

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA PROTEÍNA
TRANSPORTADORA DE LIPÍDEO (LTP) DE SEMENTES DE
PIMENTA

MARIÂNGELA DE SOUSA SANTOS DIZ

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO – UENF
CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
ABRIL - 2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA PROTEÍNA TRANSPORTADORA DE LIPÍDEO (LTP) DE SEMENTES DE PIMENTA

MARIÂNGELA DE SOUSA SANTOS DIZ

Tese apresentada ao Centro de
Biotecnologia e Biociências, da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense Darcy Ribeiro, como
parte das exigências para a
obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia e Biociências.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Valdirene Moreira Gomes

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
ABRIL, 2007

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA PROTEÍNA TRANSPORTADORA DE LIPÍDEO (LTP) DE SEMENTES DE PIMENTA

MARIÂNGELA DE SOUSA SANTOS DIZ

Tese apresentada ao Centro de
Biotecnologia e Biotecnologia, da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense Darcy Ribeiro, como
parte das exigências para a
obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia e Biotecnologia.

Aprovada em: 27 de abril de 2007.

Comissão examinadora:

Prof^a Maura da Cunha (LBCT - CBB – UENF)

Prof^a Antônia Elenir Amâncio Oliveira (LQFPP – CBB – UENF)

Prof^a Ana Gisele C. Neves-Ferreira (Laboratório de Toxicologia - FioCruz)

Prof^a Valdirene Moreira Gomes (LFBM – CBB – UENF)

Orientadora

Agradecimentos

“O valor das coisas não está no tempo que elas duram,
mas na intensidade com que acontecem. Por isso,
existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e
pessoas incomparáveis.”

Fernando Pessoa

Dedico esta tese ao homem
que me ensinou que o amor, a honestidade e acima de tudo
a gratidão são as maiores dádivas de
Deus. Obrigada, Pai, por tudo no que
você me tornou. Sou obra
sua!

A Deus por tudo... Toda honra e toda glória!

À prof^a. Valdirene pela difícil tarefa de ser minha orientadora. Obrigada pela paciência, pela cobrança e acima de tudo pelo constante incentivo. Acho que não conseguiria ir muito longe sem você!

À prof^a Rosana Rodrigues por toda colaboração, sempre pronta para fornecer o que fosse necessário para o desenvolvimento deste trabalho, além de preciosos ensinamentos. E aos seus alunos Cláudia e Marlon pela inestimável ajuda nos experimentos desenvolvidos no LMGV-CCTA.

Ao André pelo eterno carinho, paciência e acima de tudo amizade, com alguns atritos é claro. Eu não sou fácil e desta vez você perdeu a calma e não ficou quieto! Mas mais uma vez a vitória é nossa, eu sou fruto do seu trabalho.

À Patrícia por ter me ensinado a ser paciente. Primeiro aluno é igual primeiro namorado a gente não esquece nunca.

À Suzanna pela dedicação, não só nos problemas do laboratório, mas também nos pessoais. Amizade não se explica ela simplesmente acontece!

Aos amigos de grupo, Felipe, Izabela, Priscila e Júlia pelos favores e colaborações trocadas.

À Érica e Luana amigas de grupo, mas também amigas de coração, por tantas conquistas e atropelos divididos. Lu, você é minha meia filha muito especial.

Aos professores do LFBM. Em especial ao Prof Lev, a Prof^a Ana e ao Prof^o João por todos os ensinamentos e agradável convivência.

Aos amigos de laboratório por fazerem do nosso espaço de trabalho o mais agradável possível. Um muito obrigado especial a: Thaís, Lívia, Ludmilla, Marcela, Natália, Flávia Emenegilda, Camila, Ana Cristina e Flávia Lobão, companheiras de longa jornada.

Ao técnico Eduardo por sua disponibilidade para ajudar enquanto esteve aqui e ao Luis pela organização do nosso espaço. Isso é que é tarefa difícil!

À prof^a Maura por toda atenção e em especial pela confiança. A sua aluna Denise por estar sempre disposta a ajudar, você foi essencial para que essa etapa do trabalho pudesse ser desenvolvida e a Carol por sua ajuda na microscopia.

Ao grupo da prof^a Kátia e da prof^a Elenir pelo auxílio e incontestável disponibilidade para o uso da célula de transferência.

À prof^a Olga Lima por permitir o uso do HPLC para a etapa final de purificação dos peptídeos.

À técnica Márcia Adriana (LBCT) por estar sempre apta a ceder o espaço da câmara escura.

À Bia e a Geovana (PAM-LBCT) pelo auxílio no preparo das amostras para microscopia.

À prof^a Kátia Fernandes pela revisão da tese. E às Prof^{as} Maura da Cunha, Elenir Amâncio e Ana Gisele Neves-Ferreira por aceitarem participar da banca.

Aos meus também pais: Jorge, Márcia e Geneci, o meu eterno obrigado. É muito bom saber que posso contar com vocês.

A toda a minha família, presentes e presentes em espírito, amigos e afilhados que sempre compreenderam que eu nunca podia. Ao Leonardo por seu incentivo mesmo sem se dar conta disso. Todos vocês são muito especiais!

Índice

| | |
|--|------|
| Agradecimentos..... | I |
| Índice..... | V |
| Lista de figuras, tabelas e esquemas..... | VII |
| Abreviaturas..... | VIII |
| Resumo..... | IX |
| Abstract..... | X |
| | |
| 1. Introdução..... | 1 |
| 1.1. Aspectos gerais..... | 1 |
| 1.2. Mecanismos de defesa de plantas..... | 2 |
| 1.3. Peptídeos antimicrobianos de plantas..... | 4 |
| 1.4. Proteínas transportadoras de lipídeos (LTPs) | 6 |
| 1.4.1. Classificação das Proteínas Transportadoras de Lipídeos (LTPs)..... | 7 |
| 1.4.2. Atividade biológica..... | 9 |
| 1.5. Pimentas (<i>Capsicum annuum</i> L.) | 12 |
| 1.6. Proteínas de defesa presentes em <i>Capsicum</i> | 14 |
| 2. Objetivos..... | 17 |
| 2.1. Objetivo geral..... | 17 |
| 2.2. Objetivos específicos..... | 17 |
| 3. Material..... | 18 |
| 3.1. Materiais biológicos..... | 18 |
| 3.1.1. Sementes..... | 18 |
| 3.1.2. Microrganismos..... | 18 |
| 3.2. Reagentes e outros materiais..... | 18 |
| 3.2.1. Reagentes para extração de proteínas de sementes..... | 18 |
| 3.2.2. Proteínas..... | 18 |
| 3.2.3. Resinas para cromatografias..... | 18 |
| 3.2.4. Reagentes utilizados nas cromatografias..... | 19 |
| 3.2.5. Materiais para eletroforese..... | 19 |
| 3.2.6. Material para diálise..... | 19 |
| 3.2.7. Reagentes usados para Western blotting..... | 19 |
| 3.2.8. Meios de cultura..... | 19 |
| 3.2.9. Reagentes usados para ensaios antimicrobianos..... | 19 |
| 3.2.10. Outros reagentes..... | 20 |
| 3.3. Equipamentos..... | 20 |
| 4. Métodos..... | 21 |
| 4.1. Extração protéica das sementes de <i>Capsicum annuum</i> | 21 |
| 4.1.1. Preparação das sementes..... | 21 |
| 4.1.2. Extração de proteínas e fracionamento com sulfato de amônio..... | 21 |
| 4.2. Purificação dos peptídeos..... | 23 |
| 4.2.1. Cromatografia de troca catiônica (CM-Sepharose) | 23 |
| 4.2.2. Cromatografia de exclusão molecular (Sephacryl S-100) | 23 |
| 4.2.3. Cromatografia de fase reversa C2/C18..... | 24 |
| 4.3. Extração protéica dos órgãos das plântulas de pimenta..... | 24 |
| 4.4. Quantificação de proteínas..... | 26 |
| 4.5. Eletroforese em gel de tricina..... | 26 |

| | |
|--|----|
| 4.5.1. Preparo da amostra e condições da “corrida”..... | 26 |
| 4.5.2. Coramento e descoramento do gel em Coomassie Blue R..... | 26 |
| 4.5.3. Revelação do gel pela técnica de precipitação com nitrato de prata..... | 27 |
| 4.5.3.1. Soluções..... | 27 |
| 4.5.3.2. Revelação do gel com a prata..... | 27 |
| 4.6. Espectrometria de massas..... | 28 |
| 4.7. Seqüenciamento de proteínas..... | 28 |
| 4.7.1. Preparo das amostras para o seqüenciamento e tratamento do gel..... | 28 |
| 4.7.2. Eletrotransferência das proteínas para o seqüenciamento..... | 28 |
| 4.7.3. Determinação da seqüência de aminoácidos..... | 29 |
| 4.8. Produção de anticorpo..... | 29 |
| 4.9. Western blotting..... | 30 |
| 4.9.1. Transferência das proteínas do gel para a membrana..... | 30 |
| 4.9.2. Imunodeteção das LTPs..... | 30 |
| 4.9.3. Revelação pelo Kit ECL..... | 31 |
| 4.9.4. Revelação por DAB..... | 31 |
| 4.10. Localização tecidual da LTP em sementes de pimenta através de técnica de imunohistoquímica..... | 31 |
| 4.10.1. Preparo da amostra (blocos) | 31 |
| 4.10.2. Imunohistoquímica..... | 32 |
| 4.11. Ensaio de inibição microbiana das frações de <i>Capsicum annuum</i> | 32 |
| 4.12. Ensaio de inibição da acidificação do meio por células de levedura estimulada por glicose..... | 33 |
| 4.12.1. Preparo das células..... | 33 |
| 4.12.2. Ensaio de acidificação..... | 33 |
| 5. Resultados..... | 35 |
| 5.1. Purificação dos peptídeos antimicrobianos..... | 35 |
| 5.1.1. Cromatografia em CM-Sepharose..... | 35 |
| 5.1.2. Cromatografia em Sephacryl S-100..... | 35 |
| 5.1.3. Cromatografia em coluna C2/C18..... | 35 |
| 5.2. Caracterização dos peptídeos antimicrobianos por eletroforese em gel de tricina em presença de SDS..... | 38 |
| 5.2.1. Fração rica em peptídeos de pimenta e frações da CM-Sepharose..... | 38 |
| 5.2.2. Frações da Sephacryl S-100..... | 38 |
| 5.2.3. Frações da C2/C18 em sistema de HPLC..... | 38 |
| 5.3. Western blotting..... | 39 |
| 5.4. Determinação da seqüência de aminoácido..... | 39 |
| 5.5. Caracterização dos peptídeos através de espectrometria de massas..... | 39 |
| 5.6. Imunolocalização da LTP em sementes de <i>Capsicum annuum</i> | 39 |
| 5.7. Detecção da presença da LTP na semente de diferentes espécies de <i>Capsicum</i> | 43 |
| 5.8. Detecção da presença da LTP nos órgãos de plântulas de <i>Capsicum annuum</i> (UENF-1381) | 43 |
| 5.9. Efeito antifúngico das frações protéicas de sementes de pimenta..... | 43 |
| 5.10. Efeito inibitório da fração F1 da CM-Sepharose sobre o crescimento de fitopatógenos bacterianos (<i>Xanthomonas</i>) | 44 |
| 5.11. Ensaio de acidificação do meio por células de leveduras..... | 44 |
| 6. Discussão..... | 50 |
| 6.1. Purificação e Caracterização de uma proteína transportadora de lipídeos...50 | |
| 6.2. Imunolocalização da LTP em sementes de pimenta..... | 52 |

| | |
|--|----|
| 6.3. Detecção da presença de LTP em diferentes espécies de <i>Capsicum</i> e nos órgãos das plântulas de <i>C. annuum</i> UENF-1381..... | 53 |
| 6.4. Atividade antimicrobiana da LTP..... | 55 |
| 7. Conclusões..... | 58 |
| 8. Referências Bibliográficas..... | 59 |

Lista de figuras, tabelas e esquemas

| | |
|---|----|
| Figura I - Diagrama modelo da estrutura tridimensional de uma LTP de <i>Amaranthus</i> | 8 |
| Figura II - Diagrama modelo da estrutura tridimensional de uma de uma proteína transportadora de lipídeo do tipo 2 (LTP2) presente em arroz..... | 9 |
| Tabela 1..... | 11 |
| Esquema 1 - Obtenção da Fração Rica em Proteínas (FRP) a partir de homogeneizados de farinha de sementes de pimenta, <i>Capsicum annuum</i> | 22 |
| Esquema 2 - Diagrama da extração protéica de órgãos de plântulas de pimenta..... | 25 |
| Figura 1 - Fracionamento de peptídeos antimicrobianos de sementes de <i>Capsicum annuum</i> | 36 |
| Figura 2 - Purificação de peptídeos antimicrobianos de sementes de <i>Capsicum annuum</i> | 37 |
| Figura 3 - Eletroforese em gel de tricina na presença de SDS..... | 40 |
| Figura 4 - Alinhamento da seqüência N-terminal da LTP..... | 41 |
| Figura 5 - Espectrometria de massas por MALDI-TOF da fração F1 da CM-Sepharose..... | 41 |
| Figura 6 - Imunolocalização da LTP em cortes anatômicos de sementes de pimenta (<i>C. annuum</i> UENF-1381)..... | 42 |
| Figura 7 - Análise de frações protéicas de diferentes espécies de <i>Capsicum</i> | 45 |
| Figura 8 - Análise de frações protéicas dos órgãos das plântulas de <i>Capsicum annuum</i> | 46 |
| Figura 9 - Gráficos do crescimento da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , até 48 h na presença de frações contendo a LTP..... | 47 |
| Figura 10 - Gráficos do crescimento de bactérias do gênero das <i>Xanthomonas</i> na presença da F1 da CM-Sepharose..... | 48 |
| Figura 11 - Gráfico da % de acidificação do meio contendo células de levedura, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 49 |

Abreviaturas

| | |
|----------------------------------|--|
| AMPs | Peptídeos antimicrobianos |
| BSA | Albumina sérica bovina |
| CM-Sepharose | Carboximetil-Sepharose |
| DAB | Diaminobenzidina |
| EDTA | Ácido etilenodiaminotetraacético |
| ELISA | Ensaio de imunoligação enzimática |
| FRP | Fração rica em proteínas |
| F1 | Fração não retida da CM-Sepharose |
| F2 | Fração retida eluída com 0,1 M de NaCl da CM-Sepharose. |
| F3 | Fração retida eluída com 0,2 M de NaCl da CM-Sepharose . |
| HPLC | Cromatografia líquida de alta eficiência |
| KCl | Cloreto de Potássio |
| kDa | Quilodaltons |
| LTP | Proteína Transportadora de Lipídeos |
| mA | Miliamperes |
| NaCl | Cloreto de sódio |
| NaH ₂ PO ₄ | Fosfato de sódio monobásico |
| Na ₂ HPO ₄ | Fosfato de sódio dibásico |
| nm | Nanômetros |
| PI | Ponto isoelétrico |
| PRs | Proteínas relacionadas à patogênese |
| PVDF | Polivinilidenodifluoreto |
| ROS | Espécies reativas de oxigênio |
| SAR | Resistência adquirida sistêmica |
| SDS | Dodecil sulfato de sódio |
| S3 e S4 | Frações eluídas da Sephacryl S-100 |
| S4H3 e S4H4 | Frações eluídas da C2/C18 em HPLC |
| TCA | Ácido tricloroacético |
| TEMED | N, N, N', N'-tetrametilenodiamino |
| TFA | Ácido Trifluoracético |
| Tris | Tris (hidroximetil) aminometano |
| µL | Microlitros |

Resumo

Durante os últimos anos, um número crescente de peptídeos antimicrobianos ricos em cisteína tem sido isolado de plantas e particularmente de sementes. Tem tornado-se claro que estes peptídeos possuem um importante papel na proteção das plantas contra infecções microbianas. Neste trabalho, proteínas de sementes de pimenta (*Capsicum annuum* L.) foram extraídas em tampão fosfato, pH 5,4 e a purificação de peptídeos antimicrobianos foi feita pelo uso de cromatografia de troca catiônica, CM-Sepharose, de exclusão molecular em Sephacryl™ S-100 High Resolution e de fase reversa em HPLC. Três frações enriquecidas, chamadas F1, F2 e F3, foram obtidas depois da cromatografia em CM-Sepharose. A fração F1, composta principalmente de três peptídeos com massa molecular em torno de 6 a 10 kDa, foi submetida à espectrometria de massa e a seqüenciamento aminoterminal. O peptídeo de aproximadamente 10 kDa apresentou uma massa de 9.461,41 Da e mostrou alta homologia de seqüência com proteínas transportadoras de lipídeos (LTPs) previamente isoladas de outras sementes. Anticorpos policlonais foram produzidos contra a LTP isolada e estes foram usados para imunolocalizar esse peptídeo em sementes de pimenta. A LTP foi observada no ambiente intracelular. Por Western blotting, também foi possível constatar a presença do peptídeo em sementes de diferentes espécies de *Capsicum* e a ausência do mesmo nos diversos órgãos de plântulas de pimenta (*Capsicum annuum* UENF 1381), com 15 e 45 dias de germinação. Ensaio de inibição do crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e de bactérias do gênero *Xanthomonas* foram feitos na presença de frações ricas em peptídeos contendo a LTP e foi observada inibição do crescimento das células de levedura e a não inibição das células bacterianas. As frações da Sephacryl inibiram fortemente a acidificação do meio por células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* quando estimuladas por glicose, em uma relação dose-dependente.

Abstract

During the last years, a growing number of cysteine-rich antimicrobial peptides has been isolated from plants and particularly from seeds. It has become increasingly clear that these peptides play an important role in the plants protection against microbial infection. In this work, proteins from chilli pepper (*Capsicum annuum* L.) seeds were extracted in pH 5,4 phosphate buffer, and antimicrobial peptides purification were performed by employing ion-exchange chromatographies on CM-Sepharose, gel filtration on Sephacryl™ S-100 High Resolution and reverse phase in HPLC. Three peptide enriched fractions, namely F1, F2 and F3, were obtained after the CM-Sepharose chromatography. The F1 fraction, mainly composed of three peptides ranging from 6 to 10 kDa, was submitted to massspectrometry analysis and N-terminal amino acid sequencing. An approximately 10 kDa peptide showed molecular mass of 9.461,41 Da and high sequence homology to lipid transfer proteins (LTPs) previously isolated from other seeds. Polyclonal antibody was raised against the purified LTP and it was used to immunolocalize the peptide in mature chilli pepper seeds. The LTP was detected in the intracellular environment mature chilli pepper seeds. By using Western blotting, it was also possible to verify the presence of the peptide in seeds of different *capsicum* species and the absence of it several organs of chilli pepper (*capsicum annuum* UENF-1381). Seedlings of 15 and 45 days after germination. Growth inhibition assays the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and bacteria from the *Xanthomonas* genera were done in the presence of the peptide rich fractions containing the LTP. Inhibition of growth for the yeast cells and no inhibition for the bacterial cells were observed. Fractions obtained from the Sephacryl™ S-100 bstrongly inhibited the acidification of the medium by the yeast *S. cerevisiae* when stimulated with glucose, in a form dose-dependent.

1. Introdução

1.1. Aspectos Gerais

Doenças de plantas influenciam significativamente a economia do mundo. De acordo com estimativas, os danos causados por essas doenças poderiam custar em torno de \$ 533 bilhões por ano. De todos os patógenos de plantas, os fungos seriam os mais devastadores que acabam levando a sérios danos nas culturas (Maor e Shirasu, 2005). Estima-se que haja mais de 13.000 patógenos fúngicos perfazendo mais que 73.000 combinações infecciosas fungo-planta. Um recente relato mostrou que, de cada 19 patógenos dos mais ameaçadores existentes, 12 são fungos (Madden e Wheelis, 2003).

O aumento da produtividade agrícola tem sido uma constante preocupação nos últimos anos, especialmente devido às inúmeras doenças que vem trazendo a perda de culturas e ao crescimento dramático da população global. Estimativas projetam que em 2020 serão 8 bilhões de pessoas; 1,5 bilhões a mais para serem alimentados (Rosegrant *et al.*, 2001). Para compensar estes fenômenos, inúmeras estratégias têm sido desenvolvidas com o objetivo de aumentar a produção de alimentos com melhoria na qualidade dos produtos. Entre as estratégias mais comumente usadas estão: o uso de variedades de plantas artificialmente selecionadas mais resistentes a doenças; melhores práticas de agricultura, tais como: a rotação das culturas; e o uso de fertilizantes e pesticidas. Entretanto, muitas dessas estratégias não mostraram resultados satisfatórios, o que reflete a necessidade de um aprofundamento dos estudos de doenças em plantas, e acima de tudo, das defesas dessas plantas às infecções (Castro e Fontes, 2005).

No caso específico de resistências a doenças das plantas, várias abordagens estão sendo estudadas com o objetivo de resolver esses problemas. Recentemente peptídeos antimicrobianos (AMPs) despertaram o interesse da engenharia genética para a produção de plantas com melhores habilidades defensivas contra patógenos. Além de serem ativos em baixas concentrações e terem atividade antimicrobiana ampla, especula-se que o desenvolvimento de resistência a esses peptídeos seja bem difícil de ocorrer devido à rapidez com que os microrganismos são mortos, bem como ao fato de ser a membrana plasmática o alvo deles. Para um patógeno adquirir resistência a esses peptídeos, ele teria que redesenhar a composição ou a

organização dos lipídeos em sua membrana, fato improvável, devido ao alto custo evolutivo que tal processo demandaria (Reddy *et al.*, 2004).

1.2. Mecanismos de defesa de plantas

As plantas constituem o mais amplo grupo de vida autotrófica sobre a terra. Por serem ricas em material orgânico, representam fonte de nutrientes para muitos organismos que se alimentam delas e que podem acabar impingindo-lhes danos durante este processo (Shewry e Lucas, 1997). Por isso, para se defender de predadores e patógenos, as plantas vêm ao longo dos anos travando uma batalha contra seus inimigos a fim de garantir sua sobrevivência. (Maor e Shirasu, 2005). Para tanto, as plantas desenvolveram várias formas de defesa, que incluem mecanismos gerais, que independem do organismo agressor ou se é decorrente de um estresse abiótico, e específicos, que estão diretamente ligados a um patógeno em particular. São esses vários mecanismos que fazem da doença uma exceção e não uma regra (Reignault e Sanchole, 2005).

