

**Caracterização de albuminas 2S de
Ricinus communis L. como inibidores de
 α -amilase e relação estrutura-atividade
de suas principais isoformas, Ric c 1 e
Ric c 3**

VIVIANE VEIGA DO NASCIMENTO

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

Campos dos Goytacazes, RJ

Março - 2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

**Caracterização de albuminas 2S de *Ricinus communis* L.
como inibidores de α -amilase e relação estrutura-atividade
de suas principais isoformas, Ric c 1 e Ric c 3**

VIVIANE VEIGA DO NASCIMENTO

**Tese de doutorado apresentada ao Centro de
Biotecnologia e Biotecnologia da Universidade Estadual
do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das
exigências para obtenção de grau de Doutor em
Biotecnologia.**

Campos dos Goytacazes, RJ

Março – 2009

**Caracterização de albuminas 2S de *Ricinus communis* L
como inibidores de α -amilase e relação estrutura-atividade
de suas principais isoformas, Ric c 1 e Ric c 3**

VIVIANE VEIGA DO NASCIMENTO

**Tese de doutorado apresentada no Centro de Biociências e Biotecnologia
da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro para obtenção do
Grau de doutor em Biociências.**

Aprovado em 23/03/09

Comissão examinadora:

Prof. Carlos Mauricio Rabello de Sant'Anna – UFRRJ

Prof^a. Elias Walter Alves – UENF

Prof^a. Valdirene Moreira Gomes – UENF

Prof^a. Olga Lima Tavares Machado - UENF (Orientadora)

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos- LQFPP, no Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, sob a orientação da Dra. Olga Lima Tavares Machado.

Financiamento: CNPq, TECNORTE/FENORTE, FAPERJ

Nascimento, Viviane Veiga do

Campos dos Goytacazes, RJ

Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos, Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), 2009.

Tese de doutorado em Biociências e Biotecnologia

Palavras chave:

- 1 - *Ricinus communis*
- 2 - Inibidor
- 3 - α -amilase
- 4 - Modelagem molecular
- 5 - Estrutura tridimensional
- 6 - Epitopos
- 7 - Alergia

*Aos meus pais Anézio e Adinéa,
aos meus irmãos Júnior e Tiago,
e aos meus avós, Nilson e Izaltina
("in memorium"), dedico.*

AGRADECIMENTOS:

- A Deus, por seu infinito amor, por me sustentar nos momentos de dor, por sua paz que excede todo entendimento e por sua alegria que enche o meu ser. Te agradeço, te agradeço, te agradeço;
- Aos meus pais, Anézio e Adinéa, por seu amor, compreensão, dedicação, por estarem sempre ao meu lado me dando forças para continuar e por seus valiosos ensinamentos. “Quando crescer quero ser igual a vocês;”
- À Dr^a Olga Lima Tavares Machado. Não tenho palavras para agradecer tudo que aprendi nestes anos, mas não posso deixar de ressaltar o carinho, a amizade, a sólida formação científica e sua forma bonita e tranqüila de ver a vida e as pessoas. Obrigada por tudo, vou te admirar sempre;
- À Dr^a Helena Carla Castro, pelos ensinamentos na parte de modelagem e por revisar a tese;
- Aos professores Valdirene Moreira Gomes, Elias Walter Alves e Carlos Mauricio Rabello de Sant'Anna, por aceitarem participar da banca examinadora;
- Aos Professores do LQFPP Elenir Antônia Amâncio de Oliveira, Kátia Valevisk Fernandes, Marílvia Dansa Petretski, Carlos Jorge Logullo, Jorge Hernandez Fernandez pelos ensinamentos;
- Ao Professor Jorge Hernandez Fernandez pela colaboração na parte de dinâmica molecular;
- À Paula Alvarez Abreu pela ajuda na parte de modelagem molecular;
- Aos companheiros de setor Alexandra (você vai ser sempre do setor), Natália, Karol, Fábio, Thiago e Mariana pela amizade, pelo companheirismo;
- À Jucélia, amiga e comadre por todo carinho e apoio;
- Ao Keysson, o eterno IC estrela, pelo carinho, companheirismo e pelas risadas;
- Ao Hélio e ao Iuri, pelo carinho e paciência. Aprendi muito ensinando vocês;
- À Cristiane e João Bosco, pelo carinho e amizade;
- Ao meu irmão Tiago pelo apoio, carinho e por sempre torcer e acreditar em mim;
- Aos meus sobrinhos Anna Clara e Pedro Henrique, por tanto carinho apesar da minha ausência. Amo vocês;
- Ao meu irmão Júnior e minha cunhada Cheila, pelo carinho e amizade;

- Às minhas primas Elaine e Eliane pelo carinho, pela amizade, pelo apoio, vocês são muito importantes para mim;
- Às minhas tias Line e Nice, pelo carinho e pelas orações;
- Aos pequeninos, Davi, Rebeca e João Marcos, crianças lindas que sempre me faziam sorrir;
- Aos funcionários do LQFPP Cristóvão, Dilza e Sheila, pelo carinho e ajuda;
- À Dona Isabela pelo carinho, amizade, as comidas gostosas e pelo café fresquinho que sempre me ajudava a acordar;
- Aos amigos do Cederj pelo carinho e incentivo, aprendi muito com vocês;
- Ao Pedro amigo de todas as horas;
- À Cassiana pela amizade, carinho, as viagens e as risadas;
- À Adriana Ferreira Uchôa, pela amizade e carinho mesmo a distância;
- À Carla Cristina pelo carinho, amizade e as longas conversas;

Meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO:

| | |
|---|------|
| LISTA DE FIGURAS | iv |
| LISTA DE TABELAS | xi |
| LISTA DE ABREVIATURAS | xii |
| RESUMO | xiii |
| ABSTRACT | xv |
| 1 – INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1.1 - A mamoneira, uma planta com potencial biotecnológico | 1 |
| 1.2 - Defesa de plantas contra pestes e patógenos | 4 |
| 1.2.1 - Defesas constitutivas: o desencadeamento da alergia por alérgenos de origem vegetal | 5 |
| 1.2.1.1 - O processo de alergia | 5 |
| 1.2.1.2 - Alérgenos de origem vegetal: as albuminas 2S da superfamília das prolaminas..... | 7 |
| 1.2.2 - Alvos e moléculas com potencial para o controle de patógenos e insetos na agricultura: as α -Amilases e seus inibidores | 11 |
| 1.2.2.1 - As α -Amilases | 11 |
| 1.2.2.2 - Os inibidores de α -amilase | 16 |
| 1.2.2.2.1 - Similares a Lectina | 17 |
| 1.2.2.2.2 - Similar a “Knottin” | 17 |
| 1.2.2.2.3 - Proteínas tipo cereal | 18 |
| 1.2.2.2.4 - Inibidores tipo Kunitz | 19 |
| 1.2.2.2.5 - Similar às γ -purotioninas | 20 |
| 1.2.2.2.6 - Similar a Taumatina | 20 |
| 1.2.2.2.7 - Inibidores de <i>Streptomyces</i> | 21 |
| 1.2.2.3 - Complexo α -amilase-inibidor | 21 |
| 1.2.3 - A Modelagem Molecular para o estudo estrutural de proteínas alergênicas | 24 |
| 2 – OBJETIVOS | 27 |
| 2.1 - Objetivo geral | 27 |
| 2.2 - Objetivos específicos | 27 |
| 3 – METODOLOGIA | 28 |

| | |
|---|----|
| 3.1 - Sementes | 28 |
| 3.2 - Insetos | 28 |
| 3.3 - Extração de proteínas das sementes de <i>Ricinus communis</i> | 28 |
| 3.4 - Separação das proteínas por filtração em gel | 29 |
| 3.5 - Isolamento das albuminas 2S, Ric c 1 e Ric c 3, por cromatografia de fase reversa em sistema HPLC | 29 |
| 3.6 - Determinação da inibição da atividade da α -amilase | 30 |
| 3.6.1 - Obtenção das α -amilase | 30 |
| 3.6.2 - Ensaio de inibição da atividade da α -amilase salivar e dos insetos <i>T. molitor</i> , <i>Z. subfasciatus</i> e <i>C. maculatus</i> | 30 |
| 3.6.3 – Gel de atividade para determinação da inibição da atividade da α -amilase salivar e dos insetos <i>C. maculatus</i> e <i>Z. subfasciatus</i> | 31 |
| 3.6.4 – Ensaio “in vivo” com sementes artificiais | 31 |
| 3.7 - Estudo estrutural das albuminas 2S de <i>Ricinus communis</i> | 32 |
| 3.7.1 – Determinação de estrutura secundária das isoformas de albuminas 2S, Ric c 1 e Ric c 3 | 32 |
| 3.7.2 – Estudos de modelagem por homologia | 32 |
| 3.7.2.1 – Alinhamento de estrutura primária e predição de estrutura secundária | 32 |
| 3.7.2.2 – Modelagem por homologia de Ric c 1 e processamento de Ric c 3 | 33 |
| 3.7.2.3 – Modelagem dos complexos entre Ric c 1 e TMA, e Ric c 3 e TMA | 34 |
| 3.7.2.4 – Construção de epitopos alergênicos de Ric c 1 e Ric c 3 | 35 |
| 3.7.2.5 – Estudos de desativação teórica dos epitopos alergênicos de Ric c 1 e Ric c 3..... | 35 |
| 3.7.2.6 – Construção dos complexos entre Ric c 1 e Ric c 3 mutadas e TMA | 35 |
| 3.7.3 – Estudos de simulação de dinâmica molecular em Ric c 1 e Ric c 3 | 36 |
| 4 – Resultados | 37 |

| | |
|--|----|
| 4.1 - Isolamento de polipeptídeos de sementes de <i>R. communis</i> por filtração em gel | 37 |
| 4.2 - Isolamento de isoformas das albuminas 2S, Ric c 1 e Ric c 3, por cromatografia de fase reversa em sistema HPLC | 38 |
| 4.3 - Ensaio de inibição da atividade da α -amilase salivar e da α -amilase dos insetos <i>Z. subfasciatus</i> , <i>C. maculatus</i> e <i>T. molitor</i> | 39 |
| 4.4 - Ensaio em gel de atividade da inibição da atividade da α -amilase salivar e da α -amilase dos insetos <i>Z. subfasciatus</i> , <i>C. maculatus</i> | 44 |
| 4.5 – Ensaio “in vivo” com sementes artificiais | 46 |
| 4.6 – Estudo estrutural | 50 |
| 4.6.1 – Estudos de modelagem por homologia das isoformas de albuminas 2S, Ric c 1 e Ric c 3 | 50 |
| 4.6.1.1 – Alinhamento de estrutura primária e determinação de estrutura secundária | 50 |
| 4.6.1.2 - Modelagem da isoforma de albumina 2S, Ric c 3 | 53 |
| 4.6.1.3 - Modelagem molecular por homologia da isoforma de albumina 2S, Ric c 1 | 57 |
| 4.6.2 – Construção e avaliação do complexo albumina 2S- α -amilase | 61 |
| 4.6.2.1 – Construção do complexo Ric c 1-TMA | 61 |
| 4.6.2.2 - Construção do complexo Ric c 1-TMA | 66 |
| 4.6.3 – Estudo teórico de epitopos alergênicos nas isoformas de albuminas 2S, Ric c 1 e Ric c 3 | 70 |
| 4.6.4 – Estudos da relação estrutura atividade envolvendo as funções inibitória de α -amilase e alergênica de Ric c 1 e Ric c 3 | 72 |
| 4.6.4.1 – Desativação teórica dos epitopos alergênicos de Ric c 1 e Ric c 3 | 72 |
| 4.6.4.2 – Construção dos complexos teóricos TMA-Ric c 1 mutado e TMA-Ric c 3 mutado | 75 |
| 4.6.5 – Estudos de dinâmica molecular das isoformas de albuminas 2S, Ric c 1 e Ric c 3 | 80 |
| 5 – DISCUSSÃO | 88 |
| 6 – CONCLUSÃO | 96 |
| 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 97 |

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Mamoneira (Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=3988>. Acesso em: 10/12/08). 2
- Figura 2** – Esquema representativo dos eventos envolvidos no desencadeamento da hipersensibilidade do tipo I (Shakib *et al.*, 2008) 6
- Figura 3** – Estrutura primária das isoformas de albuminas 2S de *R. communis*, Ric c 1 e Ric c 3, destacando as cadeias leve e pesada e os epitopos. 10
- Figura 4** – Estrutura da amilose (A) e da amilopectina (B) que compõem o amido, alvo da α -amilase. 12
- Figura 5** – **As α -amilases e os três domínios estruturais.** (A) Esquema representativo da estrutura secundária da maioria das amilases com os 3 domínios (A, B e C). As α -hélices são representadas como cilindros e as folhas- β como setas (Kadziola *et al.*, 1994). (B) Estrutura cristal da α -amilase larval do inseto *Tenebrio molitor*, mostrando o domínio A (azul), domínio B (verde), domínio C (vermelho), os resíduos catalíticos Asp185, Glu222 e Asp287 (rosa) e os íons cálcio (amarelo) e cloro (violeta) (Strobl *et al.*, 1998, PDB – 1JAE). 14
- Figura 6** - Perfil cromatográfico do extrato protéico das sementes de *R. communis*, após Sephadex G-50. Ácido trifluoracético (TFA) 0,1 % foi utilizado como eluente sob fluxo de 1,0 mL/min, sendo coletadas frações de 1 mL. As frações foram monitoradas por leitura de absorvância a 280 nm. 37
- Figura 7** - Cromatografia de fase reversa em coluna C18. Perfil do fracionamento da fração II (pool de albuminas 2S), obtida por cromatografia de filtração em gel em resina Sephadex G-50. Eluentes A: TFA 0,1 % e B: ACN 80 %, contendo TFA 0,1 %, Fluxo 0,7 mL/min. 38
- Figura 8** – Efeito da isoforma Ric c 1 sobre a atividade da enzima α -amilase salivar humana. 40

| | |
|--|----|
| Figura 9 – Efeito da isoforma Ric c 3 sobre a atividade da enzima α -amilase salivar humana. | 40 |
| Figura 10 – Efeito da isoforma Ric c 1 sobre a atividade da α -amilase larval do inseto <i>C. maculatus</i> | 41 |
| Figura 11 – Efeito da isoforma Ric c 3 sobre a atividade da α -amilase larval do inseto <i>C. maculatus</i> | 41 |
| Figura 12 – Efeito da isoforma Ric c 1 sobre a atividade da α -amilase larval do inseto <i>T. molitor</i> | 42 |
| Figura 13 – Efeito da isoforma Ric c 3 sobre a atividade da α -amilase larval do inseto <i>T. molitor</i> | 42 |
| Figura 14 – Efeito da isoforma Ric c 1 sobre a atividade da α -amilase larval do inseto <i>Z. subfasciatus</i> | 43 |
| Figura 15 – Efeito da isoforma Ric c 3 sobre a atividade da α -amilase larval do inseto <i>Z. subfasciatus</i> | 43 |
| Figura 16 – Gel de atividade α -amilásica. 1 – α -amilase larval do inseto <i>C. maculatus</i> ; 2 - α -amilase larval do inseto <i>C. maculatus</i> + pool de albuminas 2S; 3 - α -amilase larval do inseto <i>Z. subfasciatus</i> ; 4 - α -amilase larval do inseto <i>Z. subfasciatus</i> + pool de albuminas 2S; 5 - α -amilase salivar humana; 6 - α -amilase salivar humana + pool de albuminas 2S. | 45 |
| Figura 17 - Larvas do inseto <i>C. maculatus</i> submetidas à alimentação com sementes artificiais contendo um pool de albuminas 2S. 1 - larvas controle, crescidas em sementes livres de albuminas 2S; 2 - larvas crescidas em sementes contendo 0,1 % de albuminas 2S; 3 - larvas crescidas em sementes contendo 0,2 % de albuminas 2S; 4 - larvas crescidas em sementes contendo | |

0,5 % de albuminas 2S; 5 - larvas crescidas em sementes contendo 2 % de albuminas 2S. A porcentagem de albuminas 2S é relativa ao peso da semente. 47

Figura 18 – Gel de atividade α -amilásica de macerado de larvas do inseto *C. maculatus* submetidas à alimentação contendo albuminas 2S. 1 e 2 – larvas controle; 3 e 4 – larvas contendo 0,1 % de albuminas; 5 e 6 - larvas contendo 0,2 % de albuminas; 7 e 8 - larvas contendo 0,5 % de albuminas; 9 e 10 - larvas contendo 2 % de albuminas. 48

Figura 19 – Gel de atividade α -amilásica de macerado de larvas do inseto *C. maculatus* submetidas à alimentação contendo albuminas 2S, sem e com prévia incubação com albuminas 2S. 1 – larvas controle; 2 – larvas controle + pool de albuminas 2 S; 3 - larvas contendo 0,1 % de albuminas; 4 - larvas contendo 0,1 % de albuminas + pool de albuminas 2S; 5 - larvas contendo 0,2 % de albuminas; 6 - larvas contendo 0,2 % de albuminas + pool de albuminas 2S; 7 - larvas contendo 0,5 % de albuminas; 8 - larvas contendo 0,5 % de albuminas + pool de albuminas 2 S; 9 - larvas contendo 2 % de albuminas; 10 - larvas contendo 2 % de albuminas + pool de albuminas 2S. 49

Figura 20 - Alinhamento das isoformas de albuminas 2S, Ric c 1 e Ric c 3, e de 4 membros de famílias com estruturas semelhantes (1PNB - albuminas 2S, Napin de *Brassica napus*), 1AFH - LTP de *Zea mays*, 1B1U- inibidor de α -amilase de *Eleusine coracana gaertneri* e 1HYP – Proteína hidrofóbica de soja de *Glycine max*). O alinhamento foi realizado como descrito por Pantoja-Uceda *et al.*, 2002. A predição de estrutura secundária foi realizada utilizando JPred server, onde α -hélices são representadas em vermelho, folhas- β em verde e regiões não estruturadas em azul. As cisteínas são marcadas em amarelo e as pontes dissulfeto são conectadas por linhas pretas. 51

Figura 21 - Dicroísmo circular das isoformas de albuminas 2S. (A) Espectro de Ric c 1; (B) – Espectro de Ric c 3. Os espectros foram obtidos em água utilizando cubeta de quartzo, com caminho ótico de 0,1 cm. 52

Figura 22 – Estrutura de Ric c 3. A – Estrutura de Ric c 3, sem processamento, determinada por RMN. Em verde estão destacados os peptídeos que são

removidos. B – Estrutura de Ric c 3 após processamento com as α -hélices destacadas (α_1 , α_2 , α_3 , α_4 e α_5). C – Estrutura de Ric c 3 processada com a cadeia leve em cinza, a cadeia pesada em vermelho e as pontes dissulfeto em amarelo. D – Sobreposição das estruturas de Ric c 3 determinada por RMN e Ric c 3 processada, com as pontes dissulfeto destacadas em amarelo..... 55

Figura 23 – Comparação dos mapas de Ramachandran das estruturas de Ric c 3 determinada por RMN (A) e Processada (B). 56

Figura 24 – Mapa de Ramachandran do modelo de Ric c 1. 58

Figura 25 – Modelo de Ric c 1. A – Estrutura teórica de Ric c 1 destacando as 5 α -hélices. B – Estrutura teórica de Ric c 1 com as cadeias leve (cinza) e pesada (vermelho) destacadas e as pontes dissulfeto em amarelo. C – Sobreposição das estruturas teóricas de Ric c 1 e Ric c 3 processado. 59

Figura 26 - Mapa de potencial eletrostático das estruturas de Ric c 3 processada e Ric c 1. A – Estrutura de Ric c 3 processada com o N-terminal da cadeia leve destacado. B - Estrutura de Ric c 3 processada (rotação de 180° em relação a estrutura A), com C-terminal da cadeia leve e N-terminal da cadeia pesada destacados. C - Estrutura de Ric c 1 com o N-terminal da cadeia leve destacado. D - Estrutura de Ric c 1 (rotação de 180° em relação a estrutura C), com C-terminal da cadeia leve destacado. As regiões eletronegativas estão representadas pela superfície vermelha e as regiões eletropositivas pela superfície azul. 60

Figura 27 – Complexo RBI-TMA. O inibidor RBI é apresentada em violeta. Os 3 domínios de TMA, A, B e C, são apresentados em Azul, verde e bege, respectivamente. As pontes dissulfeto são apresentadas em amarelo. 62

Figura 28 – Complexo Ric c 1-TMA. A cadeia leve de Ric c 1 é apresentada em cinza, e a cadeia pesada em vermelho. Os 3 domínios de TMA, A, B e C, são apresentados em Azul, verde e bege, respectivamente. As pontes dissulfeto são apresentadas em amarelo. 63

- Figura 29** - Complexo teórico Ric c 1-TMA. A – Representação das estruturas secundárias, com α -hélices em vermelho, folhas- β em verde e loops em cinza. B - Visão do sítio catalítico de TMA, destacando as ligações de hidrogênio entre o inibidor e a enzima. Os resíduos de TMA estão em cinza, resíduos de Ric c 1 em azul e ligações de hidrogênio em verde. Os resíduos de Ric c 1 envolvidos em ligações de hidrogênio com TMA são apresentados em violeta, e os de TMA em laranja. 64
- Figura 30** – Complexo teórico Ric c 3-TMA. A cadeia leve de Ric c 3 é apresentada em cinza, e a cadeia pesada em vermelho. Os 3 domínios de TMA, A, B e C, são apresentados em azul, verde e bege respectivamente. As pontes dissulfeto são apresentadas em amarelo/verde. 67
- Figura 31** - Complexo teórico Ric c 3-TMA. A – Representação das estruturas secundárias, com α -hélices em vermelho, folhas- β em verde e loops em cinza. B - Visão do sítio catalítico de TMA, destacando as ligações de hidrogênio entre o inibidor e a enzima. Os resíduos de TMA estão em cinza, resíduos de Ric c 3 em azul e ligações de hidrogênio em verde. Os resíduos de Ric c 1 envolvidos em ligações de hidrogênio com TMA são apresentados em violeta, e os de TMA em laranja. 68
- Figura 32** - Estruturas tridimensionais teóricas dos epitopos alergênicos de Ric c 1 (P0 e P3) Ric c 3 (P1, P2, P4 e P5), mostrando os resíduos de ácido glutâmico (azul) e ácido aspártico (verde) destacados. 71
- Figura 33** – Estruturas de Ric c 1 (A) e Ric c 3 (B) antes e após a mutação, respectivamente. Os resíduos de ácido glutâmico estão em azul, de ácido aspártico em verde e de leucina em preto. 74
- Figura 34** – Complexo TMA-Ric c 1 mutado, com os resíduos do inibidor envolvidos em ligações de hidrogênio com a enzima destacados em violeta e os resíduos da enzima envolvidos em ligações de hidrogênio com o inibidor destacados em laranja. α -Hélices em vermelho, folhas β em verde, loops em cinza e resíduos de leucina envolvidos na mutação em preto. 76

Figura 35 - Complexo teórico TMA- Ric c 1 mutado. A – Representação das estruturas secundárias, com α -hélices em vermelho, folhas- β em verde e loops em cinza. B - Visão do sítio catalítico de TMA, destacando as ligações de hidrogênio entre o inibidor e a enzima. Os resíduos de TMA estão em cinza, resíduos de Ric c 1 em azul e ligações de hidrogênio em verde. Os resíduos de Ric c 1 envolvidos em ligações de hidrogênio com TMA são apresentados em violeta e os de TMA em laranja. Resíduos de leucina envolvidos na mutação estão em vermelho. 77

Figura 36 – Complexo TMA-Ric c 3 mutado, com os resíduos do inibidor envolvidos em ligações de hidrogênio com a enzima destacados em violeta e os resíduos da enzima envolvidos em ligações de hidrogênio com o inibidor destacados em laranja. α -Hélices em vermelho, folhas β em verde, loops em cinza e resíduos de leucina envolvidos na mutação em preto. 78

Figura 37 - Complexo teórico TMA-Ric c 1 mutado. A – Representação das estruturas secundárias, com α -hélices em vermelho, folhas- β em verde e loops em cinza. B - Visão do sítio catalítico de TMA, destacando as ligações de hidrogênio entre o inibidor e a enzima. Os resíduos de TMA estão em cinza, resíduos de Ric c 3 em azul e ligações de hidrogênio em verde. Os resíduos de Ric c 3 envolvidos em ligações de hidrogênio com TMA são apresentados em violeta e os de TMA em laranja. Resíduos de leucina envolvidos na mutação estão em vermelho. 79

Figura 38 – Simulação de dinâmica molecular em Ric c 3. Gráfico da flutuação de estrutura secundária em 48 ns de simulação. 82

Figura 39 - Simulação de dinâmica molecular em Ric c 3. A -Gráfico da representação da análise de clusters durante a simulação. B – Flutuação dos resíduos, as α -hélices são representadas por barras azuis. 83

Figura 40 – Sobreposição das estruturas 3D de Ric c 3 durante os 10-58 ns de simulação de dinâmica molecular. Representando os 3 clusters analisados. 84

Figura 41 – Simulação de dinâmica molecular em Ric c 1. Gráfico da flutuação de estrutura secundária em 48 ns de simulação. 85

Figura 42 - Simulação de dinâmica molecular em Ric c 1. A -Gráfico da representação da análise de clusters durante a simulação. B – Flutuação dos resíduos, as α -hélices são representadas por barras azuis. 86

Figura 43 – Sobreposição das estruturas 3D de Ric c 3 durante os 10-58 ns de simulação de dinâmica molecular. Representando os 3 clusters analisados. 87

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Mapa estatístico | 56 |
| Tabela 2 - Interações observadas no complexo teórico Ric c 1- TMA | 65 |
| Tabela 3 – Contatos do complexo Ric c 3-TMA | 69 |
| Tabela 4 – Resíduos de ácido glutâmico substituídos por leucina em Ric c 1 e Ric c 3, utilizando modelagem molecular | 73 |

LISTA DE ABREVIATURAS

- AAI - Inibidor de α -amilase de sementes de *Amaranthus hypocondriacus*;
- α -AI1 – Inibidor de α -amilase 1 de sementes de *Phaseolus vulgaris*;
- DC - Dicroísmo circular;
- HPA - α -Amilase humana de pâncreas;
- HSA - α -Amilase salivar humana;
- nsLTPs – Proteínas transportadoras de lipídeos não específica;
- PDB - Protein Data Bank;
- PPA - α -Amilase de pâncreas de porco;
- RBI - Inibidor bifuncional de tripsina/ α -amilase de *Eleusine coracana*;
- RMN - Ressonância magnética nuclear;
- RMSD – “Root mean square deviation”
- TFA - Ácido trifluorácetico;
- TMA - α -Amilase larval do inseto *Tenebrio molitor*;
- 3D - Estrutura tridimensional.

RESUMO

Nas sementes há uma grande variedade de diferentes inibidores protéicos agindo sobre α -amilase e outras enzimas que processam polissacarídeos. Estes inibidores apresentam uma função natural em sementes, no controle da atividade endógena de α -amilase ou na defesa contra pragas e patógenos. Além disso, apresentam grande potencial como ferramenta para transformação de plantas, tornando as mesmas resistentes contra o ataque de pragas e patógenos.

As albuminas 2S são uma família de proteínas de reserva pertencentes a superfamília das prolaminas, que incluem inibidores de α -amilase e/ou tripsina, proteínas transportadoras de lipídeos não específicas, proteínas hidrofóbicas de soja e glicoproteínas de parede celular. Elas são proteínas com 12-15 kDa, geralmente compostas de duas cadeias polipeptídicas ligadas por duas pontes dissulfeto. Assim como outros membros da superfamília das prolaminas, as albuminas 2S são amplamente distribuídas em sementes de plantas e apresentam um domínio conservado de oito cisteínas. As principais isoformas de albuminas 2S das sementes de *Ricinus communis* são Ric c 1 e Ric c 3. Estas proteínas são descritas como alergênicas e neste trabalho nós analisamos propriedades inibitórias destas albuminas. Elas inibem a atividade da α -amilase salivar humana, e α -amilase larval dos insetos *Callosobruchus maculatus*, *Zabrotes subfasciatus* e *Tenebrio molitor*.

As isoformas de albuminas 2S, Ric c 1 e Ric c 3, apresentam estruturas secundárias similares. Com o intuito de estabelecer a relação entre estrutura e propriedades biológicas de Ric c 1 e Ric c 3, inicialmente nós propusemos o modelo de estrutura tridimensional de Ric c 1, utilizando o programa Swiss model Server, baseada na estrutura de Ric c 3 determinada por RMN. Nós também propusemos o modelo de interação entre α -amilase do inseto *Tenebrio molitor* e Ric c 1 e Ric c 3. Com o propósito de desativar epitopos alergênicos das albuminas 2S, mutações em resíduos em Ric c 1 e Ric c 3 envolvidos com a ligação a IgE e consequente desencadeamento da alergia, foram também propostas e as estruturas tridimensionais destas novas proteínas, em complexo com α -amilase, foram investigadas por modelagem molecular.

O estudo destas estruturas poderia ajudar a estabelecer relações entre estrutura, alergenicidade e inibição de α -amilase, que poderia ser utilizada como ferramenta na defesa de plantas e terapia alérgica.

ABSTRACT

Plant seeds are rich sources of a large number of different proteinaceous inhibitors acting on α -amylases or other polysaccharide processing enzymes. These inhibitors can have natural roles in the control of endogenous α -amylase activity or in defense against pathogens and pests and show great potential as tools to engineer resistance of crop plants against pests.

The 2S albumins are a family of storage proteins belonging to the prolamin superfamily, that includes cereal seed inhibitors of α -amylase and/or trypsin, nonspecific lipid transfer proteins, the hydrophobic protein from soybean, and some cell wall glycoproteins. They are small proteins (12-15 kDa) generally composed of two different polypeptide chains linked by two disulfide bridges. Like other members of the superfamily, the 2S albumin proteins are widely distributed in plant seeds and show a conserved motif of eight cysteine residues. The major isoforms of 2S albumins in these seeds are Ric c 1 and Ric c 3. These proteins present allergenic characteristics. In this work we have analyzed the inhibitory properties of 2S albumin isoforms. They inhibited the α -amylase activities of human salivary and of insects *Callosobruchus maculatus*, *Zabrotes subfasciatus* and *Tenebrio molitor*.

The isoforms of 2S albumins, Ric c 1 and Ric c 3, present similarities in the secondary structure. In order to establish relationships between structure and different biological properties of Ric c 1 and Ric c 3, initially we have predicted the tertiary structure of Ric c 1 utilizing Swiss model program, based in Ric c 3 structure that was determined by RMN. We also have modeled the three-dimensional structure of the *Tenebrio molitor* α -amylase in complex with Ric c 1 and Ric c 3 and introduced mutations in residues the of Ric c 1 e Ric c 3 involved in IgE binding to generate proteins with reduced IgE binding.

These studies may help to establish meaningful relationships among structure, allergenicity and α -amylase inhibition that could be used in plant defense and allergy therapy.

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - A mamoneira, uma planta com potencial biotecnológico

A mamoneira é conhecida no Brasil como “carrapateira”, “rícin” ou “palma cristi”, na Espanha por “rícin” e “palma cristi”, na Inglaterra e nos Estados Unidos pelo nome de “castor bean” e “castor seeds”, na França por “ricin” e na Alemanha por “baun vouder” (Fornazieri Júnior, 1986). É uma planta de origem afro-asiática, nativa, muito resistente e encontrada em grande quantidade na Etiópia, na região do Sennaar, Kordofan e na Índia. Suas sementes foram trazidas para o Brasil possivelmente pelos escravos no século XVI e hoje a mamoneira não é somente um arbusto comum dos matagais, mas uma planta de alto valor econômico.

A mamoneira é um arbusto, seu sistema radicular é constituído de uma raiz pivotante que pode atingir 1,5 metros de profundidade e de raízes laterais com até 80 cm. A parte aérea dessas plantas é ramificada, de coloração verde ou avermelhada, suas folhas são lobadas e de forma variada. A classificação da mamoneira é descrita na figura 1.

A mamoneira é uma planta monóica (flores masculinas e femininas no mesmo espécime) e assim, a inflorescência contém flores femininas na parte superior e masculinas na parte inferior. Sua semente é carunculada, oval e de tamanho grande, médio ou pequeno, podendo ter colorações diversas (Fornazieri Júnior, 1986).

A mamoneira encontra no Brasil excelentes condições para o seu desenvolvimento, já que é uma planta de clima tropical e sub-tropical, necessitando de chuvas regulares no início do desenvolvimento da planta e de períodos secos durante a maturação dos frutos (Azevedo e Beltrão 2007).

O fruto da mamoneira é a mamona, desta por processos industriais são extraídos o óleo, como produto principal, e a torta, como sub-produto. O óleo de mamona tem como principal ácido graxo, o ácido ricinoléico ou 12-hidroxi-9-octadecenóico, que constitui 90% do óleo, os outros 10% são formados por ácidos graxos não hidroxilados, principalmente dos ácidos oléicos e linoléicos (Ogunniyi, 2006).

Mamona

Super Reino: Eucariota

Reino: Viridiplantae

Filo: Streptophyta

Superdivisão: Spermetophyta

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Subclasse: Rosidae

Ordem: Malpighiales

Família: Euphorbiaceae

Subfamília: Alcalyphoideae

Tribo: Acalypheae

Gênero: *Ricinus*

Espécie: *Ricinus communis* L.



Figura 1 – Mamoneira (Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=3988>. Acesso em: 10/12/08).

O óleo extraído das sementes de mamona possui um mercado internacional crescente, garantido por extenso número de aplicações que incluem o uso medicinal e em cosméticos, e a substituição do petróleo na fabricação de plásticos e lubrificantes. Ele tem ampla utilização na fabricação de tintas, sabões, vernizes, detergentes, papel carbono, velas, nylon, produtos sintéticos, plásticos, desinfetantes, adesivos, resinas isolantes (como as usadas em cabos telefônicos), colas especiais, tubos especiais para irrigação, cosméticos, lentes de contato, entre outras (Fornazier Junior, 1986; Ogunniyi, 2006). Na medicina o óleo de mamona também apresenta ampla aplicação, sendo utilizado na fabricação de grande parte dos filtros hospitalares de hemodiálise, bombas corpóreas e extracorpóreas, prótese óssea de resina de mamona, material mais leve que a platina e que não apresenta o problema de rejeição, etc. O óleo de mamona tem como aspecto particular não mudar suas características físicas em altas ou baixas temperaturas e mesmo em variações

bruscas de temperaturas, razão de sua imprescindível aplicação na aviação, como lubrificante de alta precisão, aditivos para tanques de combustíveis, sem o qual as aeronaves não decolariam (Aboissa, 2005).

Uma série de estudos vem sendo realizada para tornar viável o uso da mamona para a produção de Biodiesel, um combustível renovável, biodegradável e obtido da reação de transesterificação de qualquer triglicerídeo com um álcool de cadeia curta, como o metanol e o etanol. A produção de biodiesel a partir do óleo de mamona tornaria o plantio desta euforbiácea uma forma de gerar recursos e emprego em diversas regiões do Brasil. Além disso, as vantagens do emprego do óleo de mamona são muitas, visto que, trata-se do único óleo solúvel em álcool, o que de certa forma facilita a produção do biodiesel, composto majoritariamente por um único ácido graxo, e mais viscoso e mais denso que os outros óleos. (Parente, 2004; Azevedo e Beltrão, 2007).

A torta da mamona rica em nitrogênio, fósforo e potássio é utilizada na recuperação de solos desgastados. Apesar de rica em proteínas, não é utilizada como alimento, nem como aditivo em ração animal, pois suas sementes contêm substâncias tóxicas que não são extraídas ou inativadas pelos processos convencionais de extração do óleo. Os constituintes tóxicos da torta são a ricina, uma proteína, a ricinina, um alcalóide, e um conjunto de proteínas alergênicas muito ativo e resistente aos processos térmicos de desintoxicação (Azevedo e Beltrão, 2007). Estas proteínas alergênicas, as albuminas 2S, são de baixo peso molecular e apresentam funções de reserva e de defesa. Na torta encontra-se ainda uma série de peptídeos com ações antifúngicas (Crespo, 1999) e inibidores de enzimas como α -amilase e proteases.

As proteínas envolvidas no processo de defesa de uma planta como a mamoneira (ex: inibidores enzimáticos) possuem um grande potencial biotecnológico para o desenvolvimento de novos inseticidas e pesticidas de origem natural com baixa toxicidade. Além disso, a manipulação de moléculas alergênicas para diminuição de seu potencial alérgico também é de interesse quando visa o uso destas plantas para o consumo de mamíferos. Com isso, o entendimento do processo de defesa e de alergia em que essas proteínas estão envolvidas, bem como do seu mecanismo de ação se torna pertinente e fundamental.

1.2 - Defesa de plantas contra pestes e patógenos

As plantas sofrem constantemente com agressões de pestes e patógenos. Estes são responsáveis por grandes perdas na agricultura, por causarem doenças e injúrias, além de se alimentarem dos tecidos da planta (Gatehouse *et al.*, 1992; Valois, 2001; Franco *et al.*, 2002). As plantas, entretanto apresentam certo grau de resistência ao ataque de pragas e patógenos, tendo para isso desenvolvido durante a evolução mecanismos de defesa (Agrawal e Karban, 2000).

Os mecanismos de defesa empregados pelas plantas para se protegerem do ataque de pragas e patógenos podem ser classificados em: **defesas induzidas**, quando substâncias são sintetizadas em resposta a estímulos bióticos e abióticos, sendo mais importante para a defesa das partes vegetativas das plantas do que para a proteção de sementes; e as **defesas constitutivas** que fazem parte do plano de desenvolvimento da planta e são depositadas durante sua formação. Estas defesas podem ser de natureza **química**, quando há o envolvimento de substâncias químicas como, por exemplo, alcalóides, aminoácidos não protéicos, flavonóides, entre outros compostos de baixo peso molecular, ou podem ainda ser decorrentes da presença de proteínas tóxicas como lectinas, inibidores de proteinases e amilases, entre outras, ou ainda de natureza **física**, quando aspectos estruturais estão envolvidos, caracterizando-se, por exemplo, pela presença em sementes de tegumento resistente, pêlos, espinhos ou tricomas (Xavier-Filho, 1993).

