use of expression cassettes with strong fungal promoters and high gene dosage. **Appl. Environ. Microbiol.**, 65, 1168–1174.

Moreira, M. A. B. (2005) Ferormônios associados aos coleópteros-praga de produtos armazenados. **Quim. Nova**, 28, 472-477.

## VII. Referências Bibliográficas

---

Moreno, F. J., Jenkins, J. A., Mellon, F. A., Rigby, N. M., Robertson, J. A., Wellner, N., Clare-Mills, E. N. (2004) Mass spectrometry and structural characterization of 2S albumin isoforms from Brazil nuts (*Bertholletia excelsa*), **Biochim. Biophys. Act.**, 1698, 175–186.

Mousavi, A., Hotta, Y. (2005) Glycine-rich proteins: a class of novel proteins. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 120, 169-174.

Muller, E., Loeffler, W. (1976) Mycology: an outline for science and medical students. **G. Thieme Publishers**, Stuttgart, Germany.

Muntz, K., Christov, V., Saalbach, G., Saalbach, I., Waddel, D., Pickardt, T., Schieder, O., Wustenhagen, T. (1998) Genetic engineering for high methionine grain legumes. **Nahrung**, 42, 125-127.

Muren, E., Rask, L. (1996) Processing *in vitro* of pronapin, the 2S storage-protein precursor of *Brassica napus* produced in a baculovirus expression system. **Planta**, 200, 373-379.

Murray, K. A., Clements, B. H., Keas, S. E. (1981) *Klebsiella ozaenae* Septicemia Associated with Hansen's Disease. **J. Clin. Microbiol.**, 14, 703-705.

## VII. Referências Bibliográficas

---

Natori, S. (1994) Function of antimicrobial proteins in insects. **Ciba Found. Symp.**, 186, 123–134.

Nielsen, K. K., Nielsen, J. E., Madrid, S. M., Mikkelsen, J. D. (1997) Characterization of a new antifungal chitin-binding peptide from sugar beet leaves, **Plant Physiol.**, 113, 83–91.

Niyonsaba, F., Hirata, M., Ogawa, H., Nagaoka, I. (2003) Epithelial cell-derived antibacterial peptides human beta-defensins and cathelicidin: multifunctional activities on mast cells. **Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy**, 2, 224-231.

Nomata, T., Kabeya, Y., Sato, N. (2004) Cloning and characterization of glycine-rich RNA-binding protein cDNAs in the moss *Physcomitrella patens*. **Plant Cell Physiol.**, 45, 48-56.

Nqai, P. H., Ng, T. B. (2005) Phaseococcin, an antifungal protein with antiproliferative and anti-HIV-1 reverse transcriptase activities from small scarlet runner beans. **Biochem. Cell Biol.**, 83, 212-220.

Office of Technology Assessment. (1995) Impact of Antibiotic-Resistant Bacteria: A Report to the U.S. Congress. **Washington, DC: U.S.** Government Printing Office.

## VII. Referências Bibliográficas

---

de Oliveira, D. E., Seurinck, J., Inze D., Van Montaque, M., Botteman, J. (1990) Differential expression of five Arabidopsis genes encoding glycine-rich proteins. **Plant Cell**, 2, 427-436.

Olli, S., Kirti, P. B. (2006) Cloning, characterization and antifungal activity of defensin Tfgd1 from *Trigonella foenum-graecum* L. **J. Biochem. Mol. Biol.**, 31, 278-283.

Paavanem-Huhtala, S., Avikainem, H. and Yli-Mattila, T. (2000) Development of strain-specific primers for a strain of *Gliocladium catenulatum* used in biological control, 106, 187-198.

Pandya, M. J., Williams, P. B., Dempsey, C. E., Sherry, P. R., Clarke, A. R. (1999) Direct kinetic evidence for folding via a highly compact, misfolded state. **J. Biol. Chem.**, 17, 26828-26837.

Pantoja-Uceda, D., Bruix, M., Gimenez-Gallego, G., Rico, M., Santoro, J. (2003) Solution structure of RicC3, a 2S albumin storage protein from *Ricinus communis*. **Biochem.**, 42, 13839-13847.

Pantoja-Uceda, D., Shewry, P. R., Bruix, M., Tatham, A. S., Santoro, J., Rico, M. (2004) Solution structure of a methionin-rich 2S albumin from sunflower seeds: relationship to its allergenic and emulsifying properties, **Biochem. J.**, 43, 6976–6986.