Todo esse arsenal de defesa geral ou específica faz parte do mecanismo de defesa das plantas, o qual é dividido em dois: o primeiro sendo representado por estruturas e compostos sintetizados durante o plano de desenvolvimento normal da planta (defesa constitutiva), e o segundo mecanismo, ativado apenas depois do contato da planta com o agressor (defesa induzida) (Greenberg, 1997).

As defesas constitutivas e induzidas podem ainda ser subdivididas em dois arsenais: características estruturais, que agem como barreiras físicas que inibem o patógeno de forma que ele não consiga entrar e espalhar-se pela planta; e reações bioquímicas, que acontecem nas células e tecidos da planta e produzem substâncias tóxicas para o patógeno ou criam condições que inibem o crescimento do patógeno na planta (Agrios, 1997).

Ambas defesas constitutivas e induzidas podem contribuir para uma ótima proteção da planta contra um grande número de herbívoros e patógenos. Mas pensa-se que essas defesas induzidas custam menos para a planta uma vez que elas só são iniciadas após um dano inicial. Porém, levando em consideração que o ataque inicial pode ser rápido e severo o mecanismo de defesa induzido pode ser uma forma de defesa muito arriscada (Wittstock e Gershenzon, 2002).

Os mecanismos de indução envolvem o reconhecimento de eliciadores (moléculas sinalizadoras do patógeno) e a transdução de sinal, com a resposta

normalmente regulada via expressão de genes relacionados à defesa (Castro e Fontes, 2005). As plantas desenvolveram sofisticados sistemas de resposta e detecção que decifram os sinais dos patógenos e induzem uma resposta de defesa (Feys e Parker, 2000). Dentre os patógenos que causam doenças em plantas podemos encontrar os vírus, as bactérias e os fungos, além de outros inimigos causadores de danos, como os insetos e nematóides e ainda condições ambientais adversas que acabam por afetar as plantas (Bonas e Lahaye, 2002; Feys e Parker, 2000; Castro e Fontes, 2005).

Na interação planta-patógeno, enquanto os parasitas usam uma série de compostos químicos, tais como toxinas e enzimas hidrolíticas, as plantas têm numerosas substâncias de defesa, além de várias formas de barreiras físicas (Castro e Fontes, 2005). Uma série de mudanças fisiológicas nas plantas ocorre em resposta a um ataque, incluindo a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), mudanças no pH intracelular que levam a um fluxo efêmero de íons, fortalecimento da parede celular próximo ao sítio de infecção, liberação de moléculas sinais secundárias, tais como o óxido nítrico (NO) e a síntese de produtos antimicrobianos incluindo fitoalexinas e proteínas relacionadas à patogênese (PRs) (Cohn *et al.*, 2001).

Todos os compostos sejam protéicos ou não, que têm efeito negativo no crescimento, desenvolvimento ou sobrevivência de algum organismo podem ser considerados como toxinas (Wittstock e Gershenzon, 2002). O mecanismo de ação de algumas toxinas de planta é bem conhecido. Esse é o caso das saponinas, triterpenóides que determinam uma resistência pré-formada para ataque fúngicos, (Osbourn, 1996) e que agem rompendo membranas celulares, liberando cianeto de hidrogênio de glicosídeos cianogênicos para inibir a respiração celular e liberando cardenolídeos que são específicos para inibir a ATPase Na^+/K^+ (Wittstock e Gershenzon, 2002).

A forma e o local de estocagem das toxinas de plantas são essenciais para a eficiência destas. Certas espécies de plantas acumulam toxinas em laticíferos ou tricomas glandulares (Hallahan, 2000). Essas toxinas são então liberadas em grandes quantidades quando estas estruturas são rompidas pela alimentação de herbívoros ou pela movimentação ou crescimento do patógeno na superfície da planta. Muitos desses compostos de defesa são tóxicos para a própria planta e devem ser estocados na forma precursora (inativa) ou em compartimentos

reservados onde sua atividade tóxica esteja resguardada para o momento certo (Wittstock e Gershenzon, 2002).

A capacidade de sinergismo entre os produtos antimicrobianos também é de grande valia para a sua ação antimicrobiana. A toxicidade de alguns compostos pode ser potencialmente maior numa mistura do que o que poderia ser esperado quando usado cada um dos compostos individualmente. Existem relatos de fitoalexinas que foram nove vezes mais tóxicas agindo com um outro composto do que quando testadas isoladamente (Hummelbrunner e Isman, 2001). Efeitos sinérgicos também são bem conhecidos para peptídeos antimicrobianos. Ensaio *in vitro* têm demonstrado que snakín-1, um peptídeo constitutivo de batata, principalmente expresso em tubérculos e órgãos reprodutivos, age sinérgicamente contra *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* com a defensina de batata PTH1, a qual tem um modelo de expressão similar (Segura *et al.*, 1999).

Como já mencionado, vários são os compostos antimicrobianos produzidos pelas plantas. Dentre as principais proteínas que participam diretamente desses mecanismos de defesa podemos encontrar: quitinases, glucanases, lectinas, inibidores de proteinase, proteínas inativadoras de ribossomos (PIR), peroxidases e vários peptídeos antimicrobianos (Carlini e Grossi-de-Sá, 2002).

1.3. Peptídeos antimicrobianos de plantas

A presença de peptídeos antimicrobianos é uma das estratégias usadas pelas plantas para sua sobrevivência. Peptídeos com propriedades antimicrobianas estão presentes em muitas, se não em todas, espécies de plantas, podendo ocorrer em todos os órgãos destas. Um grande número destes peptídeos tem sido isolado especialmente de sementes, local em que podemos encontrá-los em nível elevado se compararmos a folhas, flores e demais órgãos da planta (Broekaert *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2001).

Todos esses peptídeos são caracterizados pela presença de um grande número de cisteínas (4, 6 e 8), as quais conectam-se em par, formando pontes dissulfeto, que conferem-lhes alta estabilidade (Broekaert *et al.*, 1997).

Recentemente tem tornado-se claro que estes peptídeos têm um importante papel na proteção das plantas contra infecções microbianas e que poderiam servir como ferramentas úteis à engenharia genética de plantas transgênicas para o aumento de resistência a doenças causadas por fungos (Pelegri e Franco, 2005).

Evidências, tais como ensaios usando corantes que marcam ácido nucléico quando a membrana do patógeno se encontra comprometida permitindo assim a entrada do mesmo, indicam que estes peptídeos agem pela permeabilização da membrana celular dos microrganismos. (Thevissen, 1999; Regente, 2005).

Baseado na sua homologia estrutural, esses peptídeos antimicrobianos podem ser classificadas em famílias distintas, incluindo, principalmente, knotinas, tioninas, defensinas de plantas e proteínas transportadoras de lipídeos (LTPs), entre outros (Broekaert *et al.*, 1997).

A partir da década de 90, vários trabalhos descreveram uma nova classe de peptídeos macrocíclicos de plantas, constituídos por aproximadamente 30 resíduos de aminoácidos, incluindo seis cisteínas altamente conservadas, que formavam três pontes dissulfeto. Essas proteínas apresentam em comum um “motif” “nó de cisteínas” e um correspondente esqueleto de carbono cíclico. Devido a essas características marcantes, esses peptídeos foram denominados knotinas ou ciclotídeos (Broekaert *et al.*, 1992; Trabi e Craik, 2002). Elas foram isoladas primeiramente de sementes de *Mirabilis jalapa* e a sua estrutura conformacional consiste de três fitas β e uma longa alça que liga a primeira fita β com a segunda (De Bolle *et al.*, 1996).

Além das características citadas acima, as knotinas, assim como outros peptídeos antimicrobianos, apresentam um caráter altamente básico. Porém apresentam uma alta divergência quanto à sua seqüência e exibem uma atividade antimicrobiana bastante diferente (Gao *et al.*, 2001). As knotinas de *Mirabilis jalapa* e de *Phytolacca americana* inibem uma grande gama de fungos e de bactérias gram-positivas (Broekaert *et al.*, 1992; Cammue *et al.*, 1992).

As tioninas representam uma classe de proteínas básicas, ricas em cisteína e com baixa massa molecular (em torno de 5 kDa). Essas proteínas são encontradas em uma variedade de plantas, como em tabaco, tomate, pimenta, pimentão, *Arabidopsis* e cevada (Lee *et al.*, 2000). Apresentam uma cadeia de 45 a 47 resíduos de aminoácidos e uma estrutura que apresenta de 3 a 4 pontes dissulfeto que são importantes na manutenção de sua conformação e assim da sua atividade biológica (Broekaert *et al.*, 1997). Sua estrutura apresenta duas α -hélices antiparalelas e uma folha β , com resíduos de aminoácidos hidrofóbicos segregados na superfície externa das hélices e resíduos hidrofílicos na superfície interna da hélice. Essa distribuição anfipática das tioninas é importante para a sua habilidade

de romper membranas microbianas e lipossomas fosfolipídicos (Caaveiro *et al.*, 1997).

As tioninas foram a primeira família de peptídeos antimicrobianos de plantas cuja atividade antimicrobiana foi detectada “*in vivo*” (Garcia-Olmedo *et al.*, 1992). Desde então tem sido proposto para as tioninas um importante papel na defesa de plantas, e sua localização no vacúolo e na parede celular sustentam essa função, sendo muitas delas tóxicas para fungos fitopatogênicos e bactérias tanto gram positivas quanto gram negativas (Broekaert *et al.*, 1997).

Na resposta imune inata, apenas uma classe de peptídeo permanece sendo conservada entre as plantas, invertebrados e vertebrados, a classe das defensinas (Thomma *et al.*, 2002). As defensinas de plantas são pequenas, possuem de 45-54 resíduos de aminoácidos, são peptídeos altamente básicos, que inibem o crescimento de um grande número de fungos em concentrações micromolares (Broekaert *et al.*, 1997), mas não parecem ser tóxicas para células de mamíferos ou para células vegetais (Thomma *et al.*, 2002).

Todas as defensinas de plantas identificadas até então possuem oito resíduos de cisteínas que formam quatro pontes dissulfeto que estabilizam sua estrutura. Estudos da estrutura tridimensional de um grande número de defensinas de plantas mostraram que sua estrutura compreende três folhas β , antiparalelas e uma α -hélice (Fant *et al.*, 1998; Almeida *et al.*, 2002). Baseando-se nessa estrutura tridimensional global, existe uma relação fechada entre as defensinas de plantas, defensinas de insetos e β -defensinas de mamíferos. Isto sugere que defensinas são peptídeos antigos conservados através do reino eucariótico, originados antes da divergência de plantas e animais. Possivelmente, as defensinas evoluíram de um único precursor, uma molécula com uma estrutura global assemelhando-se a defensinas de plantas atuais (Thomma *et al.*, 2002).

1.4. Proteínas Transportadoras de Lipídeos (LTPs)

Proteínas transportadoras de lipídeos têm sido isoladas de animais, fungos, bactérias e plantas (Park *et al.*, 2002). As LTPs de plantas não possuem seqüência similar às de mamíferos (Han *et al.*, 2001). Elas têm sido isoladas de várias espécies de monocotiledôneas e dicotiledôneas em plantas e isoladas de plantas como trigo, arroz, cevada, milho e pêssego (Douliez *et al.*, 2000).

Inicialmente elas foram caracterizadas pela sua habilidade de transferir moléculas de lipídeos entre membranas *in vitro* (Kader, 1996). Esta observação acabou por sugerir um papel citoplasmático para estas proteínas, na biogênese de membranas e regulação do “pool” de ácidos graxos intracelulares (Kader *et al.*, 1984). Entretanto, grande parte das LTPs possui um peptídeo sinal (Broekaert *et al.*, 1992) e está localizada extracelularmente ou está associada com a parede celular (Thoma *et al.*, 1994; Carvalho *et al.*, 2004). Estes resultados inviabilizam o papel intracelular dessas proteínas e leva a sugerir que elas estão envolvidas em outras funções como, por exemplo, na biossíntese de cutina e cera através de sua habilidade de carrear cadeias acil ou monômeros de cutina (Hollenbach *et al.*, 1997), em papel de defesa contra patógenos fúngicos e bacterianos (Garcia-Olmedo *et al.*, 1995) e no controle de condições de estresse abiótico ocasionado por temperatura ou seca (Larsen e Winther, 2001).

1.4.1. Classificação das Proteínas Transportadoras de Lipídeos (LTPs)

As LTPs podem ser classificadas em LTP do tipo 1 e LTP do tipo 2. Essas duas principais famílias de LTP são identificadas por sua massa molecular. A LTP1 possui uma massa molecular em torno de 9 kDa, enquanto as LTP2 possuem massa molecular em torno de 7 kDa (Douliez *et al.*, 2000).

As LTPs possuem várias características em comum. Elas são peptídeos pequenos, básicos e com ponto isoelétrico entre 8,8 e 10,0 (Kader, 1996), embora algumas descritas até hoje apresentem algumas particularidades. Por exemplo, três LTPs ácidas foram identificadas em *Arabidopsis* (Arondel *et al.*, 2000). Em frutos de *Capsicum chinense*, durante seu processo de amadurecimento foi detectada a expressão de uma LTP que apresentava características típicas desta classe de proteínas, como a presença de 8 resíduos de cisteína em posições conservadas e o peptídeo sinal no N-terminal, mas que diferia de LTPs descritas até então pela presença de 137 resíduos de aminoácidos e um *pI* neutro em torno de 7,5 (Liu *et al.*, 2006).

As LTPs1 possuem de 91 a 95 resíduos de aminoácidos, com massa molecular em torno de 9 kDa. Essas proteínas possuem um alto conteúdo de glicina, prolina, alanina e serina, com um baixo número de resíduos aromáticos, além de serem ricas em cisteínas (8 resíduos) que formam quatro pontes dissulfeto, as quais conferem alta estabilidade para esse peptídeo antimicrobiano (Kader, 1996; Douliez *et al.*,

2000). Elas possuem uma estrutura compacta consistindo de quatro α -hélices conectadas por três “loops” e um segmento C-terminal que encerra uma cavidade hidrofóbica, a qual pode acomodar diferentes ligantes hidrofóbicos (Kader, 1996; Douliez *et al.*, 2000; Ramirez-Medeles *et al.*, 2003).

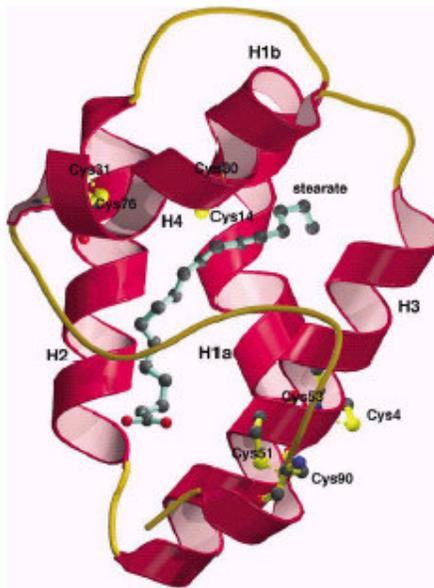
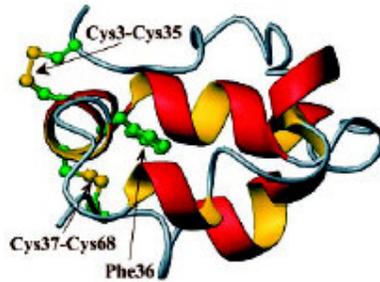


Figura I – Diagrama modelo da estrutura tridimensional de uma LTP de *Amaranthus*. As 4 α -hélices da estrutura geral das LTPs estão representadas em vermelho e a ligação com o lipídeo em azul. As pontes dissulfeto são mostradas através dos resíduos de cisteínas marcados em amarelo. Fonte: Ramirez – Medeles *et al.*, 2003.

LTPs2 possuem aproximadamente 70 resíduos de aminoácidos e têm sido isoladas e caracterizadas de poucas plantas. Apenas a estrutura tridimensional de uma LTP2 de arroz foi até então resolvida; e consiste de três α -hélices proeminentes, sendo duas delas constituídas de hélices de volta simples. Sua estrutura tridimensional é estabilizada por pontes dissulfeto, como nas LTPs1, sendo que existe uma diferença quanto à organização dos “motifs” de CXC (Samuel *et al.*, 2002).

Arroz e trigo apresentam tanto LTP1 quanto LTP2. As LTPs2 foram testadas quanto à sua atividade de transferência de lipídeos. Para LTP2 de trigo, por exemplo, o nível de transferência de moléculas de lipídeos é muito maior, em torno de 5 vezes, quando comparada a LTP1 de trigo. Este aumento da eficiência de

transferência de lipídeos de LTPs2 se deve provavelmente à maior flexibilidade da cavidade em LTPs2 em contraste com LTPs1, a qual facilita a ligação da molécula de lipídeo e a sua liberação (Samuel *et al.*, 2002).



LTP2

Figura II – Diagrama modelo da estrutura tridimensional de uma proteína transportadora de lipídeo do tipo 2 (LTP2) presente em arroz. Fonte: Samuel *et al.*, 2002.

1.4.2. Atividade Biológica

Particularmente o papel de defesa para as LTPs tem sido reforçado através da identificação de que estas proteínas ligam-se a um receptor na planta envolvido no controle de respostas de defesa (o receptor elicítina), postulando que as LTPs também podem estar envolvidas na sinalização de vias que levam a uma resposta hipersensitiva (Buhot *et al.*, 2001). Um outro relato diz respeito a um gene LTP “like” de *Arabidopsis* que está envolvido na produção e transmissão de sinais móveis na Resposta Sistêmica Adquirida (SAR) (Maldonado *et al.*, 2002).

Uma LTP isolada de sementes de *Phaseolus mungo*, conhecido como feijão “mung” mostrou possuir atividade antimicrobiana. Esta LTP foi isolada e exibiu atividade antifúngica contra *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Pythium aphanidermatum* e *Sclerotium rolfsii* e atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, porém não teve nenhum efeito sobre *Salmonella typhimurium*. Foi detectada também nesta LTP uma capacidade de transferência de lipídeos similar às de LTPs de milho e trigo, indicando a sua possível atuação também no transporte de lipídeos, além da atividade antimicrobiana (Wang *et al.*, 2004).

Um estudo com LTP de sementes de girassol e com a sua indução durante a germinação condicionada a estresse mostrou que a Ha-AP10 isolada de sementes

de girassol apresentava uma forte atividade antimicrobiana quando testada contra fungos modelos, como o *Fusarium solani*, nos cinco primeiros dias de germinação e viu-se também que a distribuição dessa LTP era homogênea nos cotilédones. No entanto, o efeito de inibição foi fraco quando testado com o fungo *Alternaria alternata*, um dos maiores causadores de doença no girassol. A proteína isolada apresentava atividade antimicrobiana apenas quando testada em altas concentrações (200 µg/mL), quando testada em concentrações menores, as quais são frequentemente usadas para outros peptídeos antimicrobianos que participam da resposta de defesa (Broekaert *et al.*, 1997),

não observava-se efeito inibitório sobre o fungo *A. alternata*. Esta observação então pôs em questão a função de Ha-AP10 como proteína de defesa e sugeriu uma função relacionada à mobilização de lipídeos de reserva (Gonorazky *et al.*, 2005).

Em um trabalho recente uma LTP isolada de sementes de *Leonurus japonicus* Houtt (LjAMP2) apresentou atividade contra vários fungos e várias bactérias testadas (tabela 1), mas outros patógenos testados não sofreram qualquer inibição; como o *Agrobacterium radiobacter* e a *Escherichia coli* (Yang *et al.*, 2006). As LTPs que possuem atividade, em geral, podem causar inibição para alguns patógenos, mas não para outros. A Ace-AMP₁ é uma potente LTP de sementes de cebola que inibiu cerca de 12 fungos testados e algumas bactérias gram positivas, entretanto, quando foi testado o seu efeito sobre bactérias gram negativas, não houve qualquer inibição (Cammue *et al.*, 1995). Logo, a capacidade de inibição dessas proteínas está diretamente relacionada com a interação delas com receptores de patógenos que vão determinar a ocorrência ou não de atividade inibitória.

Desde a descoberta das LTPs como peptídeos com a capacidade de inibir fitopatógenos, tem se especulado se este efeito poderia resultar da interação da LTP com membranas biológicas, possivelmente levando à permeabilização devido à perda da integridade membranar. Regente *et al.* (2005) isolaram uma proteína que apresentou homologia com LTPs de plantas (HaAP10) e que mostrou capacidade de permeabilização da membrana do fungo *Fusarium solani*. Esta ação pôde ser detectada pelo uso do corante de ácido nucléico SYTOX green, que penetra em membranas celulares comprometidas. Este resultado sugere uma ação sobre à membrana.

Tabela 1 – Atividade antimicrobiana de LjAMP2 contra várias espécies de bactérias e fungos. A inibição do crescimento bacteriano e fúngico da LTP foi expressa em concentração. NO significa nenhuma inibição a 25 µM de LjAMP2. Tabela adaptada de Yang *et al.*, (2006).

| Tabela 1 – Atividade antimicrobiana da LjAMP2 | |
|---|----------------------------------|
| Patógenos testados | Concentração de inibição (µM) |
| Bactérias | |
| <i>Pseudomonas solanacearum</i> | 7.5-15 |
| <i>Ralstonia solanacearum</i> | ≥15 |
| <i>Agrobacterium radiobacter</i> | NO |
| <i>Bacillus subtilis</i> | >15 |
| <i>Escherichia coli</i> | NO |
| Fungos | |
| <i>Alternaria alternata</i> | <7.5 |
| <i>A. brassicae</i> | <7.5 |
| <i>Aspergillus niger</i> | <7.5 |
| <i>Bipolaris maydis</i> | <7.5 |
| <i>Botrytis cinerea</i> | 7.5-15 |
| <i>Ceraspora personata</i> | 7.5-15 |
| <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> | <7.5 |
| <i>Fusarium graminearum</i> | 7.5-15 |
| <i>Fusarium oxysporum</i> | 7.5-15 |
| <i>Penicillium digitatum</i> | >15 |
| <i>Pyricularia grisea</i> | 7.5-15 |
| <i>Rhizoctonia solani</i> | <7.5 |
| <i>R. cerealis</i> | 7.5-15 |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | >15 |
| <i>Sclerotinia sclerotiarum</i> | >15 |
| <i>Trichoderma harzianum</i> | 7.5-15 |
| <i>Verticillium dahliae</i> | 7.5-15 |

Para determinar o possível mecanismo de ligação das LTPs nas membranas e assim determinar seu papel na defesa de plantas, estudos com LTPs de sementes de arroz mostraram que a presença de moléculas de esterol em elicinas é uma etapa essencial para o reconhecimento do receptor na membrana para causar a defesa da planta. LTPs do tipo 1 falham em acomodar moléculas rígidas de esterol, enquanto as LTPs do tipo 2 associadas com moléculas de esterol podem interagir com o receptor de membrana da planta, induzir uma via de sinalização e promover a resposta de defesa em plantas para inibir ou matar micróbios (Cheng *et al.*, 2004). Esse trabalho mostra a possibilidade de existirem moléculas que são essenciais para a sinalização e conseqüente ativação do mecanismo de defesa em plantas. Também destaca a capacidade de algumas LTPs poderem acomodar melhor essas moléculas e assim desencadear o processo de defesa.