1.2.1 - Defesas constitutivas: o desencadeamento da alergia por alérgenos de origem vegetal

1.2.1.1 - O processo de alergia

A alergia é comumente definida como uma reação de hipersensibilidade imediata ou do tipo I, onde os sintomas aparecem rapidamente e são causados pela exposição a macromoléculas exógenas, conhecidas como antígenos ou alérgenos, geralmente de origem protéica. A resposta alérgica é geralmente mediada por uma classe específica de anticorpos, conhecida como imunoglobulina E (IgE) (Gould e Sutton 2008).

A reação de hipersensibilidade apresenta duas fases: a sensibilização, quando o indivíduo é exposto pela primeira vez ao antígeno e a reação subsequente, quando o indivíduo é novamente exposto ao antígeno (Mills *et al.*, 2003).

A reação alérgica envolve uma série de eventos que inicia com o reconhecimento da estrutura do alérgeno por células apresentadoras de antígenos (APC), também chamadas macrófagos ou células dendríticas (CD), estas células internalizam o alérgeno que sofre proteólise, gerando fragmentos peptídicos conhecidos como epitopos. Estes epitopos são expostos na membrana das APCs e reconhecidos pelos linfócitos T auxiliares (TH1 e/ou TH2) que juntamente com os linfócitos B, iniciarão a resposta imunológica (Figura 2). As células TH2 são ativadas após o contato com APCs e produzem grandes quantidades de interleucinas 4 e 5 (IL-4 e IL-5, respectivamente). Estas por sua vez atuam como citocinas e levam a biossíntese de IgE por linfócitos B (Abbas *et al.*, 2003).

Os anticorpos IgE, são capazes de se ligar a receptores Fcε presentes na membrana de mastócitos e basófilos. Esta ligação se caracteriza como sensibilização, ou seja, o primeiro contato do indivíduo com o alérgeno. No segundo e nos demais contatos do indivíduo com o mesmo alérgeno, ocorrerá uma ligação cruzada entre segmentos específicos do alérgeno (epitopos) e as IgEs presentes na membrana dos mastócitos e basófilos. Esta ligação induzirá mudanças fisiológicas e anatômicas que desencadearão a

ruptura da membrana destas células, liberando mediadores inflamatórios que levarão aos sintomas da alergia (Abbas *et al.*, 2003).

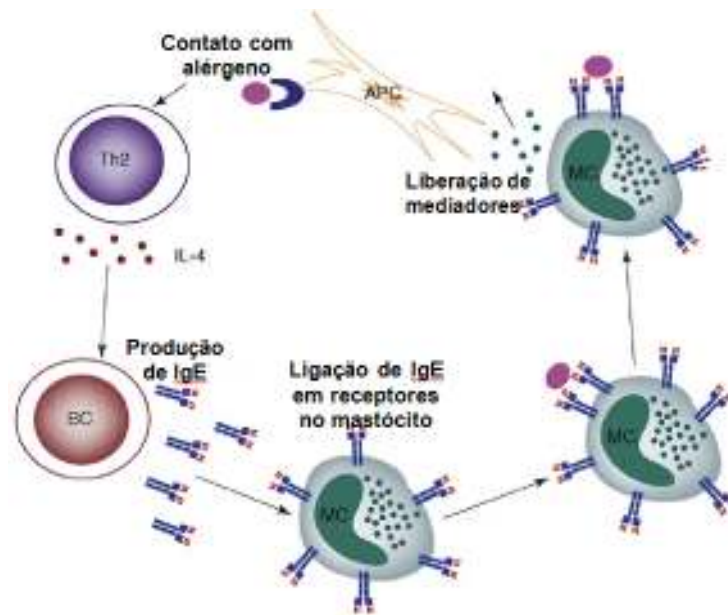


Figura 2 – Esquema representativo dos eventos envolvidos no desencadeamento da hipersensibilidade do tipo I (Shakib *et al.*, 2008).

A região de interação do alérgeno com as IgEs é conhecida como epítopo. Os epítopos podem ser conformacionais, resultantes do arranjo estrutural da molécula ou contínuos, onde a sequência primária contínua é alergênica. Epítopos contínuos foram relacionados a processos de reações cruzadas entre alérgenos (Ivanciuc *et al.*, 2009; Felix *et al.*, 2008).

1.2.1.2 - Alérgenos de origem vegetal: as albuminas 2S da superfamília das prolaminas

Os maiores grupos de proteínas de plantas estão classificados na superfamília das prolaminas, que incluem glicoproteínas de parede celular, proteínas de reserva de sementes de cereais e proteínas sulfídricas de baixo peso molecular, muitas delas também presentes em sementes. Desta superfamília fazem parte também os principais alérgenos de plantas, que possuem baixo peso molecular, são estáveis a altas temperaturas e a proteólise, devido a sua estrutura estabilizada por pontes dissulfeto (Breiteneder e Radauer, 2004; Mills *et al.*, 2004).

Os alérgenos membros da superfamília das prolaminas apresentam uma limitada homologia de sequência, porém mantêm um esqueleto conservado de 8 resíduos cisteínas (C-X_n-C-X_n-CC-X_n-CXC-X_n-C-X_n-C), que formam 4 pontes dissulfeto (Kreis *et al.*, 1985). A presença do “motif” CC e CXC não é comum em proteínas, o que facilita a identificação dos membros da superfamília das prolaminas, que possuem as α -hélices como principais componentes de estrutura secundária, apresentando um enovelamento conservado (Shewry *et al.*, 2002). Embora os resíduos de cisteínas sejam consideravelmente conservados, eles podem formar pontes dissulfeto com diferentes padrões, dependendo do grupo em que a proteína se encontra.

Os principais alérgenos de plantas que fazem parte da superfamília das prolaminas incluem as proteínas transportadoras de lipídeos não específicas (nsLTP), inibidores de α -amilase e/ou tripsina de sementes de cereais e as albuminas 2S (Shewry *et al.*, 2002). As albuminas 2S são proteínas de reserva de dicotiledôneas, encontradas em sementes, frutos e pólen destas plantas. Elas são caracterizadas como os principais alérgenos de castanha do Pará, nozes, mostarda, gergelim e mamona (Breiteneder e Mills 2005).

As albuminas 2S são, em algumas espécies de plantas, proteínas ricas em metionina (Kortt *et al.*, 1991; Beyer *et al.*, 2002; Hagan *et al.*, 2003), enquanto em outras apresentam alto teor de glutamina (Odani *et al.*, 1983; Barciszewski *et al.*, 2000). Elas apresentam massa molecular de 12-15 kDa, e geralmente são compostas de duas cadeias polipeptídicas ligadas por duas

pontes dissulfeto. Em sementes, as albuminas são encontradas em corpos protéicos e mobilizadas durante a germinação, sendo descritas como doadoras de nitrogênio e enxofre para este processo (Youle e Huang 1978).

As isoformas de albuminas 2S são os principais alérgenos em *R. communis*, e foram primeiro descritas por Spies e Coulson em 1943, que isolaram uma fração denominada CB-1A, com baixo peso molecular e estável em altas temperaturas (Spies 1974). Em 1978, Youle e Huang mostraram que CB-1A, era o alérgeno descrito por Li e colaboradores em 1977, e que estas proteínas estavam presentes em corpos protéicos nas sementes de mamona.

A estrutura primária de CB-1A foi determinada por Sharief e Li (1982). Uma proteína de baixo peso molecular, com alto teor de glutamina, e composta de duas cadeias polipeptídicas, uma menor com 34 resíduos de aminoácidos (cadeia leve) e outra maior, com 61 resíduos (cadeia pesada), estas cadeias são ligadas por duas pontes dissulfeto. Hoje a proteína descrita por Sharief e Li é conhecida como Ric c 1.

Uma outra proteína alergênica, também com baixo peso molecular e alto teor de glutamina foi identificada em *R. communis* (Machado e Silva 1992; Silva *et al.*, 1996). Esta proteína denominada inicialmente ASP-Ib, é hoje conhecida como Ric c 3, e assim como Ric c 1, apresenta duas cadeias polipeptídicas, cadeia leve com 41 resíduos de aminoácidos e a cadeia pesada com 67 resíduos, ligadas por duas pontes dissulfeto.

As isoformas de albuminas 2S, Ric c 1 e Ric c 3, são sintetizadas como um único precursor, com 237 resíduos de aminoácidos. O precursor sofre processamento pós-traducional, por endopetidases e carboxipeptidases, perdendo alguns fragmentos peptídicos para assim dar origem as isoformas, Ric c 1 e Ric c 3 (Irwin *et al.*, 1990).

As isoformas de albuminas 2S, Ric c 1 e Ric c 3, são descritas há muitos anos como proteínas alergênicas (Sharief and Li, 1982; Thorpe *et al.*, 1988; Machado and Silva, 1992; Silva *et al.*, 1996). Em estudo recente, nosso grupo (Felix *et al.*, 2008) identificou seis epitopos, 2 em Ric c 1 e 4 em Ric c 3, responsáveis pelo desencadeamento da alergia (Figura 3). Nesses epitopos é importante que haja 2 resíduos de aminoácidos ácidos a uma distância de no máximo 12 resíduos (Felix 2007) para ligarem às IgEs presentes na membrana dos mastócitos e/ou basófilos para assim, dispararem o processo de

desgranulação destas células, ou seja, liberação de mediadores que levam aos sintomas da alergia.

Nos últimos anos, diversas funções de defesa vêm sendo descritas para as albuminas 2S incluindo a atividade antifúngica (Agizzio *et al.*, 2003; Terras *et al.*, 1992, 1993) e a inibição de proteases serínicas (Genov *et al.*, 1997). Entretanto, não há estudos avaliando o efeito das albuminas 2S sobre a atividade da enzima α -amilase, que é um alvo em potencial para o controle de patógenos e insetos na agricultura.

Ric c 1

Cadeia leve:

1 10 20 30
PSQQGCRGQIQEQQLNRQCEYIKQQVSGQGPRR
 P3 (Epitopo 1)

Cadeia pesada:

1 10 20 30 40 50 60
QERSLRGCCDHLKQMMSQRCRCEGLRQAIQQQSQGQLGGQDVFEAFRTAANLPSMCGVSPTECRF
 P0 (Epitopo 2)

Ric c 3

Cadeia leve:

1 10 20 30 40
ESKGEREGSSSQCRQEVQRKDLSSCERYLRQSSRRSPGE
P1 (Epitopo 3) P2 (Epitopo 4)

Cadeia pesada:

1 10 20 30 40 50 60
QQQESQQLQCCNQVKQVRDECQCEAIKYIAEDQIQGGQLHGEESERVAQRAGEIVSSCGVRCMRQT
 P4 P5
 (Epitopo 5) (Epitopo 6)

Figura 3 – Estrutura primária das isoformas de albuminas 2S de *R. communis*, Ric c 1 e Ric c 3, destacando as cadeias leve e pesada e os epitopos alergênicos.

1.2.2 - Alvos e moléculas com potencial para o controle de patógenos e insetos na agricultura: as α -amilases e seus inibidores

1.2.2.1 - As α -Amilases

As plantas estão expostas a inúmeros tipos de estresse químico e físico. As perdas anuais de grãos devido ao ataque por patógenos e insetos promovem sérios prejuízos. Em países tropicais o ataque por insetos contribui fortemente para as estas perdas (Gatehouse *et al.*, 1992; Franco *et al.*, 2002). Muitos destes predadores utilizam além das proteínas, o amido das sementes como fonte alimentar. Assim, o conhecimento das amilases destes insetos, bem como a identificação de inibidores destas enzimas, poderá ser útil como ferramenta para o controle destes patógenos.

As α -amilases (α -1,4 glucano-4-glucanohidrolases) são enzimas monoméricas que constituem uma família de endoamilases e catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas α -1,4 do amido, glicogênio e outros carboidratos. Essas enzimas são amplamente distribuídas em plantas, animais e microrganismos, tendo um importante papel no metabolismo de carboidratos desses organismos.

O amido é formado por dois componentes, a amilose, um polímero linear de glicose em ligações α -1,4, e a amilopectina, um polímero ramificado de glicose, onde as cadeias lineares em ligações α -1,4 são interconectadas com ligações α -1,6 (Figura 4). A clivagem do amido pela α -amilase constitui o primeiro passo na degradação enzimática de polissacarídeos o que é essencial na assimilação de carboidratos. Os carboidratos normalmente constituem o principal componente da dieta humana, e o amido está presente na maior parte das misturas de carboidratos (Payan, 2004), sendo também essencial na germinação e maturação de sementes e para o crescimento e desenvolvimento de muitos insetos, especialmente daqueles que vivem em sementes e grãos ricos em amido.

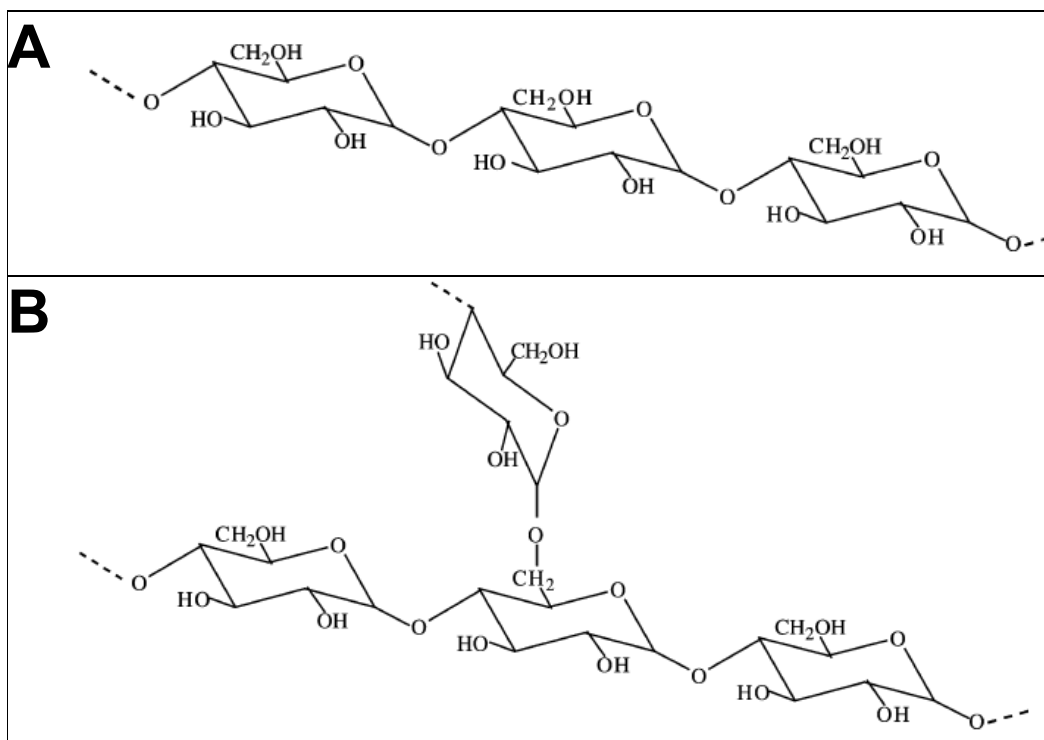


Figura 4 – Estrutura da amilose (A) e da amilopectina (B) que compõem o amido, alvo da α -amilase.

As α -amilases estão agrupadas em 3 famílias de hidrolases glicosídicas e transglicosilases (famílias 13, 70 e 77) que compõem as hidrolases glicosídicas do Clan H. O esquema de classificação nestas famílias se baseia em similaridades de sequência primária, estrutura tridimensional e mecanismo de ação (MacGregor *et al.*, 2001; Bozonnet *et al.*, 2005).

A arquitetura da maioria das α -amilases possui três domínios distintos, chamados A, B e C (Figura 5). O domínio A é o maior, sendo formado por dois segmentos que formam um $(\beta/\alpha)_8$ -barril, ou seja, um barril de 8 fitas- β paralelas envolvidas por um círculo concêntrico de 8 segmentos helicoidais (sete α -hélices e uma hélice- 3_{10}) (Figura 5).

O domínio B das α -amilases é globular, está inserido no domínio A e é formado por vários segmentos estendidos e uma α -hélice curta (Figura 5). Este domínio forma uma cavidade contra o β -barril do domínio A, onde o íon cálcio está ligado, este cátion é de fundamental importância para a integridade

estrutural da enzima (Strobl *et al.*, 1998a; Valeé *et al.*, 1959). O domínio C está localizado do lado oposto ao domínio B, compreendendo o C-terminal da proteína, formando uma unidade separada, feita exclusivamente de folhas- β (Figura 5).

As diferentes α -amilases apresentam um mecanismo similar de ação com os resíduos catalíticos conservados entre todas as enzimas (Svensson, 1994; MacGregor *et al.*, 2001). De forma interessante, o sítio ativo da enzima está localizado em uma fenda em forma de V na interface entre os domínios A e B. A conservação da interface dos domínios A e C entre as amilases de diferentes origens sugerem um importante papel na atividade, estabilidade e enovelamento da enzima (Strobl *et al.*, 1998a).

A estrutura dessas α -amilases, assim como quase todas as estruturas de α -amilases determinadas, apresenta um íon cálcio em posição conservada. O sítio de ligação do cálcio está localizado na interface entre os domínios A e B, próximo ao sítio catalítico (Strobl *et al.*, 1998a). Um ânion cloro também está presente nesta estrutura, e pode ser capaz de ativar alostericamente a enzima (Buonocore *et al.*, 1976) devido a sua proximidade com uma molécula de água que, provavelmente, inicia a clivagem do substrato (Mazur *et al.*, 1994).

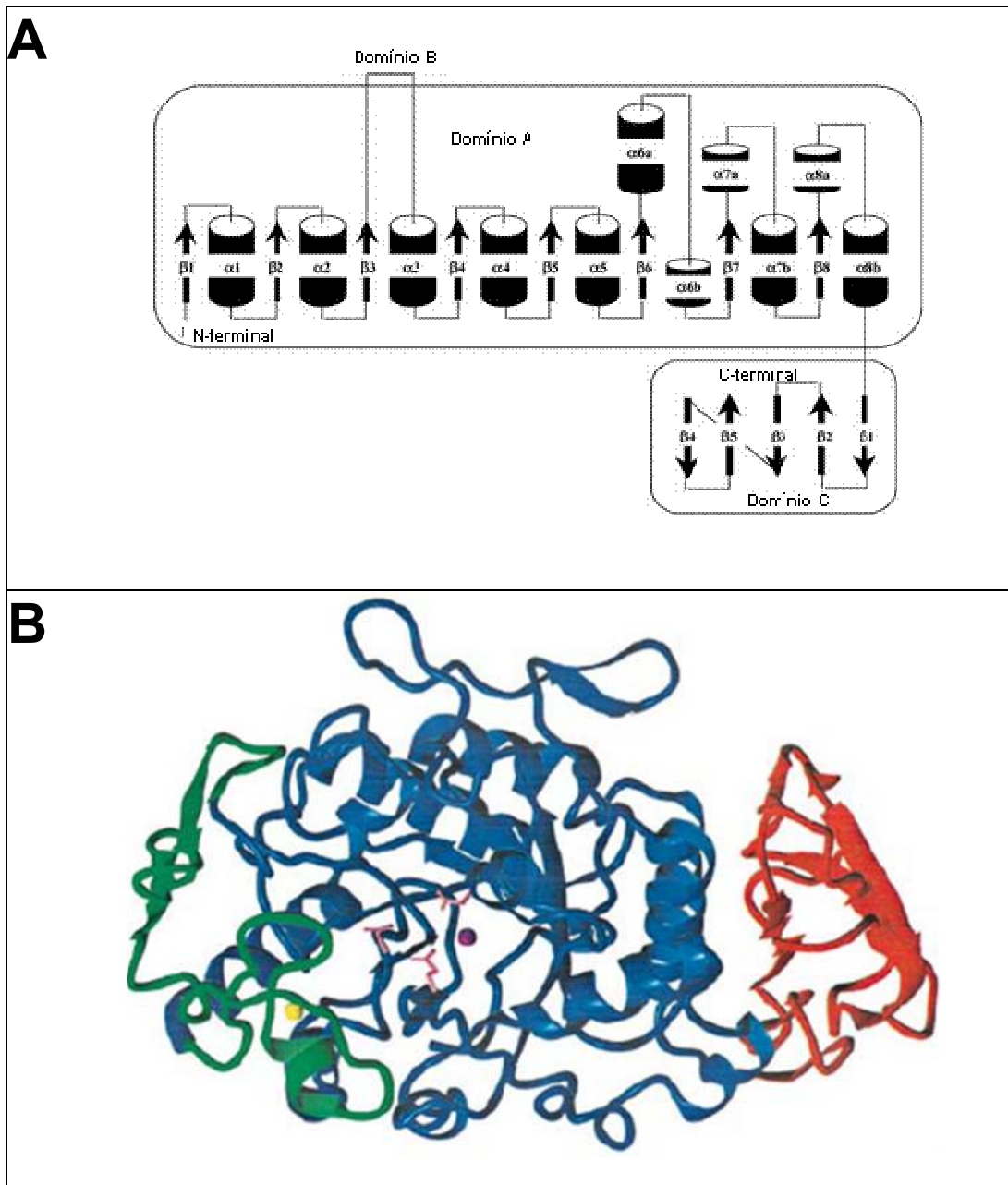


Figura 5 – As α -amilases e os três domínios estruturais. (A) Esquema representativo da estrutura secundária da maioria das amilases com os 3 domínios (A, B e C). As α -hélices são representadas como cilindros e as folhas- β como setas (Kadziola *et al.*, 1994). **(B)** Estrutura cristal da α -amilase larval do inseto *Tenebrio molitor*, mostrando o domínio A (azul), domínio B (verde), domínio C (vermelho), os resíduos catalíticos Asp185, Glu222 e Asp287 (rosa) e os íons cálcio (amarelo) e cloro (violeta) (Strobl *et al.*, 1998a, PDB - 1JAE).

O sítio ativo das α -amilases é composto por diferentes sub-sítios de ligação a carboidratos, capazes de interagir com um resíduo de glicose do substrato. O número de sub-sítios pode variar de amilase para amilase, podendo chegar a 11 (Quian *et al.*, 1994; Machius *et al.*, 1996; Svensson *et al.*, 2002; Kandra *et al.*, 2002; Saboury, 2002). A α -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* foi a primeira a ter seus 9 sub-sítios identificados (Robyt e French 1963; Thoma *et al.*, 1970, 1971). Para a α -amilase pancreática de porco (PPA), inicialmente com estudos cinéticos (Robyt e French 1970) e posteriormente por cristalografia de raio X, na ligação de PPA e o inibidor acarbose (Quian *et al.*, 1994) foram identificados 5 sítios de ligação à glicose. Entretanto, em estudos com a PPA ligada ao octassacarídeo derivado da família trestatina (V-1532), foram identificados 6 sub-sítios (Machius *et al.*, 1996).

Na α -amilase salivar humana foram identificados 6 sub-sítios de ligação à glicose (Kandra e Gyémánt 2000; Kandra *et al.*, 2002), diferentemente da α -amilase de *Aspergillus oryzae*, na qual estudos cinéticos em reação com maltodextrina e com a determinação da energia de ligação, identificaram 7 sub-sítios (Suganuma *et al.*, 1978), posteriormente confirmado por cristalografia de raio X (Matsuura *et al.*, 1984; Brzozowski e Davies, 1997).

Muitos estudos vêm sendo desenvolvidos no intuito de desvendar o funcionamento das amilases e de descobrir proteínas com função inibitória a essas enzimas digestivas (Machius *et al.*, 1996; Grossi-de-Sá e Chrispeels, 1997; Da Silva *et al.*, 2000; Oliveira-Neto *et al.*, 2003; Zhi-Fei *et al.*, 2008). As plantas desenvolveram estratégias de defesa contra a ação de enzimas digestivas, os chamados inibidores de α -amilases e proteinases, que impedem estas enzimas de exercer sua função (Mello e Silva-Filho, 2002; Sivakumar *et al.*, 2006; Farias *et al.*, 2007). Desvendar os mecanismos inibitórios exercidos sobre α -amilases de mamíferos e insetos, é um passo chave no desenho de inibidores de α -amilase com alta afinidade/seletividade. Este conhecimento será muito útil em campos como o da saúde humana, no diagnóstico de pancreatite e em outras desordens hiperamilásicas (O'Donnel *et al.*, 1977; Huang *et al.*, 1982; Turcotte *et al.*, 1994). Poderá ser útil também no controle do diabetes, da obesidade e em hiperlipemia (Layer *et al.*, 1985; Bischoff *et al.*,

1994; Aiso *et al.*, 2007), contribuindo ainda para o entendimento dos aspectos toxicológicos e antinutricionais dos alimentos. Outro aspecto em potencial é o uso para a modificação de plantas ou mesmo para pulverizações que protejam as plantas contra o ataque de pragas (Gatehouse e Gatehouse, 1998; Valência *et al.*, 2000; Payan, 2004).

1.2.2.2 - Os inibidores de α -amilase

Os inibidores de α -amilase vêm sendo isolados de plantas, animais e microrganismos, podendo ser de natureza protéica ou não. Os inibidores de α -amilase não protéicos (acarbose, isoacarbose, acarviosine-glicose, ácido hibiscus e ciclodextrinas) são caracterizados por apresentarem diferentes composições orgânicas, e sua atividade inibitória se dá em parte por sua estrutura cíclica, similar a estrutura do substrato da α -amilase (Franco *et al.*, 2002). De acordo com suas propriedades, os inibidores não protéicos são interessantes para o uso em diagnósticos e tratamentos na medicina (O'Donnell *et al.*, 1977), mas o uso para a proteção de plantas, via produção de plantas transgênicas é muito complexo. A expressão de compostos como a acarbose ou ácidos orgânicos, envolve várias vias metabólicas, sendo necessária expressão de vários genes para conferir a proteção na planta, o que dificulta essa aplicação biotecnológica.

Os inibidores de α -amilase protéicos podem ser encontrados em cereais (Feng *et al.*, 1996; Franco *et al.*, 2000), leguminosas (Ishimoto *et al.*, 1996; Yamada *et al.* 2001), tubérculos e em outros organismos, podendo apresentar massa molecular de 4 kDa, 5 kDa, 13 kDa, 26 kDa e 50 kDa. Estes inibidores apresentam especificidade pela enzima alvo, desta forma, alguns inibidores apresentam alta afinidade por α -amilase de insetos e mamíferos (Franco *et al.*, 2002), enquanto outros agem especificamente sobre a enzima de apenas alguns insetos (Chagolla-Lopez *et al.*, 1994).

Os inibidores protéicos de α -amilase encontrados na natureza foram divididos em sete famílias de acordo com sua similaridade de seqüência primária e estrutura tridimensional (Svensson *et al.*, 2004; Payan, 2004; Franco *et al.*, 2002), incluindo seis famílias isoladas de plantas (Chagolla-Lopez *et al.*,

1994; Bloch e Richardson, 1991; Barber *et al.*, 1986; Campos e Richardson, 1983; Mundy *et al.*, 1984; Ohtsubo e Richardson, 1992; Blanco-Labra e Iturbe-Chinas, 1980; Marshall e Lauda, 1975; Ho e Whitaker, 1993; Fakhoury e Wolosuk, 2001) e uma de espécies de *Streptomyces* (Murao *et al.*, 1980). Essas famílias são classificadas como dos tipos: lectina, “knottin”, cereal, inibidor kunitz, γ -purotioninas, taumatina e inibidores de *Streptomyces*. Uma breve descrição destes inibidores é apresentada a seguir.

1.2.2.2.1 - Similares a Lectina

Esta família de inibidores é formada pelas isoformas α -AI1, α -AI2 e α -AI3 (ou α -AIL), isoladas de diferentes variedades de feijão comum, *Phaseolus vulgaris* (Kasahara *et al.*, 1996; Marshall e Lauda, 1975; Wilcox e Whitaker, 1984; Berre-Anton *et al.*, 1997). Estes inibidores apresentam diferentes especificidades. O inibidor α -AI1 inibe α -amilase pancreática humana, de porco e dos insetos *Callosobruchus maculatus* e *Callosobruchus chinensis*, mas não inibe a α -amilase do inseto *Zabrotes subfasciatus*. Diferentemente, o inibidor α -AI2 inibe somente a α -amilase do inseto *Zabrotes subfasciatus*. Os inibidores α -AI1 e α -AI2 são formados por duas subunidades glicopeptídicas com massa moleculares de 7,8 kDa, cadeia α e 14 kDa, cadeia β , estas cadeias estão associadas por interações não covalentes (Berre-anton *et al.*, 2000). A isoforma α -AI3, corresponde a uma proteína com estrutura similar aos inibidores, formada por uma simples cadeia, que se mostrou inativa contra as α -amilases testadas (Finardi-Filho *et al.*, 1996). A literatura sugere que esta isoforma, provavelmente representa um intermediário evolucionário entre fitohemaglutinas, arcelinas, e inibidores de α -amilases.

1.2.2.2.2 - Similar a “Knottin”

O inibidor de α -amilase isolado de sementes de *Amaranthus hypocondriacus* (AAI) é o menor inibidor de α -amilase descrito até o momento, com 32 resíduos de aminoácidos e três pontes dissulfeto (Chagolla-Lopez *et al.*, 1994). Este inibidor apresenta três fitas β antiparalelas e uma arquitetura de

pontes dissulfeto bem característica em sua estrutura. AAI é um inibidor específico de α -amilase de insetos, cuja estrutura em complexo com a α -amilase do inseto *T. molitor* mostra que este se insere perfeitamente no sítio catalítico da enzima, interagindo com resíduos dos domínios A e B (Chagolla-Lopez *et al.*, 1994). Como se trata de um peptídeo com poucos resíduos de aminoácidos, o complexo enzima-inibidor mostra que embora quase metade da superfície do inibidor entre em contato com a enzima, esta ainda é a menor área de contato descrita, entre um inibidor de α -amilase protéico e a enzima (Pereira *et al.*, 1999).

Nosso grupo identificou recentemente, um peptídeo de sementes de *R. communis*, designado Rc-knottin (Nascimento, 2002), por apresentar características semelhantes aos inibidores da família “knottin”. Este peptídeo apresenta massa molecular de 3,4 kDa, é resistente a hidrólises enzimáticas (tripsina, quimotripsina, protease endo-Glu), e é ativo contra α -amilase salivar humana, e dos insetos *Zabrotes subfasciatus* e *Callosobruchus maculatus* sendo porém inativo contra α -amilase de *Tenebrio molitor*.

1.2.2.2.3 - Proteínas tipo cereal

Os inibidores de α -amilase da família dos cereais são compostos de 120-160 resíduos de aminoácidos e cinco pontes dissulfeto (Lyons *et al.*, 1987; Franco *et al.*, 2000). Estes inibidores são também conhecidos por serem agentes sensibilizantes de humanos, causando alergias, dermatites e asma, que estão associadas à farinha do cereal. Os inibidores desta família podem ser encontrados como monômeros, como por exemplo os inibidores de trigo 0.28, WRP28, WRP26 e WRP27 (Franco *et al.*, 2000), e o inibidor bifuncional de tripsina e α -amilase (RBI) (Garcia-Casado *et al.*, 1996; Kusaba-Nakayama *et al.*, 2000), ou como dímeros, como é o caso do inibidor de trigo denominado 0.19, devido a sua mobilidade eletroforética (Franco *et al.*, 2000; Petrucci *et al.*, 1976). Os inibidores 0.19 e RBI são os mais estudados desta família.

O inibidor 0.19 apresenta atividade inibitória contra α -amilase de pássaros, insetos e mamíferos (Titarenko e Chrispeels, 2000; Franco *et al.*, 2000; Feng *et al.*, 1996). Sua estrutura tridimensional determinada por

cristalografia (Miyazaki *et al.*, 1994) apresenta 5 α -hélices arranjadas em sentidos opostos, favorecendo o empacotamento, com todos os 10 resíduos de cisteínas formando pontes dissulfeto (Oda *et al.*, 1997). O inibidor RBI apresenta estrutura tridimensional semelhante à do inibidor 0.19, com um dobramento globular de 4 α -hélices arranjadas em sentidos opostos e uma pequena região de folhas β antiparalelas (Strobl *et al.*, 1995), este inibidor é ativo contra α -amilase de insetos e de mamíferos.

1.2.2.2.4 - Inibidores tipo Kunitz

Os inibidores desta família apresentam cerca de 180 resíduos de aminoácidos e 4 cisteínas. Estes inibidores vêm sendo isolados de cereais como cevada (Rodenburg *et al.*, 1995), trigo (Gvozdeva *et al.*, 1993) e arroz (Ohtsubo e Richardson, 1992). O inibidor bifuncional de α -amilase e subtilisina (BASI), isolado de cevada, é o inibidor melhor caracterizado desta família, este é ativo contra α -amilase 2 do cereal e serino proteinases da família da subtilisina (Abe *et al.*, 1993). A estrutura do inibidor BASI apresenta uma arquitetura de folhas β com duas pontes dissulfeto (Valleé *et al.*, 1998), possuindo assim homologia com o inibidor bifuncional de α -amilase e subtilisina (WASI) de trigo (Zemke *et al.*, 1991), o inibidor de tripsina de *Erythrina caffra* (Onesti *et al.*, 1991) e a cadeia β da ricina (Rutenber e Robertus, 1991).

O inibidor BASI está envolvido na regulação da degradação de carboidratos da semente, prevenindo que a α -amilase 2 hidrolise o amido durante o estágio de brotamento prematuro (Kadzola *et al.*, 1998). Além disso, este inibidor protege a semente contra proteinases e α -amilase, produzidas por diversos patógenos e pestes (Garcia-Olmedo *et al.*, 1991). BASI como outros inibidores também apresenta especificidade de inibição, atuando sobre a α -amilase 2 de cevada, mas sendo inativo contra a α -amilase 1 que apresenta 74% de similaridade de seqüência com a α -amilase2 (Mundy *et al.*, 1983).

1.2.2.2.5 - Similar às γ -purotioninas

Os inibidores desta família apresentam 47 ou 48 resíduos de aminoácidos, 5 pontes de enxofre e são parte da superfamília das γ -tioninas. Membros desta superfamília são compostos envolvidos na defesa das plantas através de mecanismos como: modificação de permeabilidade de membrana (Castro *et al.*, 1996; Thevissen *et al.*, 1996), inibição de síntese protéica (Mendez *et al.*, 1996), inibição de proteinases (Wijaya *et al.*, 2000) e inibição de α -amilase, que vem sendo observada em 3 isoformas de *Sorghum bicolor*, denominadas SL α -1, SL α -2 e SL α -3 (Bloch e Richardson, 1991). Estes inibidores são potentes contra α -amilases de gafanhoto e barata, inibem fracamente a α -amilase salivar humana e não inibem α -amilase pancreática de porco, α -amilase de cevada e de espécies de *Bacillus* (Bloch e Richardson, 1991). A estrutura de SL α -1 foi determinada por RMN (Bloch *et al.*, 1998), apresentando uma estrutura $\alpha + \beta$ formando um sanduíche com 9 resíduos da hélice firmemente empacotados contra as folhas β (Orengo e Thorton, 1993). A α -hélice está segura por duas pontes dissulfeto que ligam os resíduos 41 e 43 desta estrutura secundária, ao meio da folha β -3. Este “motif” é chamado hélices estabilizadas por cisteínas (Bloch *et al.*, 1998).

As γ -purotioninas apresentam alta similaridade estrutural com defensinas de plantas podendo apresentar diferenças no padrão de pontes dissulfeto (Carvalho e Gomes, 2009). A defensina de *Vigna radiata* (VrD1) apresenta atividade inibitória contra α -amilase do inseto *T. molitor* (Linet *et al.*, 2007) e a defensina de *Vigna unguiculata* apresenta atividade inibitória contra α -amilase dos insetos *Acanthoscelides obtectus* e *Zabrotes subfasciatus*, mas apresenta baixa atividade contra a enzima de mamíferos (Pellegrini 2008).

1.2.2.2.6 - Similar a Taumatina

Os inibidores desta família apresentam massa molecular em torno de 22 kDa e similaridade de seqüência com proteínas do grupo 5 relacionadas à patogenezidade (PR-5) e a taumatina, uma proteína de frutos de *Thaumatococcus danielli* (Cornelissen *et al.*, 1986; Vigers *et al.*, 1991). O

inibidor melhor caracterizado desta família, denominado Zeamatina, foi isolado de milho. É um inibidor bifuncional de proteinase e α -amilase. Este inibidor apresenta atividade inibitória contra α -amilase dos insetos *Tribolium castaneum*, *Sitophilus zeamays* e *Rizopherta dominica* (Blanco-Labra e Iturbe-Chinas, 1980; Schimoler-O'Rourke *et al.*, 2001). A estrutura de zeamatina apresenta 13 folhas β , 11 destas formam um sanduíche β no centro da proteína (Batalia *et al.*, 1996). Algumas voltas estendidas no centro deste inibidor são seguras por uma ou mais das 8 pontes dissulfeto. A superfície de zeamatina é eletrostaticamente polarizada, apresentando grande quantidade de resíduos de arginina e lisina (Batalia *et al.*, 1996).

1.2.2.2.7 - Inibidores de *Streptomyces*

Os inibidores desta família apresentam cerca de 75 resíduos de aminoácidos e são isolados de espécies de *Streptomyces* (Murao *et al.*, 1980; Vértesy *et al.*, 1984; Murao *et al.*, 1983). Estes inibidores são ativos contra α -amilase de animais, algumas espécies de *Streptomyces* e *Bacillus* (Wiegand *et al.*, 1995).

A classificação dos inibidores de α -amilase em sete famílias foi realizada até 2004, mas após esta data outros inibidores de α -amilase já foram identificados. Dayler e colaboradores em 2005 identificaram uma proteína com 33330 Da com capacidade de formar dímeros e apresentando atividade quitinolítica (Dayler *et al.*, 2005).

Neste trabalho nós apresentamos as isoformas de albuminas 2S, Ric c 1 e Ric c 3, pertencentes à superfamília das prolaminas, como proteína capazes de inibir α -amilase de insetos e mamíferos, desta forma, nós entendemos que a classificação dos inibidores de α -amilase precisa sofrer uma reformulação.

1.2.2.3 - Complexo α -amilase-inibidor

As α -amilases estão presentes em diversos organismos apresentando funções importantes para os processos metabólicos destes seres, incluindo patógenos e insetos. Assim, entender os mecanismos de

interação entre α -amilase e seus inibidores tem sido o propósito de vários pesquisadores a fim de desenvolver inibidores específicos para as diferentes classes de α -amilases.