## VII. Referências Bibliográficas

---

Parashina, E. V., Serdobinskii, B. S., Kalle, E. G., Lavorova, N. V., Avetisov, V. A., Lunin, V. G., Naroditskii, B. S. (2000) Genetic engineering of oilseed rape and tomato plants expressing a radish defensin gene. **Rus. J. Plant Physiol.**, 47, 417-423.

Parsons, D. M. J., Credland, P. F. (2003) Determinants of oviposition in *Acanthoscelides obtectus*: a nonconformist bruchid. **Physiol. Entomol.**, 28, 221-231.

Pastorello, E. A., Farioli, L., Pravettoni, V., Ispano, M., Conti, A., Ansaloi, R., Rotondo, F., Incorvaia, C., Bengtsson, A. Rivolta, F., Trmabaioli, C. Previdi, M. Ortolani, C. (1998) Sensitization to the major allergen of Brazil nut is correlated with the clinical expression of allergy. **J. Allergy Clin. Immunol.**, 102, 1021-1027.

Pastorello, E. A., Varin, E., Farioli, L., Pravettoni, V., Ortolani, C., Trambaioli, C., Fortunato, D., Giuffrida, M. G., Rivolta, F., Robino, A., Calamari, A. M., Laçava, L. (2001) The major allergen of sesame seeds (*Sesamum indicum*) is a 2S albumin. **J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.**, 756, 85-93.

Pearson, W. R. (1990) Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA, **Methods Enzymol.**, 183, 63-98.

## VII. Referências Bibliográficas

---



Pelegrini, P. B., Franco, O. L. (2005) Plant gamma-thionins: novel insights on the mechanism of action of a multi-functional class of defense proteins, **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, 37, 2239–2253.

Pelegrini, P. B., Murad, A. M., Grossi-de-Sá, M. F., Mello, L. V., Romeiro, L. A. S., Noronha, E. F., Caldas, R. A., Franco, O. L. (2006) Structure and Enzyme Properties of *Zabrotes subfasciatus*  $\alpha$ -Amylase. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 61, 77-86.

Pereira, P. J. B., Valentin, L., Patthy, A., Huber, R., Bode, W., Pongor, S., Strobl, S. (1999) Specific inhibition of insect alpha-amylases: yellow worm alpha-amylase in complex with the amaranth alpha-amylase inhibitor at 2.0Å resolution. **Structure**, 7, 1079-1088.

Pearson, W. R., Lipman, D. J. (1998) Improved Tools for Biological Sequence Comparison. **PNAS**, 85, 2444- 2448.

Pianetti Filho, G., Pedroso, E. R., Giannetti, A. V., Darwich, R. (2005) Cerebral *Aspergillus* abscess in immunocompetent patient. **Arq. Neuropsiquiatr.**, 63, 1094-1098.

## VII. Referências Bibliográficas

---

Podoler, H., Applebaum, S. W. (1971) The  $\alpha$

Ringli, C., Keller, B., Ryser, U. (2001) Glycine-rich protein as structural components of plant cell walls. **Cell Mol. Life Sci.**, 58, 1430-1441.

Ringli, C., Hauf, G., Keller, B. (2001) Hydrophobic interactions of the structural protein GRP1.8 in the cell wall of protoxylem elements. **Plant Physiol.**, 125, 673-682.

Ritchie, D. W. (2003) Evaluation of Protein Docking Predictions Using Hex 3.1 CAPRI Rounds 1 and 2. **PROTEINS: Struct. Funct. Genet.**, 52, 98-106.

Robotham, J.M., Wang, F., Seamon, V., Teuber, S. S., Sathe, S. K., Sampson, H. A., Beyer, K., Seavy, M., Roux, K. H. (2005) Ana o 3, an important cashew nut (*Anacardium occidentale* L.) allergen of the 2S albumin family. **J. Allergy Clin. Immunol.**, 115, 1284–1290.

Rossi, F., Andreazzi, D. (1999) [www.saudetotal.com/microbiologia/index.htm](http://www.saudetotal.com/microbiologia/index.htm) [site informativo].

Ryser, U. Keller, B. (1992) Ultrastructural localization of a bean glycine-rich protein in unlignified primary walls of protoxylem cells. **Plant Cell.**, 4, 773-783.