É importante ressaltar ainda que estudos na área de biologia molecular têm evidenciado o potencial biotecnológico de algumas LTPs. Estudos mostraram que quando o gene *ltp2* de *Hordeum vulgare* é super-expresso em *Nicotiana tabacum* e *Arabidopsis thaliana*, a tolerância para patógenos bacterianos é aumentada (Molina e Garcia-Olmedo, 1997). Plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana*, super-expressando uma CALTP1 de *C. annuum*, também têm sua resistência aumentada para *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* e para o fungo *Botrytis cinerea*. Quando observadas as lesões causadas por ambos os microrganismos nas plantas modificadas, nota-se uma menor lesão quando comparada às plantas controles (não-modificadas). Estas plantas transgênicas também exibem altos níveis de tolerância para NaCl e estresses a seca (Jung *et al.*, 2005).

1.5. Pimenta (*Capsicum annuum* L.)

O gênero *Capsicum* tem, aproximadamente, 27 espécies e pertence à família das Solanaceae. Nesta família também encontramos o jiló, o tomate, a batata, a berinjela e outros. Existe um grupo cujos frutos não possuem pungência (pimentões) e outro grupo caracterizado pela presença de alcalóides (capsaicinóides: capsaicina e diidrocapsaicina), que conferem pungência aos seus frutos (pimentas) (Bosland, 1996).

Dentre as dezenas de espécies de *Capsicum* (do grego kopto, que significa morder, picar) encontradas e descritas, apenas cinco são aceitas como cultivadas: *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. pubescens*. Todas são

espécies de pimenta, podendo o *C. annuum* ser representada pelas pimentas e também pelos pimentões. Todas essas espécies apresentam a possibilidade de troca de genes de forma natural entre si (Reifschneider, 2000).

C. annuum é a espécie agrônômica mais importante, por ser a mais cultivada (Heiser Jr., 1976; Reifschneider, 2000), e se caracteriza por possuir flor isolada em cada nó, corola branca leitosa, sem manchas difusas na base das pétalas (Viñals et al., 1996) e antera azul ou arroxeadada. Inclui as variedades mais comuns de *Capsicum*: os pimentões, as pimentas doces para páprica e pimentas do tipo "jalapeño" (Reifschneider, 2000).

O *Capsicum annuum* é cultivada globalmente para consumo "in natura" e pelo seu uso como tempero, corante e também como produto medicinal (Sugita et al., 2006). Para fins medicinais, as pimentas são usadas, em algumas regiões do mundo, como estimulante digestivo, como afrodisíaco, no combate à disenteria e infecções intestinais e, ainda, como antiparasitário e cicatrizante, dentre outros (Viñals et al., 1996). *C. frutescens* e *C. annuum* são as principais espécies utilizadas para fins medicinais. *C. microcarpum* D.C. (sinonímia: *C. annuum* var. *glabriusculum*), conhecida como pimenta "olhos-de-passarinho", é considerada por alguns como a espécie com mais propriedades medicinais (Bosland, 1996).

Um dos aspectos mais relevantes das espécies de *Capsicum* está relacionado à sua ampla utilização, quer seja como alimento "in natura", como mencionado, ou processado como princípio ativo para a indústria farmacêutica ou cosmética, dentre outros (Viñals et al., 1996; Reifschneider, 2000). Entretanto, vários entraves ao desenvolvimento desses cultivos têm causado queda na produção, desestimulando os produtores. Como exemplo, podemos citar a ocorrência de doenças, que além de queda na produção, causam aumento do seu custo, devido ao uso de agroquímicos, utilizados muitas vezes de forma inadequada, podendo causar danos tanto para o produtor quanto ao consumidor (Reifschneider e Lopes, 1998).

No gênero *Capsicum*, um dos maiores problemas fitopatológicos é a mancha bacteriana, causada pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv *vesicatoria* – Xav (Lopes e Quezado-Soares, 1997; Reifschneider, 2000). Entre os métodos de controle recomendados, o uso de cultivares resistentes é considerado o mais econômico e tecnicamente mais prático, principalmente quando se observam os custos, o risco potencial de resíduos químicos nos frutos e a resistência do patógeno aos produtos químicos utilizados (Sahin e Miller, 1998).

Porém, temos ainda a murcha-bacteriana que é causada por uma bactéria do gênero *Ralstonia*, comum na família das Solanáceas e altamente destrutiva para elas. Mas são os fungos os maiores responsáveis pelas doenças nas pimentas e pimentões. A murcha-de-fitóftora é a mais destrutiva para as pimentas e é causada pela espécie *Phytophthora capsici*. Temos ainda a cercosporiose e o oídio, respectivamente ocasionados pelo *Cercospora capsici* e *Leveillula taurica*, que afetam somente as folhas das plantas da pimenta (Reiffchneider *et al.*, 2000).

1.6. Proteínas de defesa presentes em Capsicum

Estudos feitos com plantas de *Capsicum* têm detectado a presença de várias proteínas com atividade antimicrobiana. Em um trabalho onde folhas de pimenta foram infectadas com vírus do mosaico do tabaco (TMV), foi observada a expressão de genes de proteínas relacionadas a patogênese (PRs) como resposta ao agressor. Dentre os genes das proteínas de defesa sintetizadas foram detectadas um gene para proteinase cisteínica, dois para inibidores de proteinases e um para nsLTP (Shin *et al.*, 2001).

Um outro trabalho trata da expressão de um gene para quitinase de classe II básica (CACHi2) expressa também em folhas de *Capsicum*, sendo que o agente agressor usado foi a *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria*. O cDNA da quitinase CACHi2, foi isolado a partir de uma biblioteca de cDNA de folhas de pimenta infectadas com a bactéria *X. campestris pv. vesicatoria*. Observou-se que, após infecção com *X. campestris pv. vesicatoria* e com *Phytophthora capsici*, a expressão do mRNA foi mais forte nas interações incompatíveis do que nas interações compatíveis. Também foi visto neste trabalho que a biossíntese de etileno estaria auxiliando no processo de defesa, uma vez que se observava o acúmulo de dois transcritos na folha, quando em presença deste hormônio (Hong *et al.*, 2000).

Também a partir de folhas de pimentas infectadas com *X. campestris pv. vesicatoria* foi clonada uma tionina (CATHION1) que apresentava oito resíduos de cisteínas com a mesma localização encontrada em outras tioninas conhecidas. Neste trabalho, quando a *X. campestris pv. vesicatoria* é usada para infectar a planta, os transcritos são mais induzidos nas interações incompatíveis do que nas compatíveis, como as quitinases, mas quando é usada a *Phytophthora capsici* o inverso ocorre e é na interação compatível que temos uma maior expressão da tionina. Também verificou-se que o etileno pode estar envolvido na via de

transdução de sinal para a síntese das tioninas, devido a maior produção de transcritos na presença do hormônio (Lee, *et al.*, 2000).

Em outro trabalho, também envolvendo genes de plantas de *C. annuum*, três clones denominados CALTPI, CALTPII e CALTPIII foram identificados como correspondentes a genes que codificam LTPs. Estes foram isolados de uma biblioteca de cDNAs de plantas infectadas com *X. campestris pv. vesicatoria* exibindo respostas de hipersensibilidade (HR). Os transcritos dos 3 genes CALTP acumulam-se diferentemente em folhas, caules e frutos de pimenta infectada por *X. campestris pv. vesicatoria*, *P. capsici* e *Colletotrichum gloesporioides* (Jung *et al.*, 2003).

Em recentes estudos envolvendo plantas de *C. annuum*, foi observada a presença de dois membros da família de genes que codificam proteínas do tipo defensina, denominadas j1-1 e j1-2, possuindo estruturas altamente similares. A análise da seqüência dos íntrons dentro do gene j1-2 revelou a existência de um exon adicional (exon 2ji), o qual também codifica uma proteína do tipo defensina. É muito provável que este exon tenha sido derivado da troca genômica de um gene jx, pertencente a uma outra subfamília, a qual permanece não identificada (Houlne *et al.*, 1998).

Em estudos mais recentes, foi isolado um clone de cDNA codificador de uma proteína antifúngica, CaAFP, de pimenta. CaAFP consiste de 3 domínios: um peptídeo sinal, um domínio de ligação à quitina e um domínio C-terminal. A proteína AFP purificada inibiu a germinação de esporos e a formação do apressório de muitos fungos patogênicos de plantas, incluindo *Fusarium oxysporum* e *C. gloesporioides* (Lee *et al.*, 2004).

Um trabalho com extratos de *Capsicum annuum* e processos que usavam condições para a extração e purificação de alcalóides da semente dessa espécie e não de compostos protéicos mostrou a purificação da afinina e da capsaicina. Ambos são alcalóides que foram testados quanto à inibição do crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e que não apresentaram qualquer atividade considerável, tendo a afinina causado menos que 20% de inibição da levedura e a capsaicina nenhuma atividade (Molina-Torres *et al.*, 1999).

Em um trabalho prévio, usando extratos protéicos de *C. annuum* e uma fração enriquecida com peptídeos antimicrobianos, chamada F1-CM, originada de uma cromatografia de troca catiônica em resina CM-Sepharose, foram testados a

atividade inibitória destes, sobre o crescimento de leveduras tais como, a *Saccharomyces cerevisiae*, a *Schizosacharomyces pombe* e a *Candida albicans*. Observou-se uma alta atividade inibitória para a levedura *S. cerevisiae*, além da capacidade de permeabilização da membrana dessas leveduras na presença da fração e do extrato, bem como diversas alterações morfológicas de células de *C. albicans* na presença dos mesmos (Diz, 2004).

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo isolar e caracterizar uma proteína transportadora de lipídeo presente em sementes de pimenta (*Capsicum annuum* – UENF 1381).

2.2. Objetivos específicos

1 – Isolar e caracterizar bioquimicamente uma LTP presente em sementes de pimenta.

2 – Obter anticorpos policlonais contra a LTP isolada de sementes de pimenta.

3 - Determinar a localização tecidual da LTP em sementes de pimenta.

4 – Detectar a presença de LTPs em diferentes espécies de pimenta e pimentão.

5 - Detectar a presença de LTPs em diferentes órgãos das plântulas de pimenta (*C. annuum* UENF-1381).

6 - Avaliar a atividade antimicrobiana de frações ricas em peptídeos contendo a LTP, sobre o crescimento de patógenos bacterianos e de leveduras.

7 – Avaliar a inibição da acidificação do meio, estimulada por glicose, na presença de frações ricas em peptídeos em células de levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

3. Materiais

3.1. Materiais Biológicos

3.1.1. Sementes

Sementes e plântulas de *Capsicum annuum* (L.), cultivar UENF 1381, foram fornecidas pelo Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal da Universidade Estadual do Norte Fluminense – Darcy Ribeiro, Campos, Rio de Janeiro.

3.1.2. Microrganismos

As cepas bacterianas de *Xanthomonas campestris* (P3 e P6) foram fornecidas pelo Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal da Universidade Estadual do Norte Fluminense – Darcy Ribeiro, Campos, Rio de Janeiro.

Foi utilizada para ensaios antifúngicos a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (1038), mantida em cultura e conservada no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos do Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense – Darcy Ribeiro. Estas células de *S. cerevisiae* também foram as usadas nos ensaios de acidificação e foram conservadas sobre as mesmas condições, no mesmo local.

3.2. Reagentes e outros materiais

3.2.1. Reagentes para extração de proteínas de sementes

NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , KCl, EDTA e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ foram obtidos da Merck S/A e Sigma Co, St Louis, U.S.A.

3.2.2. Proteínas

Ovalbumina e BSA foram obtidas da Sigma Co, St Louis, U.S.A.

3.2.3. Resinas para cromatografias

CM-Sepharose, Sephacryl™ S-100 High Resolution e C2/C18 e foram adquiridas da GE Healthcare, Suécia.

3.2.4. Reagentes utilizados nas cromatografias

Foram utilizados NaH_2PO_4 , acetonitrila, TFA e NaCl obtidos da Merck e da Sigma Co, St Louis, U.S.A.

3.2.5. Materiais para eletroforese

Acrilamida, bis-acrilamida, SDS, azul de bromofenol, persulfato de amônio, Tris, TEMED, tricina, glicerol e marcadores de peso molecular foram adquiridos da Sigma Co, St Louis, U.S.A.

3.2.6. Material para diálise

Membranas de celulose com poros de retenção para moléculas de massa molecular acima de 1000 Da foram adquiridas da Sigma Co, St Louis, U.S.A.

3.2.7. Reagentes usados para Western blotting

Membranas de nitrocelulose (Hybond ECL) e anticorpo anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase foram adquiridas da GE Healthcare, Suécia.

3.2.8. Meios de cultura

O meio DYGS foi feito no laboratório com os seguintes reagentes: Dextrose, peptona bacteriológica, extrato de levedura, K_2HPO_4 , MgSO_4 , ácido L-glutâmico, ágar-ágar e H_2O destilada. Os reagentes foram adquiridos da Sigma Co, St Louis, U.S.A, Merck S/A Industrias Químicas e outros representantes químicos.

O meio de cultura ágar-Sabouraud e caldo Sabouraud usados para o cultivo de leveduras foram adquiridos da Merck S/A Industrias Químicas.

3.2.9. Reagentes usados para ensaios antimicrobianos

Tris-HCl, NaH_2PO_4 , NaCl, glicose e outros foram adquiridos da Sigma Co, St Louis, U.S.A. e da Merck S/A Industrias Químicas.

Placas de polietileno para cultura de células, estéreis, com 96 poços, diâmetro de 6,4 mm, fundo redondo, com tampa, foram adquiridos da Corning Glass Works, New York, USA.

3.2.10. Outros reagentes

Todos os demais reagentes utilizados são de grau analítico e adquiridos comercialmente.

3.3. Equipamentos

| Equipamentos | Marca | Modelo |
|---|-----------------------------|-----------------------------------|
| Autoclave | Quimis | Q.190.24 |
| Balança Analítica | AND | HM-300 |
| Balança Semi-Analítica | AND | HF-200 |
| Banho Maria | Quimis | Q.220.B.1 |
| Banho Seco | Thermolyne | Dri-bath 17.600 |
| Bomba Peristáltica | Pharmacia | P-1 |
| Capela de Fluxo Laminar Vertical com Lâmpada Germicida | Quimis | Q.216.F.21 |
| Célula de Transferência | Bio Rad | Trans-Blot SD cell |
| Coletor de Frações | Pharmacia | RediFrac |
| Centrífuga | Hitachi | Himac CR 21 |
| Espectrofotômetro | Shimadzu | UV-1203 |
| Estufa | Quimis | Q.316.14 |
| Kit para Eletroforese (cuba, fonte, etc) | Bio-Rad | Mini Protean II |
| Leitor de ELISA | Gio. De Vita E. C. | Dv 990 BV 4-6 |
| Liofilizador | LABCONCO | Freeze dry system/freezone 4.5 |
| Microcentrífuga não refrigerada | Eppendorf | 5415C |
| Microscópio | Zeiss | Axioplan |
| PHmetro | QUIMIS | 400-A |
| Placa Agitadora/Aquecedora | CORNING | PC 220 |
| Agitador (Shaker) | New Brunswick Scientific | Innova™4300 |
| Sistema para Eletroforese | Biorad | 150A gel Electrophoresis Cell |
| Vortex | Quimis | Q.220.B.1 |

4. Métodos

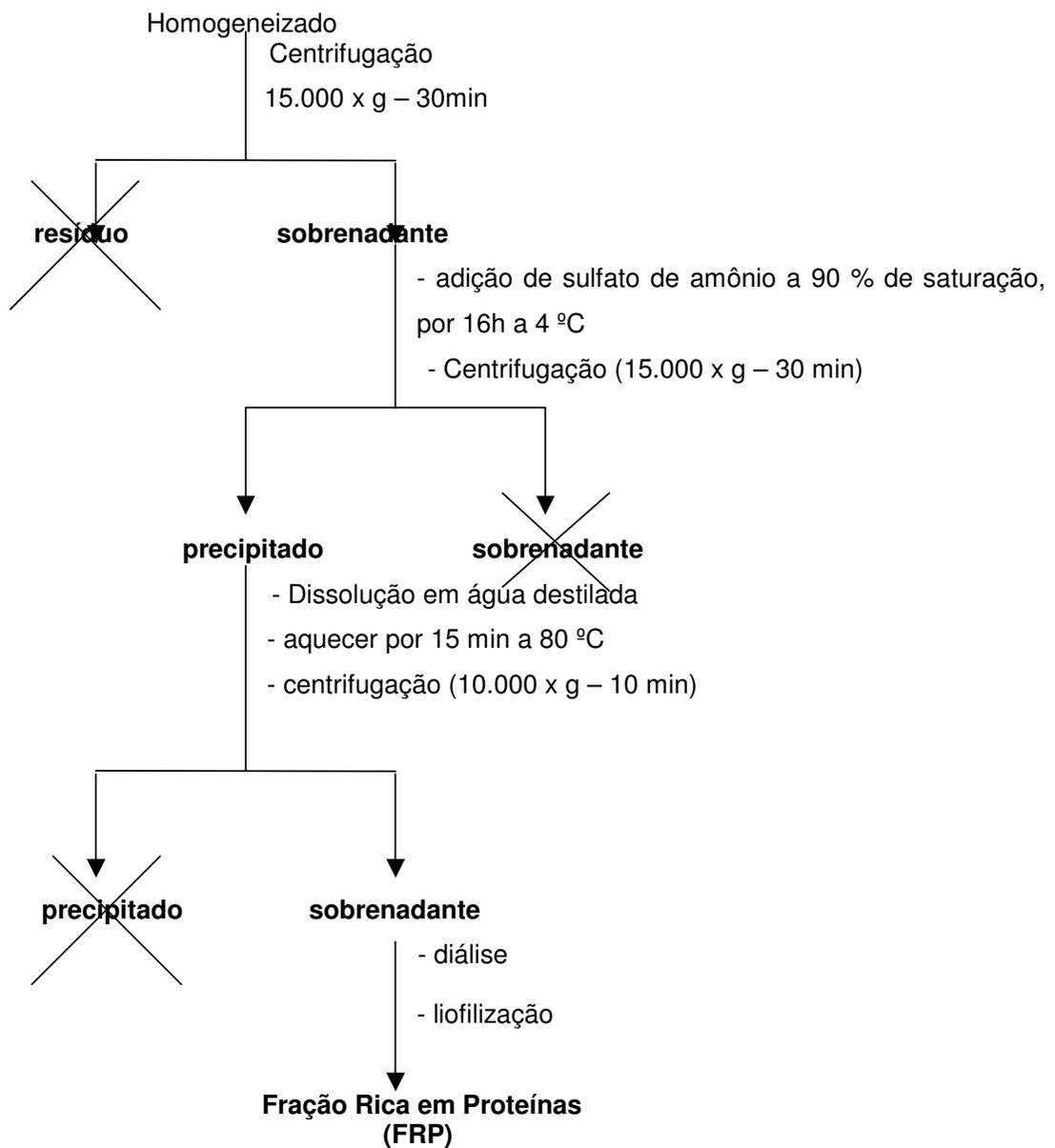
4.1. Extração protéica das sementes de *Capsicum annuum*

4.1.1. Preparação da farinha.

Sementes de pimenta (*Capsicum annuum* L.) foram maceradas com o auxílio de gral, pistilo e nitrogênio líquido, até a formação de uma farinha de granulação bem fina. Após a obtenção da farinha, segue-se imediatamente a extração das proteínas.

4.1.2. Extração de proteínas e fracionamento com sulfato de amônio.

As proteínas da farinha foram extraídas segundo metodologia descrita por Terras *et al.* (1993) com algumas modificações. Inicialmente as proteínas foram extraídas em tampão fosfato pH 5,4 (Na_2HPO_4 0,01 M, NaH_2PO_4 0,015 M, KCl 0,1 M, EDTA 1,5 %) na proporção de 1:10 (farinha:tampão), por 3 horas, sob agitação constante, a 4 °C. O homogeneizado foi submetido a uma centrifugação (15.000 x g por 30 minutos), o resíduo foi descartado e ao sobrenadante foi adicionado sulfato de amônio a 90% de saturação. Esta solução foi mantida “overnight” a 4 °C. Após este processo, o sobrenadante resultante do fracionamento a 90 % de saturação foi submetido a nova centrifugação (15.000 x g por 30 min) e o precipitado resultante ressuspenso em 10 mL de água destilada e aquecido a 80 °C por 15 min e em seguida submetido a uma última centrifugação (10.000 x g por 10 min). As proteínas termosensíveis resultantes desta última centrifugação foram descartadas e o sobrenadante dialisado contra água destilada (membranas com poros de 1.000 Da) a 4 °C, durante 3 dias (3 trocas por dia), e em seguida liofilizado para então ser utilizado no isolamento dos peptídeos antimicrobianos (Esquema 1).



Esquema 1 – Obtenção da Fração Rica em Proteínas (FRP) a partir de homogeneizados de farinha de sementes de pimenta, *Capsicum annum*. (Adaptado de Terras *et al.*, 1993).