O mecanismo enzimático das α -amilases estudadas até o momento mostra que estas apresentam um mecanismo de ação similar, com resíduos catalíticos conservados (Svensson, 1994; MacGregor *et al.*, 2001). Na α -amilase de pâncreas de porco (PPA) os resíduos Asp 197, Glu 233 e Asp 300 correspondem aos resíduos Asp 185, Glu 222 e Asp 287 na α -amilase larval do inseto *T. molitor* (TMA) (Strobl *et al.*, 1998a), e estão envolvidos no processo de catálise (Machius *et al.*, 1995). A forma como os diferentes inibidores interagem com os resíduos catalíticos da enzima apresenta enormes variações. A interação entre o inibidor e o sítio catalítico da enzima pode ser via ligação de hidrogênio direta, ou via uma molécula de água, ou envolvendo uma molécula de Ca^{+2} hidratado, ou ainda, alguns inibidores apresentam interações que mimetizam a interação do substrato com a enzima (Svensson *et al.*, 2004).

No complexo formado entre α -AI1 e as enzimas de mamífero, PPA e α -amilase humana de pâncreas (HPA), duas alças em forma de “grampo” emergem do dobramento de folhas β do inibidor, formando ligações de hidrogênio, contatos hidrofóbicos e ligações de hidrogênio intermediadas pela água com o sítio ativo da enzima. No centro do sítio ativo, 2 resíduos de tirosina (Tyr 37 e Tyr 186) emergem da extremidade dessas duas alças de α -AI1, interagindo com resíduos catalíticos da enzima (Asp 197 e Glu 233). Interações hidrofóbicas também ocorrem entre a superfície do substrato e os resíduos hidrofóbicos da entrada da fenda. Estas interações são proteína-proteína envolvendo áreas fora do centro catalítico, incluindo as 303-312, 237-240, 347-357 e 140-150 do domínio B (Nahoum *et al.*, 2000; Payan, 2004).

O mecanismo de inibição de PPA e HPA é muito similar nos complexos α -AI1-PPA e α -AI1-HPA, com a presença de ligações de hidrogênio adicionais entre o inibidor e o domínio B da HPA. Diferenças nas interações também são observadas nas regiões das alças 303-312 e 347-357 do domínio A (Nahoum *et al.*, 2000).

A ligação de α -AI1 ao sítio ativo da enzima mimetiza as interações do substrato com os sub-sítios de ligação da enzima, impedindo completamente a ligação do substrato (Payan, 2004).

A enzima TMA apresenta uma estrutura muito similar a de PPA e HPA, com variações em algumas alças e em regiões na alça próxima ao sítio ativo (Strobl *et al.*, 1998a). Análises estruturais do complexo α -AI1-TMA mostram que as interações entre o inibidor e a fenda das enzimas PPA, HPA e TMA são conservados (Nahoum *et al.*, 1999). Desta forma, α -AI1 inibe α -amilase de insetos e de mamíferos utilizando um mecanismo inibitório similar (Payan, 2004).

No complexo RBI-TMA o inibidor bloqueia o sítio ativo da enzima, interagindo com resíduos dos domínios A e B. Os resíduos Ser₁-Ala₁₁ da região N-terminal e Pro₅₂-Cys₅₅ do inibidor emergem na fenda da enzima, se ligando aos resíduos catalíticos (Strobl *et al.*, 1998b).

Modelos dos complexos RBI-PPA e do inibidor de *Streptomyces* com TMA (Tendamistat-TMA) construídos com base na estrutura de cristalografia de raios X dos complexos RBI-TMA (Strobl *et al.*, 1998b) e Tendamistat-PPA (Wiegand *et al.*, 1995), respectivamente. A comparação dos modelos com as estruturas determinadas experimentalmente, indica que os 3 inibidores (α -AI1, tendamistat e RBI), inibem a α -amilase de insetos e de mamíferos utilizando caminhos alternativos (Pereira *et al.*, 1999).

Identificar e explorar funcionalmente e estruturalmente moléculas protéicas que possam afetar a atividade da α -amilase pode permitir o desenvolvimento de novos protótipos de inseticidas naturais, que possam afetar estes predadores sem riscos para os seres humanos. Assim o uso de novas técnicas que vem sendo desenvolvidas, aperfeiçoadas e descritas na literatura, como a modelagem molecular de proteínas, pode auxiliar na realização de estudos para esses fins.

1.2.3 - A Modelagem Molecular para o estudo estrutural de proteínas alergênicas

As proteínas alergênicas vêm sendo estudadas como macromoléculas importantes na defesa de algumas plantas (Pastorello *et al.*, 2007; Radauer e Breiteneder, 2007). Entender a relação estrutura-atividade destas moléculas é de extrema importância para o conhecimento dos fenômenos biológicos envolvendo essas plantas, e para isso é essencial conhecer suas estruturas tridimensionais. O estudo estrutural dessas e de outras proteínas nos permite propor avanços nas áreas da medicina, farmacêuticas e agrárias. Três técnicas experimentais são comumente utilizadas para o estudo de estruturas tridimensionais de proteínas: ressonância magnética nuclear (RMN), cristalografia de raios X e modelagem por homologia ou comparativa.

A técnica de RMN permite a elucidação da estrutura de proteínas em solução. Ela se baseia no fato de certos núcleos atômicos serem intrinsecamente magnéticos, entre eles estão ^1H , ^2H , ^{13}C , ^{14}N , ^{15}N , ^{17}O , ^{31}P , etc. Apenas um número limitado de isótopos apresenta esta propriedade, chamada de spin. O exemplo mais simples é o átomo de hidrogênio (^1H), cujo núcleo é um próton. A rotação de um próton gera um momento magnético, que pode assumir uma orientação ou estado de spin (α ou β), quando é aplicado um campo magnético externo. O ambiente químico de cada núcleo pode ser sondado pela ressonância magnética nuclear, e esta técnica pode ser explorada dando informações sobre a distância entre os átomos em uma molécula. Estas distâncias são usadas para estimar um modelo de estrutura tridimensional da molécula (Berg *et al.*, 2004).

A técnica cristalografia de raios X fornece a estrutura de proteínas que sofreram processo de cristalização. O raio X é uma das radiações eletromagnéticas de comprimento de onda curto, emitida quando elétrons passam de um estado de energia maior para um estado de energia menor. Estes raios X incidem sobre o cristal de proteína, os átomos da molécula desviam os mesmos, resultando na difração destes raios. O padrão de difração resultante é captado em um filme fotográfico ou em um detector de radiação. As intensidades e as posições de difração máximas são utilizadas para

construir matematicamente uma imagem tridimensional da estrutura do cristal (Berg *et al.*, 2004).

Apesar de sua ampla utilização, as técnicas de RMN e cristalografia de raios X nem sempre podem ser utilizadas para determinação da estrutura de proteínas, devido a fatores intrínsecos da molécula. Esses fatores incluem dificuldade na obtenção da proteína purificada e na concentração necessária, ou mesmo dificuldade na formação dos cristais. No intuito de permitir o estudo estrutural de proteínas com maior velocidade e menor custo, foram desenvolvidas técnicas computacionais para predição de estrutura tridimensional (3D), incluindo a modelagem por homologia, a partir da estrutura primária da proteína, cuja obtenção está mais simplificada pelas técnicas de biologia molecular (Sali e Blundell, 1993; Sanchez e Sali, 1997).

A modelagem por homologia ou comparativa é uma técnica de determinação teórica de estrutura 3D de proteínas, onde a estrutura da proteína de interesse é montada com base em uma estrutura já conhecida que apresente um determinado grau de homologia ou similaridade na seqüência de aminoácidos. A modelagem é feita através de programas específicos que permitam a construção ou constroem diretamente a estrutura da proteína sobre o esqueleto da proteína molde que possui sua estrutura 3D conhecida e determinada experimentalmente.

A modelagem por homologia se baseia em alguns aspectos biológicos: a) homologia entre seqüências de aminoácidos, o que implica em semelhança estrutural e funcional; b) proteínas homólogas apresentam regiões internas conservadas, principalmente constituídas de elementos de estrutura secundária: α -hélices e fitas- β ; e c) as principais diferenças estruturais entre proteínas homólogas ocorrem geralmente nas regiões externas, constituídas principalmente por alças ("Loops"), que ligam os elementos de estruturas secundárias.

Segundo Foster, a técnica de modelagem por homologia é composta por quatro etapas principais (Foster 2002):

1 - Identificação e seleção de proteínas-molde. Nesta etapa, proteínas com estrutura 3D determinada por RMN ou cristalografia de raios X, que servirão de molde para modelagem da proteína-problema, serão identificadas em bancos de dados de proteínas como o Protein Data Bank

(PDB) (Berman *et al.*, 2000). O grau de homologia de sequência entre o molde e a proteína-problema é um parâmetro muito importante para confiabilidade do modelo gerado.

2 - Alinhamento das sequências. Nesta etapa a sequência da proteína-problema é alinhada com a sequência do molde, onde resíduos idênticos e quimicamente similares (ex: apolares, polares, neutros, iônicos, etc.) são analisados e identificados, levando-se em conta ainda a estrutura secundária, os resíduos catalíticos e de cisteína. Através do alinhamento é possível identificar regiões estruturalmente conservadas (regiões de máxima similaridade) e regiões variáveis, que ocorrem principalmente nas regiões das alças.

3 - Construção das coordenadas do modelo. Arquivos contendo a sequência da proteína-problema e as coordenadas tridimensionais da proteína molde são utilizados nos programas computacionais de modelagem molecular, como o Swiss model e Swiss-PDB-Viewer, para a construção do modelo da proteína desejada.

4 - Validação do modelo. Nesta etapa a qualidade estereoquímica do modelo e possíveis erros estruturais são avaliados. Um programa comumente utilizado na avaliação dos parâmetros estereoquímicos é o PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993), que avalia diversos parâmetros inclusive, comprimento e ângulo de ligação, planaridade dos anéis e conformação das cadeias laterais, quiralidade, ângulos de torção da cadeia principal e das cadeias laterais, impedimento estérico entre pares de átomos não-ligados e expressão no gráfico de Ramachandran. O mapa de Ramachandran é particularmente útil e define os resíduos que se encontram nas regiões energeticamente mais favoráveis e desfavoráveis, orientando a avaliação da qualidade de modelos teóricos ou de estruturas experimentais de proteínas.

A modelagem de proteínas por homologia tem sido muito utilizada, sendo capaz de acelerar o processo de elucidação de estruturas protéicas e apresentando custo reduzido. Apesar das limitações do método, tem servido como ferramenta importante para a predição teórica da estrutura de proteínas.

2 - OBJETIVOS

2.1 - Objetivo geral

Analisar a relação estrutura-atividade das isoformas de albuminas 2S, Ric c 1 e Ric c 3, presentes em sementes de *R. communis*, através da determinação do perfil inibitório sobre a α -amilase salivar humana e de 3 espécies de insetos e da utilização da modelagem molecular por homologia.

2.2 - Objetivos específicos

- Isolar as isoformas de albuminas 2S, Ric c 1 e Ric c 3, de sementes de mamona;
- Analisar o efeito de Ric c 1 e Ric c 3 sobre α -amilase salivar humana e α -amilase dos insetos *Zabrotes subfasciatus*, *Callosobruchus maculatus* e *Tenebrio molitor*;
- Avaliar o efeito das albuminas 2S adicionadas em sementes artificiais, sobre o crescimento de larvas do inseto *C. maculatus*;
- Determinar a estrutura secundária de Ric c 1 e Ric c 3 por dicroísmo circular;
- Propor a estrutura de Ric c 1 utilizando a modelagem molecular por homologia;
- Construir, avaliar e comparar os complexos teóricos entre Ric c 1, Ric c 3 e a α -amilase do inseto *T. molitor*;
- Avaliar os epitopos alergênicos utilizando os modelos de Ric c 1 e Ric c 3;
- Propor estratégias de desativação de epitopos por mutação sítio dirigida, baseadas em estudo de modelagem, em Ric c 1, Ric c 3.

3 – METODOLOGIA

3.1 – Sementes

As sementes de *Ricinus communis*, cultivar IAC-226 foram fornecidas pelo Instituto Agronômico de Campinas (IAC).

3.2 - Insetos

Os intestinos do inseto *Tenebrio molitor* foram fornecidos pelo professor José Xavier Filho, do Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos, do Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense.

Os intestinos dos insetos *Zabrotes subfasciatus* e *Callosobruchus maculatus* foram fornecidos pela professora Antônia Elenir Amâncio de Oliveira, do Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos, do Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense.

Os insetos *Callosobruchus maculatus* foram fornecidos pela professora Antônia Elenir Amâncio de Oliveira, do Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos, do Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense.

3.3 - Extração de proteínas das sementes de *Ricinus communis*

O extrato protéico foi obtido por processo clássico de extração de proteínas, descrito por Thorpe e colaboradores em 1988, com adaptações feitas por Machado e colaboradores em 1992. Este processo se baseia na solubilidade das albuminas 2S em tampão fosfato pH 7,0, na sua precipitação com sulfato de amônio e na resistência destas proteínas ao aquecimento a 100 °C.

As sementes (30 g) de *R. communis*, após retirada do tegumento e da carúncula, foram maceradas, e os lipídeos extraídos com 150 mL de hexano. Após agitação por duas horas o material foi centrifugado por 10 minutos a 2.500 x g. O sobrenadante foi descartado e o procedimento de extração repetido até que não se observasse mais a presença de lipídeos (2 ou 3 vezes). Ao sedimento, isento de gorduras, foi adicionado 100 mL de tampão

fosfato 1 M pH 7,0 e a mistura mantida sob agitação por 1 hora a 4 °C, e em repouso por 2 horas. O homogenato obtido foi centrifugado a 2.500 x g, por 15 minutos, o sedimento foi descartado, ao sobrenadante foi adicionado sulfato de amônio até atingir a saturação de 90 % com agitação posterior por 1 hora. O material foi armazenado por 16 hs a 4 °C e após este período, a suspensão foi centrifugada a 2.500 x g, por 20 minutos, e o sobrenadante foi descartado. O precipitado resultante foi dissolvido em água destilada fervente para flocular a ricina. A suspensão foi então centrifugada a 26.000 x g por 20 minutos e o sobrenadante obtido, rico em proteínas, foi utilizado para purificação das albuminas 2S.

3.4 - Separação das proteínas por filtração em gel

O extrato protéico obtido das sementes de *R. communis* foi submetido à filtração em gel. A coluna (53 cm x 1,5 cm) foi empacotada com resina sephadex G-50 embebida em ácido trifluoracético (TFA) 0,1 %. Após o empacotamento, a coluna foi equilibrada com o eluente (TFA 0,1 %), três vezes o volume da coluna no fluxo de uso.

Cerca de 1 mL da amostra protéica (10 mg) foi aplicada no topo da coluna. O fluxo utilizado foi de 1,0 mL/min, sendo coletadas frações de 1 mL/tubo. Por esta metodologia separamos três frações, I - rica em ricina, II - rica em albuminas 2S e III - rica em polipeptídeos de menor massa molecular.

3.5 - Isolamento das albuminas 2S, Ric c 1 e Ric c 3, por cromatografia de fase reversa em sistema HPLC

A fração referente às albuminas 2S, obtida da etapa de filtração em gel em resina Sephadex G-50 foi submetida à cromatografia líquida de fase reversa empregando coluna C18 (Sephasil peptide C18 5µ ST 4.6/250), com fluxo de 0,7 mL/min., sendo o solvente A composto por ácido trifluoracético (TFA) 0,1 % e o solvente B por acetonitrila 80 % contendo TFA 0,1 %. No gradiente empregado a concentração do solvente B chega a 100 % em 40 min.

3.6 - Determinação da inibição da atividade da α -amilase

3.6.1 - Obtenção das α -amilase

As larvas dos insetos *Tenebrio molitor*, *Zabrotes subfasciatus* e *Callosobruchus maculatus* foram dessecadas, e seus intestinos, juntamente com o conteúdo luminal extraídos. Os intestinos dos insetos foram macerados em salina e submetidos à centrifugação por 10 min a 12000 g, e o sobrenadante contendo a α -amilase foi reservado para as análises posteriores.

Amostras de saliva humana (500 μ L) foram coletadas e centrifugadas a 12.000 x g por 10 min a 4 °C. O sedimento contendo restos celulares e muco foi descartado e o sobrenadante coletado. Também foi utilizada α -amilase salivar humana obtida da Sigma.

Para quantificação protéica de cada uma das amostras foi utilizada a metodologia de Bradford (Bradford, 1976).

3.6.2 - Ensaio de inibição da atividade da α -amilase salivar e dos insetos *T. molitor*, *Z. subfasciatus* e *C. maculatus*

Quantidades crescentes das isoformas de albumina 2S, Ric c 1 e Ric c 3, dissolvidas em água "MILIQ" foram incubadas com 10 U de cada α -amilase (α -amilase salivar humana, α -amilase dos insetos *C. maculatus*, *Z. subfasciatus* e *T. molitor*) e a foi mistura incubada em banho-maria a 37 °C por 15 min. Após este período foram adicionados 25 μ L de solução de amido 1 % e novamente as amostras foram incubadas em banho-maria a 37 °C por 15 min. (α -amilase salivar humana) e por 30 min. (α -amilase dos insetos). As amostras foram retiradas do banho e após o resfriamento foram adicionados 400 μ L de 3,5 ácido dinitrossalicílico (DNS). O material foi então fervido por 5 min. e 400 μ L de água foi adicionada a cada amostra. A hidrólise do substrato pela enzima foi determinada após leitura da absorvância a 540 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata e foi calculado o desvio padrão para cada experimento. Uma unidade de α -amilase foi definida como uma variação de 0,1 de ABS a 540 nm por 30 minutos de reação, como descrito por Franco e colaboradores (2000).

3.6.3 – Gel de atividade para determinação da inibição da atividade da α -amilase salivar e dos insetos *C. maculatus* e *Z. subfasciatus*

Para determinação da atividade α -amilásica em gel, foi preparado gel nativo 8 %, contendo 1,5 mg de amido por mL de gel. As amostras de α -amilase foram incubadas com a fração rica em albuminas 2S obtida por filtração em gel e dialisada. A mistura foi incubada em banho-maria por 15 min. a 37 °C. A proporção enzima/inibidor está apresentada abaixo:

- α -amilase salivar humana (6 μ g de proteína) + Pool de albuminas (9,5 μ g);
- α -amilase do inseto *C. maculatus* (11 μ g de proteína) + Pool de albuminas (9,5 μ g);
- α -amilase do inseto *Z. subfasciatus* (7 μ g de proteína) + Pool de albuminas (9,5 μ g).

As amostras de α -amilase sem e com a presença do pool de albuminas 2S, foram adicionadas separadamente ao tampão de amostra, aplicadas no gel, e submetidas a uma corrente de 20 mA por aproximadamente 1,5 horas.

O gel foi embebido no tampão de atividade (acetato de sódio 100 mM contendo NaCl 0,2 mM e CaCl₂ 20 mM) por 3 horas em banho-maria a 37 °C. Após este período, o tampão foi retirado, uma solução de iodo foi adicionada ao gel, e agitado, por aproximadamente 2 min, até que o gel fosse revelado, ficando todo em coloração escura.

3.6.4 – Ensaio “in vivo” com sementes artificiais

Para avaliar o efeito das isoformas de albuminas 2S sobre a viabilidade de larvas de *C. maculatus*, foram realizados ensaios biológicos com sementes artificiais, contendo diferentes quantidades de albuminas 2S.

Sementes artificiais com massa total de 400 mg foram preparadas com farinha de *Vigna unguiculata* contendo 0,1; 0,2; 0,5 e 2 % do pool de albuminas 2S isolado por filtração em gel e dialisado. As sementes foram infestadas com fêmeas do inseto *C. maculatus* de 2 dias de idade por um período de 48 horas a 28 °C. Após este período, as sementes foram

desinfestadas, o excesso de ovos postos removidos com o auxílio de uma agulha fina, deixando-se apenas 3 ovos por semente. Após incubação por 20 dias a 28 °C, as sementes foram abertas, as larvas retiradas, contadas e pesadas. A massa e o número de larvas foram comparados com larvas de mesma idade que se desenvolveram em sementes controle, preparadas com farinha de *Vigna unguiculata* e isenta de albuminas. Os ensaios foram realizados em triplicata.

As larvas foram maceradas em salina, centrifugadas a 10.000 x g por 20 min a 4 °C. O teor protéico do sobrenadante foi quantificado pela metodologia de Bradford (Bradford, 1976). Quantidades iguais de proteína de cada uma das amostras sem e com a presença do pool de albuminas 2S obtida por filtração em gel e dialisada, foram aplicadas em um gel nativo contendo amido, como descrito na seção 3.4.3.

3.7 - Estudo estrutural das albuminas 2S de *Ricinus communis*

3.7.1 – Determinação de estrutura secundária das isoformas de albuminas 2S, Ric c 1 e Ric c 3

Para determinação da estrutura secundária, Ric c 1 e Ric c 3, foram submetidas ao experimento de dicroísmo circular (CD), em espectropolarímetro modelo J-715 (Jasco Corporation, Tokyo, Japan). As isoformas foram dissolvidas em água destilada, colocadas em cubeta de quartzo com caminho óptico de 0,1 cm e os espectros foram coletados a 25 °C. Os espectros foram realizados a uma velocidade média de 50 nm/min, o espectro da água foi subtraído. As análises foram realizadas na região de 190 a 260 nm.

3.7.2 – Estudos de modelagem por homologia

3.7.2.1 – Alinhamento de estrutura primária e predição de estrutura secundária

Segundo Foster 2002, para modelar uma proteína o primeiro passo é encontrar um molde, ou seja, uma proteína com estrutura primária homóloga e estrutura tridimensional desvendada por cristalografia de raios-X

ou RMN. Assim, para encontrar um molde para Ric c 1 foi utilizada a ferramenta BlastP, que utilizando um banco de dados de sequências (Altschul *et al.*, 1997), faz a comparação da sequência da proteína alvo (Ric c 1), com outras que apresentem alguma identidade, e a partir desta seleção, pode-se escolher o melhor molde para a modelagem da proteína alvo.

Na busca de um molde para a modelagem da isoforma de albumina 2S de *R. communis*, Ric c 1, chegamos a Ric c 3, também uma isoforma de albumina 2S de *R. communis*, com atividade biológica e estrutura secundária semelhante à Ric c 1 e com a estrutura tridimensional determinada por RMN (Pantoja-Uceda *et al.*, 2003).

A partir das estruturas primárias de Ric c 1 e Ric c 3 foi realizado o alinhamento de sequência utilizando o programa Clustal-W (Thompson *et al.*, 1994 - <http://www.ebi.ac.uk/clustalw>).

A predição de estrutura secundária de Ric c 1, Ric c 3 e outras 4 proteínas de famílias relacionadas, com suas estruturas depositadas no PDB - Protein Data Bank (albumina 2S de *Brassica napus*, código PDB = 1PNB, [Rico *et al.*, 1996], nsLTP de *Zea mays*, código PDB = 1AFH, [Gomar *et al.*, 1996], inibidor de α -amilase e tripsina de *Eleusine coracana*, código PDB = 1B1U, [Strobl *et al.*, 1995] e proteína hidrofóbica de *Glycine max*, código PDB = 1HYP, [Gourinath *et al.*, 2000]), foi realizada utilizando o programa JPred server (Cuff *et al.*, 1998 - <http://www.compbio.dundee.ac.uk/www-jpred>).

3.7.2.2 – Modelagem por homologia de Ric c 1 e processamento de Ric c 3

Os experimentos de modelagem molecular foram realizados em colaboração com a Professora Helena Carla Castro, no Laboratório de Biologia Molecular, no Instituto de Biologia da Universidade Federal Fluminense.

A estrutura de Ric c 1 foi modelada utilizando como molde a estrutura de Ric c 3, determinada por RMN (PDB = 1PSY). Para a modelagem de Ric c 1 foram utilizados os programas Swiss-Model server (Schwede *et al.*, 2003 - <http://swissmodel.expasy.org/SWISS-MODEL>) e Swiss-PDB-Viewer (Guex e Peitsch, 1997 - <http://www.expasy.org/spdbv>). Com base na sobreposição de regiões conservadas estruturalmente, identificadas por

alinhamento entre Ric c 1 e Ric c 3, o programa gera um conjunto de restrições espaciais e constrói o modelo. A partir do modelo gerado foram realizadas minimizações de energia (aproximadamente 10) para otimizar os parâmetros geométricos do modelo. A minimização do modelo foi realizada utilizando a ferramenta Gromos96 do programa Swiss-PDB Viewer.

A qualidade estereoquímica do modelo foi validada utilizando o programa PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993), disponível via PARMODEL web server (Uchôa *et al.*, 2004), que analisa diversos parâmetros incluindo ligações peptídicas, planaridade dos anéis das cadeias laterais, torção dos ângulos ϕ e ψ da cadeia principal.

A estrutura de Ric c 3 determinada por RMN após super-expressão em *Escherichia coli*, apresenta um peptídeo sinal, um peptídeo de ligação entre as cadeias leve e pesada e um peptídeo na região C-terminal que não estão presentes na proteína nativa. Para a construção do modelo de Ric c 3 processado estes peptídeos foram retirados da estrutura da proteína, utilizando os programas Swiss-Model server e Swiss-PDB-Viewer, e estrutura processada passou por minimizações energéticas e pela validação, como descrito acima para Ric c 1.

3.7.2.3 – Modelagem dos complexos entre Ric c 1 e TMA, e Ric c 3 e TMA

No intuito de estudar possíveis sítios de interação entre albumina/ α -amilase, nós construímos modelos teóricos para avaliar os complexos formados entre as albuminas 2S (Ric c 1 e Ric c 3) e a α -amilase do inseto *T. molitor* (TMA). O complexo entre a α -amilase do inseto *T. molitor* e o inibidor bifuncional de tripsina e α -amilase de *Eleusine coracana* (TMA-RBI) (Strobl *et al.*, 1998b) foi escolhido como molde para a modelagem dos complexos TMA-Ric c 1 e TMA-Ric c 3.

A modelagem do complexo TMA-Ric c 1 foi realizado utilizando o programa Swiss-PDB-Viewer. O modelo foi gerado a partir da sobreposição do modelo teórico de Ric c 1 com o complexo TMA-RBI, tendo em vista que, Ric c 1 e RBI, apresentam alguma similaridade estrutural. A estrutura de RBI foi então deletada, sendo gerado o complexo TMA-Ric c 1. O modelo teórico final do complexo foi submetido a minimizações de energia (aproximadamente 10).

O mesmo procedimento foi repetido para a formação do complexo TMA-Ric c 3. A minimização do modelo foi realizada utilizando a ferramenta Gromos96 do programa Swiss-PDB Viewer.

3.7.2.4 – Construção de epitopos alergênicos de Ric c 1 e Ric c 3

Conhecendo a sequência primária de 6 epitopos, de Ric c 1 e Ric c 3, descritos por Felix e colaboradores em 2008, e a estrutura tridimensional de Ric c 1 e Ric c 3, construímos os epitopos alergênicos utilizando o programa Swiss-PDB-Viewer.

Durante a construção dos 6 epitopos, 2 em Ric c 1 e 4 em Ric c 3, os resíduos de aminoácidos da proteína que não faziam parte do epitopo foram excluídos. Após a construção eles foram submetidos à minimização de energia e avaliação no PROCHECK.

3.7.2.5 – Estudos de desativação teórica dos epitopos alergênicos de Ric c 1 e Ric c 3

Em todos os epitopos identificados por Felix (2007), pelo menos 2 resíduos de aminoácidos ácidos (ácido glutâmico e ácido aspártico) estão presentes e foi demonstrado que estes resíduos são fundamentais para a interação entre as IgEs e os antígenos (Ric c 1 e/ou Ric c 3), e consequente desencadeamento da alergia. Com base neste estudo, alguns resíduos de ácidos glutâmicos foram substituídos por resíduos de leucina utilizando o programa Swiss-PDB-Viewer. Após a construção das estruturas de Ric c 1 e Ric c 3 mutadas, as mesmas foram submetidas a minimizações de energia, e a avaliação PROCHECK.

3.7.2.6 – Construção dos complexos entre Ric c 1 e Ric c 3 mutadas e TMA

As estruturas de Ric c 1 e Ric c 3 mutadas tiveram alguns resíduos de ácidos glutâmicos trocados por resíduos de leucina. A modelagem do complexo TMA-Ric c 1 mutante foi realizado utilizando o programa Swiss-

PDB-Viewer . O modelo foi gerado a partir da sobreposição de Ric c 1 mutante com o complexo TMA-Ric c 1, após a sobreposição entre as duas estruturas, a estrutura de Ric c 1 foi deletada, gerando o complexo TMA-Ric c 1 mutante. O modelo foi submetido a minimizações de energia (aproximadamente 10) e a avaliado no PROCHECK. O mesmo procedimento foi repetido para a formação do complexo TMA-Ric c 3 mutante.

3.7.3 – Estudos de simulação de dinâmica molecular em Ric c 1 e Ric c 3

No intuito de estudar a melhor acomodação dos resíduos N- e C-terminal das cadeias leve e pesada de Ric c 1 e Ric c 3, as estruturas, a partir de sua coordenadas foram submetidas à simulação de dinâmica molecular, utilizando o pacote de programa Gromacs 3.3.3 (Lindahl *et al.*, 2001) e aplicando o campo de força GROMOS96 53a5 (Oostenbrink *et al.*, 2004).

Os modelos de Ric c 1 e Ric c 3 processado foram solvatados em caixa d'água modelo SPC/E (Berendsen *et al.*, 1987). Cada modelo foi rodeado por 8000 a 9000 moléculas de água, representando mais do que 3 camadas de solvatação. As coordenadas de Ric c 1 e Ric c 3 foram obtidas com a ferramenta pdb2gmx, utilizando protonação padrão (pH 7,0) para todos os resíduos. Para a neutralização do sistema, foram utilizados os íons Na⁺ e Cl⁻. Os sistemas de simulação foram submetidos a passos de minimização de energia (aproximadamente 2000 passos), utilizando o algoritmo LINCS (Hess *et al.*, 1997). Os modelos minimizados foram submetidos a simulação em temperatura de 310 K e pressão de 1 atm., em célula de simulação octaédrica (7.3 X 6.9 X 5.9 X 0 X 0 X 2.5 X 0 X -2.5 X 3.4 nm), com o método PME de tratamento eletrostático (Essman *et al.*, 1995).

Os modelos foram submetidos a 50-60 ns de simulação. A análise dos "clusters" da trajetória foi realizada utilizando a ferramenta g_cluster. Os "clusters" mais estáveis na simulação de dinâmica molecular foram selecionados e utilizados para os cálculos das flutuações das estruturas em estudo.

4 - Resultados

4.1 - Isolamento de polipeptídeos de sementes de *R. communis* por filtração em gel

O extrato protéico das sementes de *Ricinus communis* foi submetido à filtração em gel em resina Sephadex G-50 e o perfil cromatográfico do fracionamento é apresentado na figura 6, onde podemos observar três frações: I - rica em ricina, II - pool de albuminas 2S e III - fração de baixo peso molecular. Nosso trabalho concentrou-se no pool de albuminas 2S.

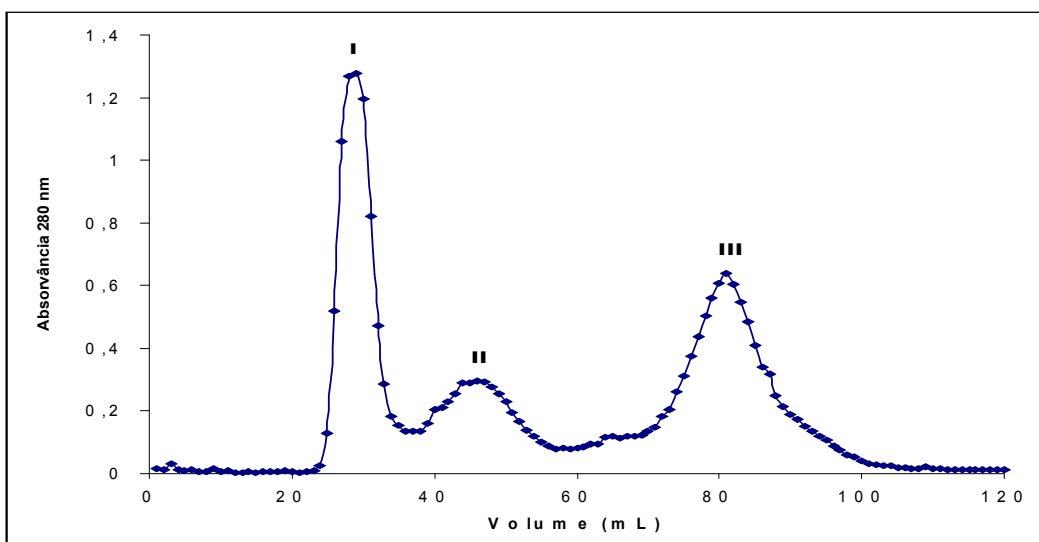


Figura 6 - Perfil cromatográfico do extrato protéico das sementes de *R. communis*, após Sephadex G-50. Ácido trifluoracético (TFA) 0,1 % foi utilizado como eluente sob fluxo de 1,0 mL/min, sendo coletadas frações de 1 mL. As frações foram monitoradas por leitura de absorvância a 280 nm.

4.2 - Isolamento de isoformas das albuminas 2S, Ric c 1 e Ric c 3, por cromatografia de fase reversa em sistema HPLC

A fração II, rica em albuminas 2S, obtida após cromatografia de filtração em gel em resina Sephadex G-50, foi submetida à cromatografia de fase reversa em sistema HPLC utilizando coluna C18 (Sephasil peptide C18 5 μ ST 4.6/250), e o perfil cromatográfico do fracionamento é apresentado na figura 7. Pode-se observar 2 picos majoritários já identificados anteriormente como as isoformas Ric c 3 e Ric c 1 de albumina 2S (Félix *et al.*, 2008), estas frações foram coletadas e secas em centrífuga a vácuo para serem utilizadas como material de estudo neste trabalho.

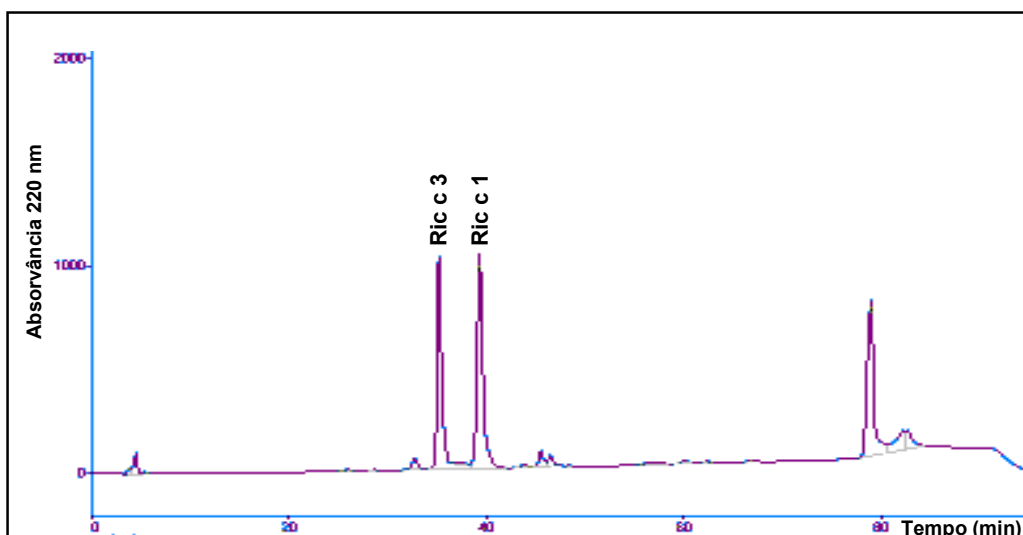


Figura 7 - Cromatografia de fase reversa em coluna C18. Perfil do fracionamento da fração II (pool de albuminas 2S), obtida por cromatografia de filtração em gel em resina Sephadex G-50. Eluentes A: TFA 0,1 % e B: ACN 80 %, contendo TFA 0,1 %, Fluxo 0,7 mL/min.

4.3 - Ensaio de inibição da atividade da α -amilase salivar e da α -amilase dos insetos *Z. subfasciatus*, *C. maculatus* e *T. molitor*.

Submetemos as isoformas de albumina 2S, Ric c 1 e Ric c 3, ao protocolo de inibição da atividade das enzimas α -amilase salivar humana e α -amilase larval dos insetos *Z. subfasciatus*, *C. maculatus* e *T. molitor*. As isoformas de albumina inibiram todas as enzimas testadas. No ensaio com a α -amilase salivar, 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ das isoformas, Ric c 1 e Ric c 3, inibiram completamente a atividade da enzima, como mostram as figuras 8 e 9. Para o inseto *C. maculatus*, 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de cada isoforma inibiram cerca de 98% da atividade da enzima, como mostram as figuras 10 e 11. Para o inseto *T. molitor*, 15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de cada isoforma inibiram cerca de 98% da atividade da enzima, como mostram as figuras 12 e 13, e para o inseto *Z. subfasciatus*, 120 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de cada isoforma inibiram cerca de 98% da atividade da enzima, como mostram as figura 13 e 14.

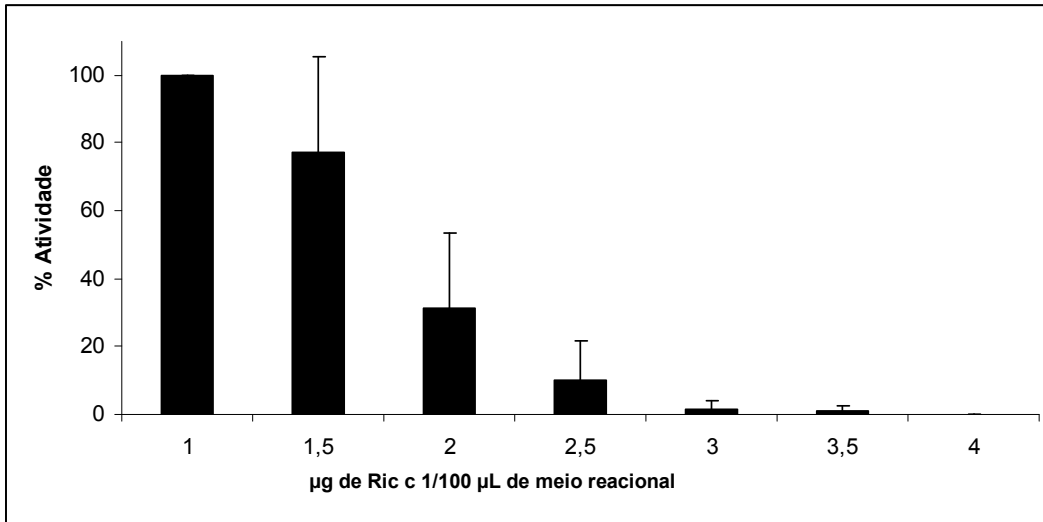


Figura 8 – Efeito da isoforma Ric c 1 sobre a atividade da enzima α -amilase salivar humana.