Sabbuba, N. A., Mahenthalingam, E., Stickler, D. J. (2003) Molecular epidemiology of *Proteus mirabilis* infections of the catheterized urinary tract. **J. Clin. Microbiol.**, 41, 4961-5.

## VII. Referências Bibliográficas

---

Sathe, S. K., Teuber, S. S., Roux, K. H. (2005) Effects of food processing on the stability of food allergens. **Biotechnol. Adv.**, 23, 423-429.

Schibli, D. J., Hunter, H-N., Aseyev, V., Dtarner, T. D., Wiencek, J. M., McCray, P. B., Tack, B. F., Vogel, H. J. (2002) The solution structures of the human beta-defensins lead to a better understanding of the potent bactericidal activity of HBD3 against *Staphylococcus aureus*. **J. Biol. Chem.**, 277, 8279-8289.

Schmitt, M. J., Poravou, O., Trenz, K., Rehfeldt, K. (1997) Unique double-stranded RNAs responsible for the anti-*Candida* activity of the yeast *Hanseniaspora uvarum*. **J. Virol.**, 71, 8852–8855.

Schroeder, H. E., Gollash, S., Moore, A., Tabe, L. M., Craig, S., Hardie, D., Chrispeels, M. J., Spencer, D., Higgins, T. J. V. (1995) Bean R-amylase inhibitor confers resistance to the pea weevil, *Bruchus pisorum*, in genetically engineered peas (*Pisum sativum* L.). **Plant Physiol.**, 107, 1233-1239.

Schuler, T. I. I. (1998) Poppy, G. M.; Kerry, B. R.; Denholm, I. Insect resistant transgenic plants. **Tib-Technol.**, 16, 168-175

## VII. Referências Bibliográficas

---

Schutte, A., Topp, S. A., Knoefel, W. T., Brilloff, S., Mueller, L., Rogiers, X., Gundlach, M. (2001) Influence of Ginkgo Biloba extract (EGB761) on expression of EGR-1 mRNA and HSP-70 mRNA after warm ischemia in the rat liver. **Transplant Proc.**, 33, 3724-3725.

Selitrennikoff, C. P. (2001) Antifungal proteins, **Appl. Environ. Microbiol.**, 67, 2883–2884.

Senda., K., Arakawa, Y., Ichiyama, S., Nakashima, K., Ito, H., Ohsuka, S., Shimokata, K., Kato, N., Ohta, M. (1996) PCR detection of metal-beta-lactamase gene (blaIMP) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum beta-lactams. **J. Clin. Microbiol.**, 34, 2909-2913.

Shai, Y., Oren, Z. (2001) From “carpet” mechanism to de-novo design dastereomeric cell-selective antimicrobial peptides. **Peptides**, 22, 1629-1641.

Shade, R. E., Schroeder, H. E., Pueyo, J. J., Tabe, L. M., Murdock, L. L., Higgins, T. J. V., Chrispeels., M. J. (1994) Transgenic pea seeds expressing the a-amylase inhibitor of the common bean are resistant to bruchid beetles. **Bio/Tecnhnol.**, 12, 793-796.

Shinozuka, H., Hisano, E. H., Yoeyama, E. S., Shimamoto, Y., Jones, E. E. S., Forster, E. J. W., Yamada, T., Kanazawa, E. A. (2006) Gene expression and genetic mapping analyses of a perennial ryegrass glycine-rich RNA-binding protein gene suggest a role in cold adaptation. **Mol. Gen. Genomics.**, 275, 399-408.

## VII. Referências Bibliográficas

---

Silva, C. P., Terra, W. R., Lima, R. M. (2001) Differences in midgut serine proteinases from larvae of the bruchid beetles *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus*. **Arch. Insect Biochem. Physiol.**, 61, 107-115.

Smith, M., Bruhn, J., Anderson, J. (1992) The fungus *Armillaria bulbosa* is among the largest and oldest living organisms. **Nature**, 356, 428-43.

Soelaiman, A., Jakes, K., Wu, N., Li, C., Shonam, M. (2001) Crystal structure of Colicin E3: implications for cell entry and ribosome inactivation. **Mol. Cell.**, 8, 1053-1062.