4.2. Purificação dos peptídeos

4.2.1. Cromatografia de troca catiônica (CM-Sepharose).

Uma resina de troca iônica, CM-sepharose, foi montada em uma coluna cromatográfica sob a ação da gravidade e devidamente ativada de acordo com o fabricante. Após o processo de ativação, foi lavada com tampão de equilíbrio, tampão fosfato ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 20 mM, pH 8,0, deixando a coluna devidamente preparada para o uso. A amostra a ser aplicada na coluna foi preparada da seguinte forma: 25 mg da Fração Rica em Proteínas (FRP) foram pesados e dissolvidos em 10 mL de tampão de equilíbrio e a solução foi centrifugada a $16.000 \times g$, por 3 min a temperatura ambiente e o sobrenadante aplicado sobre a resina. A amostra foi percolada primeiramente através de tampão de equilíbrio e em seguida eluída por um tampão fosfato adicionado de NaCl em um gradiente “stepwise”. O NaCl foi adicionado de modo a formar um gradiente com molaridades crescentes que variaram de 0,1 à 1 M. Foram coletadas frações de 3 mL num fluxo de $40 \text{ mL} \cdot \text{h}^{-1}$. As absorvâncias das frações foram lidas em um espectrofotômetro a 280 nm e separados os picos de acordo com essas absorvâncias.

4.2.2. Cromatografia de exclusão molecular (Sephacryl™ S-100 High Resolution)

Uma resina de exclusão molecular, Sephacryl S-100, foi montada em uma coluna, sob um fluxo de 1 mL/min. Depois da coluna estar devidamente empacotada, ela foi lavada com o tampão de equilíbrio, tampão fosfato - $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 50 mM, pH 8,0, sob um fluxo no qual a cromatografia seria feita, 0,5 mL/min. Com a resina devidamente preparada para o uso, a amostra foi preparada da seguinte forma: 80 mg da fração não retida na CM-Sepharose (F1) foram pesados e dissolvidos em 500 μL de tampão de equilíbrio adicionados de 500 μL de água e a solução foi centrifugada a $16.000 \times g$, por 3 min à temperatura ambiente e o sobrenadante aplicado sobre a resina. A amostra foi então percolada através de tampão de equilíbrio em um fluxo contínuo de $30 \text{ mL} \cdot \text{h}^{-1}$, coletando-se 1 mL por tubo, num total de 130 tubos coletados. Após o processo cromatográfico, as absorvâncias das frações foram lidas em um espectrofotômetro a 280 nm e separados os picos de acordo com essas absorvâncias.

4.2.3. Cromatografia de fase reversa C2/C18.

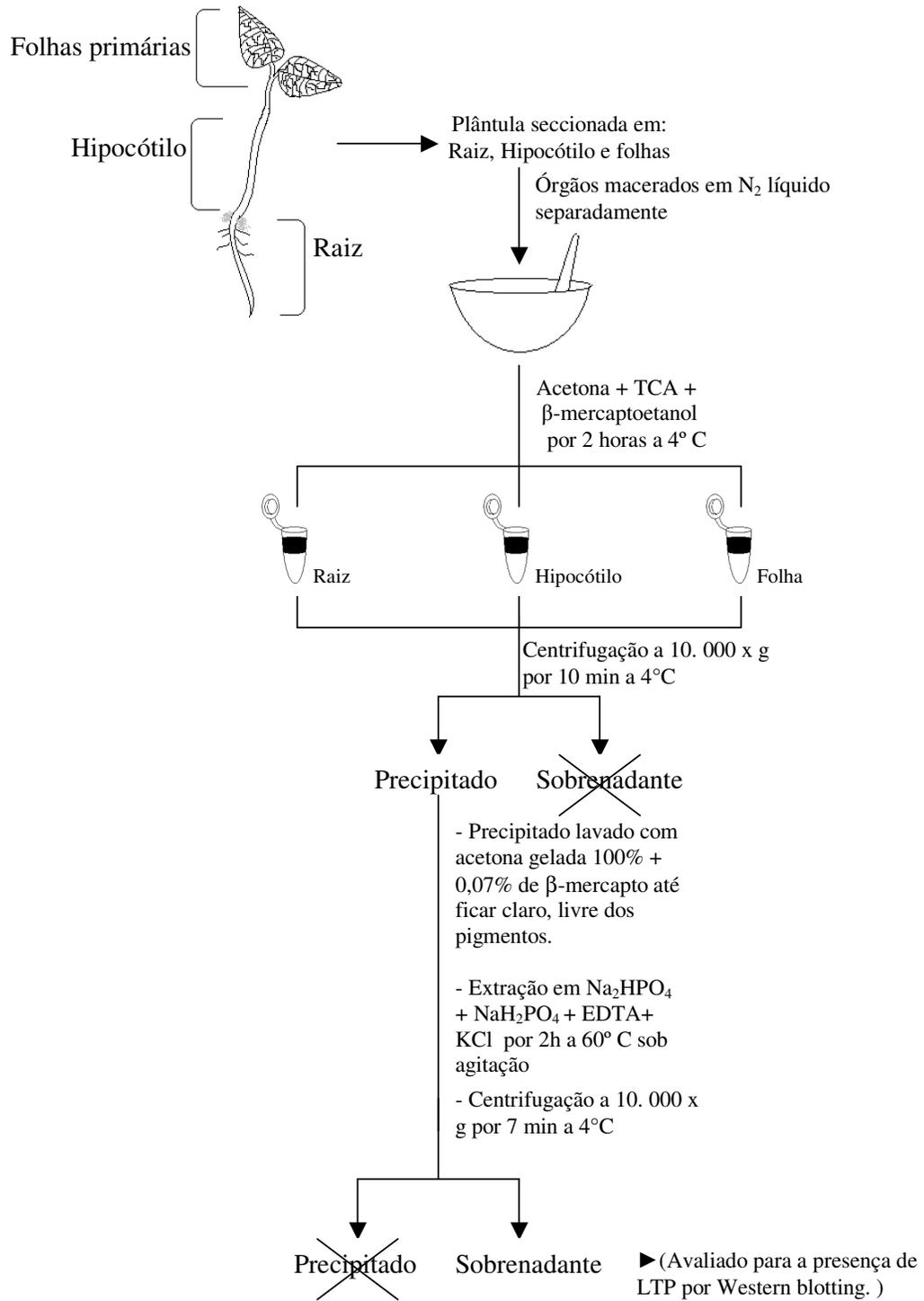
Uma coluna de fase reversa μ RP C2/C18 foi equilibrada com TFA 0,1% contendo 2% de acetonitrila (solvente A) e a eluição das amostras foi efetuada por gradiente linear de acetonitrila até 80% em 0,1% de TFA (Solvente B), sob o fluxo de 0,5 mL/min. O gradiente de eluição foi feito de acordo com as seguintes etapas: 0-10 min, 0% de B; 10-50 min, 100% de B e de 50-60 min, 0% de B. A eluição da coluna foi acompanhada por um detector do tipo DAD, sendo os picos proteicos detectados a 220 nm.

As amostras aplicadas na coluna foram as frações S3 e S4 retiradas da Sephacryl S-100 após serem filtradas e dissolvidas em TFA.

4.3 Extração protéica dos órgãos das plântulas de pimenta

As proteínas dos órgãos das plântulas de pimenta (*C. annuum* UENF-1381) foram extraídas de acordo com um protocolo usado para focalização isoeétrica. Foram usadas plântulas com 15 e 45 dias de germinação.

As plântulas foram separadas em: raiz, hipocótilo e folhas. Cada órgão foi então submetido à maceração usando-se gral e pistilo a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ com a utilização de nitrogênio líquido ($\text{N}_2\text{ L}$) para a formação de uma farinha com granulação bem fina. Sobre cada farinha obtida (de raiz, hipocótilo e folha) foi utilizada uma solução gelada composta de ácido tricloroacético (TCA) 10 % e β -mercaptoetanol 0,07 % diluídos em acetona pura, na proporção de 3 g de peso fresco para 1 mL da solução para a precipitação dos compostos protéicos. Essa extração foi mantida a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 h e em seguida as amostras foram centrifugadas a $10.000 \times g$ por 15 min, os precipitados foram então lavados em uma solução de acetona contendo β -mercaptoetanol 0,07 %, até o precipitado se tornar claro. Os precipitados lavados foram secos em banho-seco a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ e então ressuspensos no tampão de extração (Na_2HPO_4 10 mM, NaH_2PO_4 15 mM, EDTA 1,5 % e KCl 100 mM) pH 5,4. Os precipitados foram mantidos nesse tampão para extração protéica a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 h, sendo periodicamente agitados com o auxílio de um vórtex; após esse período as extrações foram centrifugadas a $10.000 \times g$ por 7 min coletando-se, ao término, os sobrenadantes (Granier, 1988).



Esquema 2 - Diagrama da extração protéica de órgãos de plântulas de pimenta.

4.4. Quantificação de Proteínas

As determinações quantitativas de proteínas foram feitas pelo método de Bradford (1976) e pelo método do ácido bicinônico (método descrito pelo fabricante, Sigma Co, St. Louis, U.S.A.), sendo a albumina sérica bovina utilizada como proteína padrão.

4.5. Eletroforese em Gel de Tricina

A visualização de proteínas nas frações foi feita através da técnica de eletroforese descontínua, sob condições desnaturantes, em gel de tricina (Schagger e Von Jagow, 1987). Foram usadas placas de vidro de 8x10 cm e 7x10 cm e espaçadores de 0,5 mm. O gel de separação foi preparado numa concentração de 16,4% de acrilamida/bis-acrilamida e o gel de concentração foi preparado numa concentração de 3,9% de acrilamida/bis-acrilamida.

4.5.1. Preparo da amostra e condições da “corrida”

O extrato bruto e as frações protéicas obtidas após cromatografias foram concentradas por liofilização e em seguida pesadas e ressuspensas em tampão de amostra contendo 5 % de β -mercaptoetanol. Estas foram aquecidas por 5 minutos a 100 °C e centrifugadas a 16.000 x *g* por 2 min. Após estes procedimentos, 10 μ g das amostras foram aplicados no gel de concentração. Para precipitação com nitrato de prata foram usadas quantidades menores. A corrida foi feita a uma voltagem constante de 20 V por um período de aproximadamente 16 horas.

Foram usados os seguintes marcadores de massa molecular: mioglobina (16.950 Da), mioglobina I + II (14.400 Da), mioglobina I + III (10.600 Da), mioglobina I (8.160 Da), mioglobina II (6.200 Da), glucagon (3.400 Da) e mioglobina III (2.500 Da).

4.5.2. Coramento e descoramento do gel em Coomassie Blue R

Após o término da corrida, o gel foi cuidadosamente retirado das placas e colocado na solução corante, de Coomassie Blue R (0,05%) dissolvido em metanol 40% e ácido acético 7%, por meia hora. Depois desse período a solução corante foi retirada e o gel colocado na solução descorante de metanol 40% e ácido acético 7%, até a visualização das bandas.

4.5.3. Revelação do gel pela técnica de precipitação com nitrato de prata

Essa técnica foi descrita por Morrissey (1998), com modificações.

4.5.3.1. Soluções

A solução 1 foi preparada utilizando-se 10% de ácido acético, 40% de etanol absoluto, mais 50% de água ultra pura.

A solução 2 foi preparada utilizando-se 5% de glutaraldeído em água ultra pura.

A solução 3 foi preparada utilizando-se 20% de etanol absoluto em água ultrapura

A solução 4 foi preparada com 0,2g de nitrato de prata dissolvidos em 1 mL de água ultra pura.

A solução 5, chamada de solução "Staining", foi preparada da seguinte forma: 36,5 mL de água ultra pura foram acrescidos de 10 mL de etanol absoluto, 500 μ L da solução 4, 500 μ L de hidróxido de amônio 30% e 2,5 mL de hidróxido de sódio 4%. Os reagentes foram colocados nessa ordem sob agitação. Essa solução foi preparada antes do uso.

A solução 6, chamada de solução de coloração, foi preparada da seguinte forma: 40 mL de água ultra pura foram adicionados a 10 mL de etanol absoluto, 50 μ L de formaldeído 37% e 12,5 μ L de ácido cítrico 2,3 M. Esta solução também foi preparada imediatamente antes do uso.

A solução 7, chamada de fixadora, foi preparada com ácido acético 10% e glicerol 1% com água ultra pura.

4.5.3.2. Revelação do gel com nitrato de prata

Ao término da corrida, o gel foi cuidadosamente retirado das placas de vidro e submetido aos seguintes procedimentos: 1 – incubado na solução 1 por 40 min; 2 – lavado em água ultra pura por 5 min; 3 – incubado na solução 2 por 20 min, 4 – lavado novamente em água ultra pura por 2X de 10 min; 5 – incubado na solução 3 por 20 min, 6 - incubado na solução 5 por 20 min ao abrigo da luz; 7 – incubado novamente na solução 3 por 2X de 10 min cada; 8 – colocado na solução 6 até a obtenção da coloração desejada (visualização das bandas); 9 - colocados na solução 7 para a fixação da coloração por 10 min; 10 - armazenado em água

4.6. Espectrometria de massas

A fração F1 da CM-Sepharose foi co-cristalizada com o ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico, para ser usada como matriz doadora de prótons. Através de um espectrômetro de massas MALDI-TOF foram obtidas as massas moleculares das proteínas de interesse, utilizando-se um Voyager-DE STR Bioworkstation em um modo linear sob acelerações de 20.000 volts e com intensidade de laser de 2160.

4.7. Seqüenciamento de proteínas

4.7.1. Preparo das amostras para o seqüenciamento e tratamento do gel

Amostras contendo os peptídeos antimicrobianos do pico F1, obtidos em coluna de CM-Sepharose, foram tratadas com tampão de amostra contendo β -mercaptoetanol 5% para redução das pontes dissulfeto e com vinil piridina (5 μ l para 60 μ l da amostra), para alquilar resíduos de cisteína. Foram então incubados a 37^o C por 30 min e depois submetidos a eletroforese em gel de tricina na presença de SDS.

Foi feita uma pré-corrída por 30 min antes das amostras serem aplicadas no gel. Os tampões usados durante a corrída do gel foram tratados com reagentes antioxidantes. O tampão anodo foi adicionado de Glutathione reduzida (5 μ M), enquanto o tampão catodo além de adicionado de glutathione foi acrescido com tioglicolato de sódio (0,1 mM).

4.7.2. Eletrotransferência das proteínas para o seqüenciamento

Após corrída, as proteínas do gel foram eletrotransferidas para membrana de PVDF utilizando uma célula comercial "Trans-blot" semi-seco. Para transferência o gel foi imerso em tampão de transferência (glicina 182 mM, Tris 25 mM e metanol 20%) por 15 min. A membrana também foi embebida no tampão de transferência sendo primeiramente imersa em metanol 100% por 5 s e depois deixada por 20 min no tampão de transferência.

Foi montado um "sanduíche" com cinco camadas de papel de filtro previamente embebido em tampão de transferência; logo acima foi colocada a membrana e depois o gel. O sanduíche foi fechado com mais 5 camadas de papel de filtro embebidos. É importante certificar-se da retirada de quaisquer bolhas que possam atrapalhar a transferência protéica.

Após esses procedimentos foi aplicada uma corrente $1\text{mA}/\text{cm}^2$ por duas horas no sentido gel-membrana. Em seguida a membrana foi corada com Ponceau S (0,1%) para visualização das bandas de interesse e recorte das mesmas para o seqüenciamento (Towbin *et al.*, 1979).

4.7.3. Determinação da seqüência de aminoácidos

A seqüência NH_2 -terminal foi obtida através da metodologia introduzida e desenvolvida por Edman (1950) utilizando-se um sequenciador automático de proteínas Shimadzu PSQ-23A. Os aminoácidos foram detectados a 269 nm após separação cromatográfica.

4.8. Produção de anticorpo

Primeiramente, foi obtido soro pré-imune a partir da sangria do coelho antes da inoculação do peptídeo de interesse. Esta sangria consiste de um corte feito na extremidade da orelha do animal com o auxílio de uma lâmina. Foram, então, coletados 10 mL de sangue em um becker e deixados por 30 min por $37\text{ }^\circ\text{C}$ para coagulação. Após formação do coágulo, o soro foi recolhido e submetido a centrifugação a $16.000 \times g$ por 6 min a $4\text{ }^\circ\text{C}$. Este procedimento permitiu a clarificação do soro, antes de armazená-lo a $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

O peptídeo antimicrobiano de sementes de pimenta (fração F1) de interesse (LTP) foi preparado de acordo com metodologia descrita por Retamal *et al.* (1998), na qual bandas de interesse são recortadas do gel corado com KCl para identificação das bandas e colocadas em tubo falcon de 15 mL. As bandas recortadas são submetidas a 3 lavagens de 5 min com 2 mL de tampão Tris-HCL 250 mM e EDTA 250 mM pH 7,4, e a 3 lavagens de 5 min com água destilada. Após esse processo, o gel foi macerado e extraído com 1 mL de tampão Tris-HCl 20 mM contendo SDS 0,1% pH 7,4, e sujeito a 5 sonicações de 5 min com 30 s de intervalo e 30 s de sonicação. Todo o processo foi feito em gelo e após a sonicação, o material foi centrifugado a $16.000 \times g$ e o sobrenadante com o peptídeo em solução foi recolhido e o precipitado descartado.

A solução decorrente do processo de sonicação foi adicionado ao adjuvante de Freund para emulsificação na proporção de 2:1 e a mistura foi injetada no coelho. A primeira imunização foi intramuscular (1 mL) e após um período de 15 dias foi feita uma 2ª imunização, subcutânea (1 mL). Após sete dias, foi feita a 1ª sangria e mais

uma imunização subcutânea. O processo foi repetido por mais duas semanas com mais duas sangrias e mais uma aplicação subcutânea.

A obtenção e estocagem do soro contendo o anticorpo anti-LTP foram feitas nas mesmas condições que aquelas descritas para o soro pré-imune.

4.9. Western blotting

Esta técnica foi realizada conforme descrito por Towbin *et al.*, 1979.

4.9.1. Transferência das proteínas do gel para a membrana

O procedimento de transferência se deu pela imersão do gel e da membrana de nitrocelulose em um tampão de transferência, igual a descrita em 4.7.2, por 20 min. Passado esse tempo, foi montado, numa célula de transferência, um sanduíche, como para o seqüenciamento (4.7.2.) com a membrana ficando por baixo e o gel por cima e acima e abaixo do sanduíche, folhas de papel de filtro embebidas em tampão de transferência. Uma corrente constante de 1 mA/cm² por duas horas no sentido gel-membrana foi aplicada.

4.9.2. Imunodeteccção das LTPs

Após a transferência, a membrana foi corada com Ponceau (0,1%) para verificação da eficiência do processo.

Depois da visualização das bandas a membrana foi bloqueada com uma solução bloqueadora de PBS (Na₂HPO₄. 2H₂O-10 mM, KCl-3 mM, KH₂PO₄. 2H₂O-1,5 mM, NaCl-140 mM) com leite desnatado 2%, por 1h. Em seguida, a membrana foi imersa no tampão bloqueador contendo o anticorpo primário (anti-LTP de pimenta 1:2000) e deixada por um período de 16 h a 4^o C. A membrana foi então lavada por 10 X por 5 min em cada lavagem com PBS e depois imersa novamente em tampão bloqueador contendo agora o anticorpo secundário (anti IgG de coelho conjugado com peroxidase – 1:2000) e deixada por 2 h à temperatura ambiente. Após esse período a membrana foi novamente lavada em PBS por 10 X por 5 min cada.

Após esse tratamento a reação na membrana foi revelada pelo Kit ECL “Western blotting” ou por reação com DAB.

4.9.3. Revelação pelo Kit ECL

Esta técnica revela a reação imunológica por quimioluminescência. Após os procedimentos descritos em 4.9.2., a membrana foi colocada sobre filme de PVC. Partes iguais dos reagentes adquiridos comercialmente na G& Healthcare são misturadas e a solução resultante vertida sobre a membrana, de acordo com as instruções do fabricante. A membrana foi envolvida no filme de PVC, com o cuidado de se evitar a formação de bolhas. A membrana foi colocada em um cassete de exposição e sobre ela, um filme para quimioluminescência cortado nas mesmas dimensões da membrana. O cassete foi fechado e o tempo foi de 20 min. Após este período, o filme foi retirado do cassete submetido à revelação e fixação. Todo o procedimento foi realizado em câmara escura.

4.9.4. Revelação por DAB

A revelação por DAB se fez pela imersão da membrana em uma solução reveladora contendo Tris-HCl 40 mM, pH 7,5, diaminobenzidina (DAB) 1mg.ml⁻¹, imidazol 100 mM e peróxido de hidrogênio 0,03 %, até a visualização das bandas marcadas. A reação é parada com água destilada.

4.10. Localização tecidual da LTP em sementes de pimenta através de técnica de imunohistoquímica

4.10.1. Preparo da amostra

Sementes de pimenta (*C. annuum*) foram embebidas em água destilada por 4 h e em seguida em tampão cacodilato de sódio 50 mM pH 7,2 por 1 h e, então devidamente cortadas e fixadas por 2h, à temperatura ambiente, em tampão cacodilato de sódio 50 mM pH 7,2 contendo paraformaldeído 4% e glutaraldeído 0,01%. Após a fixação, o material passou por três lavagens (1h cada) em tampão cacodilato de sódio 50 mM pH 7,2 e foi desidratado e infiltrado com resina LR Gold. Para desidratação e infiltração, as amostras foram incubadas em concentrações crescentes de metanol e, posteriormente, de LR Gold (ao abrigo da luz), da seguinte forma: metanol 50% por 30 min, metanol 70% por 1h, metanol 90% por 1h, metanol 50% + 50% LR Gold por 4h, metanol 30% + 70% LR Gold por 18h e 100% de LR Gold por 3 dias. Após esse período, as amostras foram deixadas polimerizar em resina LR Gold contendo 0,05 % de benzil e 0,05% de peróxido de benzoil sob a

incidência de luz branca, por um período de 5 dias. Todas as etapas até a infiltração foram feitas a -20° C.

4.10.2. Imunohistoquímica

As lâminas foram devidamente lavadas em álcool e água destilada e depois colocadas para secar. As amostras foram seccionadas em ultramicrótomo. Cortes seriados de 1 a 3 µm de espessura foram coletados em lâminas, e então, incubados em cloreto de amônio 50 mM por 30 min; em seguida incubados em PBS (NaH₂PO₄ 10 mM + NaCl 0,15 M)-BSA 1% pH 7,4 por 20 min; e depois incubados em soro pré-imune de coelho (1:100) em PBS-BSA por 20 min. O anticorpo primário (anti- LTP 1:300) foi incubado também em PBS-BSA por 2h; passado esse tempo as lâminas foram lavadas em PBS-BSA (10 vezes de 10 min cada) e incubadas na presença do anticorpo secundário (anti-IgG de coelho 1:100, conjugado com ouro coloidal 10nm) em PBS-BSA por 2h; os cortes foram então lavados com PBS-BSA (10 vezes por 10 min cada); depois lavados com PBS (2 vezes por 10 min cada) e então lavados com água deionizada (2 vezes por 10 min cada).