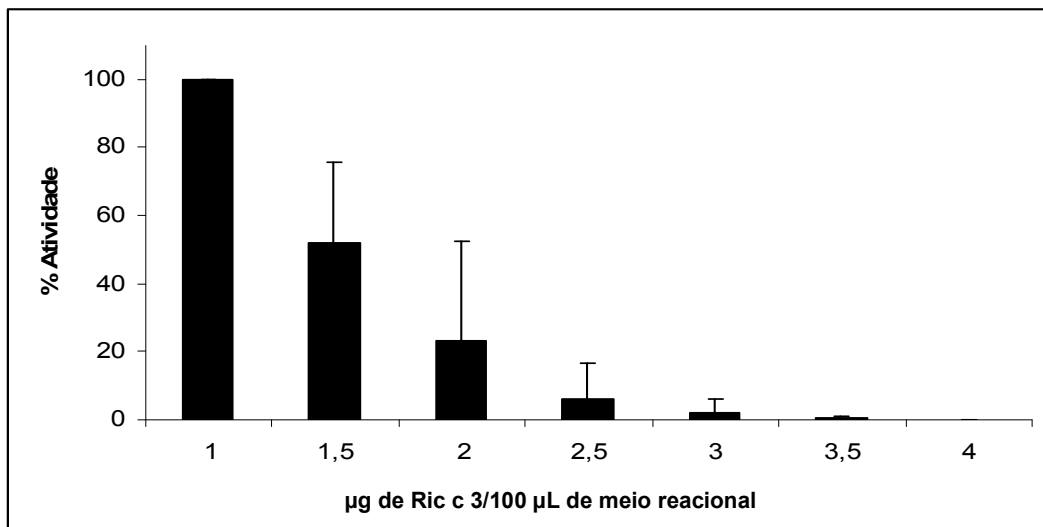


Figura 9 – Efeito da isoforma Ric c 3 sobre a atividade da enzima α -amilase salivar humana.

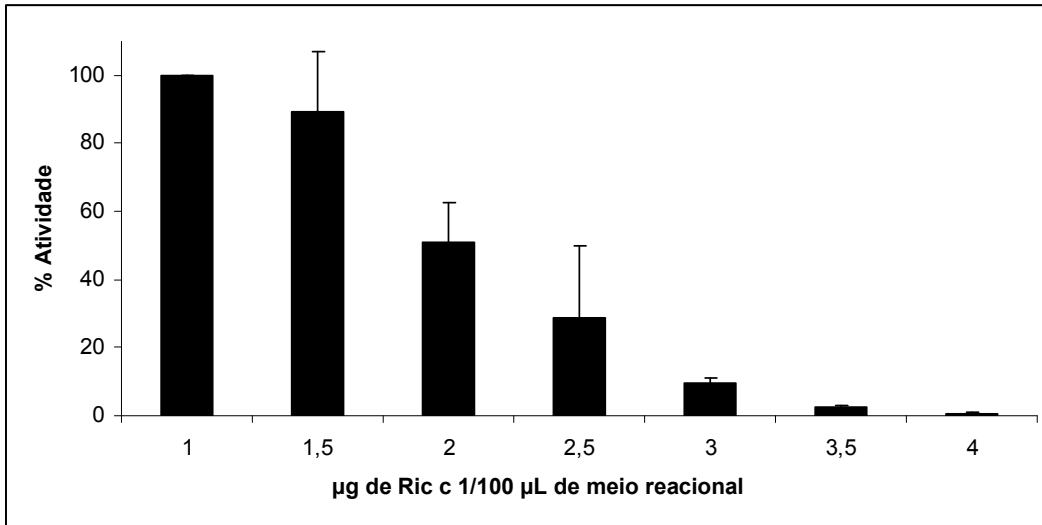


Figura 10 – Efeito da isoforma Ric c 1 sobre a atividade da α -amilase larval do inseto *C. maculatus*.

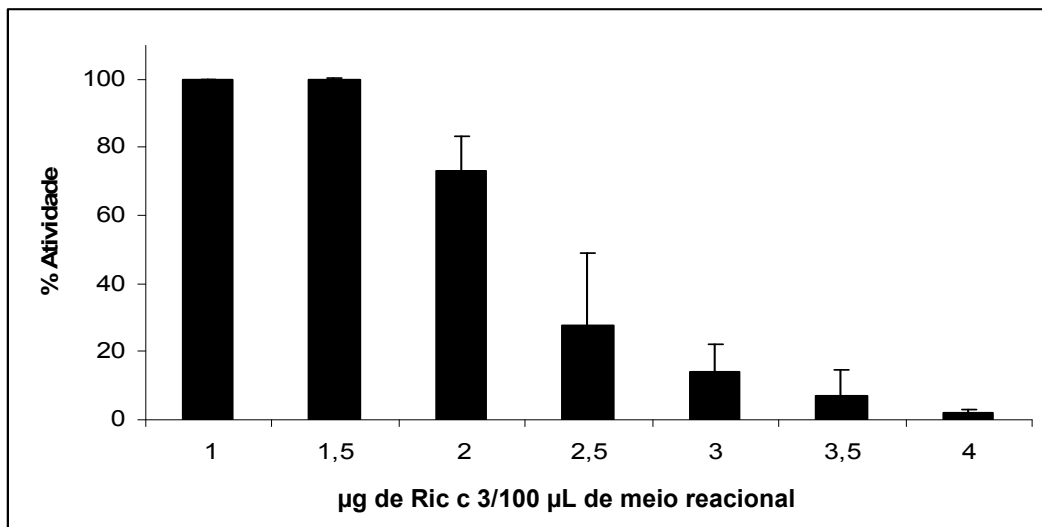


Figura 11 – Efeito da isoforma Ric c 3 sobre a atividade da α -amilase larval do inseto *C. maculatus*.

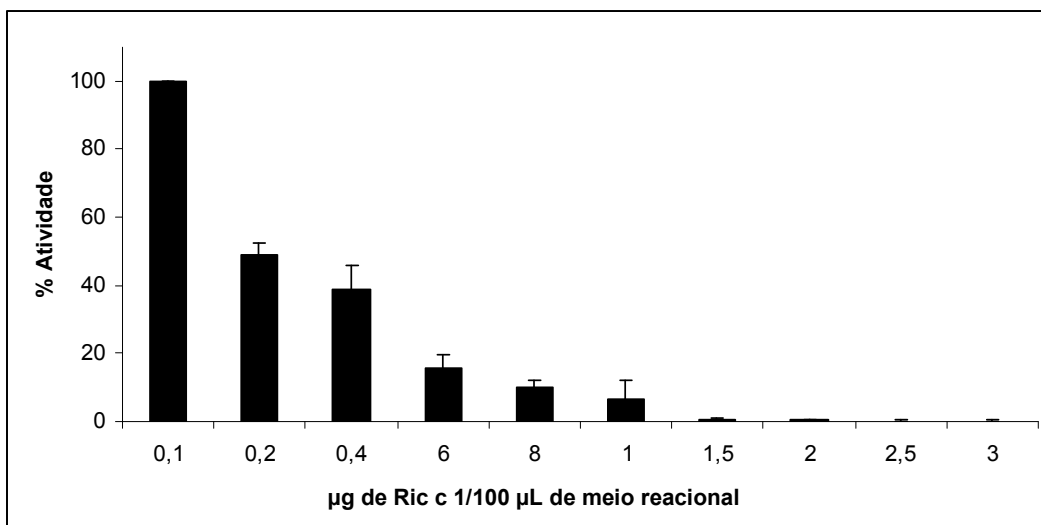


Figura 12 – Efeito da isoforma Ric c 1 sobre a atividade da α -amilase larval do inseto *T. molitor*.

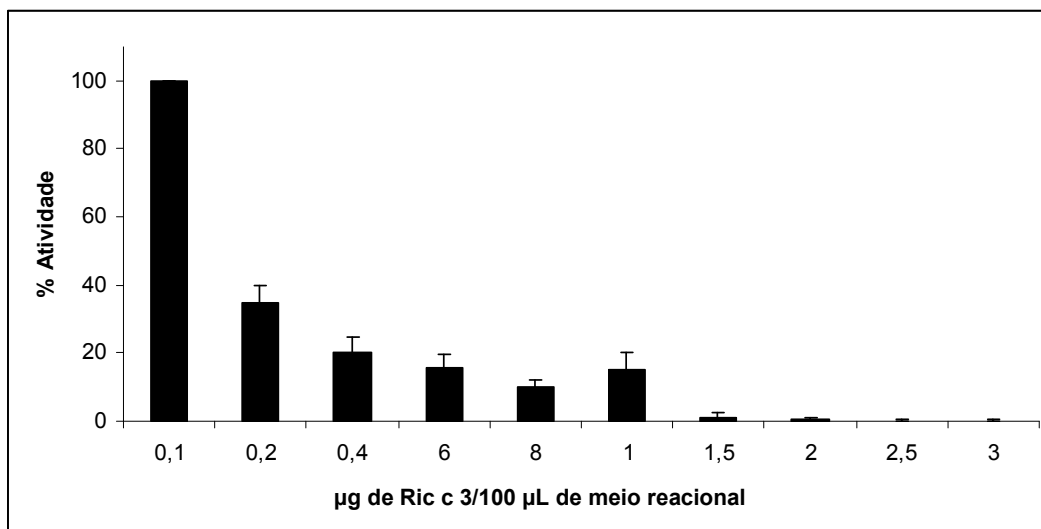


Figura 13 – Efeito da isoforma Ric c 3 sobre a atividade da α -amilase larval do inseto *T. molitor*.

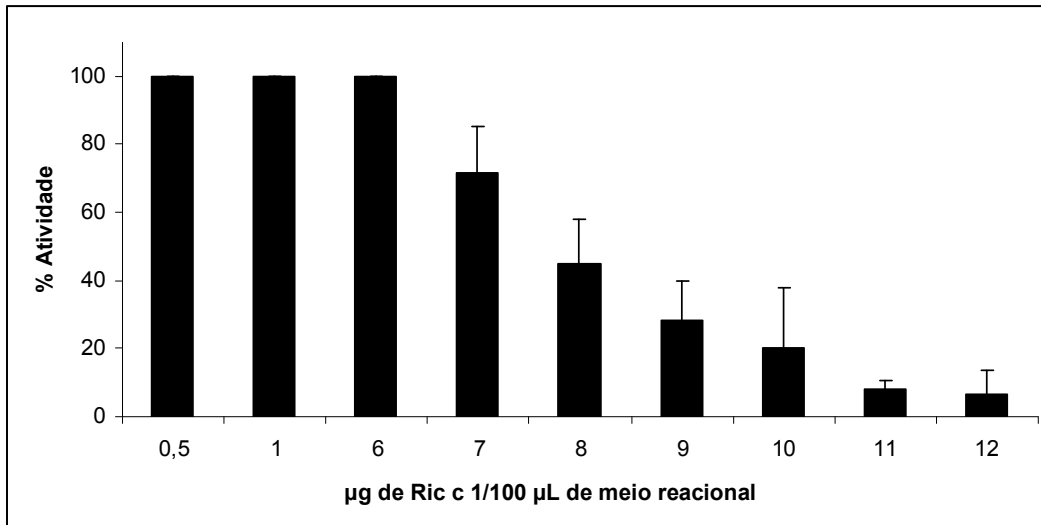


Figura 14 – Efeito da isoforma Ric c 1 sobre a atividade da α -amilase larval do inseto *Z. subfasciatus*.

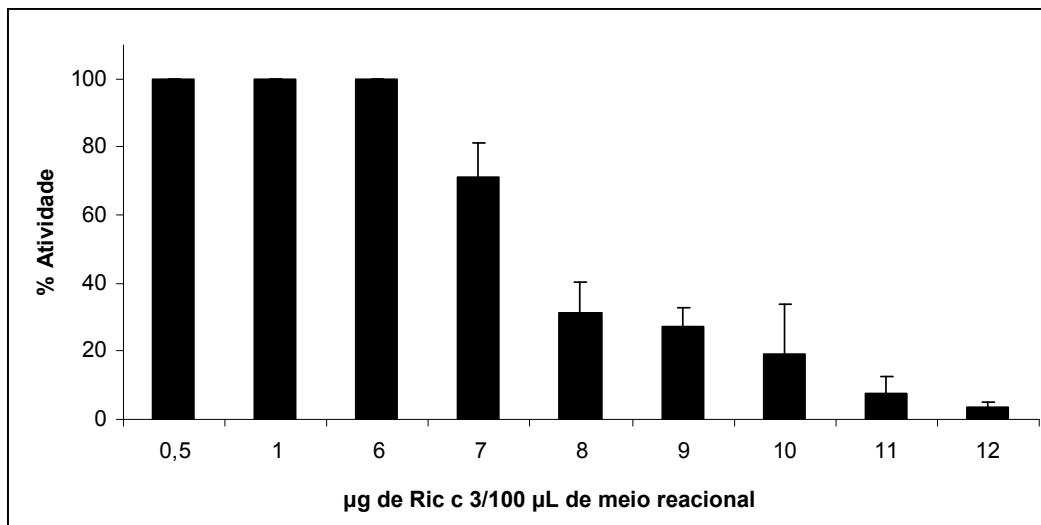


Figura 15 – Efeito da isoforma Ric c 3 sobre a atividade da α -amilase larval do inseto *Z. subfasciatus*.

4.4 - Ensaio em gel de atividade da inibição da atividade da α -amilase salivar e da α -amilase dos insetos *Z. subfasciatus*, *C. maculatus*

Os organismos de uma forma geral apresentam mais de uma isoforma de α -amilase. Para avaliar se todas as isoformas de α -amilase estudadas estavam sendo inibidas pelas albuminas 2S de *R. communis*, nós realizamos ensaios de atividade em gel contendo amido.

Na figura 16 é apresentado um gel de atividade α -amilásica, onde as α -amilases larvais dos insetos *C. maculatus*, *Z. subfasciatus*, e a α -amilase salivar humana foram testadas sem e com a presença das albuminas 2S. Na raia 1 podemos observar a presença de pelo menos 3 isoformas de α -amilase de *C. maculatus*, e na raia 2 observamos que todas as isoformas foram inibidas pelas albuminas 2S. Na raia 3 também podemos observar pelo menos 3 isoformas de α -amilase de *Z. subfasciatus* e na raia 4 observamos que todas as isoformas foram inibidas pelas albuminas 2S. Na raia 5 podemos observar uma alta atividade da α -amilase salivar humana, e na raia 6 observamos ainda um resquício de atividade, provavelmente pelo fato da quantidade de inibidor não ter sido suficiente, já que a atividade da enzima foi significativamente alta.

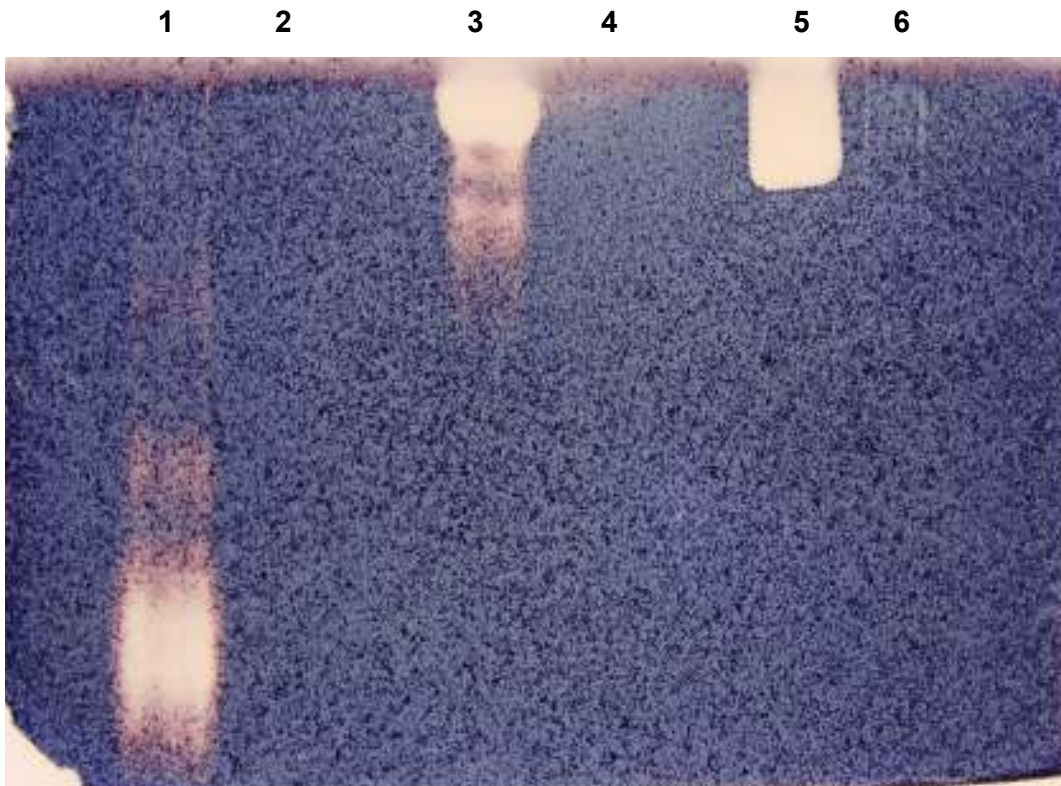


Figura 16 – Gel de atividade α -amilásica. 1 – α -amilase larval do inseto *C. maculatus*; 2 - α -amilase larval do inseto *C. maculatus* + pool de albuminas 2S; 3 - α -amilase larval do inseto *Z. subfasciatus*; 4 - α -amilase larval do inseto *Z. subfasciatus* + pool de albuminas 2S; 5 - α -amilase salivar humana; 6 - α -amilase salivar humana + pool de albuminas 2S.

4.5 – Ensaio “in vivo” com sementes artificiais

Para avaliar o efeito das albuminas 2S de *R. communis* no desenvolvimento de larvas do inseto *C. maculatus*, nós realizamos ensaios biológicos, sob condições controladas, com sementes artificiais contendo quantidades crescentes (0,1; 0,2; 0,5, e 2 %) de um pool de albuminas 2S. A figura 17 mostra que 2 % do inibidor acarreta uma perda significativa de peso e tamanho nas larvas.

Para avaliar se a perda de peso das larvas estava diretamente relacionada à inibição de α -amilase, nós realizamos um gel de atividade com um macerado das larvas. Na figura 18 podemos observar que a atividade α -amilásica aumenta com 0,1 %; diminui em 0,2 % e apresenta um novo aumento em 0,5 e 2 %.

Para avaliar se as larvas estavam expressando outras isoformas de albuminas 2S resistentes ao inibidor, nós repetimos o experimento acima, porém os macerados de larvas foram ensaiados sem e com a presença do pool de albuminas 2S. Podemos observar na figura 19 que todas as isoformas de α -amilase presentes nas larvas, crescidas em diferentes concentrações do inibidor, foram inibidas.



Figura 17 - Larvas do inseto *C. maculatus* submetidas à alimentação com sementes artificiais contendo um pool de albuminas 2S. 1 - larvas controle, crescidas em sementes livres de albuminas 2S; 2 - larvas crescidas em sementes contendo 0,1 % de albuminas 2S; 3 - larvas crescidas em sementes contendo 0,2 % de albuminas 2S; 4 - larvas crescidas em sementes contendo 0,5 % de albuminas 2S; 5 - larvas crescidas em sementes contendo 2 % de albuminas 2S. A porcentagem de albuminas 2S é relativa ao peso da semente.

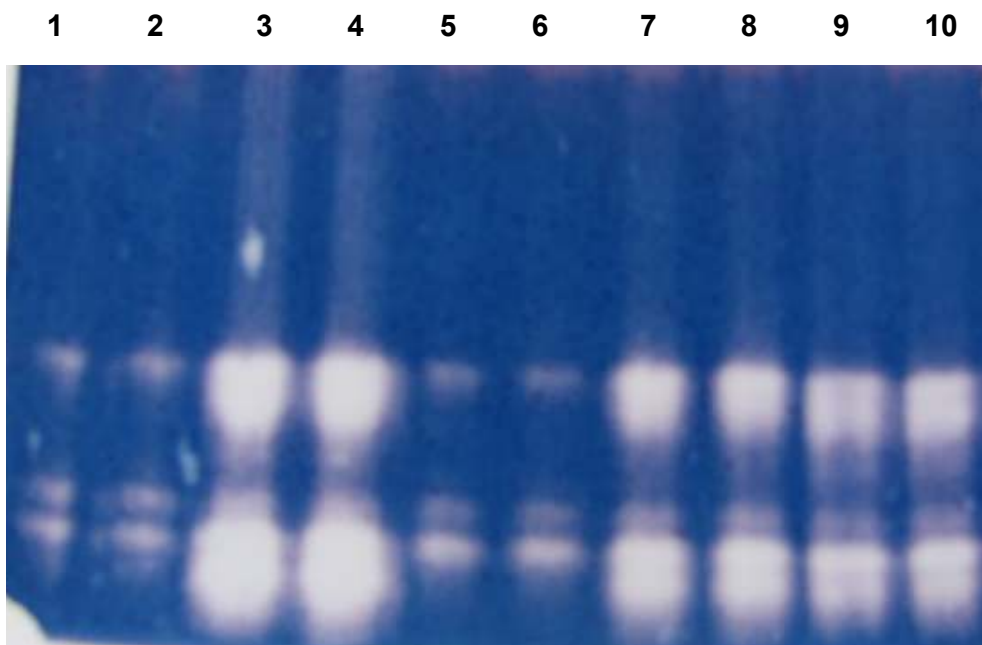


Figura 18 – Gel de atividade α -amilásica de macerado de larvas do inseto *C. maculatus* submetidas à alimentação contendo albuminas 2S. 1 e 2 – larvas controle; 3 e 4 – larvas contendo 0,1 % de albuminas; 5 e 6 - larvas contendo 0,2 % de albuminas; 7 e 8 - larvas contendo 0,5 % de albuminas; 9 e 10 - larvas contendo 2 % de albuminas.

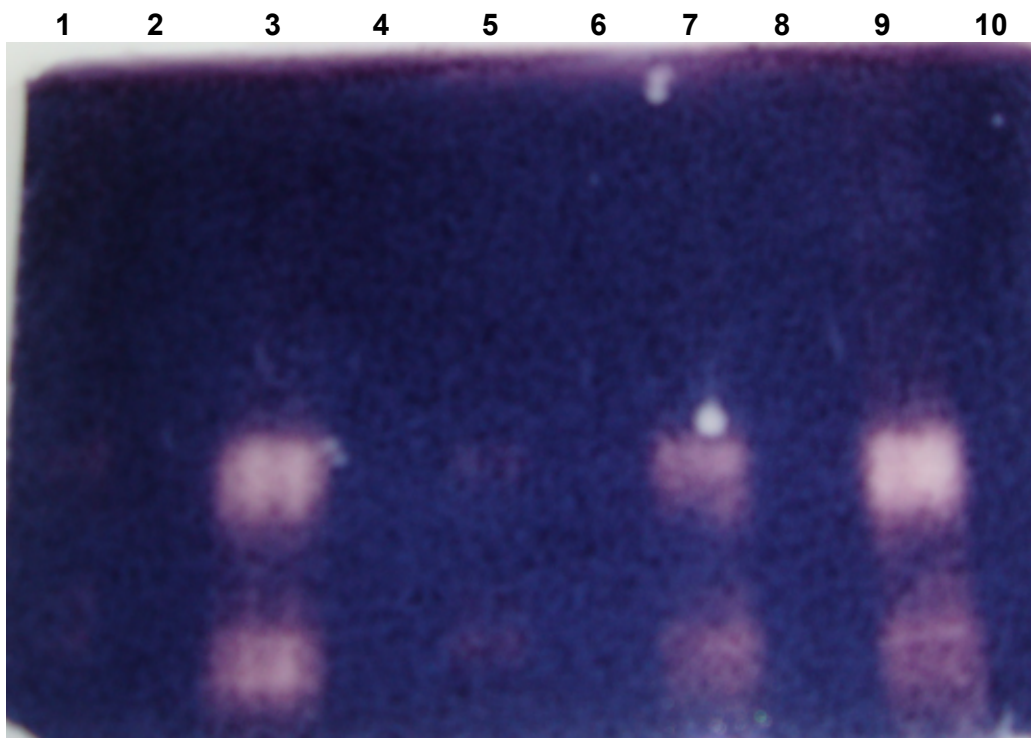


Figura 19 – Gel de atividade α -amilásica de macerado de larvas do inseto *C. maculatus* submetidas à alimentação contendo albuminas 2S, sem e com prévia incubação com albuminas 2S. 1 – larvas controle; 2 – larvas controle + pool de albuminas 2 S; 3 - larvas contendo 0,1 % de albuminas; 4 - larvas contendo 0,1 % de albuminas + pool de albuminas 2S; 5 - larvas contendo 0,2 % de albuminas; 6 - larvas contendo 0,2 % de albuminas + pool de albuminas 2S; 7 - larvas contendo 0,5 % de albuminas; 8 - larvas contendo 0,5 % de albuminas + pool de albuminas 2 S; 9 - larvas contendo 2 % de albuminas; 10 - larvas contendo 2 % de albuminas + pool de albuminas 2S.

4.6 – Estudo estrutural

4.6.1 – Estudos de modelagem por homologia das isoformas de albuminas 2S, Ric c 1 e Ric c 3

4.6.1.1 – Alinhamento de estrutura primária e determinação de estrutura secundária

O alinhamento de seqüência de Ric c 1 e Ric c 3, realizado utilizando o programa Clustal-W, mostrou 31 % de identidade e 79 % de similaridade para estas proteínas, além de apresentarem um padrão conservado de 8 cisteínas, que formam 4 pontes dissulfeto (Cys14–Cys73, Cys26–Cys62, Cys63–Cys109, e Cys75–Cys113) (Figura 20). Este padrão de pontes dissulfeto é conservado em membros da superfamília das prolaminas, e ajudam a manter a estrutura destas proteínas.

Para determinação da estrutura secundária, as isoformas, Ric c 1 e Ric c 3 foram submetidas a experimentos de dicroísmo circular (DC). Os espectros de DC mostram uma absorção positiva em 208 nm e uma absorção negativa em 216 nm (Figura 21), característicos de estruturas com predominância em α -hélices.

Realizamos também a predição de estrutura secundária de Ric c 1 e Ric c 3 (Figura 20) utilizando o programa Jpred, bem como o alinhamento e predição para outros membros de famílias relacionadas, e observamos predominância de α -hélices e alças conservados (Figura 20).

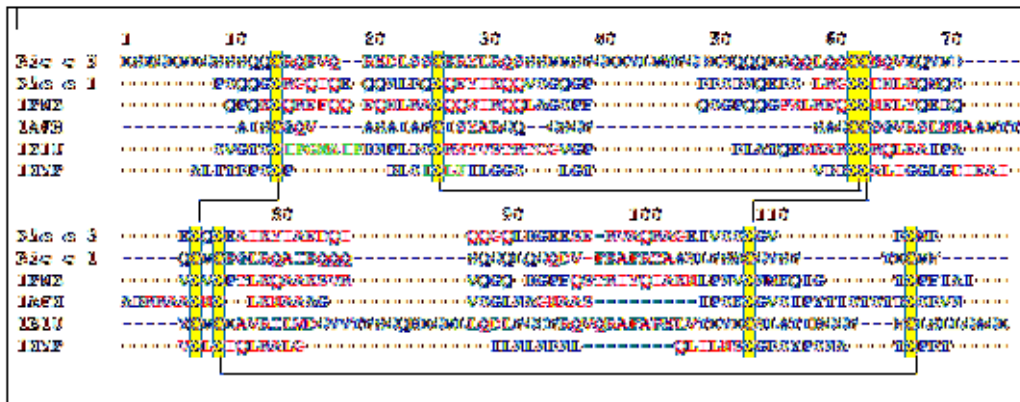


Figura 20 - Alinhamento das isoformas de albuminas 2S, Ric c 1 e Ric c 3, e de 4 membros de famílias com estruturas semelhantes (1PNB - albuminas 2S, Napin de *Brassica napus*), 1AFH - LTP de *Zea mays*, 1B1U- inibidor de α -amilase de *Eleusine coracana gaertneri* e 1HYP – Proteína hidrofóbica de soja de *Glycine max*). O alinhamento foi realizado como descrito por Pantoja-Uceda *et al.*, 2002. A predição de estrutura secundária foi realizada utilizando JPred server, onde α -hélices são representadas em vermelho, folhas- β em verde e regiões não estruturadas em azul. As cisteínas são marcadas em amarelo e as pontes dissulfeto são conectadas por linhas pretas.

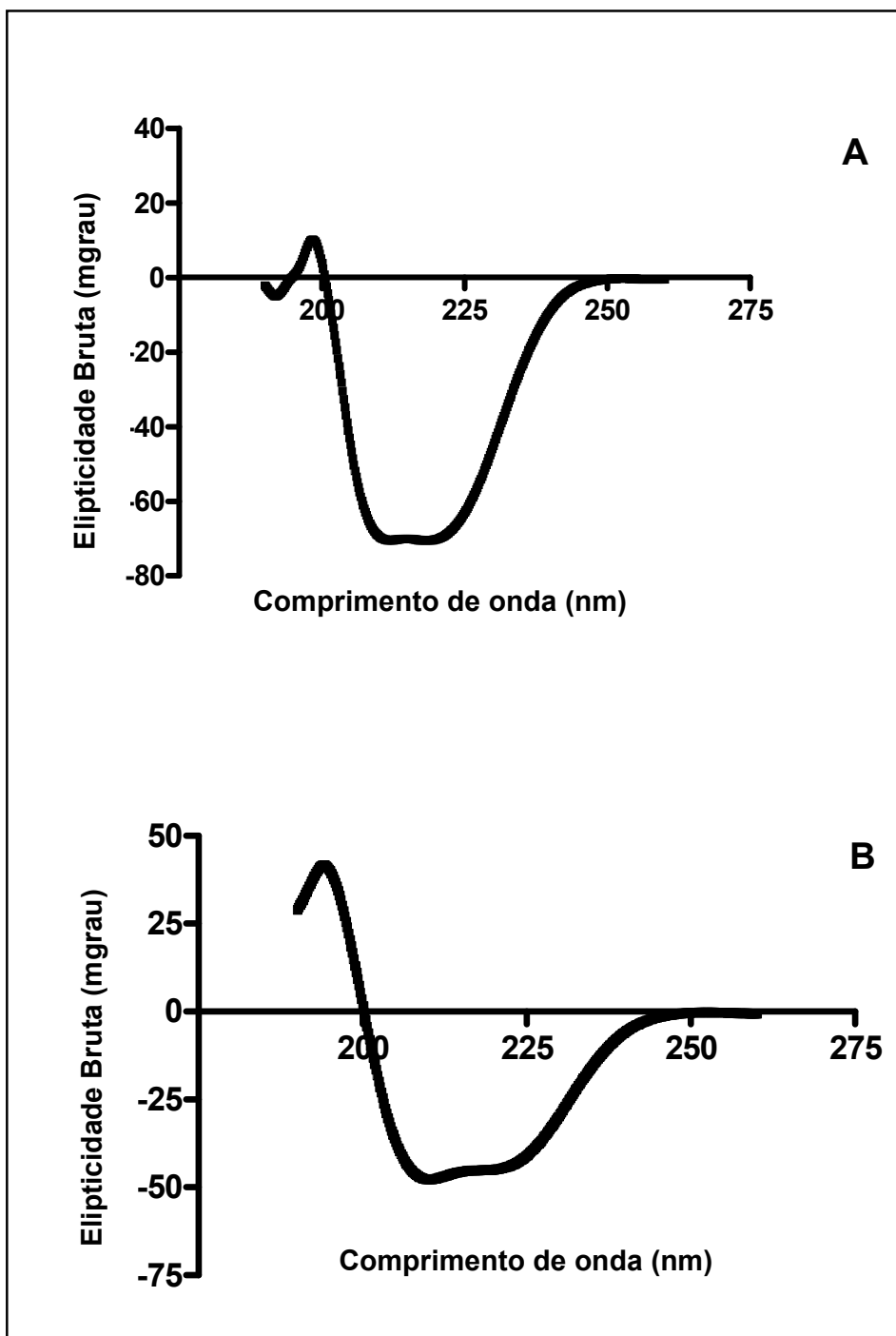


Figura 21 - Dicroísmo circular das isoformas de albuminas 2S. (A) Espectro de Ric c 1; (B) – Espectro de Ric c 3. Os espectros foram obtidos em água utilizando cubeta de quartzo, com caminho ótico de 0,1 cm.

4.6.1.2 - Modelagem da isoforma de albumina 2S, Ric c 3

A isoforma de albumina 2S, Ric c 3 foi escolhida como molde para a modelagem molecular por homologia de Ric c 1, visto que sua estrutura tridimensional já havia sido determinada por RMN (Pantoja-Uceda *et al.*, 2002) (PDB 1PSY), e apresentava semelhanças estruturais e biológicas com Ric c 1.

A estrutura 3D de Ric c 3, determinada por RMN, foi construída a partir da proteína obtida por super-expressão em *Escherichia coli*. A estrutura apresenta um peptídeo sinal (Ala-Glu-Phe-Met), um peptídeo de ligação entre as cadeias leve e pesada (Glu-Val-Leu-Arg-Met-Pro-Gly-Asp-Glu-Asn), e um tripeptídeo no parte C-terminal (Arg-Thr-Asn). Estes peptídeos não estão presentes na proteína nativa, e foram retirados para simular a proteína como em sua forma nativa.

A figura 22A apresenta a estrutura de Ric c 3 determinada por RMN, onde podem ser observadas 5 α -hélices (α_1 - α_5) organizadas em uma super-hélice de direita. Este motif foi primeiro observado em proteínas transportadoras de lipídeos não específicas (nsLTPs) e posteriormente observada em albuminas 2S. Na figura 22A também podemos observar os peptídeos da molécula precursora, descritos acima, marcados em verde. A figura 22B apresenta a estrutura de Ric c 3 processada, ou seja, com os peptídeos retirados. Podemos observar que a proteína mantém sua estrutura geral após a clivagem, conservando o motif de α -hélices. A figura 22C apresenta Ric c 3 com as cadeias leve (cinza) e pesada (vermelho) destacadas. Além disso, podemos observar as 4 pontes dissulfeto (amarelo), duas pontes entre as cadeias, mantendo as cadeias leve e pesada unidas, e duas pontes intra-cadeias. A estrutura de Ric c 3 apresenta 2 α -hélices na cadeia leve (α_1 - Cys14-Arg19, α_2 - Cys26-Arg31) e 3 na cadeia pesada (α_3 - Gln6-Lys16, α_4 - Cys22-Gln37, α_5 - Ser45-Cys59). A figura 22D apresenta a sobreposição das estruturas de Ric c 3, determinada por RMN (cinza), e Ric c 3 processada (vermelho), com as pontes dissulfeto (amarelo), a sobreposição mostra que não há diferenças significativas entre as duas estruturas.

Para avaliar a qualidade das estruturas de Ric c 3 nós calculamos, utilizando o programa Procheck, o mapa de Ramachandran para a estrutura de Ric c 3 determinada por RMN (Figura 23A) e para a estrutura de Ric c 3 processada

(Figura 23B). Comparando os mapas de Ramachandran, podemos observar que a estrutura de Ric c 3 processada apresenta boa estereoquímica, visto que 58,8 % dos resíduos de aminoácidos se encontram em regiões mais favoráveis, 30,7 % dos resíduos de aminoácidos se encontram em regiões favoráveis e 10,5 % dos resíduos de aminoácidos se encontram em regiões menos favoráveis, o que é bem semelhante ao observado para a estrutura de Ric c 3 determinada por RMN, e utilizada como molde, a qual apresenta 62,9 % dos resíduos de aminoácidos em regiões mais favoráveis, 26,8 % dos resíduos de aminoácidos em regiões favoráveis e 10,3 % dos resíduos de aminoácidos em regiões menos favoráveis.

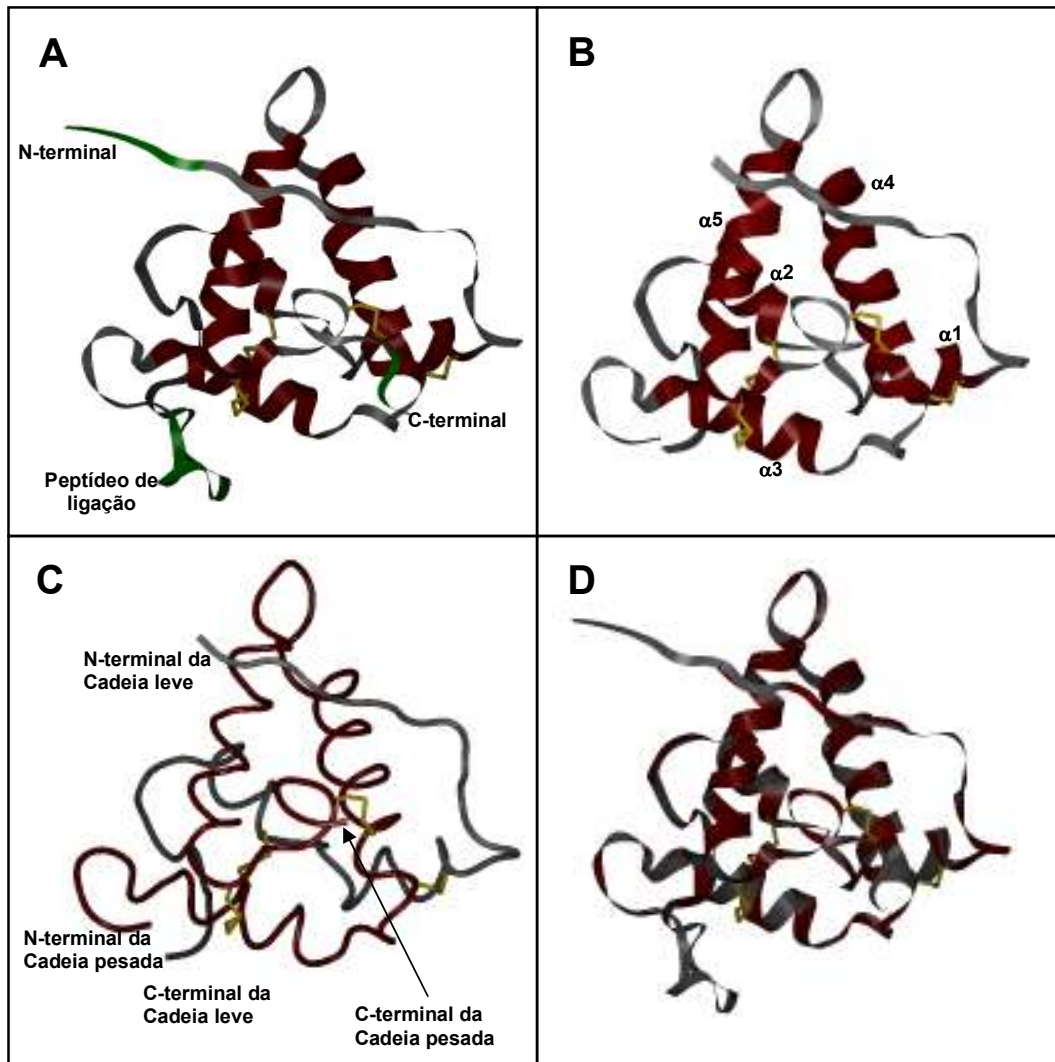


Figura 22 – Estrutura de Ric c 3. A – Estrutura de Ric c 3, sem processamento, determinada por RMN. Em verde estão destacados os peptídeos que são removidos. B – Estrutura de Ric c 3 após processamento com as α -hélices destacadas ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$ e $\alpha 5$). C – Estrutura de Ric c 3 processada com a cadeia leve em cinza, a cadeia pesada em vermelho e as pontes dissulfeto em amarelo. D – Sobreposição das estruturas de Ric c 3 determinada por RMN e Ric c 3 processada, com as pontes dissulfeto destacadas em amarelo.