Song, X., Wang, J., Wu, F., Li, X., Teng, M., Gong, W. (2005) cDNA cloning, functional expression and antifungal activities of a dimeric plant defensin SPE10 from *Pachyrrhizus erosus* seeds. **Plant Mol. Biol.**, 57, 13-20.

Stoor, P., Soderling, E., Grenman, R. (1999) Interactions between the bioactive glass S53P4 and the atrophic rhinitis-associated microorganism *Klebsiella ozaenae*. **J. Biomed. Mater Res.**, 48, 869-874.

Strobl, S., Maskos, K., Betz, M., Wiegand, G., Huber, R., Gomis-Rüth, F. X., Glockshuber, R. (1998) Crystal structure of yellow meal worm R-amylase at 1.64 Å resolution. **J. Mol. Biol.**, 278, 617-628.

## VII. Referências Bibliográficas

---

Strobl, S., Gomis-Ruth, F-X., Maskos, K., Frank, G., Huber, R., Glockshuber, R. (1997) The  $\alpha$ -amylase from the yellow meal worm: complete primary structure, crystallization and preliminary X-ray analysis. **FEBS Lett.**, 409, 109-114.

Snyder, W. C., Hansen, W. C. (1954) Variation and speciation in the genus *Fusarium*. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 60, 479-484.

Tai, S. S. K., Lee, T. T. T., Sai, C. C. Y., Yui, T.-J., Tzen, J. T. C. (2001) Expression pattern and deposition of three storage proteins, 11S globulin, 2S albumin and 7S globulin in maturing sesame seeds, **Plant Physiol. Biochem.**, 39, 981–992.

Terashima, M., Katoh, S. (1996) Modification of  $\alpha$ -amylase function by protein engineering. **Ann. NY Acad. Sci.**, 799, 65-69.

Terra, W. R., Ferreira, C. (1994) Insect digestive enzymes properties, compartmentalization and functions. **Comp. Biochem. Physiol.**, 109B, 1-62.

Terras, F. R., Schoofs, H. M., De Bolle, M. F., Van Leuven, F., Rees, S. B., Vanderleyden, J., Cammue, B. P., Broekaert, W. F. (1992) Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. **J. Biol. Chem.**, 267, 15301–15309.

## VII. Referências Bibliográficas

---

Terras, F. R. G., Torrekens, S., Leuven, F. V., Osborn, R. W., Vanderleyden, J., Cammue, B. P. A., Broekaert, W. F. (1993) A new family of basic cysteine-rich plant antifungal proteins from Brassicaceae species. **FEBS Lett.**, 316, 233–240.

Terras, F. R. G., Eggermont, K., Kovaleva, V., Raikel, N. V., Osborn, R. W., Kester, A., Rees, S. B., Torrekens, S., Van-Leuven, F., Vanderleyden, K., Cammue, B. P. A., Broekaert, W. F.

(1995) Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. **Plant Cell**, 7, 573–588.

Terras, F. R., Penninckx, I. A., Goderis, I. J., Broekaert, W. F. (1998) Evidence that the role of plant defensins in radish defense responses is independent of salicylic acid. **Planta**, 206, 117-124.

Thiery, D., Jarry, M., Pouzat, J. (1994) To penetrate or not to penetrate: a behavioral choice by bean beetle first instars larvae in response to *Phaseolus vulgaris* seed surface quality. **J. Chem. Ecol.**, 20, 1867-1875.

Thomma, B. P., Nelissen, I., Eggermont, K., Broekaert, W. F. (1998) Deficiency in phytoalexin production causes enhanced susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to the fungus *Alternaria brassicicola*. **Planta J.**, 19, 163-171.

## VII. Referências Bibliográficas

---



Thomma, B. P. H. J., Cammue, E. B. P. A., Thevissen, K. (2002) Plant defensins. **Planta.**, 216, 193-202.

Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.**, 22, 4673–4680.

Trabulsi, L. R., Alterthum, F., Gompertz, O. F., Candeias, J. A. N. (1999) Microbiologia. 3<sup>a</sup> ed. **Ed. Atheneu.** pp. 207-251.

Tulasi, R. B., Nadimpalli, S. K. (1997) Purification of  $\alpha$ -mannosidase activity from Indian lablab beans. **Biochem. Mol. Biol. Int.**, 41, 925–931.