Após os procedimentos acima, foi feita a revelação da reação imunológica através da precipitação com prata: ao término da última lavagem, foi retirado o excesso de água das lâminas, reunidas quantidades iguais de cada um dos substratos adquiridos comercialmente (Kit Inten SETMBL Silver enhancement) e a mistura vertida sobre as lâminas. Depois de 8 min as lâminas foram

lavadas em água destilada e colocadas para secar para serem observadas em microscópio óptico de campo claro.

4.11. Ensaio de inibição microbiana das frações de *Capsicum annuum*

Em placas de cultura de células (96 poços), contendo 0,2 mL de meio de cultura específico para o crescimento de levedura, caldo Sabouraud, foram adicionadas as amostras a serem testadas em concentrações de 12,5 e 25µg de proteína (S3 e S4 da Sephacryl S-100) obtidas de sementes de pimenta e 1 x 10⁴ céls/mL de *Saccharomyces cerevisiae*. Para a observação da inibição do crescimento da levedura, foi determinada a densidade ótica calculada a partir de leituras em “um leitor de ELISA” a 670 nm a cada 6 horas, por um período de 48 horas (Broekaert *et al.*, 1990, com modificações).

Com as células bacterianas, o mesmo processo foi utilizado. Em placas de 96 poços, 10^5 céls/mL de bactérias foram incubadas em 0,2 mL de meio de cultura específico para o crescimento de *Xanthomonas*, meio DYGS (Rodrigues *et al.*, 1986), contendo concentrações diferentes de uma solução dos peptídeos antimicrobianos preparados em tampão fosfato 20 mM, pH 8,0. As amostras foram mantidas a 28° C por 48 horas e a determinação da densidade óptica (crescimento celular) foi realizada de 6 em 6 horas em leitor de ELISA a 670 nm. O controle experimental foi feito nas mesmas condições sem adição de proteínas (Broekaert *et al.*, 1990, com modificações; Nakajima *et al.*, 2003).

Todo o procedimento, desde a obtenção das células até a montagem do experimento na placa, foi feito sobre condições assépticas em capela de fluxo laminar. O experimento foi realizado em triplicata e o resultado e as médias estatísticas calculadas.

4.12. Ensaio de inibição da acidificação do meio por células de levedura estimulada por glicose

4.12.1. Preparo das células

Inicialmente as células de *S. cerevisiae* foram crescidas em placas de Petri contendo ágar Sabouraud por um período de 2 dias a 30 °C. Após este período, 5 mL de salina 0,15 M estéril foram vertidos sobre as colônias e as células homogeneizadas com o auxílio de uma alça de Drigalski. Um volume de 50 µL dessa suspensão celular foi adicionado a 200 mL de meio de cultura (caldo Sabouraud) e as culturas deixadas crescer por 16 horas sob agitação constante a 30 °C. Após crescimento, foram feitas leituras a 620 nm para verificar se o crescimento celular atingiu uma OD entre 0,2 e 0,3, valor desejado para utilização nos experimentos descritos a seguir. O material foi centrifugado a 3.000 x *g* por 5 minutos a 4 °C. As células precipitadas foram lavadas 3 X com água mili-Q e centrifugadas, mantendo-se as mesmas condições acima descritas. Ao final das lavagens, as células precipitadas foram ressuspensas em 3 mL de água e utilizadas nos ensaios de acidificação.

4.12.2. Ensaio de acidificação

Este ensaio foi feito com células de levedura em um tampão contendo Tris-HCl 10 mM pH 6,0. Células de *S. cerevisiae* (10^7 céls.mL⁻¹) foram pré-incubadas em 4

mL deste tampão contendo uma fração rica em peptídeos com a LTP (S3 ou S4). O tempo de pré-incubação foi de 30 minutos. Após este período foi adicionado 1 mL de glicose 0,5 M e em seguida foram feitas leituras de pH a cada minuto por 30 min. Um controle negativo sem adição da fração rica em peptídeos foi realizado (Gomes *et al.*, 1998).

Este ensaio foi feito em triplicata e cálculos de Δ pH foram feitos para determinação da porcentagem de inibição obtida com o experimento.

5. Resultados

5.1. Purificação de peptídeos antimicrobianos

5.1.1. Cromatografia em CM-Sepharose

A Fração Rica em Proteínas obtida da extração protéica de sementes de pimenta foi submetida a uma cromatografia em CM-Sepharose onde se obteve 3 picos que foram chamados de F1, F2 e F3. O primeiro pico foi eluído com o tampão de equilíbrio da coluna e o segundo e o terceiro picos, a partir de um gradiente de NaCl, que variou de 0,1 a 1,0 M de sal, sendo que apenas 2 concentrações apresentaram “pools” protéicos. F2 foi eluído com o tampão fosfato 20 mM, adicionado de 0,1 M de NaCl e F3, com o tampão fosfato 20 mM adicionado, de 0,2 M de NaCl (figura 1A).

5.1.2. Cromatografia em Sephacryl™ high Resolution

A fração não retida, F1, obtida a partir de cromatografia de troca iônica em CM-Sepharose foi submetida a uma cromatografia de exclusão molecular (Sephacryl S-100) onde se obtiveram cinco picos que foram chamados de S1, S2, S3, S4 e S5. Os picos foram eluídos com o tampão de equilíbrio da coluna, tampão fosfato 50 mM pH 8,0 (Figura 1B). Os picos S3 e S4 foram os que se apresentaram enriquecidos com peptídeos.

5.1.3. Cromatografia em coluna C2/C18

As frações S3 e S4 obtidas a partir de cromatografia de exclusão molecular, Sephacryl S-100, foram submetidas a uma cromatografia de hidrofobicidade acoplada a um sistema de HPLC, onde foi usado o solvente acetonitrila como eluente da amostra.

A fração S3 apresentou um cromatograma com a presença de apenas um pico protéico chamado S3H1, enquanto o S4 apresentou um cromatograma onde se pôde observar a presença de quatro picos, o S4H1, o S4H2, o S4H3 e o S4H4 (figuras 2A e 2B).

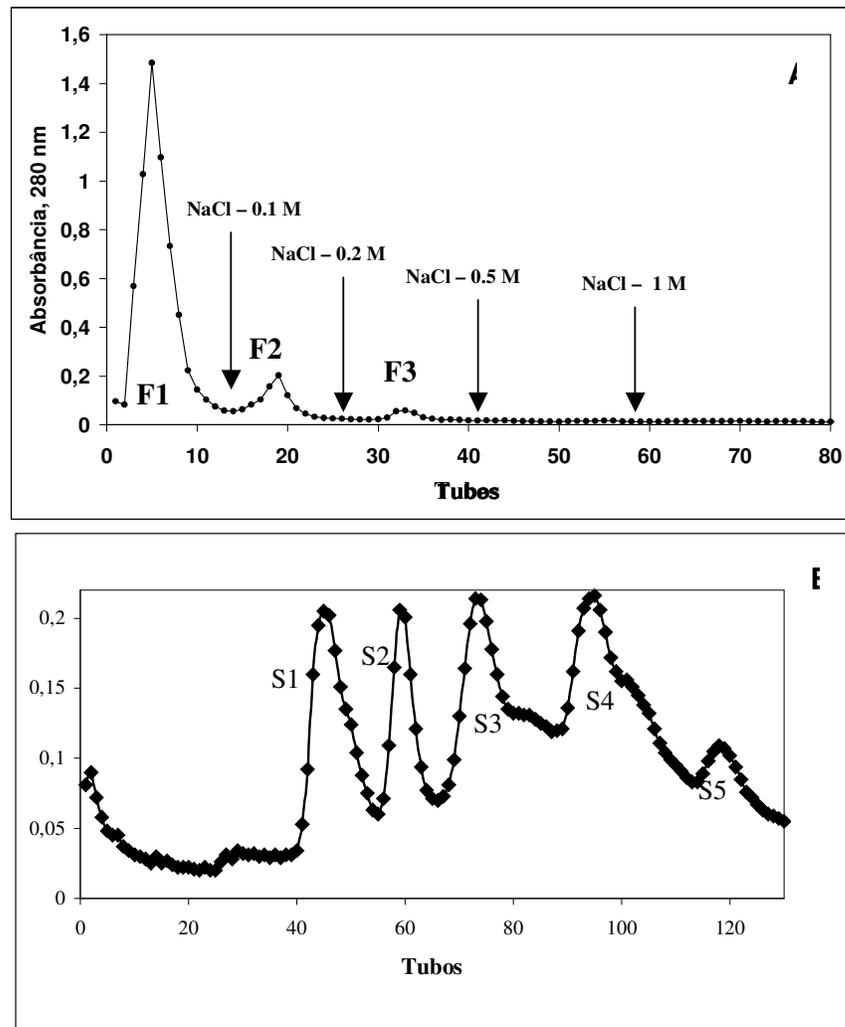


Figura 1 - Fracionamento de peptídeos antimicrobianos de sementes de *Capsicum annum*. **(A)** Cromatografia da FRP de pimenta em coluna de troca catiônica (CM-Sephacryl). A coluna foi previamente equilibrada com tampão fosfato 20 mM pH 8,0. A eluição foi feita com tampão fosfato 20 mM + NaCl 0,1 M e tampão fosfato 20 mM + 0,2 M de NaCl. O fluxo foi de 40 mL.h⁻¹ e foram coletadas frações de 3 mL **(B)** Cromatografia do F1 de pimenta em coluna de Sephacryl S-100. A coluna foi previamente equilibrada com tampão fosfato 50 mM pH 8,0. Todo o processo de eluição cromatográfica foi feito com o tampão de equilíbrio. O fluxo usado foi de 30 mL.h⁻¹ e foram coletadas frações de 1 mL.

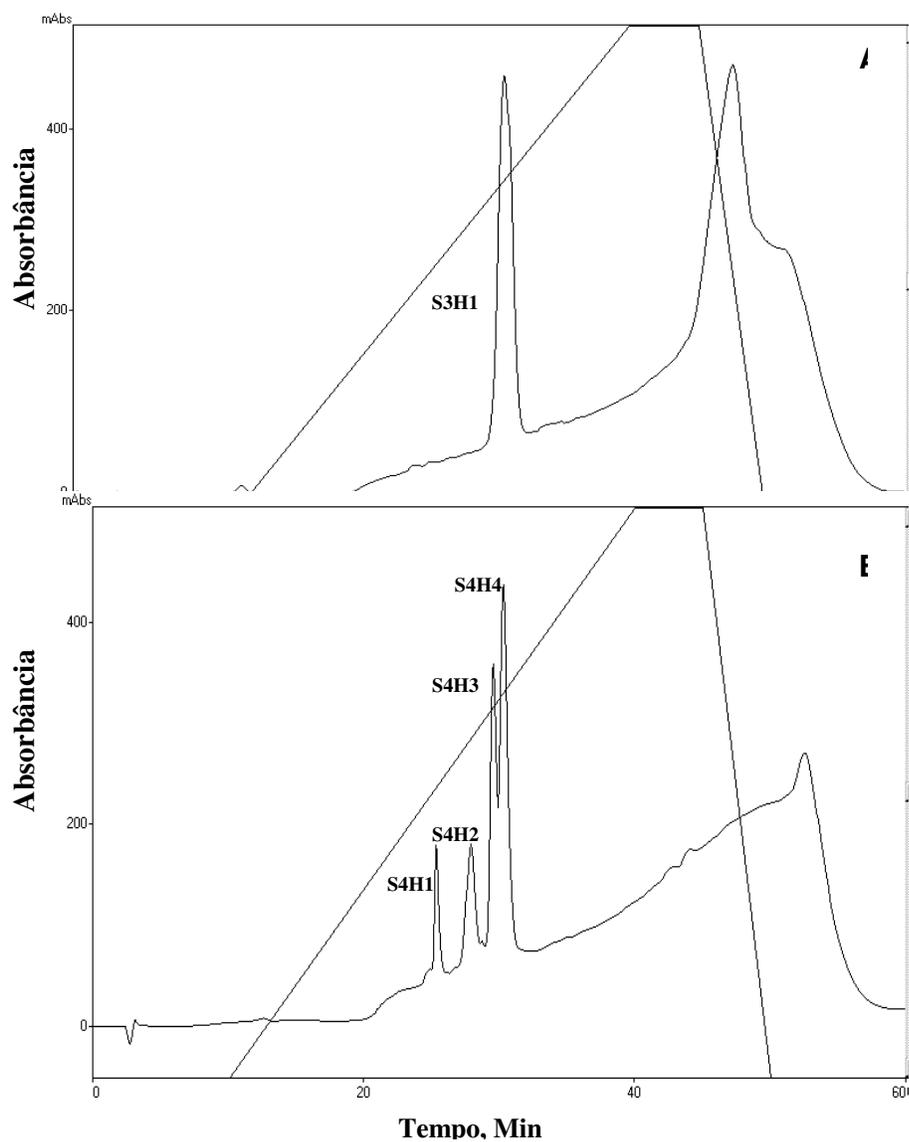


Figura 2 - Purificação de peptídeos antimicrobianos de sementes de *Capsicum annuum*. **(A)** Cromatografia em coluna μ RP C2/C18 da fração S3 da Sephacryl. **(B)** Cromatografia em coluna μ RP C2/C18 da fração S4 da sephacryl. Ambas as cromatografias, A e B, foram feitas sobre as mesmas condições. A coluna foi previamente equilibrada e a corrida foi feita com TFA 0,1% em 2% de acetonitrila (Solvente A) e a amostra foi eluída usando-se um gradiente linear de acetonitrila 80% em TFA 0,1% (Solvente B). O fluxo foi de $0,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$.

5.2. Caracterização dos peptídeos por eletroforese em gel de tricina em presença de SDS

5.2.1. Fração rica em peptídeos de pimenta e frações da CM-Sepharose

A figura 3A representa o perfil eletroforético obtido a partir da FRP e das frações da CM-Sepharose. A FRP, representada na canaleta 2, apresenta diversas bandas de proteínas com massas moleculares diferentes, onde observamos principalmente 2 com a massa molecular mais elevada e 3 com baixas massas moleculares, variando entre 13 e 6 kDa. Já as frações da CM apresentaram uma distribuição das bandas protéicas contidas na FRP. Na canaleta 3, onde temos o perfil eletroforético de F1, observamos a presença de 2 ou 3 peptídeos. Um em torno de 9 kDa, outro em torno de 6 kDa, e um provável terceiro com massa molecular abaixo de 6 kDa, que está em concentração menor. A canaleta 4, representando o F2, possui duas bandas com massas moleculares mais altas e a presença de um peptídeo que deve ter em torno de 6 kDa. A canaleta 5 representa o F3 e mostra a presença de 3 principais bandas, uma próxima de 13 kDa, outra entre 8 e 7 kDa e uma terceira próxima de 6 kDa .

5.2.2. Frações da Sephacryl S-100

A figura 3B representa o perfil eletroforético obtido a partir das frações da Sephacryl-S100. Na canaleta 1 temos o marcador de baixas massas moleculares. O S3 está representado na canaleta 4 onde observamos um único peptídeo com massa molecular abaixo de 8kDa. Na canaleta 5, podemos observar o perfil eletroforético do S4 onde identificamos 2 bandas: uma LTP, detectada por western blotting (dado não mostrado), e outra abaixo da LTP detectada. Nas canaletas 2, 3 e 6 temos representados respectivamente o S1, o S2 e o S5, onde não pudemos visualizar a presença de bandas protéicas, que pode ser em função da concentração das proteínas nessas frações.

5.2.3. Frações da C2/C18 em sistema de HPLC

A figura 3C representa o perfil eletroforético obtido a partir das frações da C2/C18. No gel, na canaleta 1 temos o marcador de baixa massa molecular. Nas canaletas seguintes encontramos respectivamente o perfil protéico dos picos S4H1, S4H2, S4H3, S4H4 e S3H1. Observamos a presença de duas bandas purificadas a partir do S4 da Sephacryl, uma no pico S4H3 e outra no S4H4, e uma banda

purificada no pico S3H1, fração vinda do S3 da Sephacryl, onde a banda já estava purificada.

5.3. Western blotting

O anticorpo produzido contra LTP de semente de pimenta, isolada da fração F1 usando metodologia descrita por Retamal, *et al*; (1998), foi usado para ensaios de imunodeteção desta proteína nas frações obtidas nas cromatografias ao longo do processo de purificação. Como mostra a figura 3D pode ser observada a presença da LTP no S4H3 e no S4H4.

5.4. Determinação da seqüência de aminoácidos

A proteína de 9 kDa vinda da fração F1 da CM-Sepharose, submetida a seqüenciamento do N-terminal pelo método de degradação de Edman, apresentou uma seqüência de 15 resíduos de aminoácidos. A comparação da seqüência em bancos de dados mostrou que essa proteína tem homologia com LTPs encontradas em várias espécies de planta, como as de milho, espinafre, *Arabidopsis*, entre outras (Figura 4).

5.5. Caracterização dos peptídeos através de espectrometria de massa

Os peptídeos presentes na fração F1 da CM-Sepharose foram submetidos a análise de espectrometria de massas. Como podem ser observados na figura 5, os dois principais peptídeos apresentados nessa fração F1 tiveram as massas determinadas em 4.721 e 9.461 Da.

5.6. Imunolocalização da LTP em sementes de *Capsicum annuum*

Na figura 6 mostramos cortes anatômicos feitos em sementes de pimenta, visualizados por microscópio óptico de campo claro.

A figura 6A mostra o cotilédone de pimenta tratado com soro pré-imune, controle, onde não ocorre nenhuma marcação nas células. A figura 6B representa a mesma região do cotilédone tratada com soro anti-LTP e podemos visualizar a marcação intracelular indicada pela seta. Na figura 6C observamos uma das células do cotilédone com um núcleo bem evidenciado, onde não foi observada marcação (cabeça de seta). E a figura 6D mostra uma região do tegumento da semente de pimenta onde também não é detectada qualquer marcação (cabeça de seta).

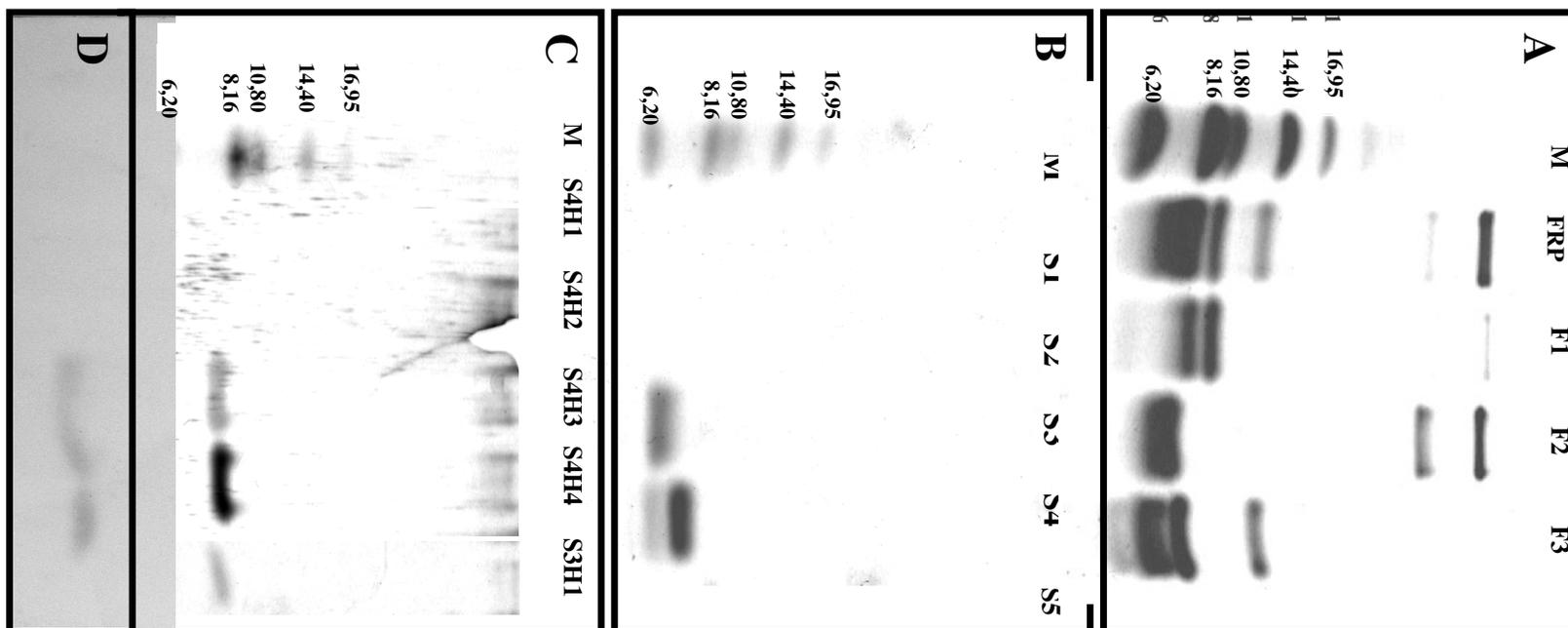


Figura 3 – Eletroforese em gel de tricina na presença de SDS. **(A)** - Frações Ricas em Proteínas (FRP) e frações da CM; 1 – Marcador de massa molecular (Da); 2 – FRP, fração obtida da extração protéica da pimenta; 3 – F1, pico não retido em CM-Sepharose; 4 – F2, pico eluído com 0,1 M de NaCl e tampão fosfato 20 mM; 5 – F3, pico eluído com 0,2 M de NaCl e tampão fosfato 20 mM. **(B)** - frações da Sephacryl S-100; 1 - (M), Marcador de massa molecular (Da); 2 - S1, 3 - S2, 4 - S3, 5 - S4 e 6 - S5, todos os picos desta cromatografia foram eluídos com tampão fosfato de sódio 50 mM pH 8,0. **(C)** - frações do HPLC, coluna C2/C18; 1 - (M) Marcador de massa molecular (Da); 2 - fração S4H1; 3 - fração S4H2; 4 - fração S4H3; 5 - fração S4H4 e 6 – fração S3H1, todo o processo cromatográfico em HPLC foi feito com um gradiente linear de acetonitrila. **(D)** – Western blotting das frações do HPLC. 1 –M; 2 - S4H1; 3 - S4H2; 4 - S4H3; 5 - S4H4 e 6 – S3H1.