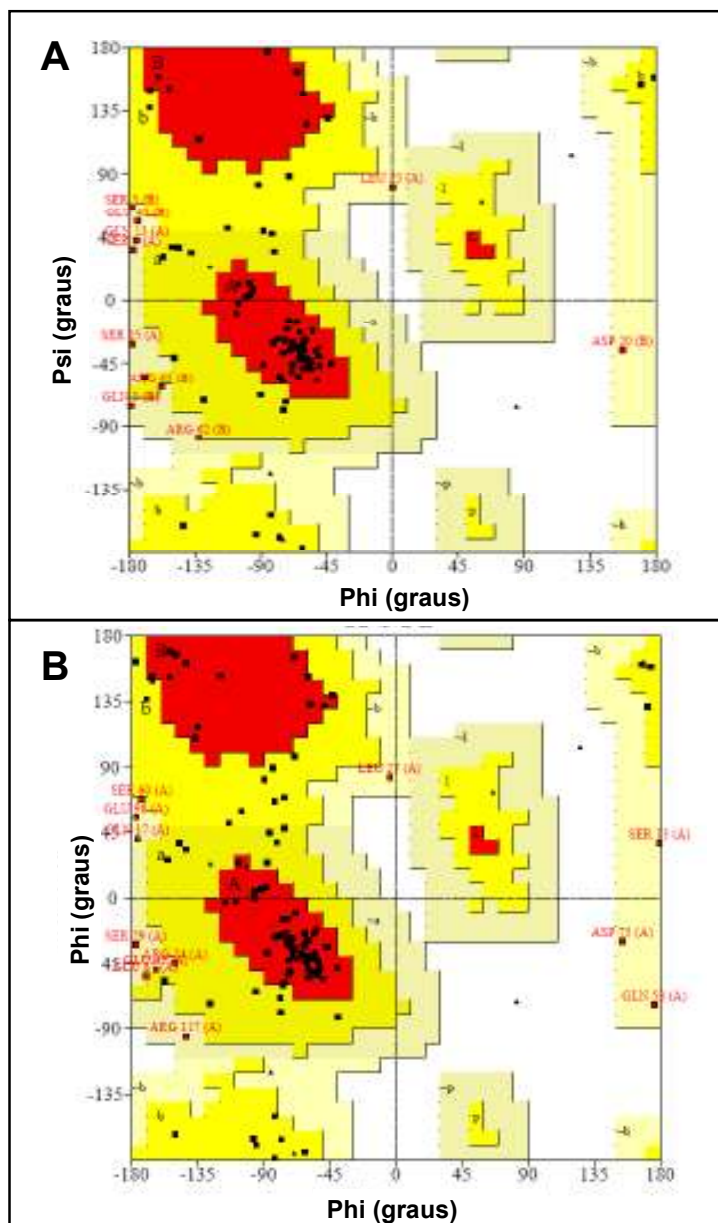


Tabela 1 - Mapa estatístico:

| | RMN | Processada |
|--|--------|------------|
| Resíduos em regiões mais favoráveis [Vermelho - A,B,L] | 62,9 % | 58,8 % |
| Resíduos em regiões favoráveis [Amarelo - a, b, l, p] | 26,8 % | 30,7 % |
| Resíduos em regiões menos favoráveis [Bege - ~a, ~b, ~l, ~p] | 10,3 % | 10,5 % |

Figura 23 – Comparação dos mapas de Ramachandran das estruturas de Ric c 3 determinada por RMN (A) e Processada (B).

4.6.1.3 - Modelagem molecular por homologia da isoforma de albumina 2S, Ric c 1

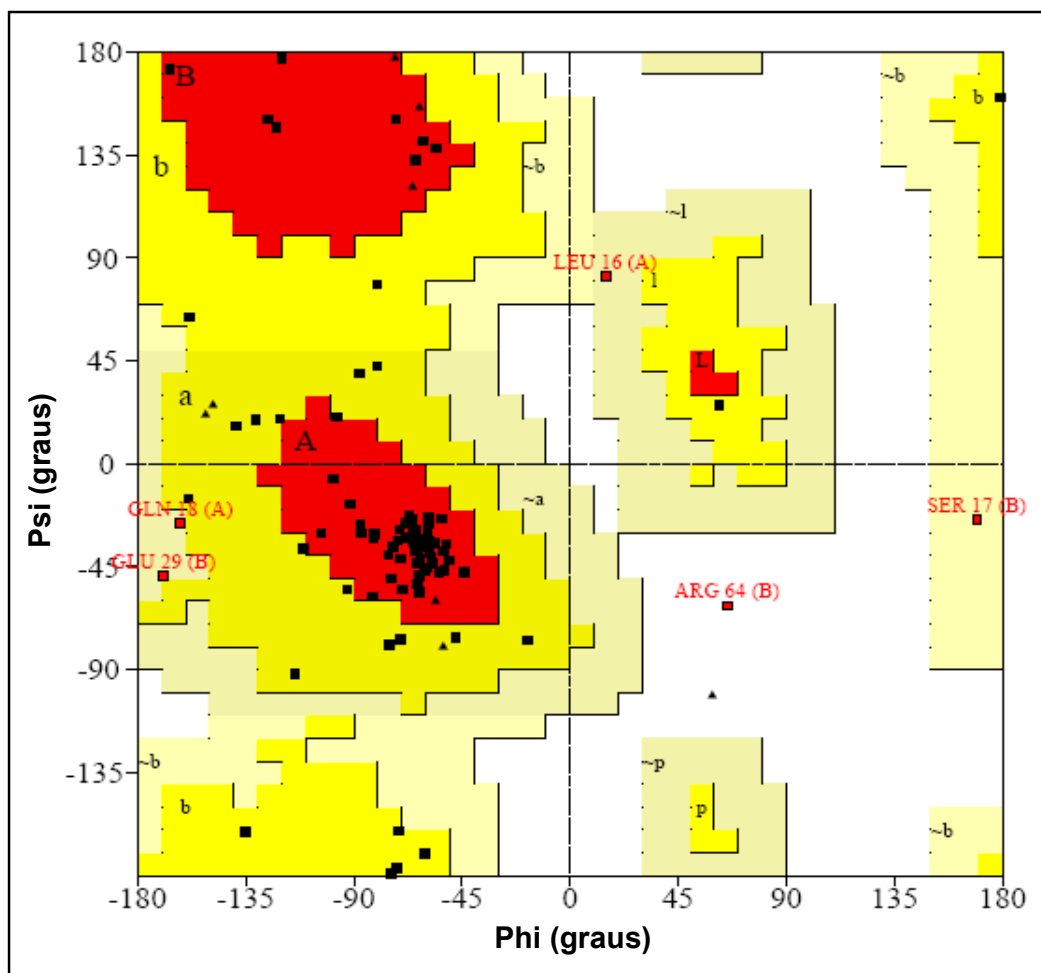
A estrutura teórica de Ric c 1 foi construída, utilizando o programa Swiss-Model server, tendo como *molde* a estrutura determinada por RMN de Ric c 3.

A qualidade do modelo construído foi avaliada utilizando o mapa de Ramachandran (Figura 24). A estrutura apresenta boa estereoquímica, visto que 67,1 % dos resíduos de aminoácidos se encontram em regiões mais favoráveis, 26,8 % dos resíduos de aminoácidos se encontram em regiões favoráveis, 4,9 % dos resíduos de aminoácidos se encontram em regiões menos favoráveis e 1,2 % dos resíduos de aminoácidos se encontram em regiões proibidas.

O modelo de Ric c 1 apresenta estrutura geral semelhante a Ric c 3, com um padrão de 5 α -hélices organizadas em uma super-hélice de direita (Figura 25), sendo duas α -hélices na cadeia leve (α_1 - Cys6-Glu12, α_2 - Cys19-Lys24) e três na cadeia pesada (α_3 - Arg3-Lys13, α_4 - Cys19-Gln34, α_5 - Glu44-Cys56) (Figura 25A). As cadeias, leve e pesada, são unidas por duas pontes dissulfeto (Figura 25B). A sobreposição das estruturas de Ric c 3 processada e Ric c 1, mostra que o modelo mantém o padrão estrutural, apresentando “Root mean square deviation” (RMSD) final de 2,09 Å. Devido ao longo N-terminal e ao peptídeo de ligação apresentados por Ric c 3, o RMSD pode chegar a 7,1 Å em algumas regiões (Figura 25C).

O perfil eletrostático da estrutura de Ric c 3 processada e da estrutura de Ric c 1 foi analisado, mostrando que em ambas as estruturas a distribuição de cargas não é uniforme (Figura 26). A estrutura de Ric c 3 apresenta 17 resíduos carregados positivamente e 17 resíduos carregados negativamente distribuídos pela superfície da molécula, sendo a maior concentração de carga negativa nas regiões N-terminal, na α -hélice 4, e na alça entre as α -hélices 4 e 5. A maior concentração de carga positiva na estrutura de Ric c 3 se encontra ao longo da cadeia leve. Diferente da estrutura de Ric c 1 que apresenta 13 resíduos carregados positivamente e apenas 9 resíduos carregados negativamente distribuídos pela superfície da molécula,

estando a maior concentração de carga negativa ao longo da cadeia pesada, e de carga positiva nas regiões do N- e C-terminal da cadeia leve.



Mapa estatístico:

- Resíduos em regiões mais favoráveis [Vermelho - A,B,L] – 67,1 %
- Resíduos em regiões favoráveis [Amarelo - a, b, l, p] – 26,8 %
- Resíduos em regiões menos favoráveis [Bege - ~a, ~b, ~l, ~p] – 4,9 %
- Resíduos em regiões proibidas – 1,2 %

Figura 24 – Mapa de Ramachandran do modelo de Ric c 1

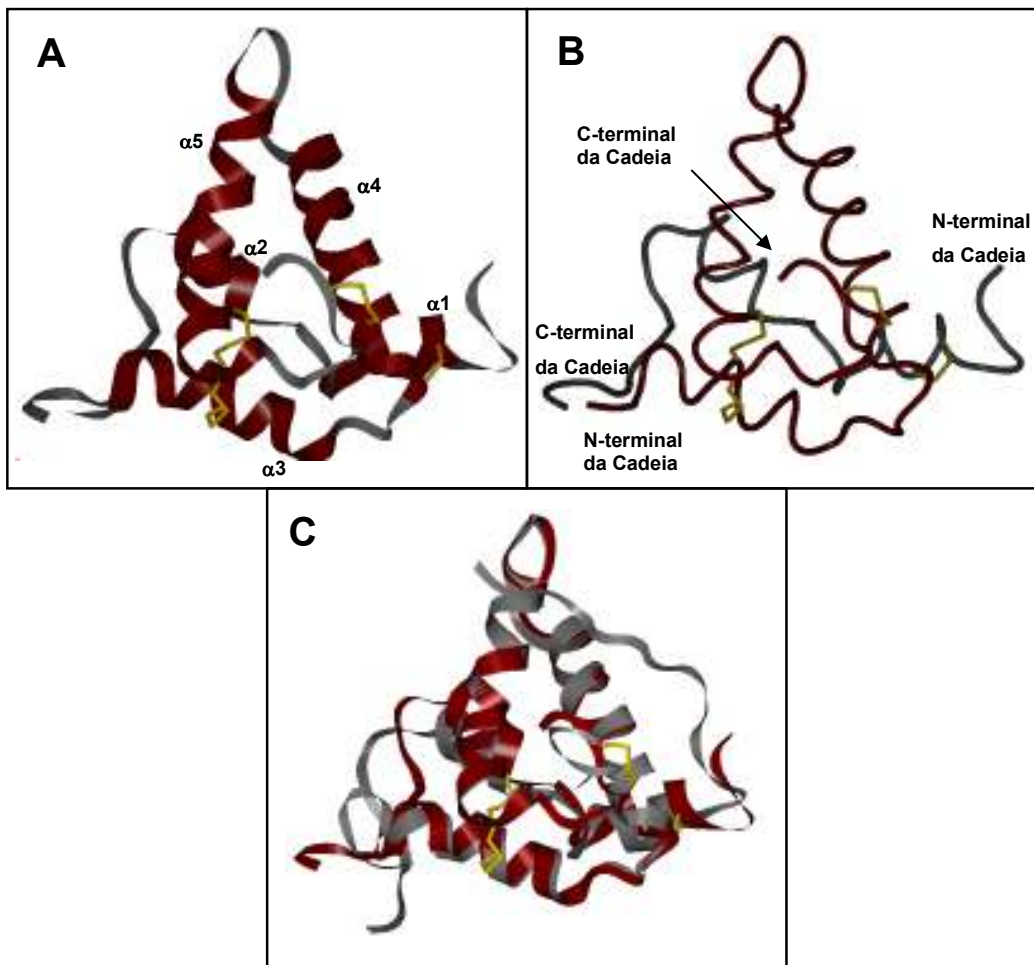


Figura 25 – Modelo de Ric c 1. A – Estrutura teórica de Ric c 1 destacando as 5 α -hélices. B – Estrutura teórica de Ric c 1 com as cadeias leve (cinza) e pesada (vermelho) destacadas e as pontes dissulfeto em amarelo. C – Sobreposição das estruturas teóricas de Ric c 1 e Ric c 3 processado.

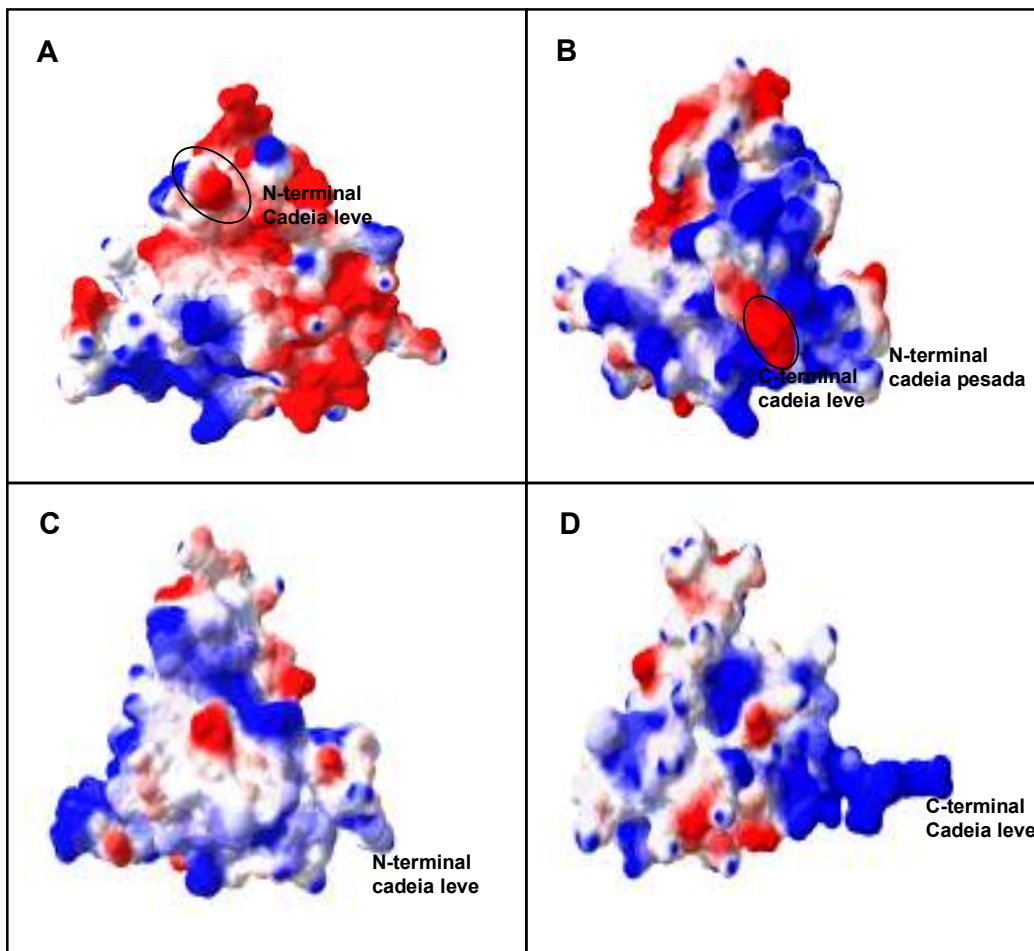


Figura 26 - Mapa de potencial eletrostático das estruturas de Ric c 3 processada e Ric c 1. A – Estrutura de Ric c 3 processada com o N-terminal da cadeia leve destacado. B - Estrutura de Ric c 3 processada (rotação de 180° em relação ao eixo na estrutura A), com C-terminal da cadeia leve e N-terminal da cadeia pesada destacados. C - Estrutura de Ric c 1 com o N-terminal da cadeia leve destacado. D - Estrutura de Ric c 1 (rotação de 180° em relação ao eixo na estrutura C), com C-terminal da cadeia leve destacado. As regiões eletronegativas estão representadas pela superfície vermelha e as regiões eletropositivas pela superfície azul.

4.6.2 – Construção e avaliação do complexo albumina 2S- α -amilase

No intuito de identificar a possível região de ligação entre Ric c 1 e Ric c 3, com alguma das α -amilases para as quais foram realizados os ensaios biológicos descritos nesta tese, selecionamos a partir dos complexos contendo α -amilase existentes na literatura a estrutura do complexo composto pelo inibidor bifuncional de tripsina e α -amilase, isolado de *Eleusine coracana*, denominado RBI que apresenta similaridade estrutural com as isoformas de albuminas 2S. A estrutura de RBI com α -amilase do inseto *T. molitor* (TMA), foi determinada por cristalografia de raios X. Como apresentado na figura 27, a TMA é constituída de 3 domínios (A azul, B em verde e C em bege), o sítio ativo se localiza em uma depressão em forma de V entre os domínios A e B, onde o RBI se encaixa.

A partir da sobreposição das estruturas de Ric c 1 e Ric c 3 com a estrutura de RBI em complexo com TMA, realizamos o “docking” de Ric c 1 e Ric c 3 com TMA, utilizando o programa Swiss-PDB-Viewer.

4.6.2.1 – Construção do complexo Ric c 1-TMA

No complexo formado entre Ric c 1 e TMA (Figura 28), o inibidor também se encaixa no sítio catalítico da enzima pela região N-terminal, que apresenta superfície parcialmente positiva, de modo similar ao apresentado por RBI (Figura 27). Os resíduos carregados positivamente podem ser importantes para ligação do inibidor na enzima que apresenta superfície predominantemente negativa, enquanto os resíduos neutros e carregados negativamente podem auxiliar na orientação, para viabilizar melhores interações.

O inibidor interage bloqueando o sítio catalítico da enzima. Resíduos da cadeia leve e da cadeia pesada do inibidor interagem diretamente via ligações de hidrogênio com resíduos dos domínios A e B da enzima (Figura 29 e Tabela 2). O sítio catalítico de TMA apresenta três resíduos importantes para a catálise, Asp185, Glu222, Asp287. O resíduo Gln4 do inibidor interage diretamente via ligação de hidrogênio com o resíduo catalítico da enzima, Glu222. Outras possíveis interações podem ser observadas entre alguns

resíduos do inibidor e da enzima que se encontram a distâncias menores que 4,0 Å (Tabela 2) levando ao bloqueio do sítio catalítico da enzima.

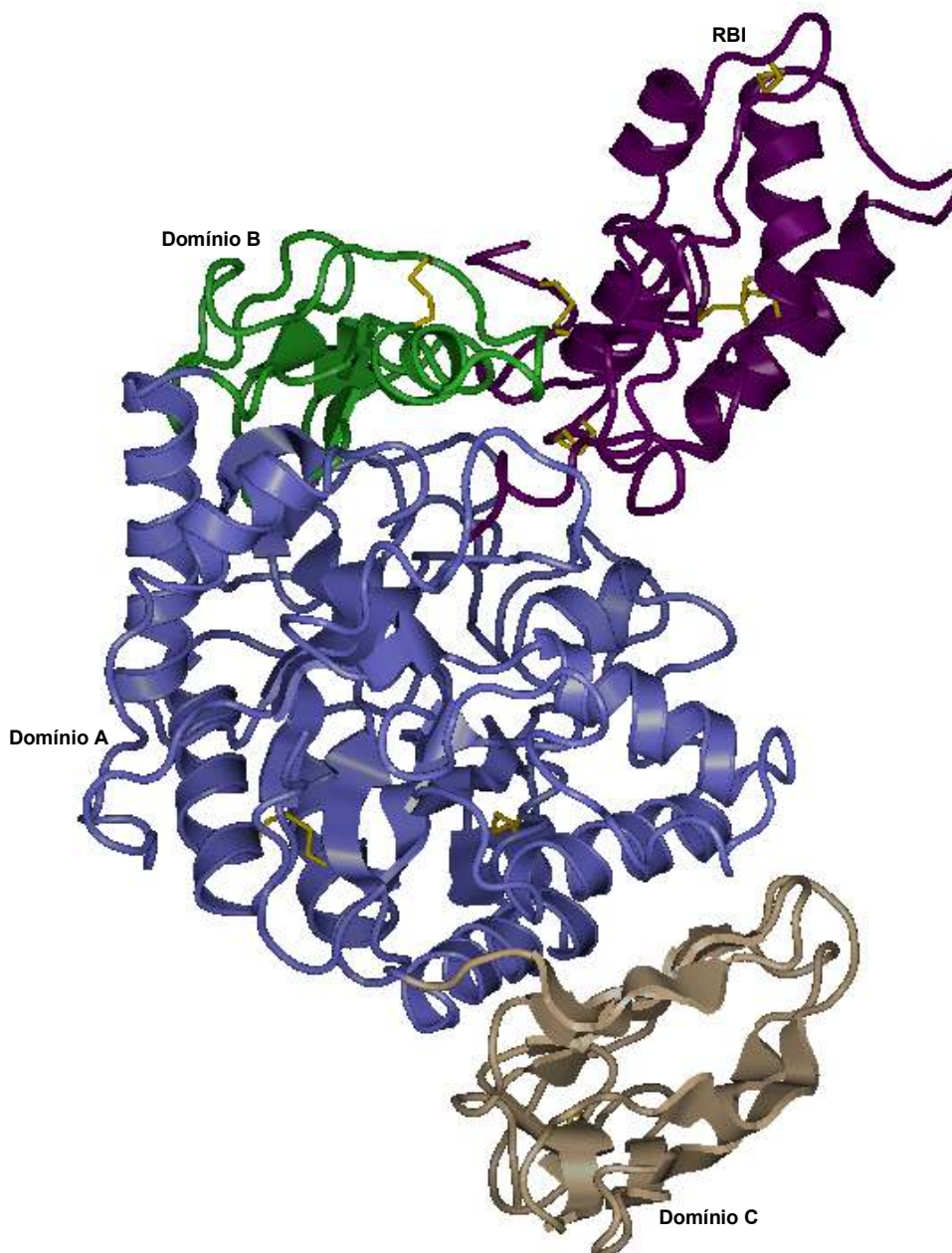


Figura 27 – Complexo RBI-TMA. O inibidor RBI é apresentada em violeta. Os 3 domínios de TMA, A, B e C, são apresentados em Azul, verde e bege, respectivamente. As pontes dissulfeto são apresentadas em amarelo.

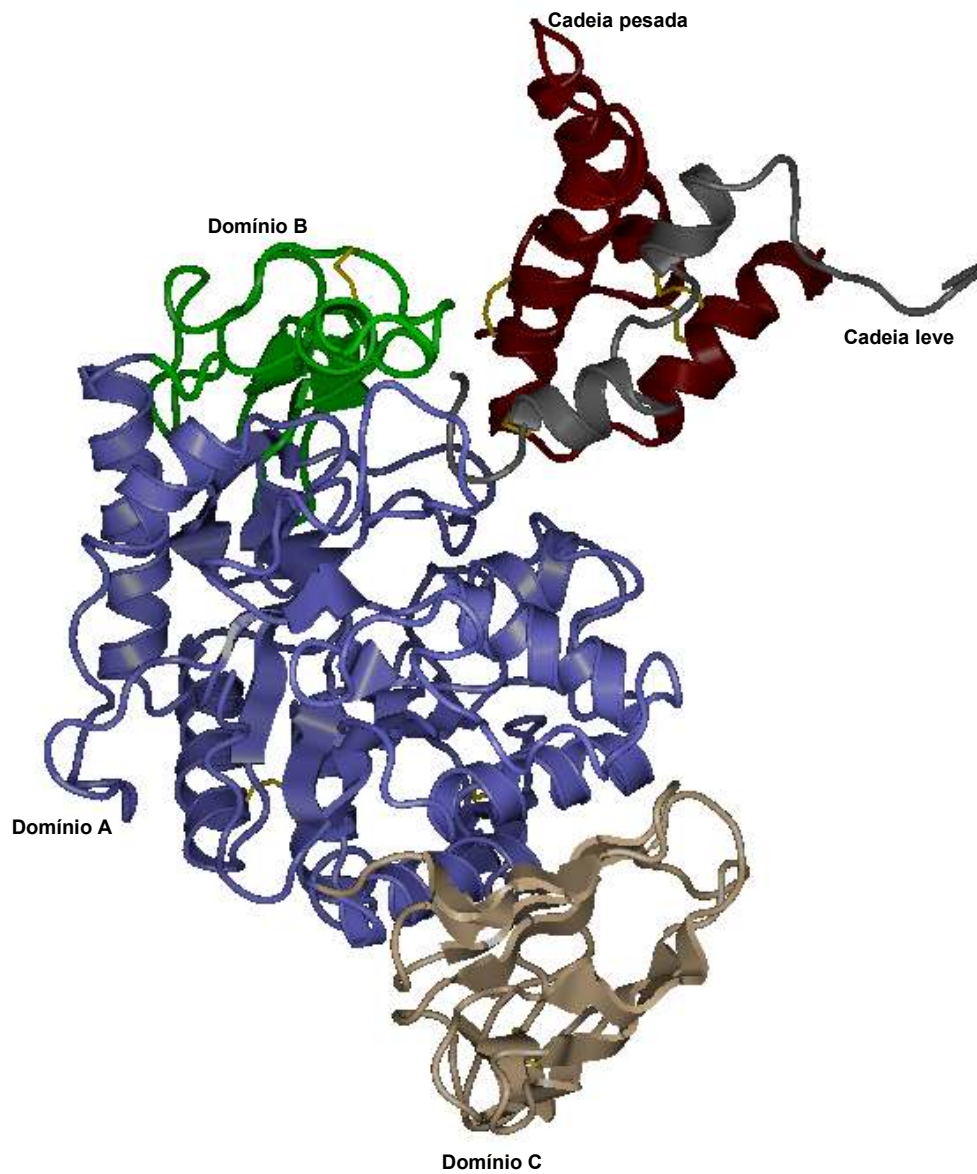


Figura 28 – Complexo Ric c 1-TMA. A cadeia leve de Ric c 1 é apresentada em cinza, e a cadeia pesada em vermelho. Os 3 domínios de TMA, A, B e C, são apresentados em Azul, verde e bege, respectivamente. As pontes dissulfeto são apresentadas em amarelo.

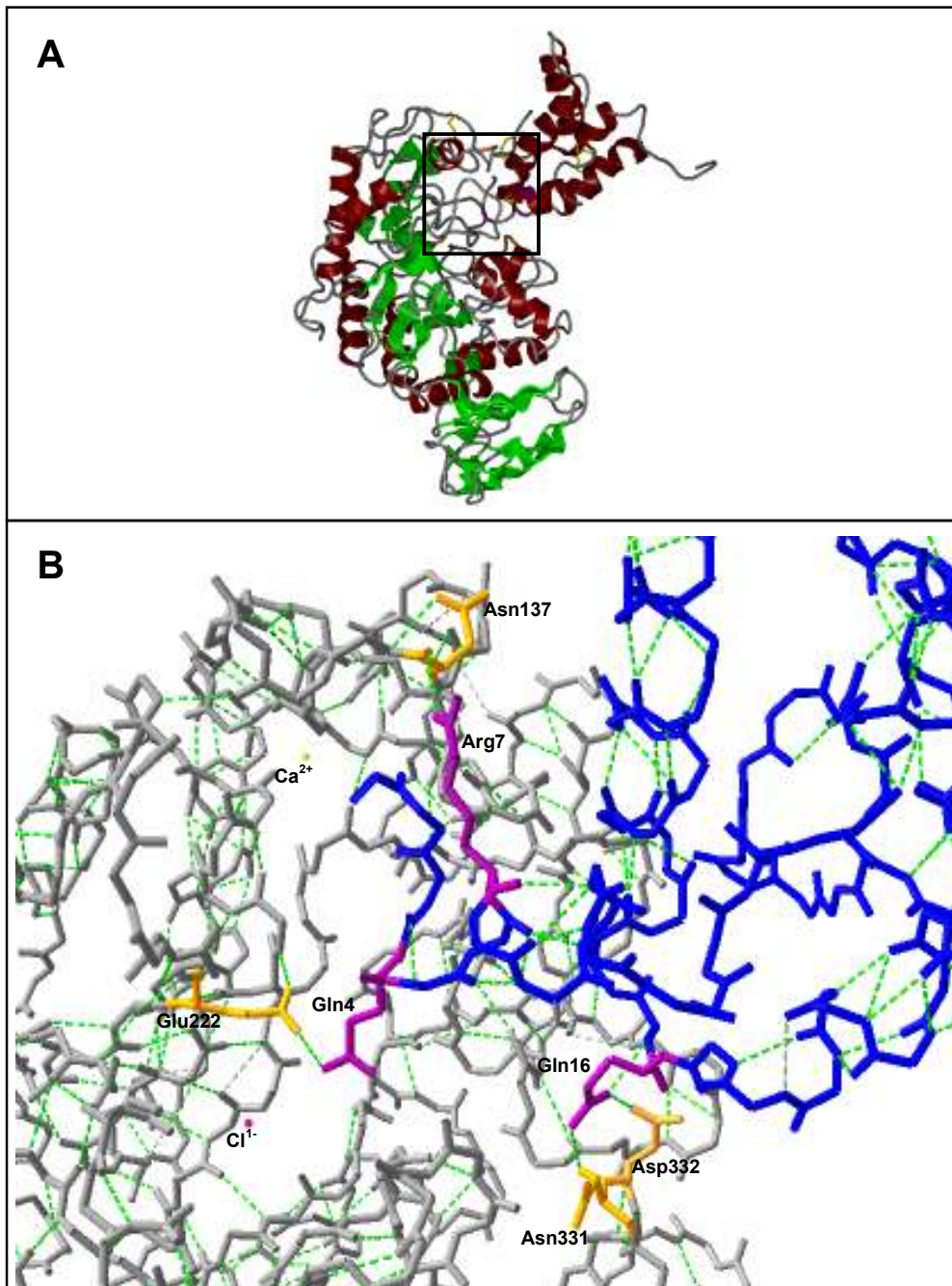


Figura 29 - Complexo teórico Ric c 1-TMA. A – Representação das estruturas secundárias, com α -hélices em vermelho, folhas- β em verde e alças em cinza. B - Visão do sítio catalítico de TMA, destacando as ligações de hidrogênio entre o inibidor e a enzima. Os resíduos de TMA estão em cinza, resíduos de Ric c 1 em azul e ligações de hidrogênio em verde. Os resíduos de Ric c 1 envolvidos em ligações de hidrogênio com TMA são apresentados em violeta, e os de TMA em laranja.

Tabela 2 - Interações observadas no complexo teórico Ric c 1- TMA.

| Ligações de hidrogênio entre Ric c 1 e TMA | | | | |
|---|---------------|------------|----------------|----------------------|
| Ric c 1 | Cadeia | TMA | Domínio | Distância (Å) |
| Gln4 | leve | Glu222 | A | 3,14 |
| Arg7 | leve | Asn137 | B | 3,17 |
| Gln16 | pesada | Asn331 | A | 2,48 |
| Gln16 | pesada | Asp332 | A | 2,26 |

| Distâncias menores que 4,0 Å entre Ric c 1 e TMA | | | | |
|---|---------------|------------|----------------|----------------------|
| Ric c 1 | Cadeia | TMA | Domínio | Distância (Å) |
| Gln3 | leve | Leu150 | B | 3,39 |
| Gln3 | leve | Leu150 | B | 2,94 |
| Gln3 | leve | Leu150 | B | 3,36 |
| Gln3 | leve | Leu150 | B | 2,97 |
| Gln3 | leve | Val151 | B | 2,69 |
| Gln4 | leve | Asp287 | A | 3,38 |
| Gln4 | leve | Asp287 | A | 3,71 |
| Gln9 | leve | Thr291 | A | 3,00 |
| Gln9 | leve | Thr291 | A | 3,72 |
| Ser17 | pesada | Asp332 | A | 2,82 |
| Glu22 | pesada | Val151 | B | 2,34 |

4.6.2.2 - Construção do complexo Ric c 3-TMA

No complexo formado entre Ric c 3 e TMA (Figura 30), o inibidor também se encaixa no sítio catalítico da enzima pela região N-terminal, que apresenta superfície parcialmente positiva. Assim como vimos para Ric c 1, os resíduos carregados positivamente podem ser importantes para ligação do inibidor na enzima que apresenta superfície predominantemente negativa, enquanto os resíduos neutros e carregados negativamente podem auxiliar na orientação, para viabilizar melhores interações.

Ric c 3 se encaixa, bloqueando o sítio catalítico de TMA, e os resíduos da cadeia leve e da cadeia pesada do inibidor interagem diretamente via ligação de hidrogênio com resíduos dos domínios A e B da enzima (Figura 31). O resíduo Gln12 do inibidor interage via ligação de hidrogênio com o resíduo catalítico Glu222 da enzima. Outras possíveis interações podem ser observadas entre alguns resíduos do inibidor e da enzima que se encontram a distâncias menores que 4,0 Å (Tabela 3) levando ao bloqueio do sítio catalítico da enzima.

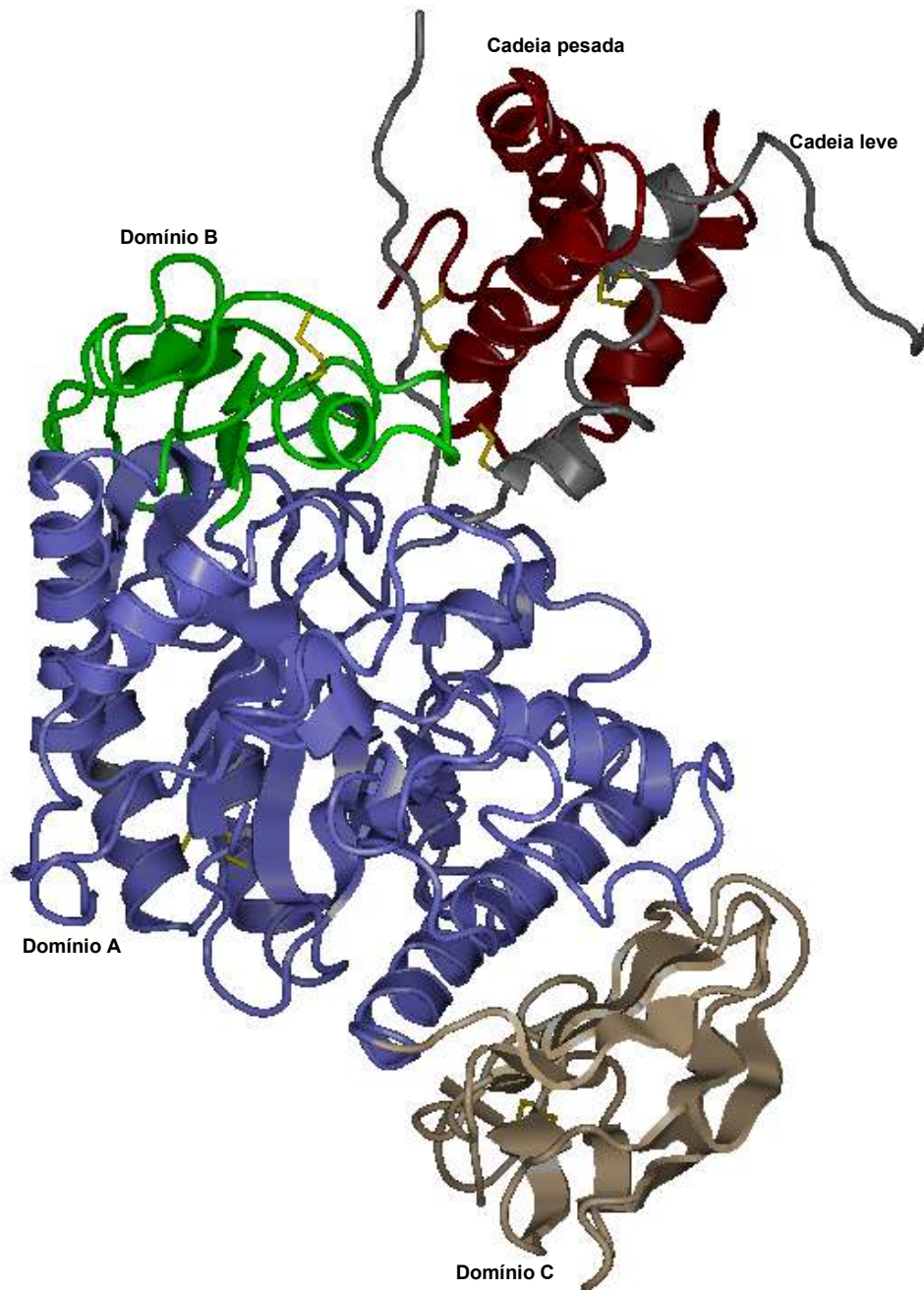


Figura 30 – Complexo teórico Ric c 3-TMA. A cadeia leve de Ric c 3 é apresentada em cinza, e a cadeia pesada em vermelho. Os 3 domínios de TMA, A, B e C, são apresentados em azul, verde e bege respectivamente. As pontes dissulfeto são apresentadas em amarelo.