Valdivieso, F., Trucco, O., Prado, V., Diaz, M. C., Ojeda, A. (1999) Antimicrobial resistance of agents causing urinary tract infections in 11 Chilean hospitals. PRONARES project. **Rev. Med. Chil.**, 127(9), 1033-1040.

Vázquez-Boland, J. A., Jun M., Berche, P., Chakraborty, T., Domínguez-Bernal, G. Goebel, W., González-Zorn, B., Wehland, J. e Kreft, J. (2001) *Listeria* patogénesis and molecular virulence determinants. **Clin. Microbiol. Rev.**, 14, 584-640.

## VII. Referências Bibliográficas

---

Vermel, M., Guermann, B., Delage, L, Grienenberger, J. M., Marechal-Drouard, L., Gualberto, J. M. (2002) A family of RRM-type RNA-binding proteins specific to plant mitochondria. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 99, 5866-5871.

Vigers, A. J., Roberts, W. K., Selitrennikoff, C. P. (1991) A new family of plant antifungal proteins. **Mol. Plant Microb. Inter.**, 4, 315–323.

Vyjayanthi, N., Subramanyam, M. V. (2002) Effect of fenvalerate-20EC on sericigenous insects. II. Digestive enzymes in the nutritive physiology of silkworm, *Bombyx mori* L. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, 53, 212-220.

Ye, X.Y., Ng, T.B. (1991) Mungin, a novel cyclophilin-like antifungal protein from the mung bean. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 273, 1111–1115.

Youle, R. J., Huang, A. H. (1979) Albumin storage protein and allergens in cottonseeds. **Agric. Food Chem.**, 27, 500-503.

Yli-Mattila, T., Paavananen S., Hannukkala A., Parikka P., Tahvonen R., Karjalainen R. (1996) Isozyme and RAPD-PCR analyses of *Fusarium avenaceum* strains from Finland. **Plant Physiol.**, 45, 126-134.

## VII. Referências Bibliográficas

---

Zhou, H., Huang, N., Wu, Q., Wang, B. (2003) Airway beta-defensin-2 gene transfer enhances the bacterial clearing of rat lung. **Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi.**, 20, 451-4.

Wang, Y., Sun, J., Chitnis, P. R. (2000) Proteomic study of the peripheral proteins from thylakoid membranes of the cyanobacterium *Synechocystis* sp PCC6803. **Electrophoresis**, 21, 1746-1754.

Wang, X., Bunkers, G. J., Walters, M. R., Thoma, R. S. (2001) Purification and characterization of three antifungal proteins from cheeseweed (*Malva parviflora*), **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 282,1224–1228.

Wang, F., Robotham, J. M., Teuber, S. S., Sathe, S. K., Roux, K. H. (2003) Ana o 2, a major cashew (*Anacardium occidentale* L.) nut allergen of the legumin family. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, 132, 27-39.

Wang, H. X., Ng, T. B. (2007) Isolation and characterization of an antifungal peptide with antiproliferative activity from seeds of *Phaseolus vulgaris* cv. 'Spotted Bean'. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 74, 125-130.

Williard, L., Ranjan, A., Zhang, H., Monzavi, H., Boyko, R. F., Sykes, B. D., Wishart, D. S. (2003)VADAR: a web server for quantitative evaluation of protein structure quality. **Nucleic Acids Res.**, 31, 3316-3319.

Wong, J. H., Ng, T. B. 92005) Sesquin, a potent defensin-like antimicrobial peptide from ground beans with inhibitory activities toward tumor cells and HIV-1 reverse transcriptase. **Peptides.**, 26, 1120-1126.

## VIII. Apendice

---

## 1. Peptídeos Antimicrobianos

### Resumo do Artigo 1:

Isolamento de um peptídeo de sementes de maracujá (*Passiflora edulis*) com similaridades a proteínas do tipo albumina 2S