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------|----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| SEQ 1 (LTP) | 1 | A | V | T | X | G | Q | V | D | A | N | L | A | P | X | V | 15 | I | P |
| <i>Zea mays</i> | 1 | A | I | S | C | G | Q | V | A | S | A | I | A | P | C | I | 15 | 47 | 33 |
| <i>Hordeum vulgare</i> | 29 | A | I | S | C | S | A | V | Y | S | T | L | M | P | C | L | 43 | 40 | 27 |
| <i>Spinacia oleracea</i> | 27 | G | I | T | C | G | M | V | S | S | K | L | A | P | C | I | 41 | 47 | 27 |
| <i>Arabidopsis</i> | 23 | A | I | S | C | G | T | V | A | G | S | L | A | P | C | A | 38 | 53 | 13 |
| <i>Prunus domestica</i> | 1 | - | I | T | C | G | Q | V | S | S | N | L | A | P | C | I | 14 | 47 | 26 |

Figura 4 - Alinhamento da seqüência N-terminal da proteína eletrotransferida para membrana de PVDF com seqüências de aminoácidos de proteínas transportadoras de lipídeos isoladas ou deduzidas a partir de sequenciamento de cDNA. SEQ 1 - banda protéica isolada da fração F1 da CM-Sepharose de semente de pimenta. (I) - indica a porcentagem de resíduos idênticos; (P) - indica a porcentagem de resíduos homólogos.

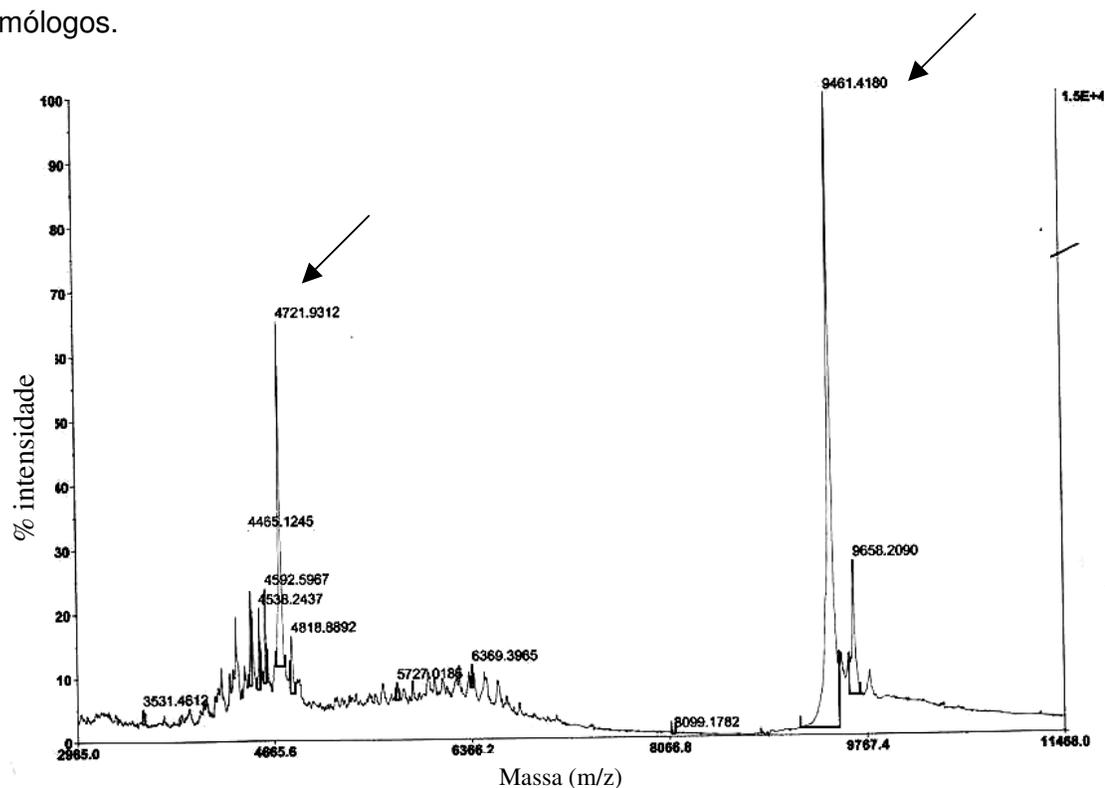


Figura 5 - Espectrometria de massas por MALDI-TOF da fração F1 da CM-Sepharose. A amostra foi diluída em uma solução de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico em acetonitrila. O espectro foi obtido em um Voyager-DE STR operando no modo linear sob uma aceleração de 20.000 volts e intensidade do laser de 2,160. (→) massa das proteínas majoritárias da fração.

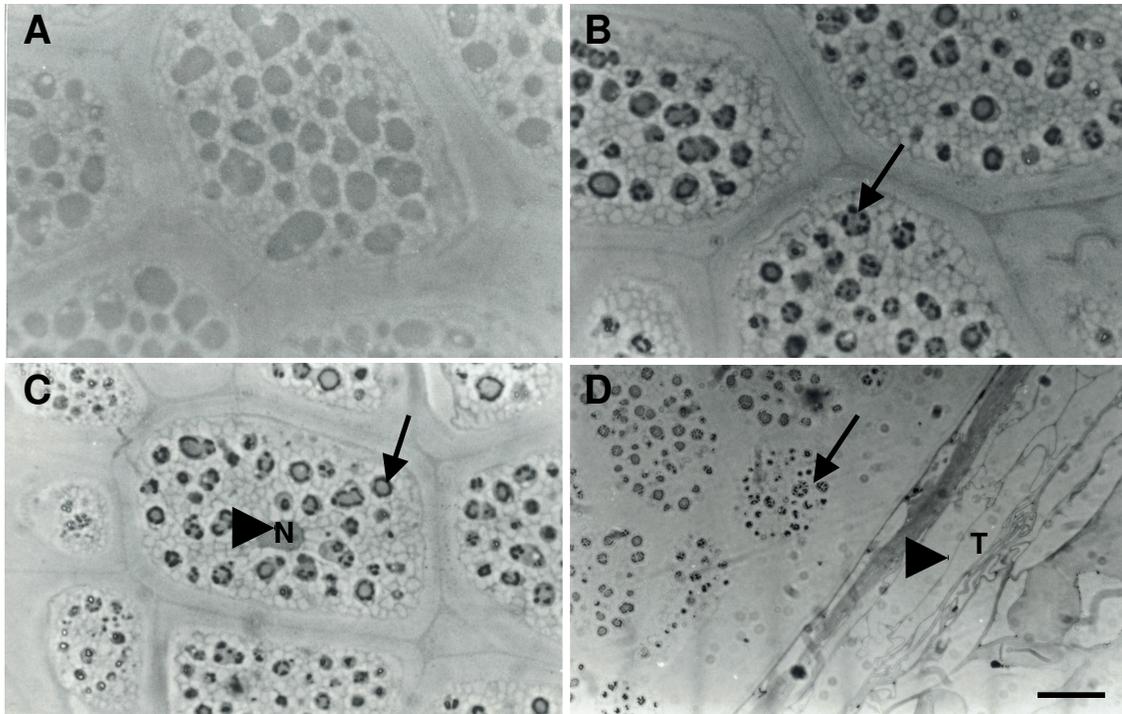


Figura 6 – Imunolocalização da LTP em cortes anatômicos de sementes de pimenta (*C. annuum* UENF-1381). **(A)** – Células do cotilédone tratadas com soro pré-imune, controle; **(B)** – Cotilédone tratado com anti-LTP; **(C)** – Cotilédone com núcleo evidenciado tratado com anti-LTP; **(D)** – Tegumento tratado com anti-LTP. (→) – região Marcada; (►) - região que não apresenta marcação; **(N)** – núcleo; **(T)** – tegumento. Barras, A, B e C = 5 μ m, D = 10 μ m.

5.7. Detecção da presença da LTP nas sementes de diferentes espécies de *Capsicum*

Os extratos das sementes de *Capsicum annuum* (Ikeda), *Capsicum annuum* (UENF-1381XIkeda) – “Híbrido”, *Capsicum chinense*, *Capsicum baccatum* e *Capsicum frutescens*, mostraram-se enriquecidos com proteínas de baixas massas moleculares, mas com presença de proteínas com massa acima de 17 kDa (figura 7A).

O blotting feito para a detecção da presença da LTP mostrou que elas se encontram presentes em todas as sementes das espécies investigadas (figura 7B).

5.8. Detecção da presença da LTP nos órgãos de plântulas de *Capsicum annuum* (UENF-1381)

Os extratos protéicos dos órgãos das plântulas testadas (raiz, hipocótilo e folha), tanto com 15 dias de germinação, quanto com 45 dias de germinação, apresentaram um perfil eletroforético com a presença de bandas protéicas nas folhas e no hipocótilo, e os extratos da raiz sem a presença de bandas protéicas (figura 8A).

O blotting da raiz, hipocótilo e folha das plantas, com os 2 tempos de germinação, não detectou a presença de LTPs nos órgãos das plântulas de pimenta (*Capsicum annuum*) (figura 8B).

5.9. Efeito antifúngico das frações protéicas de sementes de pimenta

Na figura 9A, usamos a levedura *Saccharomyces cerevisiae* para testar concentrações variadas da fração F1, vinda da CM e observamos uma ótima inibição do crescimento com todas as concentrações utilizadas, que variaram de 70 a 9 µg/mL de proteína. Obtivemos 100 % de inibição nas concentrações testadas.

Na figura 9B observamos o efeito das frações S3 e S4 da Sephacryl S-100 sobre células da levedura *S. cerevisiae*. Pode-se notar o efeito inibitório significativo do pico S4 e nenhum efeito de inibição do pico S3. As duas frações foram utilizadas nas concentrações de 12,5 µg/mL e de 25 µg/mL, apresentando efeito inibitório as duas concentrações utilizadas da fração S4, onde encontramos uma LTP durante o processo de purificação.

5.10. Efeito inibitório da fração F1 da CM-Sepharose sobre o crescimento de fitopatógenos bacterianos (*Xanthomonas*).

É observada uma leve inibição do crescimento bacteriano na presença da fração F1 da CM, tanto quando testada a cepa P3 (4135) de *Xanthomonas campestris*, como quando usada a cepa P6 (157) de *Xanthomonas axonopodis* (Figuras 10A e 10B) . Para ambas as cepas foi usada uma concentração de 50 µg/mL de proteína. Nenhuma das cepas teve inibição acima de 50%, ou seja, apresentou um IC 50 satisfatório. Porém, é notável que a inibição da P3 foi levemente maior com relação a P6.

5.11. Ensaio de acidificação do meio por células de levedura

Na figura 11 é mostrado o efeito da inibição da acidificação do meio contendo células de leveduras a partir do momento em que é introduzida no meio a fração S3 e S4 da Sephacryl-S100. Foram usados 12,5 µg/mL de cada fração e para as duas tivemos uma notável inibição da acidificação do meio. Observando a figura podemos ver que a inibição da acidificação foi praticamente de 100% para as duas frações testadas.

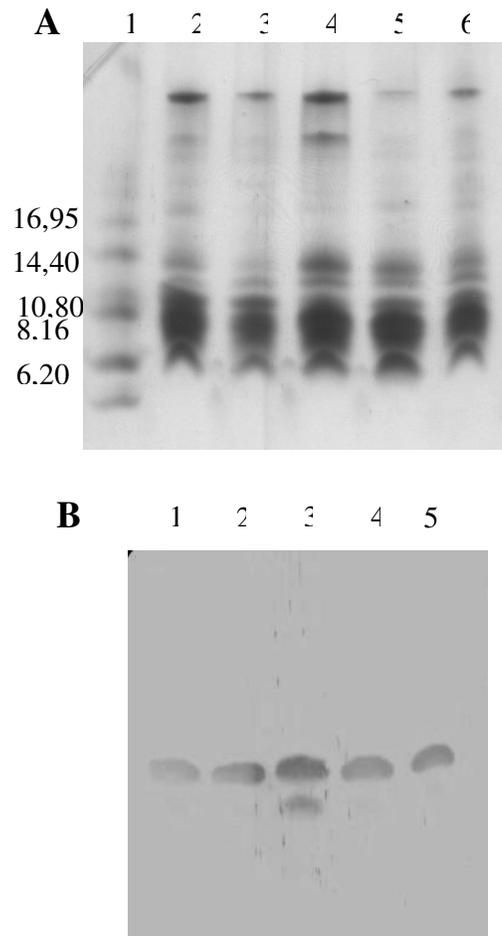


Figura 7 - Análise de frações protéicas de diferentes espécies de *Capsicum*. **(A)** Eletroforese em gel de tricina na presença de SDS corado com Coomassie Blue. (1) - (M) Marcador de massa molecular (Da); (2) - *Capsicum annuum* (Ikeda); (3) - *C. annuum* (IkedaXUENF1381); (4) - *C. chinense*; (5) - *C. baccatum*; (6) - *C. frutescens*. **(B)** Western blotting para detecção de LTPs nas sementes das espécies de pimenta. (1) - *C. annuum* (Ikeda); (2) - *C. annuum* (IkedaXUENF1381); (3) - *C. chinense*; (4) - *C. baccatum*; (5) - *C. frutescens*. Membrana revelada com DAB.

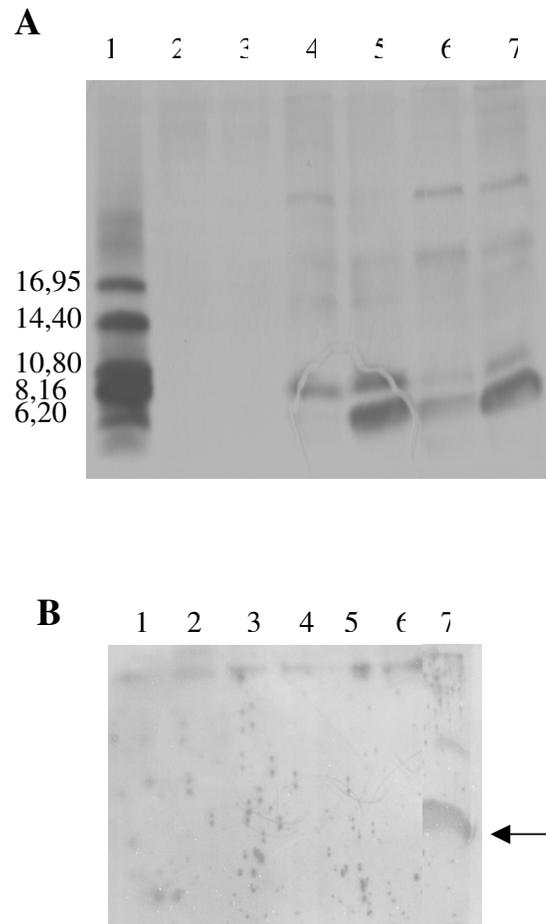


Figura 8 - Análise de frações protéicas dos órgãos das plântulas de *Capsicum annuum*. **(A)** Eletroforese em gel de tricina na presença de SDS das plântulas de pimenta (*Capsicum annuum* – UENF1381). (1) - (M) Marcador de massa molecular (Da); (2) – Raiz, 15 dias; (3) – Raiz, 45 dias; (4) – Hipocótilo, 15 dias; (5) – Hipocótilo, 45 dias; (6) – Folha, 15 dias; (7) – Folha, 45 dias. Gel corado com prata. **(B)** Western blotting de plântulas de pimenta e do F1 da CM-Sepharose. (1) – Raiz, 15 dias; (2) – Raiz, 45 dias; (3) – Hipocótilo, 15 dias; (4) – Hipocótilo, 45 dias; (5) – Folha, 15 dias; (6) - Folha, 45 dias; (7) - F1, CM-Sepharose (controle positivo). Membrana revelada com Kit ECL.

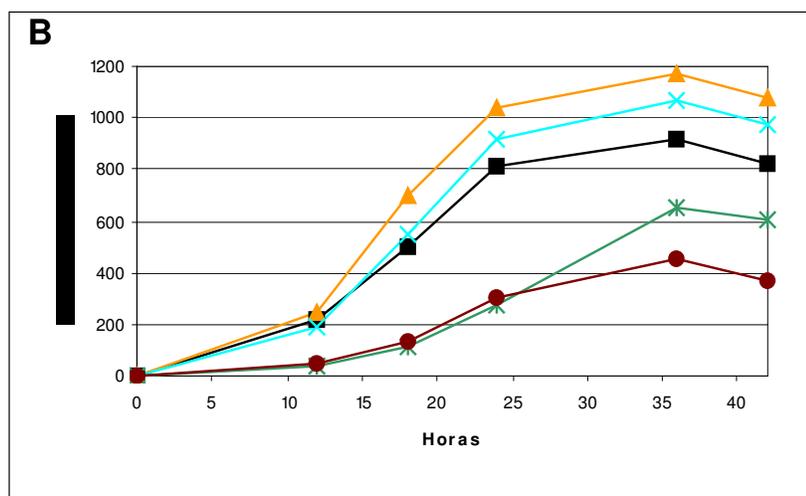
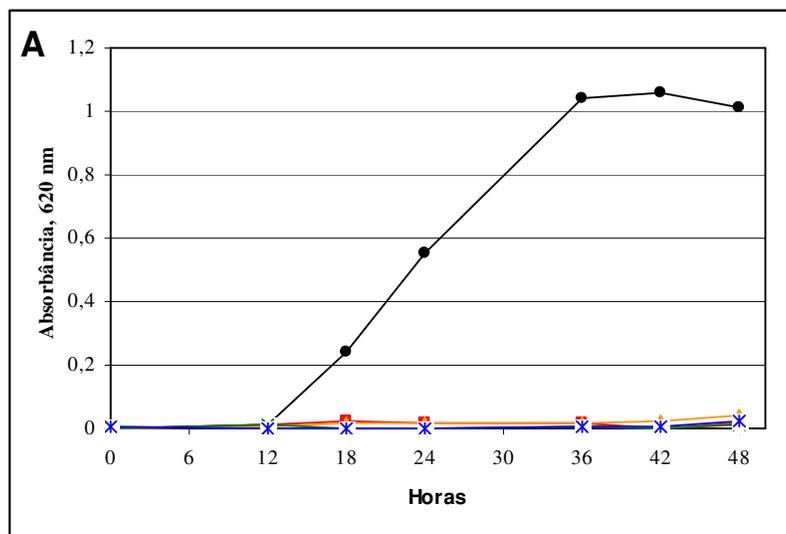


Figura 9 – Gráficos do crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, até 48 h na presença de frações contendo a LTP. **(A)** – Fração F1 da CM-Sepharose. (●) Controle; (■) 70 µg/mL do F1-CM; (▲) 35 µg/mL do F1-CM; (x) 18 µg/mL do F1-CM; (*) 9 µg/mL do F1-CM. **(B)** - Fração S3 e S4 da Sephacryl S-100. (■) Controle; (●) 12,5 µg/mL do S4 da Sephacryl; (*) 25 µg/mL do S4 da Sephacryl; (x) 12,5 µg/mL do S3 da Sephacryl; (▲) 25 µg/mL do S3 da Sephacryl.

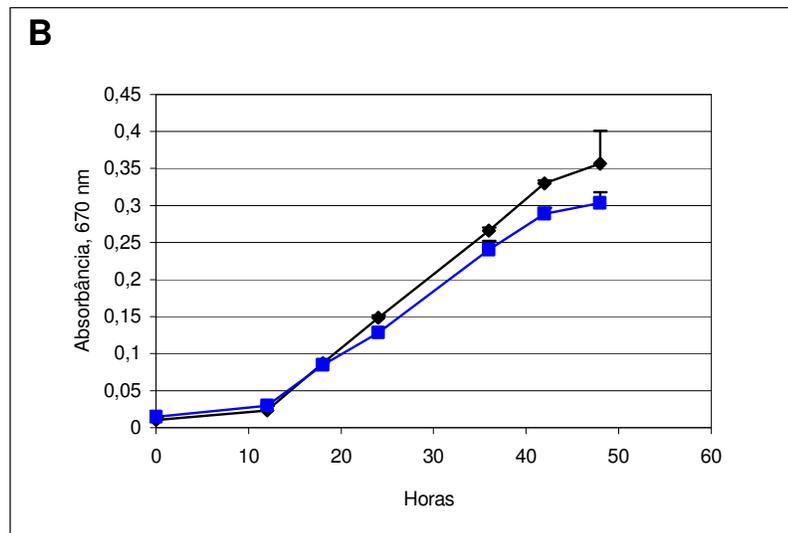
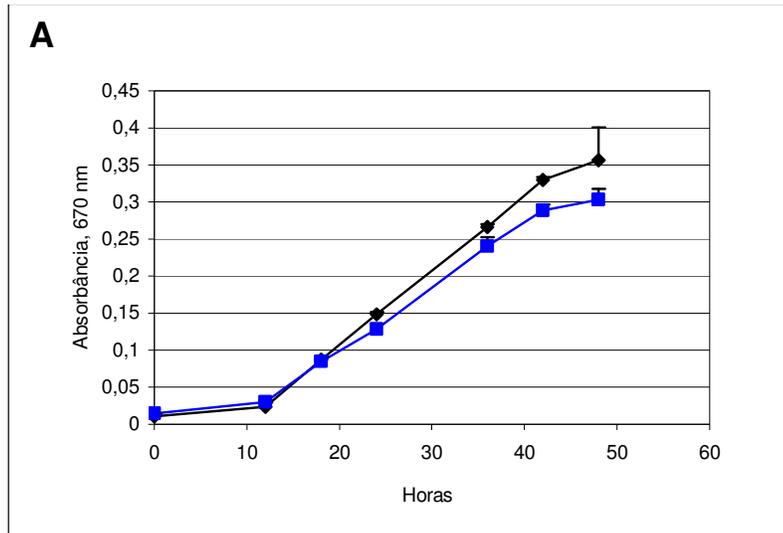


Figura 10 – Gráficos do crescimento de bactérias do gênero das *Xanthomonas* na presença da F1 da CM-Sepharose. **(A)** - Gráficos do crescimento da bactéria *Xanthomonas campestris* P3 (4135), até 60 h na presença da fração F1 da CM-sepharose. (—■—) Controle; (—▲—) 50 µg/mL da F1-CM. **(B)** - Gráfico do crescimento da bactéria *Xanthomonas axonopodis* P6 (157), até 60 h na presença da fração F1 da CM-sepharose. (—■—) Controle; (—▲—) 50 µg/mL da F1-CM.