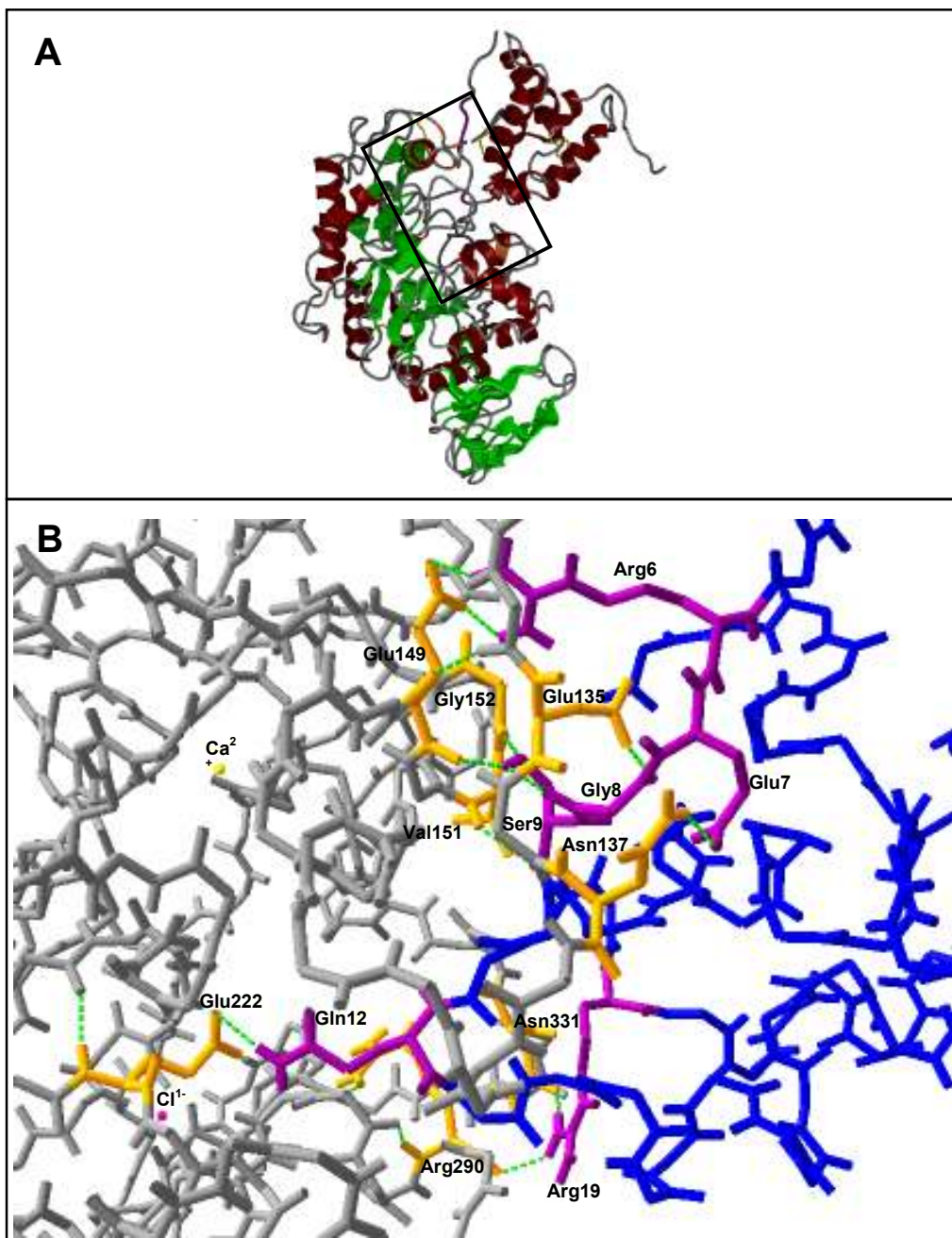


Figura 31 - Complexo teórico Ric c 3-TMA. A – Representação das estruturas secundárias, com α -hélices em vermelho, folhas- β em verde e alças em cinza. B - Visão do sítio catalítico de TMA, destacando as ligações de hidrogênio entre o inibidor e a enzima. Os resíduos de TMA estão em cinza, resíduos de Ric c 3 em azul e ligações de hidrogênio em verde. Os resíduos de Ric c 1 envolvidos em ligações de hidrogênio com TMA são apresentados em violeta, e os de TMA em laranja.

Tabela 3 – Interações observadas no complexo teórico Ric c 3-TMA.

| Ligações de hidrogênio entre Ric c 3 e TMA | | | | |
|---|---------------|------------|----------------|----------------------|
| Ric c 3 | Cadeia | TMA | Domínio | Distância (Å) |
| Arg6 | leve | Glu149 OE1 | B | 2,62 |
| Arg6 | leve | Glu149 OE2 | B | 2,22 |
| Glu7 | leve | Asn137 | B | 2,44 |
| Gly8 | leve | Glu135 | B | 2,0 |
| Ser9 | leve | Val151 | B | 2,35 |
| Ser9 | leve | Gly152 | B | 1,83 |
| Gln12 | leve | Glu222 | A | 2,34 |
| Arg19 | pesada | Asn331 | A | 1,98 |
| Arg19 | pesada | Arg290 | A | 2,15 |
| Distâncias iguais ou menores que 4,0 Å entre Ric c 3 e TMA | | | | |
| Arg6 | leve | Cys134, | B | 2,87 |
| Arg6 | leve | Pro133 | B | 3,54 |
| Glu7 | leve | Asn137 | B | 3,01 |
| Glu7 | leve | Glu135 | B | 4,0 |
| Glu7 | leve | Glu135 | B | 4,0 |
| Gly8 | leve | Glu135 | B | 3,54 |
| Gly8 | leve | Val136 | B | 2,78 |
| Gly8 | leve | Val136 | B | 3,0 |
| Ser9 | leve | Val151 | B | 3,15 |
| Gln12 | leve | Glu222 | A | 3,72 |
| Gln12 | leve | Glu222 | A | 2,81 |
| Asp20 | pesada | Asp332 | A | 2,83 |
| Asp20 | pesada | Asp332 | A | 4,0 |
| Glu21 | pesada | Trp57 | A | 3,49 |
| Glu21 | pesada | Asp332 | A | 3,28 |
| Glu21 | pesada | Asn331 | A | 3,85 |

4.6.3 – Estudo teórico de epitopos alergênicos nas isoformas de albuminas 2S, Ric c 1 e Ric c 3

A figura 3, apresentada na introdução, mostra a estrutura primária das proteínas Ric c 1 e Ric c 3 destacando os seis epitopos alergênicos previamente descritos por Felix e colaboradores (2008).

A partir das estruturas tridimensionais de Ric c 1 e Ric c 3, construímos a estrutura dos epitopos alergênicos e localizamos os resíduos de aminoácidos ácidos (ácido glutâmico e ácido aspártico), importantes para o processo alérgico (Figura 32).

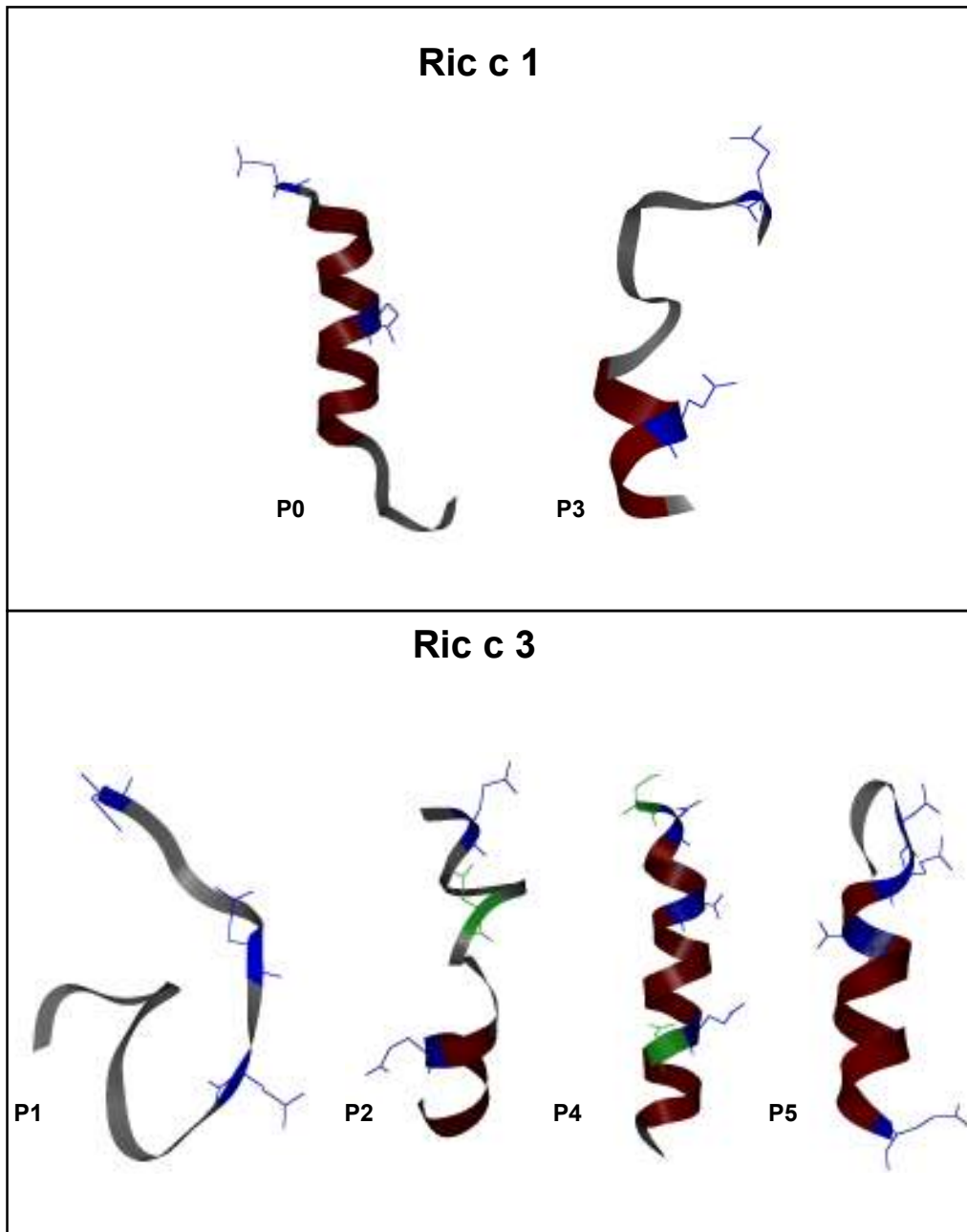


Figura 32 - Estruturas tridimensionais teóricas dos epitopos alergênicos de Ric c 1 (P0 e P3) Ric c 3 (P1, P2, P4 e P5), mostrando os resíduos de ácido glutâmico (azul) e ácido aspártico (verde) destacados.

4.6.4 – Estudos da relação estrutura atividade envolvendo as funções inibitória de α -amilase e alergênica de Ric c 1 e Ric c 3

A síntese e acumulação de proteínas de reserva em plantas vêm sendo relacionadas com a defesa destas plantas (Sales *et al.*, 2000; Franco *et al.*, 2002). As isoformas de albuminas 2S de *R. communis*, Ric c 1 e Ric c 3, são proteínas de reserva, alergênicas e foram capazes de inibir α -amilases (humana e de insetos). No intuito de manter a propriedade de defesa e inativar a função alergênica destas proteínas, que é prejudicial para humanos, realizamos estudos teóricos mutacionais.

4.6.4.1 – Desativação teórica dos epitopos alergênicos de Ric c 1 e Ric c 3

A presença de pelo menos 2 resíduos de aminoácidos carregados negativamente próximos é importante para o desencadeamento da alergia pelas albuminas 2S de *R. communis*. No intuito de propor a desalergenização das isoformas de albuminas 2S, Ric c 1 e Ric c 3, substituímos pelo menos um resíduo de ácido glutâmico presente em cada epitopo por resíduo de leucina (aminoácido neutro), preservando o resíduo Glu21 (cadeia leve) apontado como importante para a interação Ric c 1-TMA (Tabela 4 e Figura 33) e os resíduos Glu7 (cadeia leve) e Glu21 (cadeia pesada) importantes para a interação Ric c 3-TMA (Tabela 4 e Figura 33).

As estruturas teóricas de Ric c 1 e Ric c 3 mutadas apresentaram um discreto desvio, quando comparadas com as estruturas teóricas originais, com RMSD de 0.06 Å e 0.17 Å respectivamente.

Para avaliar a qualidade das estruturas teóricas de Ric c 1 e Ric c 3 mutadas nós calculamos, utilizando o programa Procheck, o mapa de Ramachandran e as estruturas apresentam boa estereoquímica, assim como, as estruturas originais.

Tabela 4 – Mutações propostas para desativar epítopos alérgicos em Ric 1 e Ric c 3, utilizando modelagem molecular.

| Albuminas 2S | Original | | Mutado | |
|--------------|-------------|---------------|-------------|---------------|
| | Cadeia leve | Cadeia pesada | Cadeia leve | Cadeia pesada |
| Ric c 1 | Glu12 | Glu2 | Leu12 | Leu2 |
| | Glu21 | Glu22 | Glu21 | Leu22 |
| | | Glu29 | | Leu29 |
| | | Glu44 | | Leu44 |
| | | Glu62 | | Glu62 |
| Ric c 3 | Glu1 | Glu4 | Leu1 | Leu4 |
| | Glu5 | Glu21 | Leu5 | Glu21 |
| | Glu7 | Glu25 | Glu7 | Leu25 |
| | Glu17 | Glu32 | Leu17 | Leu32 |
| | Glu27 | Glu43 | Leu27 | Leu43 |
| | Glu41 | Glu44 | Glu41 | Leu44 |
| | | Glu46 | | Leu46 |
| | | Glu54 | | Glu54 |

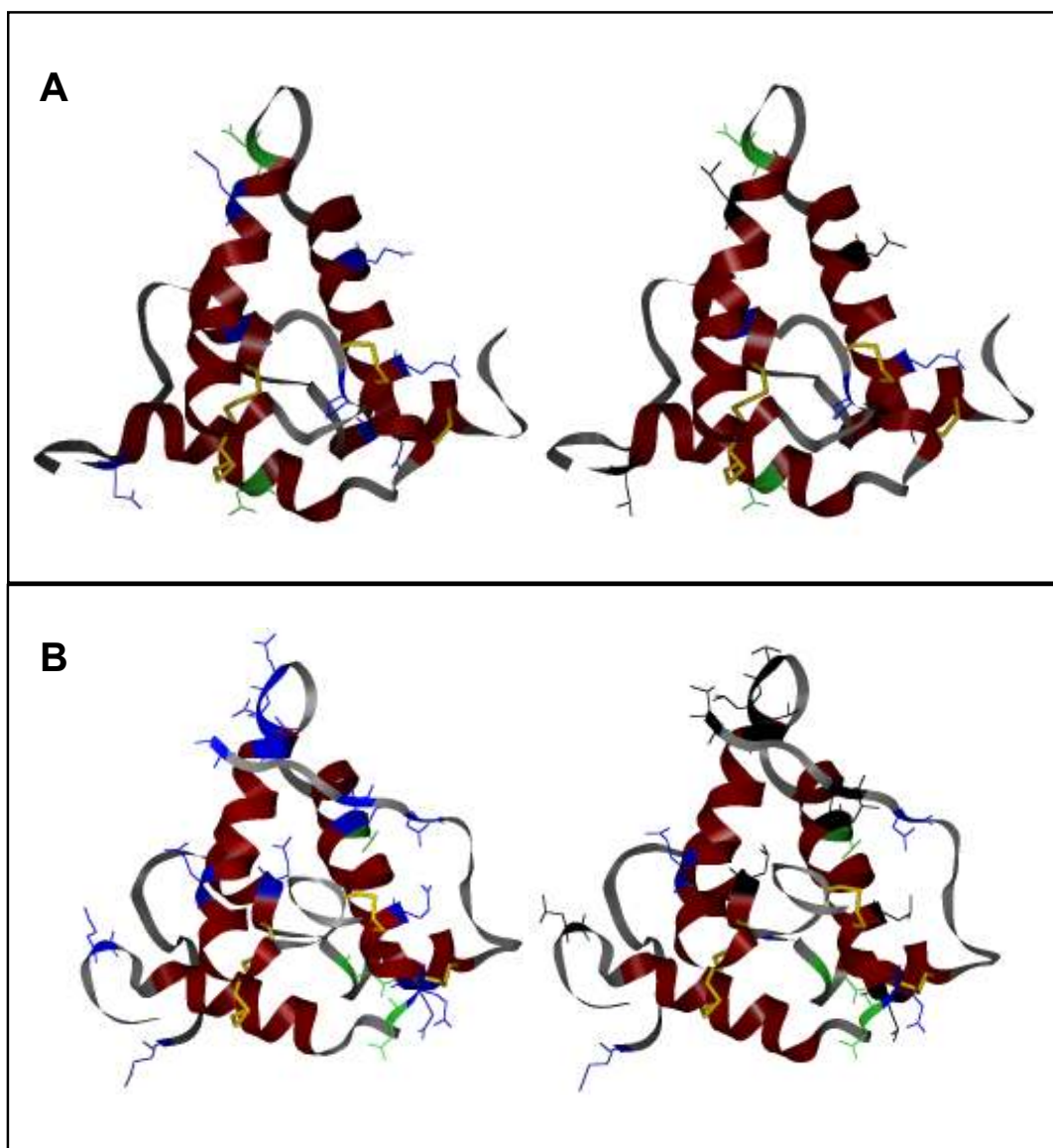


Figura 33 – Estruturas de Ric c 1 (A) e Ric c 3 (B) antes e após a mutação, respectivamente. Os resíduos de ácido glutâmico estão em azul, de ácido aspártico em verde e de leucina em preto.

4.6.4.2 – Construção dos complexos teóricos TMA-Ric c 1 mutado e TMA-Ric c 3 mutado

Para verificar se a proposta de desalergenização de Ric c 1 e Ric c 3 manteve sua função como inibidoras de α -amilase, propriedade que acreditamos estar envolvida no processo de defesa da planta contra insetos, nós construímos os modelos para os complexos destas proteínas com a α -amilase do inseto *T. molitor*.

As α -amilases são proteínas que apresentam superfície carregada negativamente, e alguns complexos estudados entre α -amilase e seu inibidor, mostram que resíduos carregados positivamente no inibidor são importantes neste processo (Vértesy *et al.*, 1984; Bompard-Gilles *et al.*, 1996, Carugo *et al.*, 2001). Nos modelos gerados de Ric c 1 e Ric c 3, mantivemos os resíduos carregados positivamente, e somente alguns resíduos de ácido glutâmico foram trocados por resíduos de leucina. Com base nos complexos gerados entre TMA e Ric c 1 e Ric c 3, nós construímos os complexos teóricos TMA-Ric c 1 mutado e TMA-Ric c 3 mutado (Figuras 34 e 36 respectivamente).

Os complexos mutados construídos apresentam discreto desvio, com RMSD de 0.08 Å para TMA-Ric c 1 mutado, em relação a TMA-Ric c 1 e 0.10 Å para TMA-Ric c 3 mutado, em relação a TMA-Ric c 3. No complexo TMA-Ric c 1 mutado em comparação com o complexo TMA-Ric c 1, podemos observar que a ligação de hidrogênio entre o resíduo Gln16 do inibidor e Asp332 da enzima não está presente, porém duas novas ligações de hidrogênio são formadas, Glu22 (cadeia pesada) com Val151 e Arg25 (cadeia pesada) com Glu135, enquanto as demais interações observadas para o complexo TMA-Ric c 1 são mantidas (Figura 35).

No complexo TMA-Ric c 3 mutado podemos observar que não ocorreram modificações no padrão de ligações de hidrogênio citados para o complexo TMA-Ric c 3 (Figura 37).

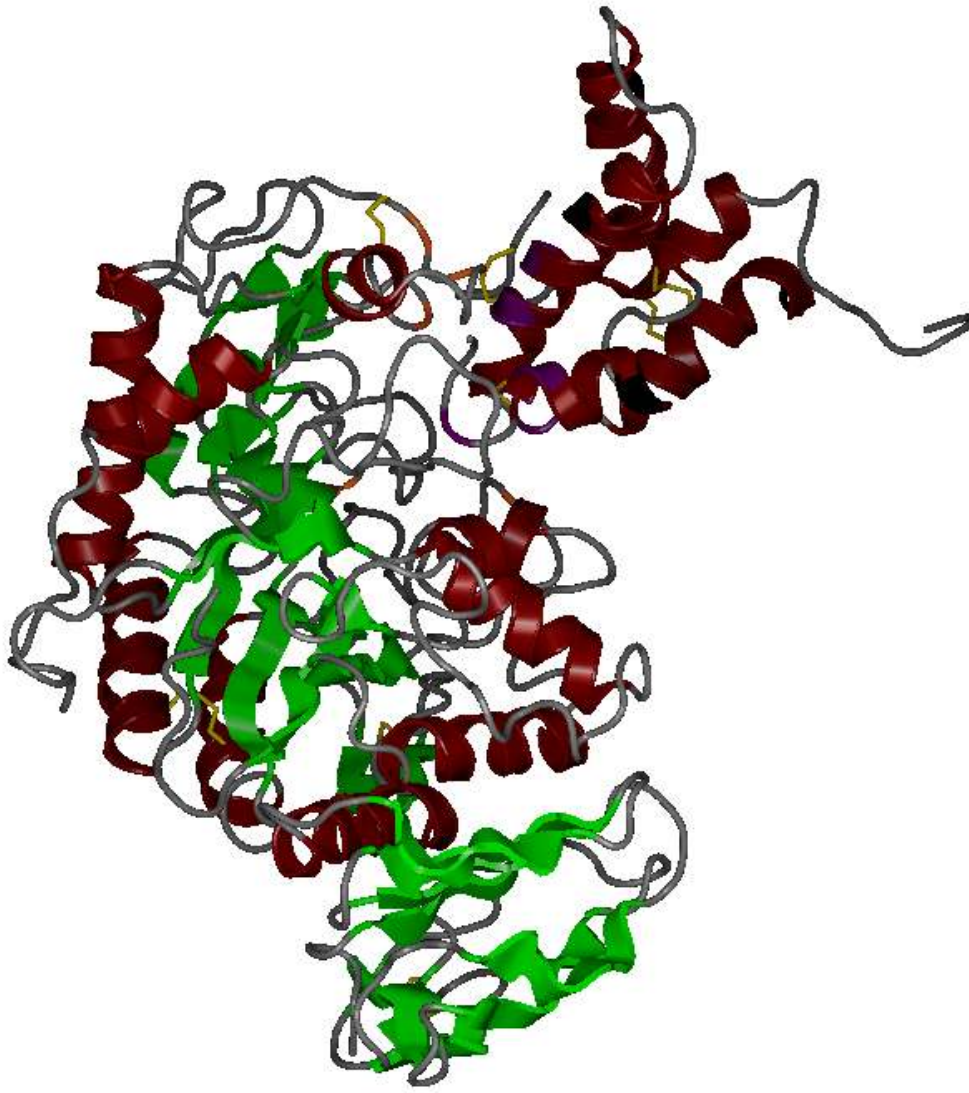


Figura 34 – Complexo TMA-Ric c 1 mutado, com os resíduos do inibidor envolvidos em ligações de hidrogênio com a enzima destacados em violeta e os resíduos da enzima envolvidos em ligações de hidrogênio com o inibidor destacados em laranja. α -Hélices em vermelho, folhas β em verde, alças em cinza e resíduos de leucina envolvidos na mutação em preto.

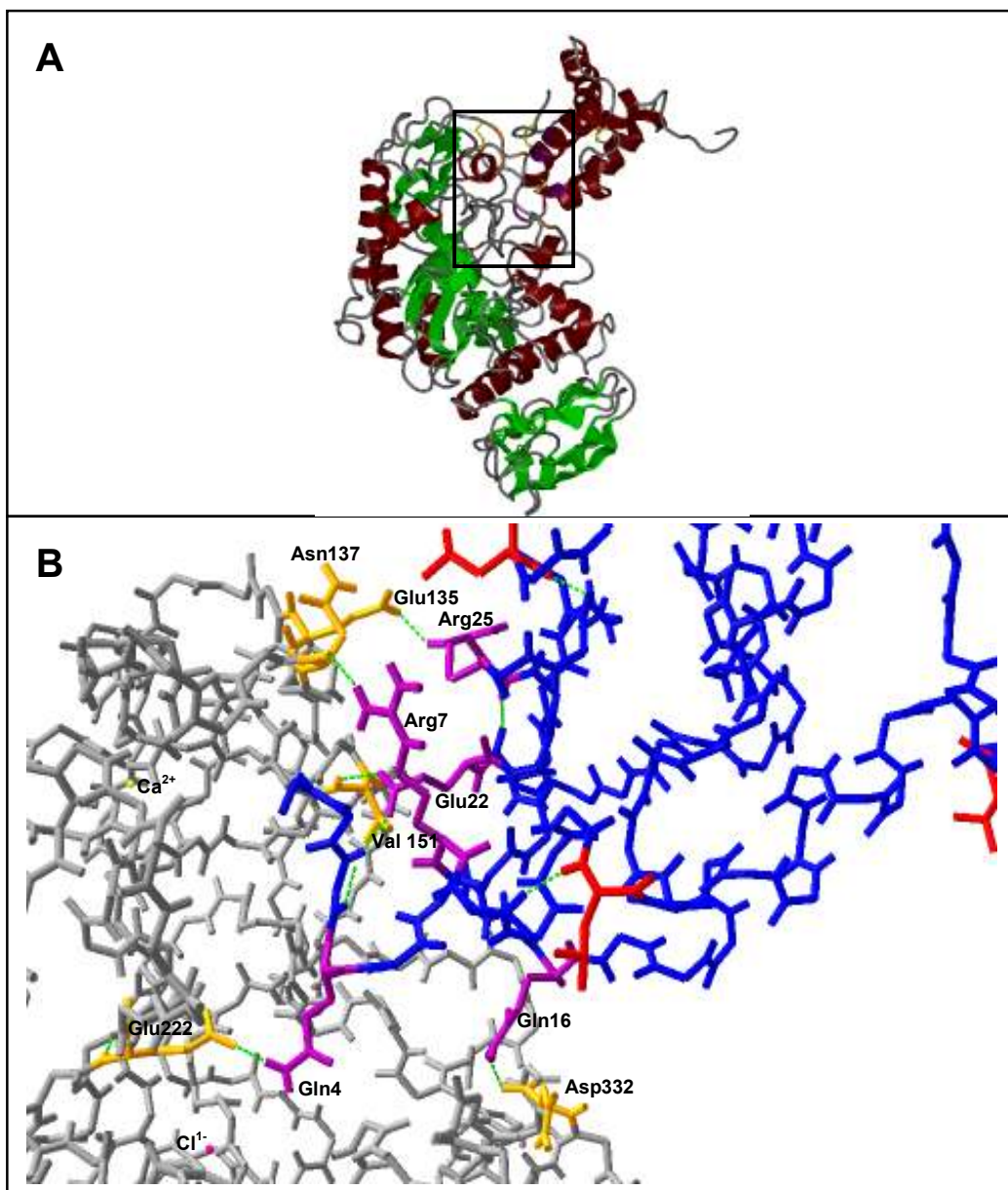


Figura 35 - Complexo teórico TMA- Ric c 1 mutado. A – Representação das estruturas secundárias, com α -hélices em vermelho, folhas- β em verde e loops em cinza. B - Visão do sítio catalítico de TMA, destacando as ligações de hidrogênio entre o inibidor e a enzima. Os resíduos de TMA estão em cinza, resíduos de Ric c 1 em azul e ligações de hidrogênio em verde. Os resíduos de Ric c 1 envolvidos em ligações de hidrogênio com TMA são apresentados em violeta e os de TMA em laranja. Resíduos de leucina envolvidos na mutação estão em vermelho.

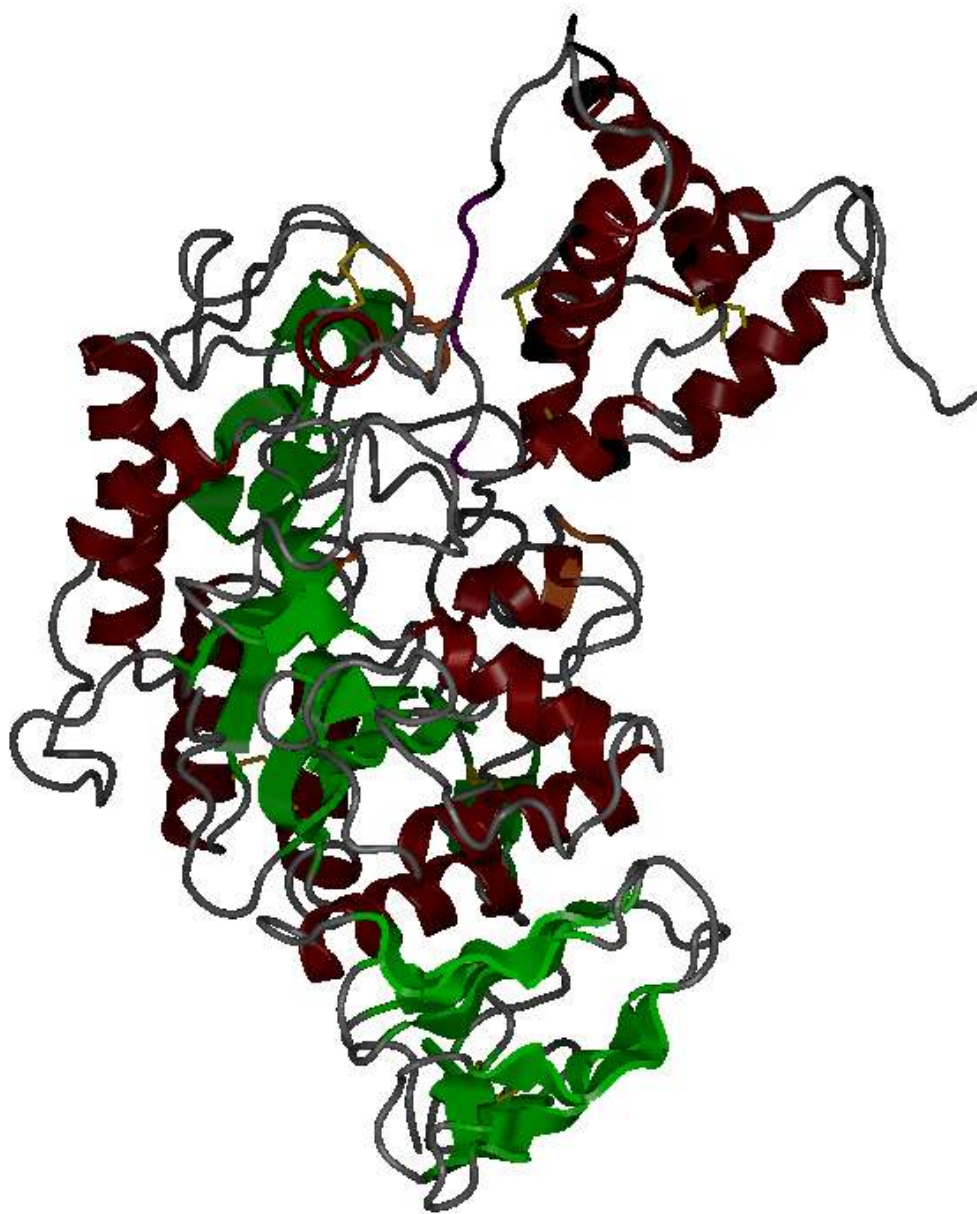


Figura 36 – Complexo TMA-Ric c 3 mutado, com os resíduos do inibidor envolvidos em ligações de hidrogênio com a enzima destacados em violeta e os resíduos da enzima envolvidos em ligações de hidrogênio com o inibidor destacados em laranja. α -Hélices em vermelho, folhas β em verde, loops em cinza e resíduos de leucina envolvidos na mutação em preto.

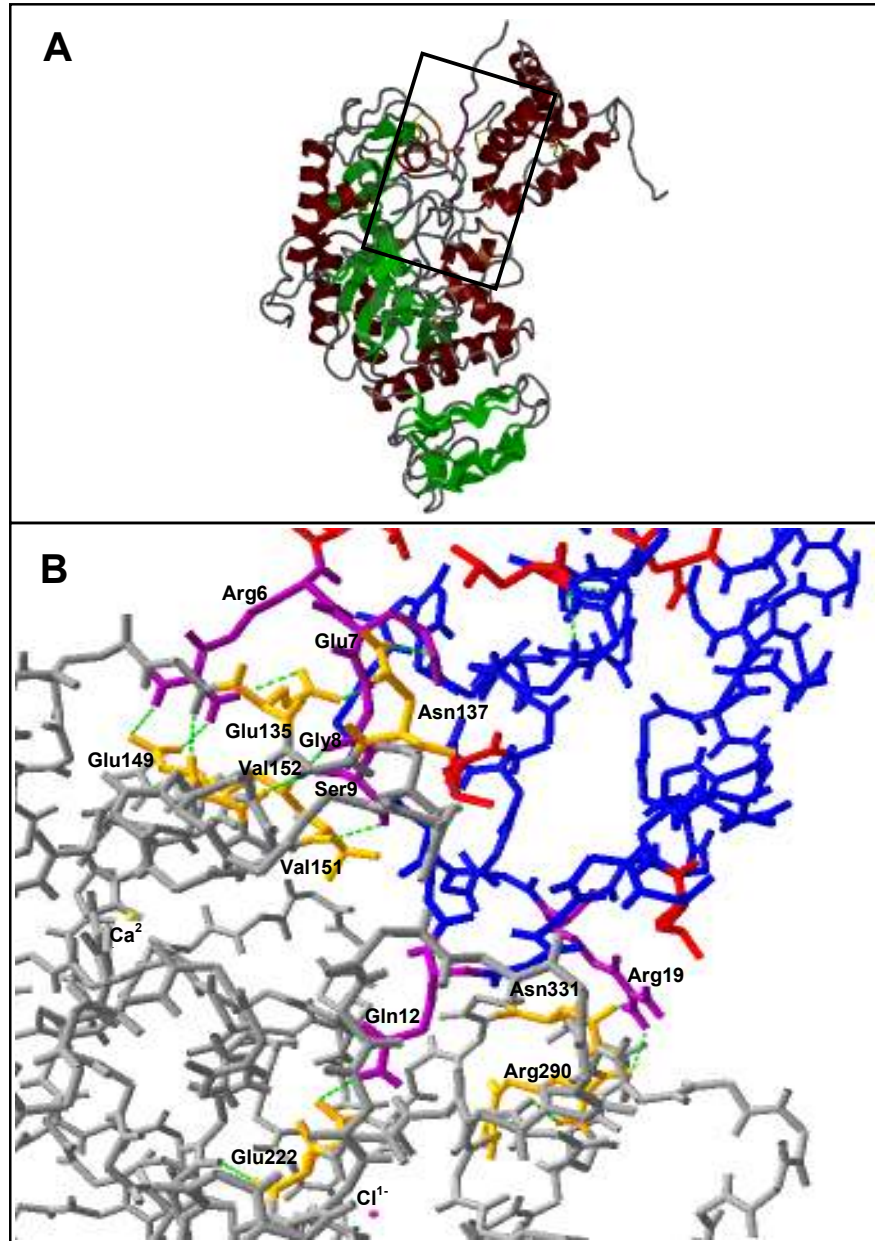


Figura 37 - Complexo teórico TMA- Ric c 3 mutado. A – Representação das estruturas secundárias, com α -hélices em vermelho, folhas- β em verde e alças em cinza. B - Visão do sítio catalítico de TMA, destacando as ligações de hidrogênio entre o inibidor e a enzima. Os resíduos de TMA estão em cinza, resíduos de Ric c 3 em azul e ligações de hidrogênio em verde. Os resíduos de Ric c 3 envolvidos em ligações de hidrogênio com TMA são apresentados em violeta e os de TMA em laranja. Resíduos de leucina envolvidos na mutação estão em vermelho.

4.6.5 – Estudos de dinâmica molecular das isoformas de albuminas 2S, Ric c 1 e Ric c 3

Os experimentos de dinâmica molecular foram realizados e analisados em colaboração com o Professor Jorge Hernandez Fernandez, no Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos, no Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

Para avaliar o comportamento das estruturas teóricas de Ric c 1 e Ric c 3, seu grau de liberdade conformacional, permitindo a melhor acomodação das regiões N e C-terminal destas proteínas, realizamos simulações de dinâmica molecular.

Para Ric c 3 utilizamos os primeiros 10 ns para equilibrar o sistema e calculamos então 58 ns de simulação. Nossas análises se concentraram de 10-58 ns e a trajetória da simulação é apresentada na figura 38. O gráfico mostra, através de códigos de cores a variação de estrutura secundária ao longo do tempo, onde podemos observar que as 5 α -hélices de uma forma geral se mantém durante o tempo de simulação, com pequenas variações na primeira α -hélice. Análises de clusterização da trajetória é apresentada na figura 39A mostrando a formação de 3 clusters principais, no início, no meio e no final da trajetória. A sobreposição das estruturas 3D durante a simulação, representando os 3 clusters, mostra uma maior movimentação na região N-terminal. Os valores de RMSD ao longo da simulação (Figura 39B) se mantiveram nas regiões de α -hélices, com maior flutuação nos loops e nas regiões N e C-terminais das cadeias leve e pesada (Figura 40).