Um dos principais problemas enfrentados no mundo consiste no aumento expressivo de perdas na economia e problemas na saúde causados por fungos filamentosos. Com o objetivo de solucionar estes problemas, diversos estudos têm sido feitos com o intuito de se obter novos peptídeos de plantas com atividades antifúngicas. Estes peptídeos normalmente são caracterizados por apresentarem baixas massas moleculares e alta quantidade de resíduos carregados positivamente. Este trabalho relata a purificação e caracterização de um novo peptídeo de 5,0 kDa, *Pe*-AFP1, purificado de sementes de maracujá (*Passiflora edulis*). A purificação foi feita utilizando-se uma cromatografia de afinidade em coluna de Red-Sepharose Cl-6B, seguida por cromatografia de fase-reversa HPLC em coluna Vydac C18-TP. Bioensaios *in vitro* indicaram que *Pe*-AFP1 foi capaz de inibir o crescimento de fungos filamentosos, tais como *Trichoderma harzianum*, *Fusarium oxysporum* e *Aspergillus fumigatus*, com valores de IC<sub>50</sub> de 32, 34 e 40 µg.ml<sup>-1</sup>, respectivamente. Todavia, este peptídeo não causou alterações no desenvolvimento de *Rhizoctonia solani*, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Cândida albicans*. Este peptídeo foi, posteriormente, submetido a um seqüenciamento de aminoácidos, mostrando alta similaridade com proteínas de armazenamento do tipo albumina 2S. A descoberta de *Pe*-AFP1 pode contribuir, futuramente, para o desenvolvimento de produtos biotecnológicos como drogas antifúngicas, bem como de plantas transgênicas resistentes a fungos patogênicos.

VIII. Apendice

## **Resumo do Artigo 2:**

$\gamma$ -Tioninas de plantas: Novos tópicos para o mecanismo de ação de uma classe multifuncional de proteínas de defesa

Esta revisão enfoca uma das primeiras classes de proteínas de defesa descrita na literatura, com atividade contra diversos patógenos. Estes peptídeos denominados de  $\gamma$ -tioninas, ou defensinas, consistem de pequenas moléculas catiônicas com diferentes habilidades. Elas são capazes de inibir enzimas digestivas, bem como agir contra fungos e bactérias. Estudos recentes focam particularmente as duas últimas funções, objetivando o desenvolvimento genético de e transgenia. Neste trabalho as estruturas primárias e terciárias das  $\gamma$ -tioninas são comparadas e suas similaridades analisadas com toxinas de escorpião e defensinas de insetos. Essas análises trazem algumas hipóteses sobre o mecanismo de ação das  $\gamma$ -tioninas contra determinados patógenos. Além disso, a interação entre  $\gamma$ -tioninas de plantas e receptores presentes na superfície celular de fungos foi enfocada, proporcionando novas evidências sobre o funcionamento desta classe de proteínas de defesa. Desta forma, pesquisas com peptídeos de defesa poderão ser úteis no desenvolvimento de plantas transgênicas resistentes a fitopatógenos. Além disso, a atividade de  $\gamma$ -tioninas também foi avaliada para futuros desenvolvimentos de drogas capazes de inibir o crescimento de bactérias e células tumorais.

VIII. Apendice

---

## **2. Enzimas Digestivas e Inibidores Enzimáticos**

### Resumo do Artigo 3:

#### Propriedades estruturais e enzimáticas da $\alpha$ -amilase de *Zabrotes subfasciatus*

$\alpha$ -Amilases digestivas apresentam um papel essencial no metabolismo de carboidratos em insetos. Essas enzimas pertencem a um grupo de endo-proteínas que hidrolisam moléculas de amido e estão envolvidas na produção de energia. As larvas de *Zabrotes subfasciatus*, um dos maiores insetos causadores de perdas na agricultura, são capazes de infestar grãos de feijão (*Phaseolus vulgaris*) armazenados, causando severos danos na economia devido a perdas na lavoura, principalmente na América Latina e África. A  $\alpha$ -amilase de *Z. subfasciatus* (ZSA) é uma enzima conhecida, mas não completamente estudada, a qual apresenta características específicas quando comparada a amilases de outros insetos. Este trabalho relata novas informações sobre a natureza química de ZSA, incluindo uma descrição de seu pH (entre 6,0 e 7,0) e temperatura (entre 20 e 30° C) ótimos para atividade enzimática. Além disso, os efeitos de certos íons na atividade de ZSA foram avaliados, mostrando que três íons divalentes ( $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  e  $Ba^{2+}$ ) foram capazes de aumentar a hidrólise de amido pela enzima. Por outro lado,  $Fe^{2+}$  proporcionou uma queda na atividade enzimática de ZSA, reduzindo pela metade sua capacidade funcional. Parâmetros cinéticos de ZSA também foram determinados e comparados com outras  $\alpha$ -amilases de insetos. Um modelo estrutural também foi proposto com o intuito de se analisar os possíveis resíduos envolvidos na catálise enzimática (Asp<sub>204</sub>, Gly<sub>240</sub> e Asp<sub>305</sub>), como também outros resíduos envolvidos na hidrólise de amido (His<sub>118</sub>, Ala<sub>206</sub>, Lis<sub>207</sub>, His<sub>304</sub>).