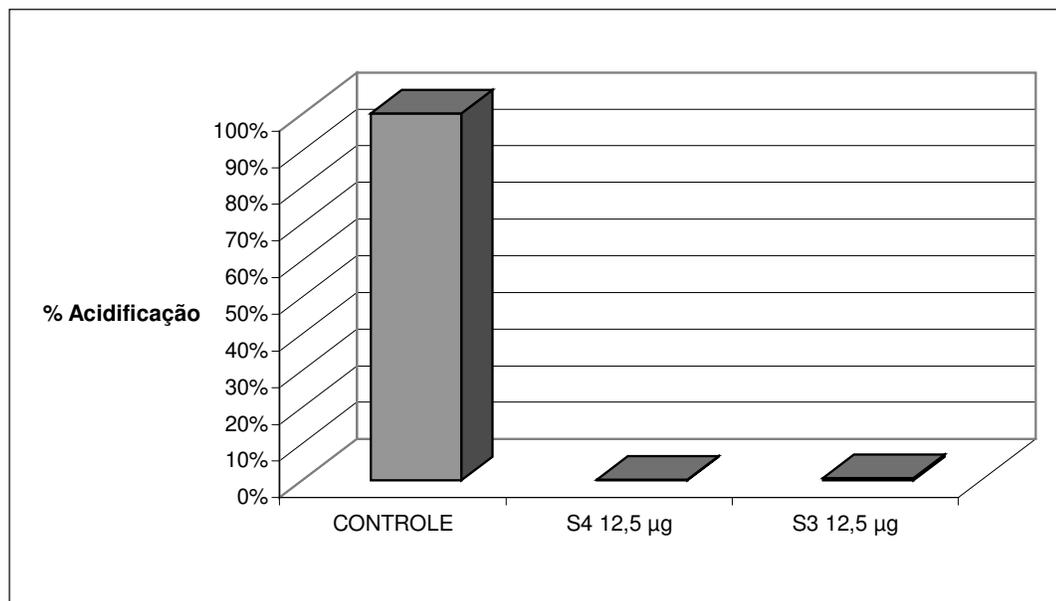


Figura 11 – Gráfico da % de acidificação do meio contendo células de levedura, *Saccharomyces cerevisiae*, na presença das frações da Sephacryl-S100: S3 e S4.

6. Discussão

6.1. Purificação e caracterização de uma proteína transportadora de lipídeos (LTP)

As LTPs são proteínas que possuem um caráter básico, com o ponto isoelétrico alto, variando entre 8 e 10, e pequeno tamanho, tendo massa molecular em torno de 9 kDa. Além dessas propriedades, as LTPs também possuem uma alta hidrofobicidade, conferida a esses peptídeos pela presença de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos em sua estrutura primária. São essas propriedades bioquímicas exibidas por esses peptídeos que ditam as melhores estratégias para sua purificação e caracterização. Em geral, esses peptídeos são purificados pelo uso de cromatografia de exclusão molecular, que separa os peptídeos de acordo com a massa molecular deles; por cromatografia de troca iônica, que separa os peptídeos de acordo com sua carga, agrupando peptídeos ácidos em uma fração e os básicos numa outra; e por último, uma cromatografia de fase reversa em HPLC, geralmente com uma resina que possua interação hidrofóbica, onde proteínas mais hidrofóbicas se ligam mais fortemente e um solvente orgânico é usado como eluente em um gradiente que vai aumentando, assim competindo com os peptídeos e os liberando de acordo com o grau de hidrofobicidade e conseqüente força de interação com a resina. Wang *et al.* (2004) e Liu *et al.* (2002) isolaram LTPs a partir de processos cromatográficos como descritos acima. Ambos fizeram uso de uma cromatografia de troca iônica, de uma exclusão molecular e ainda uso do sistema de HPLC para a finalização da purificação.

O presente trabalho é a continuidade de um trabalho prévio onde foi detectada, em sementes de pimenta, uma fração rica em peptídeos, a qual apresentou alta atividade antifúngica *in vitro* contra *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* e *Candida albicans*. Neste trabalho, objetivou-se então, isolar, caracterizar e melhor avaliar as atividades antimicrobianas das frações protéicas obtidas durante o processo de purificação e dos peptídeos isolados.

O processo de purificação foi feito a partir de um extrato de sementes de pimenta (*Capsicum annuum* UENF1381) em tampão fosfato de sódio pH 5,4, seguido de processo de precipitação com sulfato de amônio das proteínas, segundo metodologia descrita por Terras *et al.* (1993). Foi detectado desde o extrato rico em peptídeos, a presença de uma proteína entre 9 e 10 kDa, onde neste primeiro

momento acreditava-se tratar de uma LTP (figura 3A). Em seguida vários métodos cromatográficos, baseados na literatura, foram usados, a fim de garantir o isolamento desse peptídeo antimicrobiano.

Terras *et al.* (1993) e Osborn *et al.* (1995) já mostraram que as frações de proteínas básicas são as usadas para purificação de peptídeos, como a LTP. Baseado nessas literaturas foi usada uma cromatografia de troca-iônica (CM-Sepharose) (figura 1A). O pico F1 não retido, onde acreditava-se estarem presentes peptídeos com caráter básico como as LTPs e as defensinas, em decorrência do pH básico do tampão utilizado e conseqüente alteração do PI dos peptídeos da fração, que então não ficaram retidos na coluna, mas sim foram liberados, foi então submetido a outros métodos cromatográficos para a separação dos peptídeos contidos nesta fração. Fez-se então uso de uma cromatografia de exclusão molecular em Sephacryl™ S-100 ‘High Resolution’ que separa frações protéicas de baixa massa molecular. Nesta cromatografia foi fracionado o pico F1 da CM em 5 picos (figura 1B), sendo o S3 e o S4 os picos onde observamos a presença de peptídeos com massa molecular entre 7 e 9 kDa. Os picos separados na Sephacryl S-100 já apresentaram perfis bastante homogêneos (figura 3B), com a presença de frações mais puras, contendo o S3 um único peptídeo e o S4 apenas dois peptídeos.

De acordo com Regente *et al.* (2005) e Carvalho *et al.* (2001), entre outros já citados, após cromatografia de troca-iônica e exclusão molecular, fez-se uso do sistema de HPLC para a finalização da purificação. Os picos S3 e S4 foram cromatografados por uma coluna de fase reversa, a C2/C18 acoplada a um sistema de HPLC (figura 2A e 2B), que nos conduziu a um resultado satisfatório, com a purificação de uma proteína imunorelacionada a LTP e de outros peptídeos com massas moleculares abaixo de 8 kDa (figura 3C)

Ramirez-Medeles *et al.* (2003) também purificaram uma LTP de *Amaranthus hypocondriacus* e determinaram sua massa exata em 9748,29 Da, usando espectrometria de massas. Através dessa mesma técnica, a caracterização da proteína entre 9 e 10 kDa da fração F1 da CM-Sepharose de sementes de pimenta revelou uma massa molecular da proteína majoritária nesta fração de 9.461,42 Da, Esta massa está de acordo com as já descritas para algumas LTPs de plantas. Uma outra proteína dessa fração F1 mostrou uma massa de 4.721,93 Da.

Após purificação e determinação da massa da proteína em torno de 9 kDa, presente na fração F1 da CM-Sepharose, para a completa caracterização e

conclusão de que realmente estávamos diante de uma proteína transportadora de lipídeos, procedemos como Castro *et al.* (2003), fazendo um seqüenciamento aminoterminal da proteína de interesse por degradação de Edman. Como pode ser visto na figura 4, foi obtida uma seqüência de 15 resíduos de aminoácidos que quando alinhados em um banco de dados para seqüências proteicas mostrou homologia com LTPs de várias espécies de plantas, como espinafre, pêssego, *Arabidopsis* e milho. Resíduos de cisteína, glicina e valina, conservados nessa região aminoterminal da proteína, podem ser observados pela comparação da seqüência de interesse com outras seqüências de LTPs de plantas, que mantêm esses resíduos conservados nessas regiões como descrito por Carvalho e Gomes (2007). Com a estrutura primária e a massa molecular elucidadas podemos agora afirmar que temos a presença de uma LTP em sementes de pimenta e que este é um peptídeo classificado dentre as LTPs do tipo 1, devido a sua massa molecular entre 9 e 10 kDa (Jégou *et al.*, 2000)

6.2. Imunolocalização da LTP em sementes de pimenta

Carvalho *et al.* (2004) mostraram a localização de uma LTP compartimentalizada, presente dentro de vacúolos, no espaço extracelular e na parede celular de sementes de feijão-de-corda. Essa localização extracelular de LTPs de plantas já foi mostrada por outros grupos (Kader, 1996) e já é aceita, sendo indicativo de que algumas dessas proteínas não possuem um papel citoplasmático, sendo responsáveis por funções fisiológicas relacionadas à sua localização tais como: formação de cutícula e proteção contra patógenos, entre outras funções (Cammue *et al.*, 1995; Hollenbach *et al.*, 1997).

Em sementes de *Ricinus comunis* foi revelada uma localização atípica de uma LTP; esta se encontrava dentro de uma organela que foi caracterizada como glioxissomo. Estudos mostraram que essa LTP parecia aumentar a atividade da enzima acetil-CoA oxidase, indicando um envolvimento em processos de β -oxidação, possivelmente na regulação do estoque de lipídeos (Tsuboi *et al.*, 1992).

Através de ensaios de imunohistoquímica pudemos verificar a presença da LTP de pimenta no citoplasma das células do cotilédone, dentro de vesículas envoltas por membranas (figura 6). Estudos mais aprofundados, através de imunocitoquímica, isolamento das frações subcelulares de membranas da semente da pimenta e marcações específicas com anticorpos específicos de membrana de

organelas se fazem necessárias para determinação da natureza de tais vesículas. A partir desses estudos essas vesículas poderão ser então caracterizadas como corpos protéicos, organelas, vacúolos de reserva ou até mesmo como glioxissomos.

A partir da localização mais precisa encontrada dessa LTP e de outros estudos poderão então ser determinadas as funções dessa proteína dentro da célula.

6.3. Detecção da presença de LTP em diferentes espécies de *Capsicum* e nos órgãos das plântulas de *C. annuum* UENF-1381

Concomitante ao processo de purificação foram produzido anticorpos contra a LTP isolada. As proteínas usadas foram retiradas de géis de tricina segundo metodologia de Retamal *et al.* (1998). O anticorpo produzido foi então usado para detecção de proteínas homólogas a LTP em diferentes espécies de pimenta e no pimentão. Aparentemente o anticorpo produzido contra a LTP foi capaz de reconhecer essa proteína em outras espécies de pimenta e no pimentão (figura 7B). Isso provavelmente aconteceu porque se fez uso de espécies de pimenta diferentes, mas que fazem parte do mesmo gênero (*Capsicum*) e da mesma família. Guerbette *et al.* (1999) mostraram que o anticorpo que ele produziu era capaz de reconhecer LTPs de milho e de trigo, mostrando uma capacidade de reação cruzada. Mas nem sempre isso acontece. Anterior à produção do anticorpo contra LTP de pimenta neste trabalho, foi testada a eficiência do reconhecimento de um anticorpo contra LTP de feijão-de-corda (leguminosa) (Carvalho *et al.*, 2001) na detecção da LTP de pimenta (hortaliça) e não houve reconhecimento (resultados não mostrados), o que mostra que nem sempre se tem essa reação cruzada, quando usando-se anticorpos que tenham sido produzidos em outra espécie.

Ensaio para a detecção da presença da LTP em sementes de diversas espécies de *Capsicum* foram feitos (figura 7B). Foram usadas sementes de *C. annuum* híbrido, Ikeda, *C. baccatum*, *C. frutescens* e *C. chinense*. Em todos os extratos das sementes foi detectada a presença de uma LTP. Os extratos das diversas sementes apresentaram um perfil eletroforético similar como mostrado na figura 7A.

Carvalho *et al.* (2001) mostraram a presença de LTPs em diferentes sementes de leguminosas que apresentaram reação cruzada com um anticorpo produzido contra LTP de feijão-de-corda, além da presença da LTP em diferentes cultivares de feijão-de-corda testados. Esses achados sugerem que a presença dessa proteína em diferentes sementes de *Capsicum* demonstra que esta proteína faz parte do

mecanismo de defesa constitutivo das plantas desse gênero, por se mostrar conservada, indicando que ela é produzida durante o plano de desenvolvimento normal da planta para estar pronta a ser usada sobre condições de estresse.

Os peptídeos antimicrobianos, além de encontrados em sementes, também são encontrados em vários órgãos e tecidos das plantas (Yang *et al.*, 2006); entretanto, eles têm sido dificilmente detectados em folhas em condições normais (Garcia-Olmedo *et al.*, 2001). Diferentes níveis transcricionais de genes de LTPs têm sido mostrados em tecidos de plantas durante diferentes estágios de desenvolvimento e condições fisiológicas. Os genes das LTPs são responsivos a mudanças ambientais tais como: seca, salinidade, frio e também infecção com bactérias e patógenos fúngicos (Park *et al.*, 2002).

Neste trabalho relatamos à presença de vários peptídeos presentes em folha e hipocótilo das plântulas de pimenta (figura 8A). Nas raízes dessas plântulas, não foi possível visualizar a presença de bandas protéicas, quando visualizado o perfil eletroforético desse órgão, por gel de tricina. (figura 8A). Isto pode ter acontecido devido a fatores externos, como concentração das proteínas no extrato, bem como uso inadequado do tampão para extração, que pode ter sido eficiente na extração das proteínas de folha, mas que pode não ter a mesma eficiência para raízes.

Após analisarmos as bandas protéicas existentes nos órgãos dos extratos das plântulas de pimenta fizemos um ensaio de Western “blotting” para detecção de LTP nesses extratos e pudemos constatar que em nenhum dos órgãos das plântulas observou-se a presença desse peptídeo (figura 8B). É importante ressaltar que apesar de não detectarmos a presença de LTP nesses órgãos isso não significa que estes não estejam ali presentes. Estas proteínas podem estar sendo expressas em níveis muito baixos de forma que não puderam ser detectadas. As condições de extração também podem ser responsável pela não detecção; tampões com força iônica maior poderiam ser mais eficazes na extração de proteínas desses órgãos, evitando a interferência de pigmentos de clorofila ou de compostos fenólicos que estão em altos níveis nesses órgãos.

Carvalho *et al.* 2006 mostraram a presença de LTP em folhas de feijão-de-corda em vários tempos de desenvolvimento. Após várias tentativas de detecção dessa proteína em folhas sem sucesso, ensaios positivos de Northern blot levaram os pesquisadores a realizarem novos testes. O método de extração protéica usado para focalização isoeletrica possibilitou a detecção desta LTP nas folhas de plântulas e

também em folhas de plantas adultas. Alguns autores já mostraram a presença de LTP em folhas maduras de plantas (Pyee *et al.*, 1994). Liu *et al.* (2006) identificaram e caracterizam uma LTP em frutos de *C. chinense* em desenvolvimento e também observaram a presença dessa proteína em plântulas da mesma espécie.

6.4. Atividade antimicrobiana da LTP

As propriedades antimicrobianas das LTPs foram descritas em primeira mão por Terras *et al.* (1992) e Molina *et al.* (1993). Após esses trabalhos e confirmação de que algumas LTPs têm uma localização extracelular, essa função de proteção contra patógenos passou a ser mais explorada e algumas LTPs têm mostrado atividade antimicrobiana contra um número de microrganismos *in vitro*.

Recentemente uma proteína transportadora de lipídeo isolada de sementes de *Leonurus japonicus* Houtt mostrou uma atividade antimicrobiana moderada quando comparada a LTP de beterraba que apresenta um IC₅₀ de 2 a 4 µg. mL⁻¹ contra vários fungos, e equivalente às atividades de LTPs de cevada e espinafre que possuem IC₅₀ variando entre 20 e 100 µg. mL⁻¹. É importante ressaltar que quando comparadas as LTPs de sementes de milho e trigo, que não possuem atividade antimicrobiana, essa LTP de *L. japonicus* possui uma alta atividade. Essa LTP isolada apresentou atividade contra algumas bactérias e fungos (Yang *et al.*, 2006).

As frações cromatográficas enriquecidas com peptídeos foram testadas contra uma levedura modelo e contra bactérias de importância econômica para a cultura do *C. annuum*. Na figura 9A, 9B e 9C, mostramos a curva de crescimento da levedura *S. cerevisiae* na presença de frações obtidas ao longo do processo de purificação da LTP. Como observado na figura 9A a fração F1 onde é observada a presença de uma LTP (figura 8B) possui uma alta atividade inibitória contra *S. cerevisiae* com IC próximo a 100% com concentrações protéicas variando entre 70 e 4 µg. mL⁻¹ de proteína. A figura 9B mostra o perfil das frações da Sephacryl sobre o crescimento da levedura *S. cerevisiae*. Quando testadas as frações S3 e S4 pudemos observar que a fração que apresentava uma LTP, a fração S4, tinha atividade inibitória sobre o crescimento da levedura, enquanto a fração S3 que estava enriquecida com um peptídeo não caracterizado neste trabalho, não mostrou atividade inibitória. É notável que essa inibição não está mais acontecendo numa porcentagem de 100% que era a encontrada quando testada a fração F1 que apresentava 3 peptídeos majoritários (figura 3A). Esse fato pode ser explicado por um processo já bem

descrito, o sinergismo. O sinergismo tem sido visto em interações envolvendo diferentes peptídeos (Segura *et al.*; 1999). A interação sinérgica tem o potencial de amplificar a eficácia dos componentes isolados alcançando uma ampla especificidade de alvos pelas interações combinatórias (Veronese *et al.*, 2003), obtendo assim um efeito mais acentuado sobre o crescimento de vários patógenos. Por exemplo, a interação sinérgica entre tioninas de trigo e um peptídeo homólogo a LTP de cevada resultou em uma inibição de quase 100% para o fungo *Fusarium solani*, enquanto a LTP sozinha testada contra o mesmo fungo, teve um efeito inibitório menor que 10% (Molina *et al.*, 1993).

Quando utilizando patógenos bacterianos do gênero *Xanthomonas*, como mostrado nas figuras 10A e 10B, altas concentrações de 50 µg. mL⁻¹ da fração F1 foram usadas e não se obteve, com essas concentrações, um valor estimável de IC₅₀. Como descrito na literatura a atividade das LTPs depende do microrganismo testado; por exemplo, uma LTP de folhas de *Oryza sativa*, expressas em *Escherichia coli*, apresenta atividade contra o fungo *Pyricularia oryzae* a concentrações de 27 µg. mL⁻¹. Esta LTP também inibe a bactéria *Pseudomonas syringae*, nas mesmas concentrações, no entanto não apresenta atividade inibitória contra *Xanthomonas oryzae* (Ge *et al.*, 2003). Cammue *et al.* (1995) mostraram a capacidade de LTPs de cebola de inibir atividade de fungos e de bactérias Gram positivas e sua incapacidade de inibição de bactérias gram negativas como é o caso das *X. campestris* testadas neste trabalho.

Na figura 11 está representada a acidificação do meio, por células de levedura, estimuladas por glicose. Ambas as frações da Sephacryl-S100, S3 e S4, apresentaram uma alta porcentagem de inibição da acidificação do meio. Diz (2004) mostrou a eficiência da fração F1 da CM-Sepharose em inibir a acidificação do meio por células de levedura, estimulado por glicose. Em todas as concentrações testadas houve uma alta inibição da acidificação. De acordo com estudos usando o corante SYTOX green, Diz (2004) também mostrou que ocorria uma permeabilização da membrana das células de levedura, uma vez que esse corante se apresentou marcando o núcleo dessas células. De acordo com o resultado obtido podemos sugerir o mesmo mecanismo para as frações da Sephacryl, uma vez que elas são derivadas da fração F1 da CM. Entretanto é interessante correlacionar esse resultado da acidificação do meio com os resultados de inibição do crescimento da levedura *S. cerevisiae*, onde mostramos que a fração S4 causa inibição enquanto a

fração S3 não causa. Fica uma questão a ser esclarecida: como a fração S3 pode estar causando a inibição da acidificação do meio uma vez que o peptídeo presente nela não leva à morte da célula, não causa inibição do crescimento celular?

Estudos para obtenção de detalhes sobre a estrutura-atividade das LTPs se fazem necessários para esclarecimento do seu mecanismo de ação na sua provável função de proteção das plantas de pimenta. A identificação de quais peptídeos estão associados com o mecanismo de defesa em sementes é de grande importância para o estabelecimento de técnicas apropriadas para a manipulação e utilização desses peptídeos através de técnicas clássicas e de técnicas recentes de manipulação genética.

7. Conclusões

- Foram isoladas duas proteínas de baixa massa molecular denominadas S4H3 e S4H4 das sementes de pimenta com massa molecular entre 8 e 9 kDa.
- A massa molecular do peptídeo presente na fração F1 da CM-Sepharose de sementes de pimenta foi determinada através de espectrometria de massas, apresentando um valor de 9.461,41 Da.
- A seqüência de aminoácidos do peptídeo de 9.461,41 Da obtida apresentou homologia com proteínas transportadoras de lipídeos (LTPs) de diferentes espécies de plantas.
- A LTP foi imunolocalizada dentro de vesículas no citoplasma de células do cotilédone de sementes de pimenta.
- Proteínas imunorelacionadas a LTPs foram detectadas em sementes de diferentes espécies do gênero *Capsicum*, mas não nos órgãos de plântulas de *Capsicum annuum* UENF1381, de 15 e 45 dias após a germinação
- Frações ricas em peptídeos, contendo uma LTP (F1 e S4), foram capazes de inibir o crescimento da levedura *S. cerevisiae* em diferentes concentrações que variaram de 9 a 70 µg/mL.
- Não foi possível determinar, com as concentrações utilizadas de F1, um IC₅₀ sobre o crescimento das bactérias do gênero *Xanthomonas*. Observou-se apenas uma leve inibição do crescimento do fitopatógeno (*Xanthomonas axinopodis*).
- Frações ricas em peptídeos (S3 e S4) obtidas da Sephacryl S-100, foram capazes de inibir fortemente a acidificação do meio, estimulada por glicose, por células da levedura *S. cerevisiae* em diferentes concentrações.