Para Ric c 1, nós calculamos 60 ns de simulação. A trajetória da simulação é apresentada na figura 41, onde podemos observar que os elementos de estrutura secundária são mantidos durante a simulação. Com as análises de clusterização da trajetória (Figura 42A) podemos observar, 3 clusters, assim como para Ric c 3. O terceiro cluster em Ric c 1, é mais estável, mostrando que a estrutura se mantém, talvez pela região N-terminal em Ric c 1 (5 resíduos) ser bem menor do que em Ric c 3 (13 resíduos). Na avaliação dos clusters e da variação de RMSD ao longo da simulação, observamos que as α -

hélices são mantidas, enquanto as regiões de N- e C-terminais nas cadeias leve e pesada apresentam maior flutuação, porém esta flutuação é bem menor que a observada para Ric c 3 (Figura 42B).

A figura 43 apresenta a sobreposição das estruturas 3D durante a simulação, representando os 3 clusters, podemos reforçar o que foi citado acima, como Ric c 1 apresenta N-terminal menor que Ric c 3, e além disso, uma cisteína, que forma ponte dissulfeto, como sexto resíduo, a movimentação na região N-terminal é muito menor.

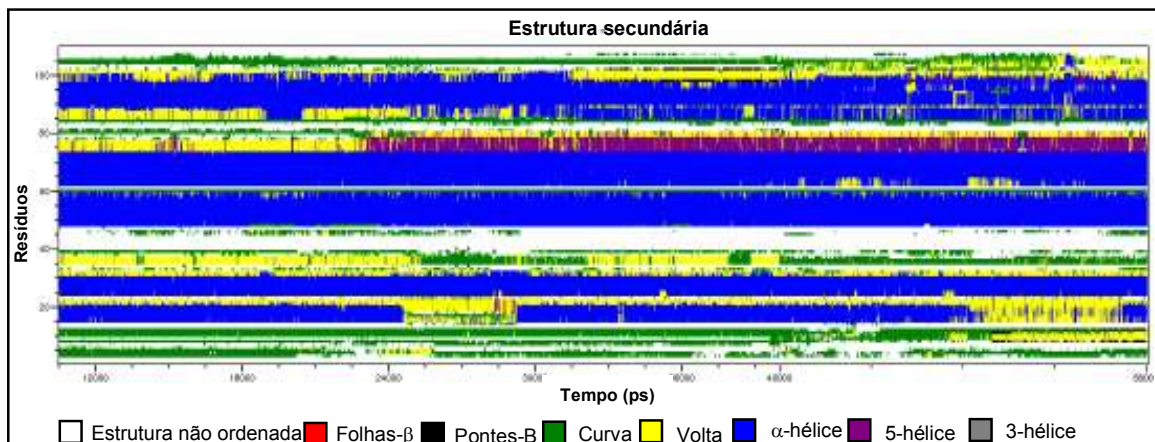


Figura 38 – Simulação de dinâmica molecular em Ric c 3. Gráfico da flutuação de estrutura secundária em 48 ns de simulação.

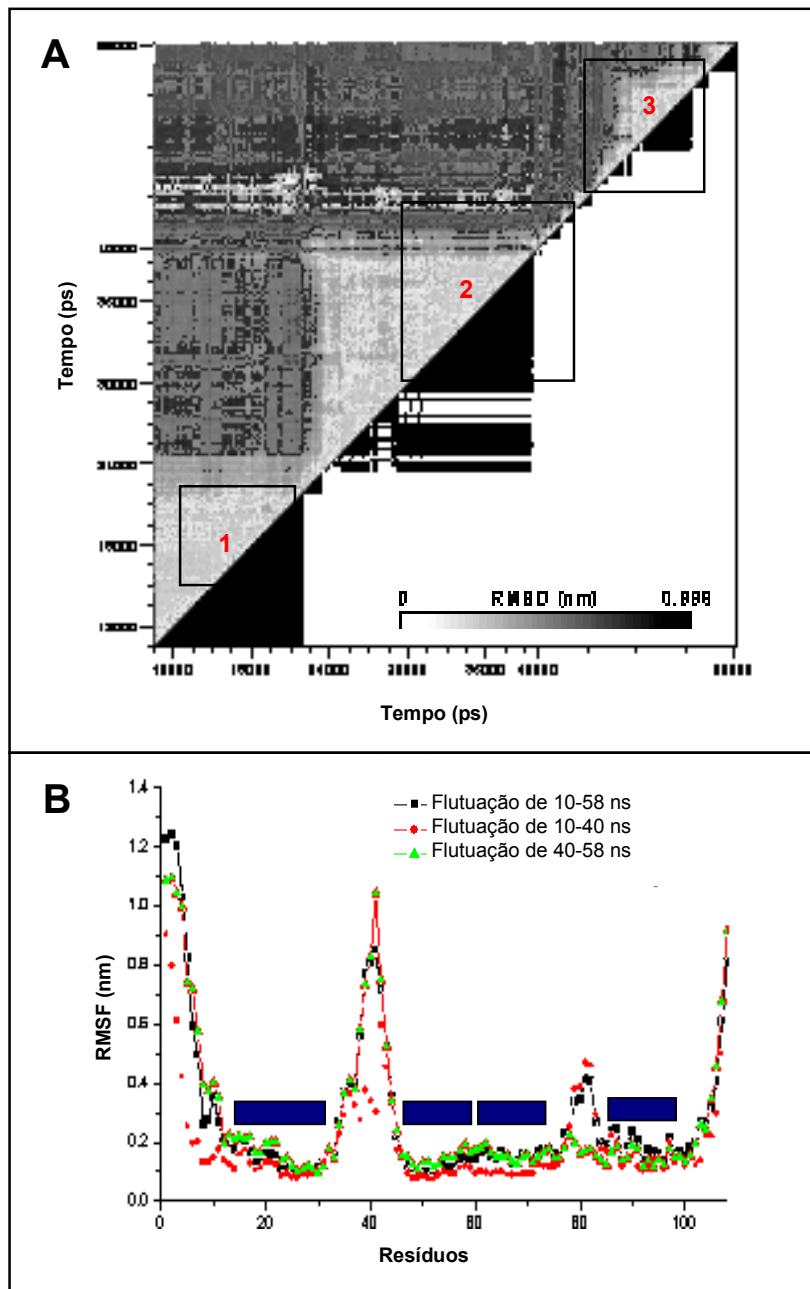


Figura 39 - Simulação de dinâmica molecular em Ric c 3. A -Gráfico da representação da análise de clusters durante a simulação. B – Flutuação dos resíduos, as α -hélices são representadas por barras azuis.

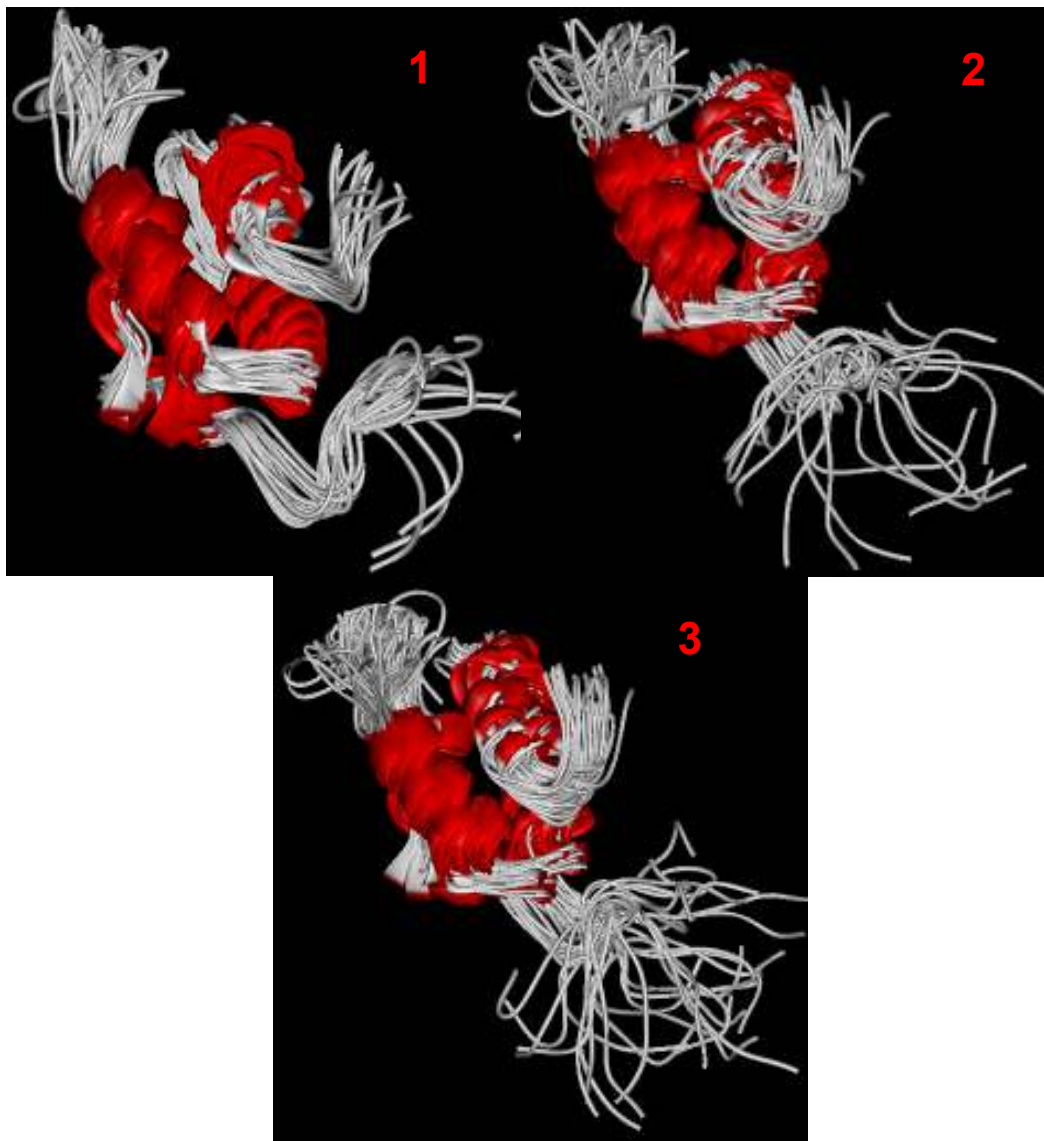


Figura 40 – Sobreposição das estruturas 3D de Ric c 3 durante os 10-58 ns de simulação de dinâmica molecular. Representando os 3 clusters analisados.

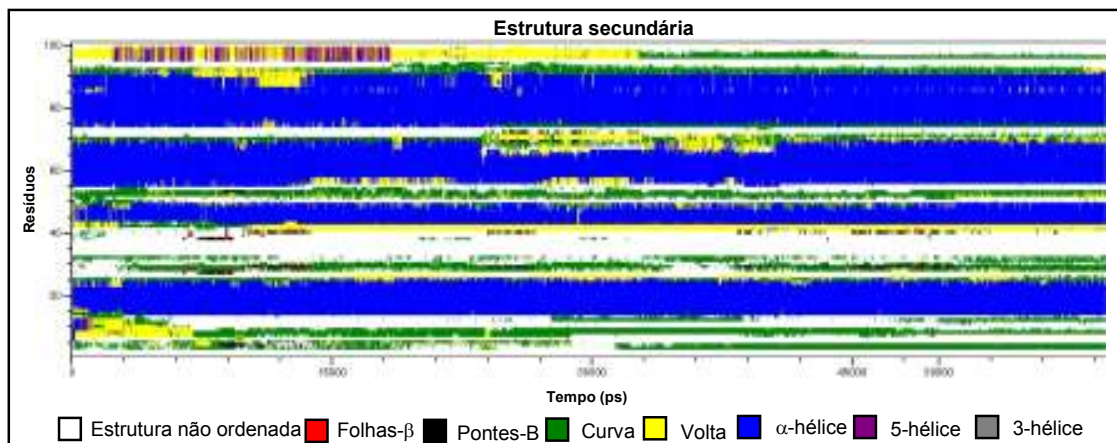


Figura 41 – Simulação de dinâmica molecular em Ric c 1. Gráfico da flutuação de estrutura secundária em 48 ns de simulação.

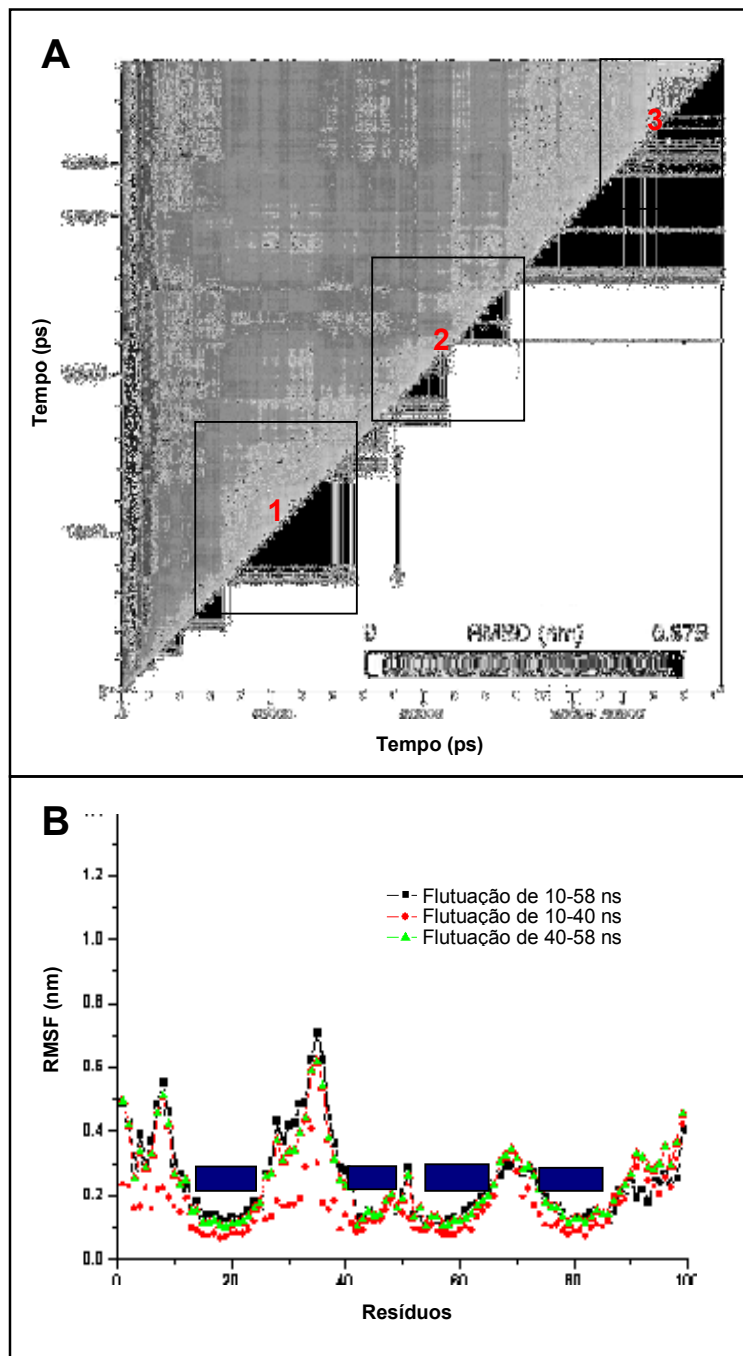


Figura 42 - Simulação de dinâmica molecular em Ric c 1. A -Gráfico da representação da análise de clusters durante a simulação. B – Flutuação dos resíduos, as α -hélices são representadas por barras azuis.

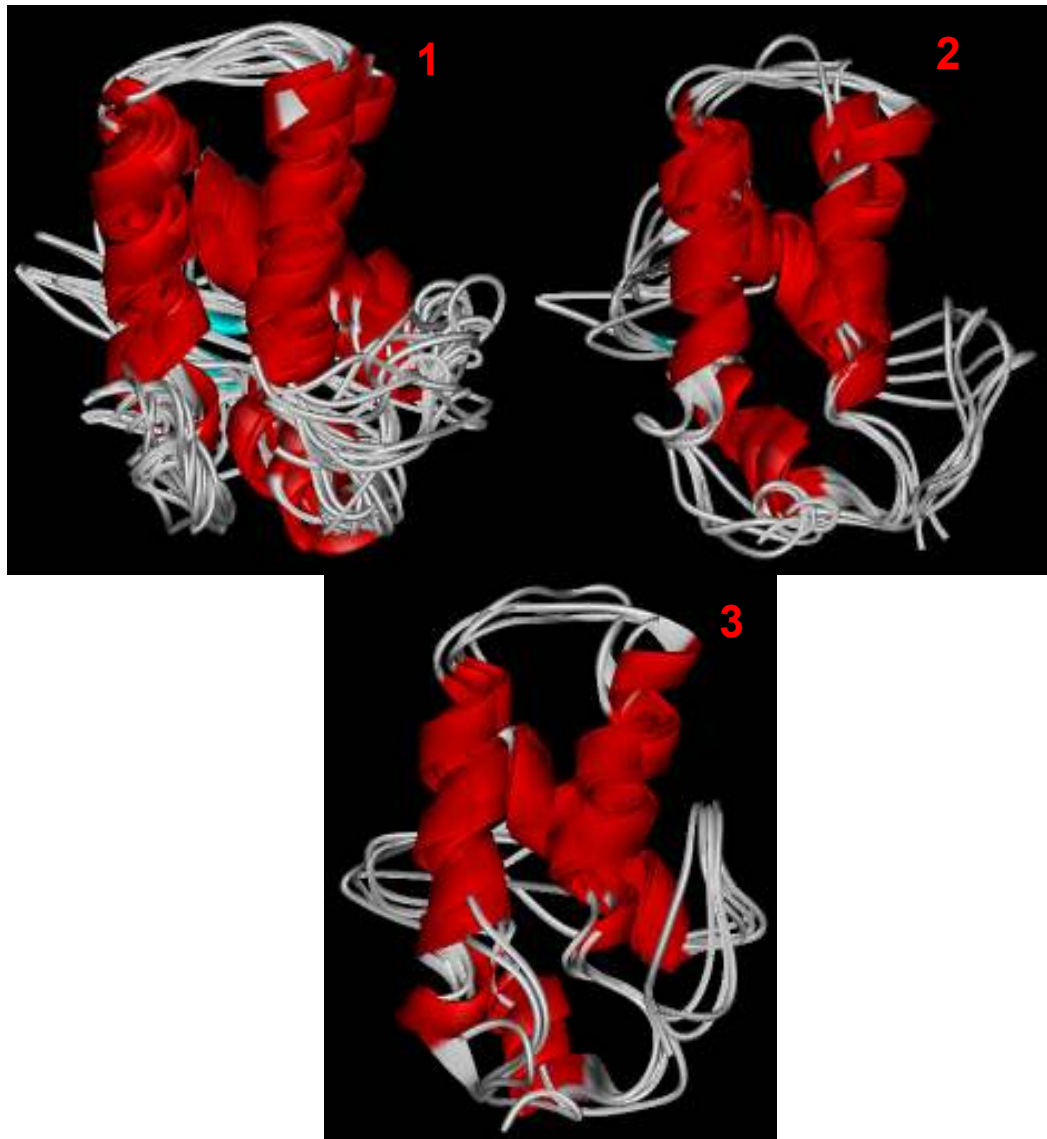


Figura 43 – Sobreposição das estruturas 3D de Ric c 3 durante os 10-58 ns de simulação de dinâmica molecular. Representando os 3 clusters analisados.

5 – DISCUSSÃO

Sementes de plantas produzem uma grande variedade de inibidores de enzimas que protegem as mesmas contra o ataque de insetos e patógenos. Neste trabalho nós estudamos as isoformas de albuminas 2S, Ric c 1 e Ric c 3, isoladas de sementes de *R. communis*, que apresentam atividade inibitória contra α -amilase e são também descritas na literatura como proteínas alergênicas.

Iniciamos nosso trabalho com a extração e purificação das isoformas de albuminas 2S, Ric c 1 e Ric c 3. As isoformas de albuminas 2S foram testadas contra a α -amilase salivar humana e α -amilase larval dos insetos *T. molitor*, *C. maculatus* e *Z. subfasciatus*. As proteínas inibiram todas as α -amilases testadas nas concentrações de 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 120 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Os inibidores, Ric c 1 e Ric c 3, mostraram-se muito potentes contra as α -amilases testadas, quando comparados com outros inibidores, como por exemplo, o inibidor bifuncional, isolado de sementes de *Phaseolus vulgaris*, que inibe α -amilase de *Z. subfasciatus* na concentração de 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Dayler *et al.*, 2005). O inibidor isolado de sementes de *Carica papaya*, que inibe 57,3 % da atividade da α -amilase do inseto *C. maculatus* na concentração de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Farias *et al.*, 2007). Os inibidores isolados de farinha do trigo, 0,19, 0,53, WRP25 e WRP26 inibem a atividade da α -amilase do inseto *C. maculatus* na concentração de 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e os inibidores 0,19, 0,53 e WRP25 inibem a atividade da α -amilase do inseto *Z. subfasciatus* na mesma concentração (Franco *et al.*, 2000).

A inibição da α -amilase salivar humana e da α -amilase larval dos insetos *C. maculatus* e *Z. subfasciatus* também foram avaliadas através de ensaios de atividade α -amilásica em gel. As larvas do inseto *Z. subfasciatus* apresentam 3 isoformas de α -amilase, duas destas são expressas em menor quantidade quando as larvas são crescidas sobre sementes de *Vigna unguiculata*, e as mesmas são expressas em maior quantidades quando as larvas são crescidas sobre sementes de *Phaseolus vulgaris* ou *Phaseolus lunatus*, enquanto que a terceira é expressa de maneira similar nos dois tipos de semente (Silva *et al.*, 2001). Ric c 1 e Ric c 3 inibiram as atividades das diversas isoformas de α -

amilase das larvas destes insetos, mesmo quando elas eram crescidas sobre as sementes de *Phaseolus vulgaris*. As albuminas de *Ricinus* inibiram também a atividade α -amilásica das larvas do inseto *T. molitor* e do inseto *C. maculatus* crescidas em *V. unguiculata*. Larvas deste inseto cultivadas nestas condições apresentam de 3 a 5 isoformas de α -amilase (Campos *et al.*, 1989; Silva *et al.*, 1999). Dados da literatura indicam que alguns inibidores são seletivos para amilase de um ou outro inseto, como por exemplo, o inibidor α -AI1 isolado de sementes de *Phaseolus vulgaris*, que inibe α -amilase dos insetos *Callosobruchus maculatus* e *Callosobruchus chinensis*, mas não inibe a α -amilase do inseto *Zabrotes subfasciatus* (Berre-anton *et al.*, 2000). Os inibidores de *R. communis* não foram seletivos para as α -amilases dos insetos testados, indicando que eles poderiam ser empregados na defesa contra estes predadores.

No intuito de verificar a eficácia das albuminas 2S de *R. communis* sobre o crescimento de larvas do inseto *C. maculatus*, nós construímos sementes artificiais de farinha de *Vigna unguiculata* contendo quantidades crescentes da fração rica em albuminas 2S. O tamanho e o peso das larvas crescidas em sementes contendo 2 % de albuminas 2S foram menores do que os das larvas crescidas em sementes controle, no entanto, a atividade α -amilásica do extrato destas larvas aumentou. Um comportamento similar foi observado por Silva e colaboradores (2001), que mostraram que larvas do inseto *Z. subfasciatus* crescidas sobre sementes artificiais de farinha de *Vigna unguiculata* contendo α -AI1 (inibidor de α -amilase isolado de sementes de *Phaseolus vulgaris*) apresentaram maior atividade de duas isoformas de α -amilase quando comparada com o controle. O extrato protéico obtido das larvas crescidas nas sementes artificiais contendo albuminas 2S foi incubado “in vitro” com estes inibidores e posteriormente submetido a ensaios de atividade α -amilásica em gel onde verificamos que todas as isoformas de α -amilase expressas foram passíveis de inibição pelas albuminas 2S. Tendo em vista que as larvas ainda conservaram atividade α -amilásica, apesar de terem seu crescimento prejudicado, podemos supor que estas possam estar aumentando a expressão de α -amilase, ou ativando enzimas pré-sintetizadas a fim de contornar o efeito inibitório. Outra hipótese seria a de que as albuminas

2S possam ser transportadas para outras partes da larva e assim, de alguma forma, prejudicarem seu crescimento.

Os inibidores protéicos de α -amilase são agrupados em sete famílias de acordo com suas similaridades de seqüência primária e estrutura 3D. As albuminas 2S de *R. communis* pertencem à superfamília das prolaminas (Shewry *et al.*, 2002), a qual não está incluída entre os inibidores de α -amilase já caracterizados Irwin e colaboradores (1990) ao analisarem o precursor de Ric c 1 e Ric c 3 identificaram domínios inibidores de α -amilase, no entanto, não havia evidências experimentais para atribuir esta atividade a estas proteínas. Nossos resultados permitem introduzir as albuminas 2S como uma nova família de inibidores de α -amilase, evidenciando um caráter multifuncional às albuminas 2S de *R. communis*, uma vez que a função de reserva, a atividade antifúngica e a atividade alergênica já já foram descritas. Para entendermos, e se for possível, correlacionarmos estas atividades, alguns aspectos estruturais de Ric c 1 e Ric c 3 foram analisados.

Ric c 1 e Ric c 3 são ambas formadas por duas cadeias polipeptídicas ligadas por duas pontes dissulfeto. Apresentam na sua totalidade oito resíduos de cisteína, onde duas pontes intra-cadeia direcionam o padrão de enovelamento destas proteínas. Esta é uma característica preservada entre as albuminas 2S de diversas fontes (José-Estanyo *et al.*, 2004).

Na análise de dicroísmo circular observamos que Ric c 1 e Ric c 3 apresentam estrutura secundária em α -hélices e algumas regiões de estrutura não ordenada. Este aspecto foi confirmado pela predição de estrutura secundária realizada através do programa Jpred, e é um aspecto comum não só entre albuminas 2S de outras fontes (Rico *et al.*, 1996) como também de nsLTPs (Gomar *et al.*, 1996), de inibidores bifuncionais de α -amilase e tripsina (Strobl *et al.*, 1995), e de proteínas hidrofóbicas de soja (Gourinath *et al.*, 2000). Apesar de não apresentarem uma alta similaridade de estrutura primária, estas proteínas apresentam elementos de estrutura secundária similar e conservam um padrão de pontes dissulfeto importante para a estabilidade da estrutura final.

A determinação da estrutura 3D de proteínas representa um passo fundamental no conhecimento de atividades biológicas, bem como para o estudo de propriedades farmacológicas, ou agrárias para engenharia genética.

Para determinação da estrutura 3D por RMN ou cristalografia de raios X necessita-se da proteína homogênea. As albuminas 2S, de um modo geral, são obtidas a partir de um precursor e sofrem processamento pós-traducional (Sharief and Li 1982; Irwin *et al.*, 1990). Estas proteínas existem em diversas isoformas o que torna difícil o isolamento de uma isoforma homogênea. Desse modo, a super-expressão poderia ser uma ferramenta efetiva para obter estas proteínas. No entanto, ao ser expressas em sistema heterólogo, o processamento necessário para obter a proteína como em sua forma nativa muitas vezes não é possível.

A estrutura 3D de Ric c 3 (RMN) foi determinada a partir da proteína obtida por super-expressão em *Escherichia coli*, e apresentava um peptídeo sinal, um peptídeo de ligação entre as cadeias leve e pesada e um peptídeo na região C-terminal, que estão ausentes na proteína nativa (Pantoja-Uceda *et al.*, 2003). Demonstramos que a remoção destas regiões para gerar a proteína como em sua forma nativa manteve o padrão de α -hélices observado na estrutura original, sinalizando a possibilidade de que a proteína super-expressa, apesar de ser constituída por uma única cadeia polipeptídica, apresente propriedades similares às da proteína nativa, que é constituída de duas cadeias polipeptídicas.

A estrutura 3D de Ric c 3 determinada por RMN e descrita na literatura por Pantoja-Uceda e colaboradores em 2003, foi também utilizada como molde para a modelagem por homologia da isoforma Ric c 1, utilizando o programa Swiss model server. O modelo gerado apresentou boa estereoquímica e mantém o padrão de 5 α -hélices observado na estrutura de Ric c 3, em outros membros da família das albuminas 2S, em nsLTPs, em inibidores de α -amilase, e em proteínas hidrofóbicas de soja (Pantoja-Uceda *et al.*, 2002).

Diversos insetos, principalmente os que crescem sobre grãos ou produtos ricos em amido, necessitam de suas α -amilases para sobreviver. Inibidores de enzimas são ferramentas importantes na natureza para o controle da atividade endógena e defesa da planta contra o ataque de pragas e patógenos (Payan 2004; Svensson *et al.*, 2004). O estudo da interação inibidor-enzima é um passo fundamental para o conhecimento da especificidade destes inibidores e o desenvolvimento de plantas modificadas geneticamente resistentes ao ataque de pragas e patógenos (Payan 2004).

No intuito de estudar o possível sítio de interação entre os inibidores Ric c 1 e Ric c 3 e α -amilase larval do inseto *T. molitor* (TMA), construímos um modelo de interação entre estas moléculas, com base no complexo descrito na literatura entre TMA e o Inibidor bifuncional de tripsina/ α -amilase de *Eleusine coracana* (RBI) determinado por cristalografia de raios X (Strobl *et al.*, 1998b). As α -amilases são enzimas ácidas com superfície eletrostática predominantemente negativa, e apresentam 3 resíduos ácidos conservados no sítio catalítico (Glu, Asp, Asp). Estes resíduos participam, não somente do processo de catálise, mas também de interações com o inibidor. Na maioria dos complexos descritos na literatura, resíduos carregados positivamente são importantes no processo de interação (Wiegand *et al.*, 1995; Pereira *et al.*, 1999; Mirkov *et al.*, 1995). As albuminas 2S de *R. communis* são ricas em arginina e alguns destes resíduos participaram efetivamente, via ligações de hidrogênio com resíduos da enzima, do processo de inibição no modelo proposto. No complexo Ric c 1-TMA, o resíduo Arg7 (cadeia leve) do inibidor, interage com Asn137 da enzima, enquanto no complexo Ric c 3-TMA, o resíduo Arg6 (cadeia leve) interage com o resíduo Glu149 da enzima e Arg 19 (cadeia pesada) interage com os resíduos Arg290 e Asn331 da enzima.

Nos complexo Ric c 1-TMA e Ric c 3-TMA, resíduos do inibidor (Gln4 e Gln12 respectivamente) interagem via ligação de hidrogênio com um dos resíduos catalíticos da enzima (Glu222), assim como observado no complexo entre α -amilase pancreática de porco (PPA) e o inibidor de *Streptomyces tendae* (tendamistat), onde o resíduo Arg19 do inibidor interage com o resíduo catalítico Glu233 da enzima (Wiegand *et al.*, 1995). Outros complexos amilase-inibidor interagem via ligação de hidrogênio com todos os resíduos catalíticos da enzima (Bompard-Gilles *et al.*, 1996, Pereira *et al.*, 1999, Strobl *et al.*, 1998).

Estudos cinéticos com PPA, utilizando oligossacarídeos de com diferentes comprimentos, sugeriram a presença de 5 sub-sítios de ligação a carboidratos no sítio ativo da enzima (Robyt e French, 1970; Ishikawa *et al.*, 1990, 1993). No complexo entre PPA e o pseudo-octassacarídeo V-1532, derivado da família de inibidores trestatina, foram identificados 6 sub-sítios de ligação a carboidratos (Machius *et al.*, 1996). No complexo RBI-TMA, Strobl e colaboradores (1998), modelaram a ligação de V-1532 no sítio catalítico de TMA e verificaram que RBI bloqueia 5 sub-sítios de ligação a carboidratos em

TMA. Nos complexos Ric c1-TMA e Ric c 3-TMA, nós observamos que os inibidores levam ao bloqueio estérico do sub-sítio 4 da enzima.

Neste trabalho as isoformas de albuminas 2S, Ric c 1 e Ric c 3, são apresentadas como inibidores de α -amilase, porém há muitos anos estas proteínas vem sendo estudadas como responsáveis pelo desencadeamento de alergia (Sharief e Li, 1982; Thorpe, *et al.*, 1988; Machado and Silva, 1992; Silva Jr. *et al.*, 1996). Em estudo recente, nosso grupo (Felix, *et al.*, 2008) identificou 6 epitopos, 2 em Ric c 1 e 4 em Ric c 3, responsáveis pela alergia. Nos epitopos de Ric c 1 e Ric c 3, assim como para o epitopo (ELKRTDLNILERFNYE) presente em Blo t 5 (principal alérgeno da poeira) os resíduos de aminoácidos ácidos são importantes para ligação nas IgEs presentes na membrana dos mastócitos e/ou basófilos para assim, dispararem o processo de desgranulação destas células, ou seja, liberação de mediadores que levam aos sintomas da alergia (Chan *et al.*, 2008). Em Ric c 1 e Ric c 3, a propriedade de inibição de α -amilase pode ser importante para defesa da planta, assim como para o controle endógeno desta enzima. Porém a propriedade alergênica é prejudicial, visto que, esta planta é utilizada para vários fins industriais, entre eles a produção de biodiesel, e por este motivo é plantada em larga escala, e manipulada por trabalhadores. As albuminas 2S também estão presentes no pólen da planta (Thorpe *et al.*, 1988, Singh *et al.*, 1997), podendo alcançar pessoas que moram em torno da plantação. Com o intuito de tornar as isoformas de albuminas 2S, Ric c 1 e Ric c 3, não-alergênicas, e manter sua propriedade de inibição de α -amilase, nós realizamos algumas substituições nestas proteínas, utilizando a modelagem molecular, onde alguns resíduos de ácidos glutâmicos, presente nos diversos epitopos, foram trocados por resíduos de leucina. Alguns autores têm mostrado que mutações sítio dirigidas em alérgenos tem levado a alta diminuição da ligação a IgE e conseqüentemente do seu potencial alergênico (Chan *et al.*, 2006, Chan *et al.*, 2008). Os mutantes gerados apresentam estrutura 3D muito similar às estruturas de origem (Ric c 1 e Ric c 3), com RMSD de 0.06 Å para Ric c 1 mutado e 0.17 Å para Ric c 3 mutado.

Utilizando as estruturas de Ric c 1 e Ric c 3 mutadas, construímos os complexos, TMA-Ric c 1 mutado e TMA-Ric c 3 mutado, onde esperávamos que as albuminas perderiam a propriedade alergênica, mas manteriam sua

função de inibição de α -amilase. Os complexos com os mutantes apresentam estruturas semelhantes aos complexos com os inibidores não mutados, com RMSD de 0.08 Å para TMA-Ric c 1 mutado e 0.10 Å para TMA-Ric c 3 mutado. A mutação realizada nos inibidores neste estudo, provavelmente não interferiria na interação com a enzima, pois a mutação mantém os resíduos carregados positivamente, descritos como importantes para interações com α -amilase (Wiegand *et al.*, 1995, Pereira *et al.*, 1999, Mirkov *et al.*, 1995). As estruturas teóricas mutadas podem apresentar uma maior hidrofobicidade devido aos resíduos de leucina utilizados nas substituições, porém este fato não deve ser um fator que impeça a ligação do inibidor na enzima, visto que, nos complexos descritos na literatura, a presença de resíduos hidrofóbicos é importante para a interação inibidor-enzima e estudos cinéticos mostram que interações hidrofóbicas são um fator de grande importância na formação do complexo entre PPA e o inibidor de *Phaseolus vulgaris* (Whitaker *et al.*, 1988). No complexo RBI-TMA, o resíduo Val2 mantém ligações de hidrogênio com o resíduo catalítico Asp287, e interações hidrofóbicas com Trp56, Trp57, Tyr60. Além disso, os resíduos hidrofóbicos, Ile7, Met10, Ala11, Ala53, Val67, Val68, Ile108, Leu115, Leu117 formam contatos importantes ou levam ao bloqueio estérico da enzima (Strobl *et al.*, 1998). No complexo PPA-Tendamistat os resíduos Leu44 e Tyr46, do inibidor, estão envolvidos em interações hidrofóbicas com o segmento Glu149- Ser150- Tyr151 da enzima. O segmento Gln52-Ile53-Thr54-Thr55, do inibidor também participa de interações hidrofóbicas com o segmento Leu237-Gly238-Gly239-Glu240 de PPA (Wiegand *et al.*, 1995). Além disso, o resíduo Trp59 (PPA) é descrito como envolvido em interação com a região hidrofóbica da unidade de maltose (Quian *et al.*, 1994).

Os inibidores Ric c 1 e principalmente Ric c 3, apresentam uma longa região de estrutura não ordenada no N- e C-terminal. Nós simulamos a movimentação destas proteínas através de técnicas de dinâmica molecular, para observar sua liberdade conformacional e gerar uma melhor acomodação dos resíduos nas proteínas avaliadas. Em Ric c 3, nós realizamos 58 ns de simulação, e observamos que o N- e o C-terminal desta proteína apresentam uma grande movimentação, o que é confirmado pelos dados de RMN (Pantoja-Uceda *et al.*, 2003, PDB – 1PSY), onde estão ausentes os dados de NOE para

a estrutura. Em Ric c 1, os dados da simulação são um pouco diferentes, visto que, esta proteína apresenta N-terminal bem menor que Ric c 3. Assim podemos observar uma menor movimentação nesta região, que pode ser acusada também pelo fato de Ric c 1 apresentar uma cisteína nesta região que forma ponte dissulfeto. Acreditamos então, que esta ponte dissulfeto seja importante para manter a estrutura e estabilidade desta proteína. Outro inibidor de α -amilase também apresentam região N-terminal com grande movimentação. Os resíduos do N-terminal do inibidor RBI livre, se encontram de forma não estruturada e flexível, e adotam uma conformação helicoidal quando em complexo com TMA (Strobl *et al.*, 1998).

O conhecimento estrutural e biológico de Ric c 1 e Ric c 3 nos permite propor modificações nestas moléculas que levem a inibidores com alta especificidade para α -amilase e baixa ou nenhuma alergenicidade, e assim potentes candidatos para modificação de plantas.