#### VIII. Apendice

---

#### **Resumo do Artigo 4:**

Isolamento de um novo inibidor de  $\alpha$ -amilase de *Carica papaya* com atividade contra  
*Callosobruchus maculatus*

O feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*) é um grão utilizado como alimento de subsistência para diversos agricultores na América Latina e África. Esta cultura é frequentemente danificada pelo inseto *Callosobruchus maculatus*, o qual penetra no interior dos grãos armazenados, se alimentando do amido presente nas sementes. Devido ao grande impacto que a larva causa nas perdas da lavoura, diversos estudos têm sido feitos com o intuito de se reduzir o ataque deste bruquídeo no feijão-de-corda. Neste trabalho, um novo inibidor de sementes de mamão (*Carica papaya*) com atividade contra amilase de *C. maculatus* foi purificado e caracterizado bioquimicamente. Para isso, as sementes de feijão foram maceradas e misturadas com uma solução contendo NaCl 0,6M e HCl 0,1%. O extrato bruto foi, então, precipitado com sulfato de amônio (100%), dialisado e aplicado numa coluna de CM-Cellulose, onde as proteínas do pico-retido foram submetidas a uma cromatografia de fase-reversa HPLC (Vydac C-18TP), gerando novos picos. Somente uma fração das proteínas purificadas, com massa molecular de 4.562 Da, mostraram atividade contra  $\alpha$ -amilase de *C. maculatus*. No entanto, nenhuma atividade foi observada contra enzimas de mamíferos. Ensaio utilizando sementes artificiais contendo o inibidor enzimático de *C. papaya* (0,5% e 1,0%) mostraram que estes inibidores foram capazes de aumentar a taxa de mortalidade das larvas em 50%, bem como de diminuir a fertilidade e longevidade dos adultos. Estes resultados mostraram que o inibidor de  $\alpha$ -amilase de

VIII. Apendice



sementes de *C. papaya* apresenta especificidade por enzimas de insetos, indicando que este possa ser utilizado na engenharia genética para a construção de plantas transgênicas com resistência aumentada contra *C. maculatus*.

#### VIII. Apendice

---

#### **Resumo do Artigo 5:**

Identificação molecular de quatro inibidores diferentes de  $\alpha$ -amilase de sementes de baru  
(*Dipteryx alata*) com atividade contra enzimas de insetos.

O bruquídeo endofítico *Callosobruchus maculatus* é capaz de causar danos severos em sementes de feijão-de-corda armazenadas, levando a perdas na lavoura e para os consumidores. Por esta razão, o uso de inibidores de  $\alpha$ -amilase no retardamento da digestão de insetos tem sido uma alternativa para o controle de bruquídeos. Portanto, inibidores de  $\alpha$ -amilase de sementes de baru (*Dipteryx alata*) foram isolados por cromatografia de afinidade, e demonstraram capacidade de inibir enzimas de *C. maculatus* e *Anthonomus grandis*. Para melhor purificação das amostras, o material foi aplicado numa cromatografia de fase-reversa HPLC, gerando quatro picos, cujas proteínas mostraram inibição contra amilases de *C. maculatus*. Análises de massa molecular por SDS-PAGE e MALDI-TOF identificaram quatro proteínas com 5, 11, 20 e 55 kDa, respectivamente. Os resultados de ensaios *in vivo* usando sementes artificiais contendo 1,0% de extrato de baru revelaram um aumento de 40% na taxa de mortalidade das larvas. Estes resultados evidenciam que inibidores enzimáticos de diversas classes isolados de sementes de baru podem ser obtidos de uma única espécie de planta.

VIII. Apendice

---

## 1. Artigos submetidos

### Artigo 1:

Nova proteína rica em glicina com atividade antimicrobiana de sementes de goiaba (*Psidium guajava*): moléculas de defesa podem funcionar também como proteínas de defesa de plantas?