8. Referências Bibliográficas

- Agrios, G. N., (1997). How plants defend themselves against pathogens. In: Plant Pathology. *Academic Press, Inc.* London, 93-114.
- Almeida, M.S., Cabral, K.M.S., Kurtenbach, E., Almeida, F.C.L. e 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.* 215:403-410.
- Arondel, V., Vergnolle, C., Cantrel, C. E Kader, J.C., (2000). Lipid transfer proteins are encoded by a small multigene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci.* 157:1-12.
- Bonas, U. e Lahaye, T., (2002). Plant disease resistance triggered by pathogen-derived molecules: refined models of specific recognition. *Curr. Op. Microbiol.* 5: 44-50.
- Bosland, P.W., (1996). *Capsicums: Innovative Uses of an Ancient Crop*. Arlington, VA: ASHS Press, p. 479-487.
- Bradford, M. M., (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of dye binding. *Biochemistry* 72: 248-254.
- Broekaert, W.F., Terras, F.R.G., Cammue, B.P.A. e Vanderleyden, J., (1990). An automated quantitative assay for fungal growth inhibition, *FEMS Microbiol.* 69:55-60.
- Broekaert, W.F., Marien, W., Terras, F.R.G., De Bolle, M.F.V., Proost, P., Van Damme, J., Dillen, L., Claley, M., Ress, S.B., Vanderleyden, A., Cammue, B.P.A., (1992). Antimicrobial peptides from *Amaranthus caudatus* seeds with sequence homology to the cysteine/glycine-rich domain of chitin-binding proteins. *Biochemistry* 31:4308-4314.
- Broekaert, W. F., Cammue, B. P. A., De Bolle, M. F. C., Thevissen, K., De Samblanx, G. e Osborn, R. W., (1997). Antimicrobial peptides from plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 16 (3): 297-323.
- Buhot, N., Douliz, J.P., Jacquemard, A., Marion, D., Tran, V., Maume, B.F., Milat, M-L., Ponchet, M., Mikes, V., Kader, J-C., Blein., J-P., (2001). A lipid transfer protein binds to a receptor involved in the control of plant defence responses. *FEBS Lett.* 309:27-30.
- Caaveiro, J.M., Molina, A., Gonzalez-Manas, J.M., Rodriguez-Palenzuela, P., Garcia-Olmedo, F., Göni, F.M., (1997). Differential effects of five types antipathogenic plant peptides on model membranes. *FEBS Lett.* 410: 338-342.

- Cammue, B. P. A., DeBoll, M. F. C., Terras, F. R. G., Proost, P., Vandamme, J., Rees, S. B., Vanderlevden, J. e Broekaert, W. F., (1992). Isolation and characterization of a novel class of plant antimicrobial peptides from *Mirabilis jalapa* L. seeds. *J. Biol. Chem.* 267: 2228 – 2233.
- Cammue, B.P.A., Thevissen, K., Hendriks, M., Eggermont, K., Goderis, I.J., Proost, P., *et al.*, (1995). A potent antimicrobial protein from onion seeds showing sequence homology to plant lipid transfer proteins. *Plant Physiol.* 109:445-455.
- Carlini, C. R. e Grossi-de-Sá, M. F., (2002). Plant toxic proteins with insecticidal properties. Review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon* 40:1515-1539.
- Carvalho, A. O., Machado, O.L. T., Da Cunha, M., Santos, I. S. e Gomes, V. M., (2001). Antimicrobial peptides and immunolocalization of a LTP in *Vigna unguiculata* seeds. *Plant Physiol. Biochem.* 39: 137-146.
- Carvalho, A.O., Teodoro, C.E.S., Da Cunha, M., Okorokova-Façanha, A.L., Okorokov, L.A., Fernandes, K.V.S., *et al.*, (2004). Intracellular localization of a lipid transfer protein in *Vigna unguiculata* seeds. *Physiol Plantarum*;122:328-36.
- Carvalho, A.O., Souza-Filho, G.A., Ferreira, B.S., Branco, A.T., Araújo, I.S., Fernandes, K.V.S., Retamal, C.A., Gomes, V.M., (2006). Cloning and characterization of a cowpea seed lipid transfer protein cDNA: expression analysis during seed development and under fungal and cold stresses in seedlings' tissues. *Plant Physiol. Biochem.* 44:732-742.
- Carvalho, A.O. e Gomes, V.M., (2007). In the role of plant lipid transfer proteins in plant physiology – a concise review. *Peptides*. In Press.
- Castro, M. S., Gerhardt, I. R., Orru, S., Pucci, P.e Bloch Jr, C., (2003). Purification and characterization of a small (7.3 kDa) putative lipid transfer protein from maize seeds. *J. Chromatogr.*794:109–114.
- Castro, M.S. e Fontes, W., (2005). Plant defense and antimicrobial peptides. *Prot. Pept. Lett.*12:11-16.
- Cheng, C-S., Samuel, D., Liu, Y-J., Shyu, J-C., Lai, S-M., Lin, K-F. E Lyu, P-C., (2004). Binding mechanism of nonspecific lipid transfer proteins and their role in plant defense. *Biochemistry* 43:13628-13636.
- Cohn, J., Sessa, G. e Martin, G. B., (2001). Innate immunity in plants. *Curr. Op. Immunol.* 13:55-62.
- De Bolle, M.F.C., Osborn, R.W., Goderis, I.J., Noe, L., Acland, D., Hart, C.A., Torrenkens, S., Vam Leuven, F. e Broekaert, W.F., (1996). Antimicrobial peptides from *Marabalis jalapa* and *Amaranthus caudatus*: expression, processing, localization and biological activity in transgenic tobacco. *Plant Mol. Biol.* 31:993-1008.

- Diz, M.S.S., (2004). Isolamento e caracterização de peptídeos antimicrobianos presentes em sementes de pimenta (*Capsicum annuum L.*). Monografia apresentada para obtenção do grau de bacharel. Universidade Estadual do Norte fluminense. Campos dos Goytacazes-RJ.
- Douliez, J.P., Michon, T., Elmorjani, K. e Marion D., (2000). Structure, biological and technological functions of lipid transfer proteins and indolines, the major lipid binding proteins from cereal kernels. *J. Cereal Sci.* 32:1-20.
- Edman, P., (1950). Method for determination of amino acid sequences in peptides. *Acta Chem. Scand.* 28: 283-293.
- Fant, F., Vranken, W., Broekaert, W., Borremans, F., (1998). Determination of the three-dimensional solution structure of *Raphanus sativus* antifungal protein by H NMR. *J. Molec. Biol.* 279:257-270.
- Feys, B. J. e Parker, J. E., (2000). Interplay of signaling pathways in Plant disease resistance. *Trends Genet.* 16(10):449-455.
- Gao, G.H., Liu, W., Daí, J.X., Wang, J.F., Hu, Z., Zhang, Y., Wang, D.C., (2001). Solution structure of PAFP-S: A new knottin-type antifungal peptide from the seeds of *Phytolacca americana*. *Biochemistry* 40(37):10973-10978.
- Garcia-Olmedo, F., López-Fando, J.J., Castagnaro, A., Molina, A., Hernández-Lucas, C., Carbonero, P., (1992). In: Genes involved in plant defense (Boller, T. e Meins, F., Eds.), pp. 283-302, Springer-Verlag, Vienna.
- García-Olmedo, F., Molin, F., Segura, A. e Moreno, M., (1995). The defensive role of nonspecific lipid-transfer proteins in plants. *Trends Microbiol.* 3(2):72-74.
- Garcia-Olmedo, F., Palenzuela, R.P. e Molina, A., (2001). Antibiotic activities, hydrogen peroxide and peroxynitrite in plant defense. *FEBS Lett.* 498:219-222.
- Ge, X., Chen, J., Li, N., Lin, Y., Sun, C. e Cao, K., (2003). Resistance function of rice lipid transfer protein LTP110. *J. Biochem. Mol. Biol.* 36:603-607.
- Gomes, V.M., Okorokov, L.A., Rose, T.L., Fernandes, K.V.S., Xavier-Filho, J., (1998). Legume vicilins (7S storage globulins) inhibit yeast growth and glucose stimulated acidification of the medium by yeast cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1379 (2): 207-216.
- Gonorazky, A.G., Regente, M.C., de la Canal, L., (2005). Stress induction and antimicrobial properties of a lipid transfer protein in germinating sunflower seeds. *J. Plant Physiol.* 162:618-624.
- Granier, F., (1988). Extraction of proteins for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 9:712-718.

- Greenberg, J. T., (1997). Programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Annu. Rev. Physiol. Plant Mol. Biol.* 48:525-545.
- Guerbette, F., Grosbois, M., Jolliot-Croquin, A., Kader, J. C. e Zachowski, A., (1999). Comparison of lipid and transfer properties of two lipid transfer proteins from plants. *Biochemistry* 38:14131-14137.
- Hallahan, D.L., (2000). Monoterpenoid biosynthesis in glandular trichomes of labiate plants. *Adv. Bot. Res.* 31:77-120.
- Han, G. W., Lee, J. Y., Song, H. K., Min, C. C. K., Moon, J., Shin, D. H., Kopka, M. L., Sawaya, M. R., Yuan, H. S., Kim, T. D., Choe, J., Lim, D., Moom, H. J., Suh, S. W., (2001). Structural basis of non-specific lipid binding in maize lipid-transfer protein complexes revealed by high-resolution X-ray crystallography. *J. Mol. Biol.* 308, 263-278.
- Heiser Jr., C. B., (1976). Peppers. *Capsicum* (Solanaceae). In: Evolution of Crop Plants. *Simmonds, N. W. (Ed.) Longman Scientific e Technical.* p. 265-268.
- Hollenbach, B., Schreiber, L., Hartung, W. e Dietz, K-J., (1997). Cadmium leads to stimulated expression of the lipid transfer protein genes in barley: implications for the involvement of lipid transfer proteins in wax assembly. *Planta* 203:9-19.
- Hong, J-K., Jung, H-W., Kim, Y-J.e Hwang, B-K., (2000). Pepper gene encoding a basic class II chitinase is inducible by pathogen and ethephon. *Plant Sci.* 159:39-49. Houlne, G., Meyer, B. e Schantz, R., (1998). Alteration of the expression of a plant defensin gene by exon shuffling in bell pepper (*Capsicum annuum* L.). *Mol. general genet.* 259(5):504-510.
- Hummelbrunner, L.A., e Isman, M.B., (2001). Acute, sublethal, antifeedant, and synergistic effects of monoterpenoid essential oil compounds on the tobacco cutworm, *Spodoptera litura* (Lep., Noctuidae). *J. Agric. Food Chem.* 49:715-720.
- Jégou, S., Douliez, J.P., Mollé, D., Boivin, P. e Marion, D., (2000). Purification and structural characterization of LTP1 polypeptides from Beer. *J. Agric. Food Chem.* 48:5023-5029.
- Jung, H.W., Kim, W., Hwang, B.K., (2003). Three pathogen-inducible genes encoding lipid transfer protein from pepper are differentially activated by pathogens, abiotic, and environmental stresses. *Plant Cell Environm.* 26(6):915-928.
- Jung, H.W., Kim, W., Hwang, B.K., (2005). Identification of pathogen-responsive regions in the promoter of a pepper lipid transfer protein gene (*CALTP1*) and the enhanced resistance of the *CALTP1* transgenic *Arabidopsis* against pathogen and environmental stresses. *Planta* 221:361-373.
- Kader, J.C., Juliene, M. e Vergnolle, C., (1984). Purification and characterization of a spinach leaf protein capable of transferring phospholipids from liposomes to mitochondria or chloroplasts. *Eur. J. Biochem.* 139:411-416.

- Kader, J. C., (1996). Lipid-transfer proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47:627-654.
- Larsen, K.L. e Winther, J.R., (2001). Surprisingly high stability of barley lipid transfer protein, LTP1, towards denaturant, heat, and proteases. *FEBS Lett.* 488:145-148.
- Lee, S. C., Hong, J. K., Kim, Y. J., Hwang, B. K., (2000). Pepper gene encoding thionin is differentially induced by pathogens, ethylene and methyl jasmonate. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 56:207-216.
- Lee, Y-M., Wee, H-S., Ahn, I-P., Lee, Y-H. e An, C-S., (2004). Molecular characterization of a cDNA for a cysteine-rich antifungal protein from *Capsicum annuum*. *J. Plant Biol.* 47(4):375-382.
- Liu, k., Jiang, H., Moore, S.L., Watkins, C.B. e Jahn, M.M., (2006). Isolation and characterization of a lipid transfer protein expressed in ripening fruit of *Capsicum chinense*. *Planta* 223:672-683.
- Liu, Y-J., Samuel, D., Lin, C-H. E Lyu, P-C., (2002). Purification and characterization of a novel 7-kDa non-specific lipid transfer protein-2 from rice (*Oryza sativa*). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 294:535-540.
- Lopes, C.A. e Quezado-Soares, A.M., (1997). Doenças bacterianas das hortaliças. Brasília: DF. EMBRAPA, 70p.
- Madden, L.V. e Wheelis, M., (2003). The threat of plant pathogens as weapons against U.S. crops. *Annu. Rev. Phytopathol* 41:155-176.
- Maldonado, A.M., Doerner, P., Dixon, R.A., Lamb, C.J. e Cameron, R.K., (2002). A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signaling in Arabidopsis. *Nature* 419:399-403.
- Maor, R. e Shirasu, K., (2005). The arms race continues: battle strategies between plants and fungal pathogens. *Curr. Op. Microbiol.* 8:399-404.
- Molina, A., Segura, A. e García-Olmedo, F., (1993). Lipid transfer protein (ns LTP) from barley and maize leaves are potent inhibitors of bacterial and fungal pathogens. *FEBS Lett.* 316(2):119-122.
- Molina, A. e Garcia-Olmedo, F., (1997). Enhanced tolerance to bacterial pathogens caused by the transgenic expression of barley lipid transfer protein LTP2. *Plant J.* 12(3) 669-675.
- Molina-Torres, J., Garcia-Chávez, A. e Ramírez-Chávez, E., (1999). Antimicrobial properties of alkaloid present in flavouring plants traditionally used in Mesoamerica: affinin and capsaicin. *J. Ethnopharm.* 64:241-248.

- Morrissey, J.H., (1998). Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Anal. Biochem.* 117:307-310.
- Nakajima, Y., Ishibashi, J., Yukuhiro, F., Asaoka, A., Taylon, D., Yamakawa, M., (2003). Antibacterial activity and mechanism of action of tick defensin against gram positive bacteria. *Biochem. Biophys. Acta* 1624:125-130.
- Osborn, R.W., De Samblanx, G.W., Thevissen, K., Goderis, I., Torrekens, S., Van Leuven, F.V., (1995). Isolation and characterization of plant defensins from seeds of Asteraceae, Hippocastanaceae and Saxifragaceae. *FEBS Lett.* 368:257-262.
- Osborn, A., (1996). Saponins and plant defence a soap story. *Trends Plant Sci.* 1(1):4-9.
- Park, C. H., Shin, R., Park, J.M., Lee, G-J., You J-S., Paek, K-H., (2002). Induction of pepper cDNA encoding a lipid transfer protein during the resistance response to tobacco mosaic virus. *Plant Mol. Biol.* 48:243-254.
- Pelegri, P.B. e Franco, O.L., (2005). Plant γ -thionins: Novel insights on the mechanism of action of a multi-functional class of defense proteins. *Intern. J. Biochem. Cell Biol.* 57:2239-2253.
- Powers, J-P.S. e Hancock, R.E.W., (2003). The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides* 24:1681-1691.
- Pyee, J., Yu, H. e Kolattukudy, P.E.,(1994). Identification of a lipid transfer protein as the major protein in the surface wax of broccoli (*Brassica oleracea*) leaves. *Arch. Biochem. Biophys.* 311:460-468.
- Ramirez-Medeles, M.D.C., Aguilar, M. B., Miguel, R. N., Bolaños-Garcia, V. M., Garcia-Hernandez, E., Soriano-Garcia, M., (2003). Amino acid sequence, biochemical characterization, and comparative modeling of a nonspecific lipid transfer protein from *Amaranthus hypochondriacus*. *Arch. Biochem. Biophys.* 415:24–33.
- Reddy, K.V.R., Yedery, R.D. e Aranha, C., (2004). Antimicrobial peptides: premises and promises. *Inter. J. Antimicrob. Agents* 24:536-547.
- Regente, M.C., Giudici, A.M., Villalain, J. e la Canal, L., (2005). The cytotoxic properties of a plant lipid transfer protein involve membrane permeabilization of target cells. *Lett. Appl. Microbiol.* 40: 183-189.
- Reifschneider, F.J.B. (Org.) (2000). *Capsicum*. Pimentas e pimentões no Brasil. Brasília, DF: EMBRAPA. 113p.
- Reifschneider, F.J.B. e Lopes, C.A., (1998). Melhoramento genético para resistência a doenças de plantas. *Rev. Anual Patol. Planta Rio Grande do Sul* 6: 329 – 366.

- Reignault, P. e Sancholle, M., (2005). Plant-Pathogen interactions: will the understanding of common mechanisms lead to the unification of concepts? *C. R. Biologies* 328:821-833.
- Retamal, C.A., Theibauld, P. e Alves, E. W., (1998). Protein purification from polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166: 368-379.
- Rodrigues Neto, J.; Malavolta Jr., V.A., Victor, O. (1986) Meio simples para isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* tipo B. *Summa Phytopathologica*, 12 (1/2): 16.
- Rosegrant, M.C., Paisner, M.S., Meijer, S. e Witcover, J., (2001) Projections of global food supply and demand and child malnutrition. In *Global Food Projections to 2020. Emerging Trends and Alternative Futures*. Washington, DC: IFPRI 58-81p.
- Sahin, F. e Miller, S.A., (1998). Resistance in *Capsicum pubescens* to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* pepper race 6. *Plant Disease* 82(7):794-799.
- Samuel, D., Liu, Y-J., Cheng, C-S. e Lyu, P-C., (2002). Solution structure of plant non-specific lipid transfer protein-2 from rice (*Oryza sativa*). *J. Biol. Chem.* 277(38):35267–35273.
- Schagger, H. e Von Jagow, G., (1987). Tricine-sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem*, 166: 368-379.
- Segura, A., Moreno, M., Madueno, F., Molina, A. e Garcia-Olmedo, F., (1999). Snakin-1, a peptide from potato that is active against plant pathogens. *Mol.Plant Microbe Interact* 12:16-23.
- Shewry, P. R. e Lucas, J. A., (1997). Plant proteins that confer resistance to pest and pathogens. *Adv. Bot. Res.*, 26:135-192.
- Shin, R., Lee, G-J., Park, C-J., KimT-Y., You, J-S., Nam, Y-W. e Paek, K-H., (2001). Isolation of pepper mRNAs differentially expressed during the hypersensitive response to tobacco mosaic virus and characterization of a proteinase inhibitor gene. *Plant Sci.* 161:727-737.
- Sugita, T., Yamaguchi, K., Kinoshita, T., Yuji, K., Sugimara, Y., Nagata, R., Kawasaki, S. e Todoroki, A., (2006). QTL analysis for resistance to Phytophthora blight (*Phytophthora capsici* Leon) using an intraspecific doubled-haploid population of *Capsicum annum*. *Breed. Sci.* 56:137-145.
- Terras, F. R. G., Schoofs, H. M. E., De Bolle, M. F. C., Van Leuven, F., Ress, S. B., Vanderleyden, J., Cammue, B. P. A. e 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.

- Terras, F. R. G., Torrekens, S., van Leuven, F., Osborn, R. W., Vandeleyden, J., Cammue, B. P. A. e Broekaert, W. F., (1993). A new family of basic cysteine-rich plant antifungal proteins from Brassicaceae species. *FEBS Letters*, 316(3):233-240.
- Thevissen, K., Terras, F. R. G., Broekaert, W. F., (1999). Permeabilization of fungal membranes by plant defensins inhibits fungal growth. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 5451-5458.
- Thoma, S., Hecht, U., Kippers, A., Botella, J., De Vries, S. E Somerville, C., (1994). Tissue-specific expression of a gene encoding a cell wall-localized lipid transfer protein from *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 105:35-45.
- Thomma, B.P.H.J.; Cammue, B.P.A.; Thevissen, K., (2002). Plant defensins. *Planta* 216, 193-202.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl.Acad. Sci. USA* 76(6): 4350-4354.
- Trabi, M. e Craik, D.J., (2002). Circular proteins no end insight. *Trends Biochem. Sci.* 27(3):132-138.
- Tsuboi S., Osafune T., Tsugeki R., Nishimura M. e Yamada M., (1992). Nonspecific lipid transfer protein in castor bean cotyledons cells: subcellular localization and a possible role in lipid metabolism. *J. Biochem.*111:500-508.
- Veronese, P., Ruiz, M.T., Coca, M.A., Hernandez-Lopes, A., Lee, H., Ibeas, J.I., Damsz, B., Pardo, J.M., Hasegawa, P.M., Bressan, R.A. e Narasimhanm, M.L., (2003). In defense against pathogens. Boyh plant sentinels and foot soldiers need know the enemy. *Plant Physiol.*, 131:1580-1590.
- Viñals, F.N.; Ortega, R.G. e Garcia, J.C., (1996). El cultivo de pimientos, chiles yajies. Madrid: Mundi-Prensa, 607p.
- Wang, X., Bunkers, G.J., Walters, M.R. e Thoma, R.S., (2001). Purification and characterization of three antifungal proteins from cheeseweed (*Malva passiflora*). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 282:1224-1228.
- Wang, S.Y., Wu, J.H., Ng, T.B., Ye, X.Y., Rao, R.F., (2004). A non-specific lipid transfer protein with antifungal and antibacterial activities from mung bean. *Peptides* 25:1235-1242.
- Wittstock, U. e Gershenzon, J., (2002). Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. *Curr. Op. Plant Pathol.* 5:1-8.
- Yang, X., Li, J., Li, X. e Pei, Y., (2006). Isolation and characterization of a novel thermostable non-specific lipid transfer protein-like antimicrobial protein from motherwort (*Leonurus japonicus* Houltt) seeds. *Peptides* 27:3122-3128.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)