Um dos problemas encontrados na saúde humana é o expressivo aumento de resistência de bactérias patogênicas a medicamentos sintéticos. Este fator vem sendo observado principalmente em pacientes com infecções hospitalares e do trato gastro-intestinal. Objetivando reduzir essas infecções, bem como a resistência bacteriana, diversos estudos têm sido feitos na busca de peptídeos de defesa de plantas com atividades antimicrobinas. Assim, neste trabalho, um peptídeo de sementes de goiaba (*Psidium guajava*) – Pg-AMP1 – foi purificado usando cromatografia de afinidade em coluna de Red-Sepharose Cl-6B, seguida por uma cromatografia de fase-reversa HPLC (Vydac C18-TP). Pg-AMP1 não mostrou nenhuma atividade inibitória contra fungos, mas proporcionou redução do crescimento de *Klebsiella* sp e *Proteus* sp, principais agentes causadores de infecções hospitalares e do trato gastro-intestinal em humanos. A massa molecular de Pg-AMP1 obtida por SDS-PAGE e espectrometria de massa (MALDI-TOF) mostrou uma proteína purificada de 6.029,34 Da. Além disso, o seqüenciamento dos aminoácidos revelou que a estrutura primária de Pg-AMP1 apresenta 72% de identidade com membros da família das proteínas ricas em glicina, sendo o peptídeo de goiaba um dos primeiros identificados a apresentar atividade contra bactérias gram-negativas. Pg-AMP1 mostrou uma estrutura tridimensional similar à de uma enterotoxina de *E. coli* denominada Colicina E3, sendo

VIII. Apendice

---

que sua relação filogenética também foi analisada. Portanto, esses estudos revelaram que *Pg-AMP1* pode, num futuro próximo, contribuir par ao desenvolvimento de novos produtos biotecnológicos como antibióticos de fontes naturais.

## **Artigo 2:**

Caracterização molecular de uma nova defensina inseticida de sementes de feijão-de-corda  
(*Vigna unguiculata*) com atividade inibitória de  $\alpha$ -amilases

Nos últimos anos, uma grande variedade de inibidores de  $\alpha$

### **Artigo 3:**

#### Novo peptídeo antifúngico de sementes de *Crotalaria pallida*

Um dos maiores problemas enfrentados na agricultura consiste de um aumento expressivo de perdas na economia causado por fungos fitopatogênicos. Com o intuito de se encontrar uma solução para este problemas, diversos estudos têm sido feitos na purificação e caracterização de peptídeos de defesa com atividades antifúngicas. Estes peptídeos geralmente apresentam carga final positiva e baixa massa molecular. Neste trabalho, um peptídeo de *Crotalaria pallida* denominado *Cp*-AFP em com 5,0 kDa foi purificado. O isolamento foi feito utilizando-se uma cromatografia de exclusão em coluna S-200, seguida por cromatografia de fase-reversa HPLC em coluna Vydac C18-TP. Ensaio *in vitro* indicaram que *Cp*-AFP foi capaz de inibir o desenvolvimento do fungo filamentosso *Fusarium oxysporum*. Este peptídeo também foi sujeito a seqüenciamento de aminoácidos, mas não mostrou homologia com nenhuma outra proteína do banco de dados. A descoberta de *Cp*-AFP pode contribuir, num futuro próximo, para o desenvolvimento de produtos biotecnológicos, tais como a produção de plantas transgênicas com resistência aumentada contra fitopatógenos.

## **Artigo 4:**

### **Ciclótides de plantas: uma nova classe de compostos de defesas**

As ciclótides de plantas são peptídeos que apresentam baixa massa molecular e uma característica não usual pela falta dos terminais C- e N-, uma vez que sua estrutura tridimensional é cíclica. Peptídeos sintéticos podem adotar esta conformação circular, mas isso não é comum para a maioria dos grupos de peptídeos. Assim, as ciclótides apresentam várias funções, tais como a capacidade de induzir contrações em gestantes e atividade anti-tumoral. Além disso, algumas ciclótides apresentam atividade inseticida, anti-viral e inibidora de proteinase. Neste trabalho, nós descrevemos as características estruturais e funcionais das ciclótides de plantas, suas propriedades conservadas, bem como a aplicação destes peptídeos para a saúde humana e na biotecnologia.

## 2. Patentes

Patente do peptídeo de sementes de goiaba (*Psidium guajava*), Pg-AMP1