6 – CONCLUSÃO

- As isoformas de albuminas 2S, Ric c 1 e Ric c 3, são inibidoras da atividade da α -amilase salivar humana, e da α -amilase larval dos insetos *C. maculatus*, *Z. subfasciatus* e *T. molitor*
- As isoformas de albuminas 2S incorporadas a sementes artificiais na concentração de 2 % reduziram drasticamente o crescimento das larvas do inseto *C. maculatus*;
- O modelo teórico de Ric c 1 mostrou a conservação de um enovelamento característico família das albuminas 2S;
- Os complexos formados pela α -amilase larval do inseto *T. molitor* e as proteínas, Ric c 1 e Ric c 3, ou seus mutantes revelaram interações importantes (ligações de hidrogênio) que reforçam o perfil inibitório observado nos ensaios biológicos.
- Estudos teóricos por modelagem molecular, indicam que mutação em resíduos de aminoácidos de Ric c 1 e Ric c 3 responsáveis pelo desencadeamento da alergia, poderiam tornar as isoformas de albuminas 2S não alergênicas, mantendo a propriedade de inibição de α -amilase podendo portanto serem aplicáveis para a transformação da mamoneira tornando-a mais adequada para trabalhadores que manipulam suas sementes e torta.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, K. A., Lichtman, A. H., Pober, J. S. (2003). *Imunologia celular e molecular*. 4ª edição, Editora Revinter. Cap.19 p. 424-444.
- Abe, J. I., Sidenius, U., Svensson, B. (1993). Arginine is essential for the α -amylase inhibitory activity of the α -amylase/subtilisin inhibitor (BASI) from barley seeds. *Biochem. J.* 293: 151-155.
- Aboissa óleos vegetais. (2005). Disponível em: <<http://www.aboissa.com.br/mamona/index.htm> >
- Agizzio, A. P., Carvalho, A. O., Ribeiro, S. D. F., Machado, O. L. T., Alves, E. W., Okorokov, L. A., Samarão, S. S., Bloch, C. J., Prates, M. V., Gomes, V. M. (2003). A 2S albumin-homologous protein from passion fruit seeds inhibits the fungal growth and acidification of the medium by *Fusarium oxysporum*. *Arch. Biochem. Biophys.* 416(2) :188-195.
- Agrawal, A. A., Karban, R. (2000). Specificity of constitutive and induced resistance: pigment glands influence mites and caterpillars on cotton plants. *Entomol. Exp. Appl.* 96: 39–49.
- Aiso, Y., Ishiyama, T., Sekino, H., Nomura, M., Kobayakawa, A., Higashimoto, K., Inoue, Y., Ikami, T., Sawai, K., Ikeda, Y. (2007). Short- and long-term intake of wheat albumin affects blood glucose and HbA1c levels in healthy and type 2 diabetic subjects. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 34: 90-92.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J. (1997). Gapped blast and psi-blast: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25 (17) 3389–402.
- Azevedo, D. M. P., Beltrão, N. E. M., editores técnicos. (2007). *O agronegócio da mamona no Brasil*. 2ª edição, Embrapa informação tecnológica.
- Barber, D., Sanchez-Monge, R., Mendez, E., Lazaro, A., Garcia-Olmedo, F., Salcedo, G. (1986). New α -amylase and trypsin inhibitors among the CM-proteins of barley (*Hordeum vulgare*). *Biochim. Biophys. Acta.* 869: 115–118.
- Barciszewski, J., Szymanski, M., Haertlé, T. (2000). Minireview: analysis of rape seed napin structure and potential roles of the storage protein. *J. Protein Chem.* 19: 249–254.

- Batalia, M. A., Monzingo, A. F., Ernst, S., Roberts, W. Robertus, J. D. (1996). The crystal structure of the antifungal protein zeamatin, a member of the thaumatin-like, PR-5 protein-family. *Nat. Struct. Biol.* 3: 19-23.
- Berendsen, H. J. C., Grigera, J. R., Straatsman, T. P. (1987). The missing term in effective pair potentials. *J. Chem. Phys.* 91: 6269-6271.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L. (2004). Bioquímica. 5ª edição, Editora Guanabara Koogan, cap. 4 p. 112-114.
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissing, H., Shindyalov, I. N., Bourne, P. E. (2000). The protein data bank. *Nucleic Acids Res.* 28 (1): 235–242.
- Berre-Anton, L. V., Bompard-Gilles, C., Payan, F. Rouge, P. (1997). Characterization and functional properties of the α -amylase inhibitor (α -AI) from kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. *Biochem. Biophys. Act.* 1343: 31-40.
- Berre-Anton, L.V., Nahoum, V., Payan, F. Rougé, P. (2000). Molecular basis for the specific binding of different α -amylase inhibitors from *Phaseolus vulgaris* seeds to the active site of α -amylase. *Plant Physiol Biochem.* 38: 657-665.
- Beyer, K., Bardina, L., Grishina, G., Sampson, H. A., (2002). Identification of sesame seed allergens by 2-dimensional proteomics and Edman sequencing: seed storage proteins as common food allergens. *J. Allergy Clin. Immun.* 110: 154–159.
- Bischoff, H., Ahr, H. J., Schmidt, D. Stoltefuss, J. (1994). Acarbose-ein neues Wirkprinzip in der Diabetes-Therapie. *Nachr. Chem. Tech. Lab.* 42: 1119–1128.
- Blanco-Labra, A., Iturbe-Chinas, F. A. (1980). Purification and characterization of an α -amylase inhibitor from maize (*Zea mays*). *J. Food Biochem.* 193: 1–12.
- Bloch, C., Richardson, M. (1991). A new family of small (5kDa) protein inhibitors of insect α -amylases from seeds of sorghum (*Sorghum bicolor* (L) moench) have sequence homologies with wheat γ -purothionins, *FEBS Lett.* 279: 101-104.

- Bloch, C. Jr , Patel, S. U., Baud, F., Zvelebil, M. J. J. M., Carr, M. D., Sadler, P. J. Thornton, J. M. (1998). H-NMR structure of an antifungal γ -thionin protein Si1: similarity to scorpion toxins. *Proteins*. 32: 334-349.
- Bompard-Gilles, C., Rousseau, P., Rougé, P., Payan, F. (1996). Substrate mimicry in the active centre of a mammalian α -amylase: structural analysis of an enzyme inhibitor complex. *Structure*. 4: 1441– 1452.
- Bozonnet, S., Bønsager, B. C., Kramhøft, B., Mori, H., Hachem, M. A., Willemoes, M., Jensen, M. T., Fukuda, K., Nielsen, P. K., Juge, N., Aghajari, N., Tranier, S., Robert, X., Hase, R. Svensson, B. (2005). Binding of carbohydrates and protein inhibitors to the surface of α -amylases. *Biologia*. 16: 27-36.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Breiteneder, H., Mills, E. N. C. (2005). Plant food allergens-structural and functional aspects of allergenicity. *Biotechnol. Adv.* 23: 395–399
- Breiteneder, H., Radauer, C. (2004). A classification of plant food allergens. *J. Allergy Clin. Immun.* 113 (5): 821-830.
- Brzozowski, A. M., Daveis, M. J. (1997). Structure of the *Aspergillus oryzae* α -amilase complexed with the inhibitor acarbose at 2.0 Å resolution. *Biochemistry*. 36: 10837–10845.
- Buonocore, V., Poerio, E., Pace, W., Petrucci, T., Silano, V. Tomasi, M. (1976) Interaction of *Tenebrio molitor* L. α -amylase with wheat flour protein inhibitor. *FEBS Lett.* 67: 202-206.
- Campos, F. A. P., Richardson, M. (1983). The complete amino acid sequence of the bifunctional α -amylase/trypsin inhibitor from seeds of ragi (Indian finger millet, *Eleusine coracana* Gaertneri). *FEBS Lett.* 152: 300–304.
- Campos, F. A. P., Xavier-Filho, J., Silva, C. P., Ary, M. B. (1989). Resolution and partial Characterization of proteinases and α -amylase from midguts of larvaen of the bruchid beetle *Callosobruchus maculatus* (F.). *Comp. Biochem. Physiol.* 92: 51-57.
- Carugo, O., Lu, S., Luo J., Gu, X., Liang, S., Strobl, S., Pongor, S. (2001). Structural analysis of free and enzyme-bound amaranth α -amylase inhibitor:

- classification within the knottin fold superfamily and analysis of its functional flexibility. *Protein Eng.* 14: 639– 646.
- Carvalho, A. O., Gomes, V. M. (2009). Plant defensins-Prospects for the biological functions and biotechnological properties. *Peptides* 30: 1007-1020
- Castro, M. D., Fontes, W., Morhy, L. Bloch Jr, C. (1996). Complete amino acid sequence from γ -thionins from maize (*Zea mays* L.) seeds. *Protein Pept. Lett.* 3: 267-274.
- Chagolla-López, A., Blanco-Labra, A., Patthy, A., Sánchez, R. Pongor, S. (1994). A novel α -amylase inhibitor from Amaranth (*Amaranthus hypocondriacus*) seeds. *J. Biol. Chem.* 269: 23675-23680.
- Chan, S. L., Ong, S. T., Ong, S. Y., Chew, F. T., Mok, Y. K. (2006). Nuclear Magnetic Resonance Structure-Based Epitope Mapping and Modulation of Dust Mite Group 13 Allergen as a Hypoallergen1. *J. Immunol.* 176: 4852-4860.
- Chan, S. L., Ong, T. C., Gao, Y. F., Tiong, Y. S., Wang, D. Y., Chew, F. T., Mok, Y. K. (2008). Nuclear magnetic resonance structure and IgE epitopes of Blo t 5, a major dust mite allergen. *J. Immunol.* 181 (4): 2586-2596.
- Cornelissen, B. J. C., Hooft Van Huijsduijnen, R. A. M, Bol, J. F. (1986). A tobacco mosaic virus-induced tobacco protein is homologous to the sweet-tasting protein thaumatin. *Nature.* 231: 531-532.
- Crespo, M. C. R. (1999). Papel antifúngico de albuminas 2S e de polipeptídeos de baixo peso molecular de sementes de *Ricinus communis*. Monografia para obtenção de graduação em Ciências biológicas. Universidade Estadual do Norte Fluminense.
- Cuff, J. A., Clamp, M. E., Siddiqui, A. S., Finlay, M., Barton, G. J. (1998). JPred: a consensus secondary structure prediction server. *Bioinformatics.* (14) 10: 892-893.
- Da Silva, M. C. M., Grossi de Sá, M. F., Chrispeels, M. J., Togawa, R, C. and Neshich, G. (2000). Analysis of structural, physico-chemical parameter in binding of between different α -amylases and their inhibitors. *Protein Eng.* 13: 167-177.

- Dayler, C. S. A., Mendes, P. A. M., Prates, M. V., Bloch Jr. C., Franco, O. L., Grossi-de-Sá, M. F. (2005). Identification of a novel bean α -amylase inhibitor with chitinolytic activity. *FEBS Lett.* 579: 5616–5620.
- Essman, U., Perela, L., Berkowitz, M. L., Darden, T., Lee, H., Pedersen, L. G. (1995). A smooth particle mesh Ewald method. *J. Chem. Phys.* 103: 8577-8592.
- Fakhoury, A.M. and Wolosuk, C.P. (2001). Inhibition of growth of *Aspergillus flavus* and fungal α -amylases by a lectin-like protein from *Lablab purpureus*. *Mol Plant-Microb. Interact.* 14: 955–961.
- Farias, L. R., Costa, F. T., Souza, L. A., Pelegrini, P. B., Grossi-de-Sá, M. F., Neto, S. M., Bloch Jr., C., Laumann, R. A., Noronha, E. F., Franco, O. L. (2007). Isolation of a novel *Carica papaya* α -amylase inhibitor with deleterious activity toward *Callosobruchus maculatus*. *Pestic. Biochem. Phys.* 87: 255–260.
- Felix, S. P. (2007). Identificação de epitopos alérgênicos de albuminas 2S de *Ricinus communis* utilizando como modelos roedores e pacientes atópicos: reações cruzadas com alérgenos alimentares e inalantes e bloqueio através da ocupação dos sítios de reconhecimento. Dissertação para a obtenção do título de mestre em Biociências e Biotecnologia pela Universidade Estadual do Norte Fluminense.
- Felix, S. P., Mayerhoffer, R. O., Damatta, R. A., Verícimo, M. A., Nascimento, V. V., Machado, O. L. T. (2008). *Peptides.* 29: 497-504.
- Feng, G. H., Richardson, M., Chen, M. S., Kramer, K. J., Morgan, T. D., Reeck, G. R. (1996). α -Amylase inhibitors from wheat: a sequences and patterns of inhibition of insect and human α -amylases. *Insect Biochem. Mol Biol.* 26: 419-426.
- Finardi-Filho, F., Mirkov, T. E., Chrispeels, M. J. (1996). A putative precursor protein in the evolution of the bean α -amylase inhibitor. *Phytochemistry.* 43: 57-62.
- Fornazieri Júnior, A. (1986). Mamona - Uma rica fonte de óleo e de divisas. Coleção Brasil agrícola. Editora Ícone.
- Foster, M. J. (2002). Molecular modelling in structural biology. *Micron.* 33: 365-384.

- Franco, O. L., Rigden, D. J., Melo, F. R., Bloch Jr, C., Silva, C. P., Grossi de Sá, M. F. (2000). Activity of wheat α -amylase inhibitors towards bruchid α -amylases and structural explanation of observed specificities. *Eur. J. Biochem.* 267 (8): 1466-1473.
- Franco, O. L., Rigden D. J, Melo, F. R., Grossi-de-Sá, M. F. (2002). Plant α -amylase inhibitors and their interaction with insect α -amylases. Structure, function and potential for crop protection. *Eur. J. Biochem.* 269: 397-412.
- Garcia-Casado, G., Sanchez-Monge, R., Chrispeels, M. J., Armentia, A., Salcedo, G., Gómez, L. (1996). Role of complex asparagine-linked glycans in the allergenicity of plant glycoproteins. *Glycobiology.* 6: 471-477.
- Garcia-Olmedo, F., Salcedo, G., Sanchez-Monge, R., Gomez, L., Royo, J., Carbonero, P. (1991). Plant proteinaceous inhibitors of proteinases and α -amylases. *Plant Mol. Cell Biol.* 4: 275-334.
- Gatehouse, A. M. R., Boulter, D., Hilder, V. A. (1992). Potential of plant-derived genes in the genetic manipulation of crops for insect resistance. In *Biotechnology in Agriculture, Plant Genetic Manipulation for Crop Protection*. Vol. 7, pp. 155-181. CAB International, Wallingford, UK.
- Gatehouse, A. M. R., Gatehouse, J. A (1998). Identifying proteins with insecticidal activity: use of encoding genes to produce insect-resistant transgenic crops. *Pest. Sci.* 52: 165-175.
- Genov, N., Goshev, I., Nikolova, D., Giorggieva, D. N., Filippi, B., Svendsen, I. (1997). A novel thermostable inhibitor of trypsin and subtilisin from the seeds of *Brassica nigra*: amino acid sequence, inhibitory and spectroscopic properties and thermostability. *Biochim. Biophys. Acta.* 1341:157-164.
- Gould, H. J., Sutton, B. J. (2008). IgE in allergy and asthma today. *Nat. Rev. Immunol.* 8: 205–217
- Gomar, J., Petit, M. C., Sodano, P., Sy, D., Marion, D., Kader, J. C., Vovelle, F., Ptak, M. (1996). Solution structure and lipid binding of a non-specific lipid transfer protein extracted from maize seeds. *Protein Sci.* 5: 565-577.
- Gourinath, S., Srinivasan, A., Singh, T. P. (2000). Structure of the bifunctional inhibitor of trypsin and α -amylase from Ragi seeds at 2.2 Å resolution. *Acta Crystallogr.* 56: 287-293.

- Grossi-de-Sá, M. F., Chrispeels, M. J. (1997). Molecular cloning of bruchid (*Zabrotes subfasciatus*) α -amylase cDNA and interactions of the expressed enzyme with bean amylase inhibitors. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 27: 271-281.
- Guex, N., Peitsch, M. C. (1997). Swiss-Model and the Swiss-PDB Viewer: an environment for comparative protein modelling. *Electrophoresis.* 18: 2714-2723.
- Gvozdeva, E. L., Valueva, T. A., Mosolov, V. V. (1993). Enzymatic oxidation of the bifunctional wheat inhibitor of subtilisin and endogenous α -amylase. *FEBS Lett.* 334: 72-74.
- Hagan, N. D., Upadhyaya, N., Tabe, L. M., Higgins, T. J. V. (2003). The redistribution of protein sulfur in transgenic rice expressing a gene for a foreign, sulfur-rich protein. *Plant J.* 34: 1-11.
- Hess, B., Bekker, H., Berendsen, H. J., Fraaije, J. G. E. M. (1997). LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *J. Comp. Chem.* 18: 1463-1472.
- Ho, M. F., Whitaker, J. R. (1993). Purification and some physical properties of red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) α -amylase inhibitors from two experimental cultivars. *J. Food Biochem.* 17: 15-33.
- Huang, W. Y., Tietz, N. W. (1982). Determinations of amylase isoenzymes in serum by of a selective inhibitor. *Clin. Chem.* 28 (7): 1525-1517.
- Irwin, S. D., Keen, J. N., Findlay, J. B. C., Lord, J. M. (1990). The *Ricinus communis* 2S albumin precursor: a single preproprotein may be processed into two different heterodimeric storage proteins. *Mol. Gen. Genet.* 222: 400-408.
- Ishikawa, K., Matsui, I., Honda, K. (1990). Substrate dependent shift of optimum pH in porcine pancreatic α -amylase-catalyzed reactions. *Biochemistry.* 29: 7119-7123.
- Ishikawa, K., Matsui, I., Kobajashi, S., Nakatani, H., Honda, K. (1993). Substrate recognition at the binding site in mammalian pancreatic α -amylase. *Biochemistry.* 32: 6259-6365.

- Ishimoto, M., Sato, T., Chrispeels, M. J., Kitamura, K. (1996). Bruchid resistance of transgenic azuki bean expressing seed α -amylase inhibitor of common bean. *Entomol. Exp. Appl.* 79: 309–315.
- Ivanciuc, O., Midoro-Horiutib, T., Scheina, C. H., Xiec, L., Hillmane, G. R., Goldblumb, R. M., Brauna, W. (2009). The property distance index PD predicts peptides that cross-react with IgE antibodies. *Mol. Immunol.* 46: 873–883
- José-Estanyol, M., Gomis-Rüth, F. X., Puigdomènech, P. (2004). The eight-cysteine motif, a versatile structure in plant proteins. *Plant Physiol. Biochem.* 42: 355–365.
- Kadziola, A., Abe, J., Svensson, B., Haser, R. (1994). Crystal and molecular structure of barley α -amilase. *J. Mol. Biol.* 239: 104–121.
- Kadziola, A., Sogaard, M., Svensson, B., Haser, R. (1998). Molecular structure of a barley α -amylase inhibitor complex: implications for starch binding and catalysis. *J. Mol Biol.* 278: 205-217.
- Kandra, L., Gyémánt, G. (2000). Examination of the active sites of human salivary α -amilase (HAS). *Carbohydr. Res.* 329: 579–585.
- Kandra, L., Gyémánt, G., Lipták, A. (2002). Action pattern of α -amylase modified maltooligosaccharides. *Biologia.* 57 (11): 171–180.
- Kasahara, K., Hayashi, K., Arakawa, T., Philo, J. S., Wen, J., Hara, S., Yamaguchi, H. (1996). Complete sequence, subunit structure, and complexes with pancreatic α -amylase of an α -amylase inhibitor from *Phaseolus vulgaris* white kidney beans. *J. Biochem.* 120: 177–183.
- Kortt, A. A., Caldwell, J. B., Lilley, G. G., Higgins, T. J. V. (1991). Amino acid and cDNA sequences of a methionine-rich 2S albumin protein from sunflower seed (*Helianthus annus* L.). *Eur. J. Biochem.* 195: 329–334.
- Kreis, M., Forde, B. G., Rahman, S., Mifflin, B. J., Shewry, P. R. (1985). Molecular evolution of the seed storage proteins of barley, rye and wheat. *J. Mol. Biol.* 183: 499-502.
- Kusaba-Nakayama, M., Ki, M., Iwamoto, M., Shibata, R., Sato, M., Imaizumi, K. (2000). CM-3, one of the wheat α -amylase inhibitor subunits, and binding of IgE in sera from Japanese with atopic dermatitis related to wheat. *Food Chem. Tox.* 38: 179-185.

- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., Thornton, J. M. (1993). PROCHECK: A program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* 26: 283-291.
- Layer, P., Carlson, G. L., DiMagno, E. P. (1985). Partially purified white bean amylase inhibitor reduces starch digestion in vitro and inactivates intraduodenal amylase in humans. *Gastroenterology.* 88: 1895–1902.
- Li, S. S. L., Lin, T. T. S., Forde, M. D. (1977). Isolation and characterization of a low-molecular weight seed protein from *Ricinus communis*. *Biochim. Biophys. Acta* 492: 364-369.
- Lin, K. F., Lee, T. R., Tsai, P. H., Hsu, M. P., Chen, C. S., Lyu, P. C. (2007). Structure-based protein engineering for alpha-amylase inhibitory activity of plant defensin. *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics* 68:530–540.
- Lindahl, E., Hess, B., van der Spoel, D. (2001). GROMACS 3.0: A Package for Molecular Simulation and Trajectory Analysis. *J. Mol. Model.* 7: 306-317.
- Lyons, A., Richardson, M., Tatham, A. S., Shewry, P. R. (1987). Characterization of homologous inhibitors of trypsin and α -amylase. *Biochim. Biophys. Acta.* 915: 305-313.
- MacGregor, E..A., Janecek, S. Svensson, B. (2001). Relationship of sequence and structure to specificity in the α -amylase family of enzymes. *Biochem. Biophys. Acta.* 1546: 1-20.
- Machado, O. L. T., Silva, J. G., Jr. (1992). An allergenic 2S storage protein from *Ricinus communis* seeds which is part of the albumin precursor predict by c-DNA data. *Braz. J. Med. Biol. Press.* 25 (6): 567-582.
- Machius, M., Wiegand, G., Huber, R. (1995). Crystal structure of calcium-depleted *Bacillus licheniformis* α -amylase at 2.2 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 246: 545-559.
- Machius, M., Vertesy, L., Huber, R., Wiegand, G. (1996). Carbohydrate and protein-based inhibitors of porcine pancreatic α -amylase: structure analysis and comparison of their binding characteristics. *J. Mol. Biol.* 260: 409-421.
- Marshall, J. J., Lauda, C. M. (1975). Purification and properties of phaseolamine, an inhibitor of α -amylase, from the kidney bean, *Phaseolus vulgaris*. *J. Biol. Chem.* 250: 8030–8037.

- Matsuura, Y., Kunusoki, M., Harada, W., Kakudo, M. (1984). Structure and Possible Catalytic Residues of Taka-Amylase A. *J. Biochem.* 95(3): 697–702.
- Mazur, A. K., Haser, R., Payan, F. (1994). The catalytic mechanism of α -amylases based upon enzyme crystal structures and model binding calculations. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 204: 297-302.
- Mello, M. O., Silva-Filho, M. C. (2002). Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. *Braz. J. Plant Physiol.* 14(2): 71-81.
- Mendez, E., Rocher, A., Calero, M., Girbes, T., Citores, L., Soriano, F. (1996). Primary structure of ω -hordothionin, a member of a novel family of thionins from barley endosperm, and its inhibition of protein synthesis in eukaryotic and prokaryotic cell-free systems. *Eur. J. Biochem.* 239: 67-73.
- Mills, E. N. C., Jenkins, J. A., Alcocer, M. J. C., Shewry, P. R. (2004). Structural, Biological, and Evolutionary Relationships of Plant Food Allergens Sensitizing via the Gastrointestinal Tract. *Crit. Rev. Food Sci.* 44(5): 379-407.
- Mills, E. N. C., Madsen, C., Shewry, P. R., Wichers, H. J. (2003). Food allergens of plant origin - their molecular and evolutionary relationships. *Trends Food. Sci. Technol.* 14: 145-156.
- Mirkov, T. E., Evans, S. V., Wahlstrom, J., Gomez, L., Young, N. M., Chrispeels, M. J. (1995). Location of the active site of the bean α -amylase inhibitor and involvement of a Trp, Arg, Tyr triad. *Glycobiology.* 5: 45–50.
- Miyazaki, T., Morimoto, T., Fukuyama, K., Matsubara, H. (1994). Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the α -amylase inhibitor coded 0.19 from wheat kernel. *J. Biochem.* 115: 179-181.
- Mundy, J., Svendsen, I., Hejgaard, J. (1983). Barley α -amylase/subtilisin inhibitor. Isolation and characterization. *Carlsberg Res. Commun.* 48: 81-90.
- Mundy, J., Hejgaard, J., Svendsen, I. (1984). Characterization of a bifunctional wheat inhibitor of endogenous α -amylase and subtilisin. *FEBS Lett.* 167: 210–214.

- Murao, S., Goto, A., Matsui, Y., Ohyama, K. (1980). New proteinous inhibitor (Haim) of animal α -amylase from *Streptomyces griseosporus* YM-25. *Agric. Biol. Chem.* 44: 1679–1681.
- Murao, S., Oouchi, N., Goto, A., Arai, M. (1983). New proteinous α -amylase inhibitor (Paim) from *Streptomyces corchorushii*. *Agric. Biol. Chem.* 47: 453–454.
- Nahoum, V., Farisei, F., Le-Berre-Anton, V., Egloff, M.P., Rouge, P., Poerio, E., Payan, F. (1999). A plant-seed inhibitor of two classes of α -amylases: X-ray analysis of *Tenebrio molitor* larvae α -amylase in complex with the bean *Phaseolus vulgaris* inhibitor. *Acta Biol. Crystal. D.* 55: 360-362.
- Nahoum, V., Roux, G., Anton, V., Rougé, P., Puigserver, A., Bischoff, H., Henrissat, B., Payan, F. (2000). Crystal structures of human pancreatic α -amylase in complex with carbohydrate and proteinaceous inhibitors. *Biochem. J.* 346: 201-208.
- Nascimento, V. V. (2002). Caracterização de polipeptídeo inibidor de α -amilase isolado das sementes de *Ricinus communis*. Monografia para obtenção de graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Norte Fluminense.
- Oda, Y., Matsunaga, T., Fukuyama, K., Miyasaki, T., Morimoto, J. T. (1997). Tertiary and quaternary structures of 0.19 α -amylase inhibitor from wheat kernel determined by X-ray analysis at 2.06 Å resolution. *Biochemistry.* 36: 13503-13511.
- Odani, S., Koide, T., Ono, T., Ohnishi, K. (1983). Structural relationship between barley (*Hordeum vulgare*) trypsin inhibitor and castor-bean (*Ricinus communis*) storage protein. *Biochem. J.* 213(2): 543-5.
- O'Donnell, M. D., Fitzgerald, O., McGeeney, K. F. (1977). Differential serum amylase determination by use of an inhibitor and design of a routine procedure. *Clin. Chem.* 23 (3): 560-566.
- Ogunniyi, D. S. (2006). Castor oil: A vital industrial raw material. *Bioresour. Technol.* 97: 1086-1091.
- Ohtsubo, K.I., Richardson, M. (1992). The amino acid sequence of a 20 kDa bifunctional subtilisin/ α -amylase inhibitor from bran of rice (*Oryza sativa* L.) seeds. *FEBS Lett.* 309: 68–72.

- Oliveira-Neto, O. B., Batista, J. A. N., Rigden, D. J., Franco, O. L., Falcão, R., Frago, R. R., Mello, L. V., Santos, R. C., Grossi-de-Sá, M. F. (2003). Molecular Cloning of α -Amylases from Cotton Boll Weevil, *Anthonomus grandis* and Structural Relations to Plant Inhibitors: An Approach to Insect Resistance. *J. Protein Chem.* 22 (1): 77-87.
- Onesti, S., Brick, P., Blow, D. M. (1991). Crystal structure of a Kunitz-type trypsin inhibitor from *Erythrina caffra* seeds. *J. Mol. Biol.* 217: 153-176.
- Oostenbrink, C., Villa, A., Mark, A. E., Van Gunsteren, W. F. (2004). A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: the GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6". *J. Comput. Chem.* 25 (13): 1656-1676.
- Orengo, C. A., Thornton, J. M. (1993). Alpha plus beta folds revisited: some favoured motifs. *Structure* 1: 105-120.
- Pantoja-Uceba, D., Bruix, M., Giménez-Gallego, G., Rico, M., Santoro, J. (2003). Solution structure of RicC3, a 2S Albumin Storage Protein from *Ricinus communis*. *Biochemistry.* 42: 13839-13847.
- Pantoja-Uceda, D., Bruix, M., Santoro, J., Rico, M., Monsalve, R., Villalba, M. (2002). Solution structure of allergenic 2S albumins. *Biochem. Soc. Trans.* 30 (6): 919-924.
- Parente, E. J. S. (2004). BIODIESEL: Uma Aventura Tecnológica num País Engraçado. CD-ROM do minicurso apresentado no 1º Congresso Nacional de Mamona.
- Pastorello, E. A., Farioli, L., Conti, A., Pravettoni, V., Bonomi, S., Lametti, S., Fortunato, D., Scibilia, J., Bindslev-Jensen, C., Ballmer-Weber, B., Robino, A. M., Ortolani, C. (2007). Wheat IgE-mediated food allergy in European patients: α -amylase inhibitors, lipid transfer proteins and low-molecular-weight glutenins. Allergenic molecules recognized by double-blind, placebocontrolled food challenge. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 144: 10-22
- Payan, F. (2004). Structural basis for the inhibition of mammalian and insect α -amylase by plant protein inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta.* 1696: 171-180.
- Pelegri, P. B., Lay, F. T., Murad, A. M., Anderson, M. A., Franco, O. L. (2008). Novel insights on the mechanism of action of α -amylase inhibitors from the plant defensin family. *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics* 73:719-729

- Pereira, P. J. B., Lozanov, V., Patthy, A., Huber, R., Bode, W., Pongor, S., Strobl, S. (1999). Specific inhibition of insect α -amylases: yellow meal worm α -amylase in complex with the Amaranth α -amylase inhibitor at 2.0 Å resolution. *Structure*. 7: 1079-1088.
- Petrucci, T., Rab, A., Tomasi, M., Silano, V. (1976). Further characterization studies of the α -amylase protein inhibitor of gel eletrophoretic mobility 0. 19 from the wheat kernel. *Biochim. Biophys. Acta*. 420: 288-297.
- Qian, M., Haser, R., Buisson, G., Duee, E., Payan, F. (1994). The active center of a mammalian α -amylase. Structure of the complex of a pancreatic α -amylase with a carbohydrate inhibitor refined to 2.2-Å resolution. *Biochemistry*. 33: 6284–6294.
- Radauer, C., Breiteneder, H. (2007). Evolutionary biology of plant food allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 120 (3): 518-525.
- Rico, M., Bruix, M., Gonzalez, C., Monsalve, R. I., Rodriguez, R. (1996). 1 H NMR assignment and global fold of napin Bnlb, a representative 2S albumin seed protein. *Biochemistry*. 35: 15672-15682.
- Robynt, J. F., French, D. (1963). Action pattern and specificity of an amylase from *Bacillus subtilis*. *Arch. Biochem. Biophys.* 100: 451–462.
- Robynt, J. F., French, D. (1970). The action pattern of porcine pancreatic α -amylase in relationship to the substrate binding site of the enzyme. *J. Biol. Chem.* 45: 3917–3927.
- Rodenburg, K. W., Varallyay, E., Svendsen, I., Svensson, B. (1995). Arg-27, Arg-127 and Arg-155 in the β -trefoil protein barley α -amylase/subtilisin inhibitor are interface residues in the complex with barley α -amylase 2. *Biochem. J.* 309: 969-976.
- Rutenber, E., Robertus, J. D. (1991). Structure of ricin B chain at 2.5 Å resolution. *Proteins*. 10: 260-269.
- Sales, M. P, Gerhardt, I. R, Grossi-de-Sá, M. F, Xavier-Filho, J. (2000). Do legume storage proteins play a role in defending seeds against bruchids? *Plant Physiol.* 124: 515-522.
- Saboury, A. A. (2002). Stability, activity and binding properties study of α -amylase upon interaction with Ca^{2+} and Co^{2+} . *Biologia*. 57 (11): 221–228.

- Sali, A., Blundell, T. A. (1993). Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* 234, 779–815.
- Sanchez, R., Sali, A. (1997). Advances in comparative protein-structure modeling. *Curr. Opin. Struc. Biol.* 7: 206-214.
- Schimoler-O'Rourke, R., Richardson, M., Selitrennikoff, C. P. (2001). Zeamatin inhibits trypsin and α -amylase activities. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2365-2366.
- Schwede, T., Kopp, J., Guex, N., Peitsch, M. C. (2003). Swiss-Model: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res.* 31 (9): 3381-3385.
- Shakib, F., Ghaemmaghami, A. M., Sewell, H. F. (2008). The molecular basis of allergenicity. *Trends Immunol.* 29 (12): 633-642.
- Sharief, F. S., Li, S. S. (1982). Amino acid sequence of small and large subunits of seed storage protein from *Ricinus communis*. *J. Biol. Chem.* 257: 14753-14759.
- Shewry, P. R., Beaudoin, F., Jenkins, J., Griffiths-Jones, S., Mills, E. N. C. (2002). Plant protein families and their relationships to food allergy. *Biochem. Soc. Trans.* 30 (6): 906-910.
- Silva, C. P., Terra, W. R., Xavier-Filho, J., Grossi de Sá, M. F., Lopes, A. R., Pontes, E. G. (1999). Digestion in larvae of *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) with emphasis on α -amylases and oligosaccharidases. *Insect Biochem. Molec.* 29: 355-366.
- Silva, C. P., Terra, W. R., Xavier-Filho, J., Grossi de Sá, M. F., Isejima, E. M., DaMatta, R. A., Miguens, F. C., Bifano, T. D. (2001). Digestion of legume starch granules by larvae of *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) and the induction of α -amylases in response to different diets. *Insect Biochem. Molec.* 31: 41–50.
- Silva, J. G. Jr., Machado, O. L. T., Izumi, C., Padovan, J. C., Chait, B. T., Mirza, U. A., Greene, L. J. (1996). Amino acid sequence of a new 2S albumin from *Ricinus communis* which is part of a 29 kDa precursor protein. *Arch. Biochem. Biophys.* 336: 10-18.
- Singh, A., Panzani, R. C., Singh, A. B. (1997). Specific IgE to castor bean (*Ricinus communis*) pollen in the sera of clinically sensitive patients to seeds. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 7: 169-174.

- Sivakumar, S., Mohan, M., Franco, O. L., Thayumanavan, B. (2006). Inhibition of insect pest α -amylases by little and finger millet inhibitors. *Pestic. Biochem. Phys.* 85: 155–160.
- Spies, J. R. (1974). Allergens. *J. Agric. Food Chem.* 22: 30-36.
- Spies, J. R., Coulson, E. J. (1943). The chemistry of allergens VIII. Isolation and properties of an active protein polysaccharide fraction, CB-1A from castor bean. *J. of the Amer. Chem. Soc.* 65: 1720-1725.
- Strobl, S., Gomis-Ruth, F.X, Maskos, K, Frank, G., Huber, R., Glockshuber, R. (1997). The α -amylase from the yellow meal worm: complete primary structure, crystallization and preliminary X-ray analysis. *FEBS Lett.* 409: 109-114.
- Strobl, S., Maskos, K., Betz, M., Wiegand, G., Huber, R., Gomis-Rüth, F. X., Glockshuber, R. (1998a) Crystal structure of yellow mealworm α -amylase at 1.64 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 278: 617-628.
- Strobl, S., Maskos, K., Wiegand, G., Huber, R., Gomis-Rüth, F. X., Glockshuber, R. (1998b). A novel strategy for inhibition of α -amylases: yellow meal worm α -amylase in complex with the Ragi bifunctional inhibitor at 2.5 Å resolution. *Structure.* 6: 911-921
- Strobl, S., Mühlhahn, P., Bernstein, R., Wiltscheck, R., Maskos, K., Wunderlich, M., Huber, R., Glockshuber, R. Holak, T. A. (1995). Determination of the three dimensional structure of the bifunctional α -amylase/trypsin inhibitors from Ragi seeds by NMR spectroscopy. *Biochemistry.* 34: 8281-8293.
- Sugannuma, T., Matsuno, R., Ohinishi, M., Hiromi, K. (1978). A Study of the Mechanism of Action of Taka-Amylase A on Linear Oligosaccharides by Product Analysis and Computer Simulation. *J. Biochem.* 84 (2): 293–316.
- Svensson, B. (1994). Protein engineering in the α -amylase family: catalytic mechanism, substrate specificity and stability. *Plant Mol. Biol.* 25: 141-157
- Svensson, B., Fukuda, K., Nielsen, P. K. and. Bønsager, B. C. (2004). Proteinaceous α -amylase inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics.* 1696 (2): 145-156.
- Svensson, B., Jensen, M. T., Mori, H., Bak-Jansen, K. S., Bønsager, B., Nielsen, P. K., Kramhøft, B., Prætorius-Ibba, M., Nøhr, J., Junge, N., Greffe, L., Milliamson, G., Druguez, H. (2002). Fascinating facets of function and

- structure of amylolytic enzymes of glycoside hydrolase family 13. *Biologia*. 57 11: 5–19.
- Terras, F. R. G., Schoofs, H. M.E., De Bolle, M. F. C., Van Leuven, F., Rees, S. B., Vanderleyden, J., Cammue, B. P. A., Broekaert, W. F. (1992). Analysis of two novel classes of antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *J. Biol. Chem.* 267: 15301-15309.
- Terras, F. R. G., Schoofs, H. M.E., Thevissen, K., Osborn, R. W., Vanderleyden, J., Cammue, B. P. A., Broekaert, W. F. (1993). Synergistic enhancement of the antifungal activity of wheat and barley thionins by radish and oilseed rape 2s albumins and by barley trypsin inhibitors. *Plant Physiol.* 103: 1311-1319.
- Thevissen, K., Ghazi, A., De Samblanx, G., Brownlee, C., Osborn, R.W., Broekaert, W.F. (1996). Fungal membrane responses induced by plant defensines and thionins. *J. Biol. Chem.* 271: 15018-15025.
- Titarenko, E., Chrispeels, M. J. (2000). cDNA cloning, biochemical characterization and inhibition by plant inhibitors of the α -amylases of the Western corn rootworm, *Diabrotica virgifera*. *Insect Biochem. Molec.* 30 (10): 979-990.
- Thoma, J. A., Brothers, C., Spradlin, J. (1970). Subsite mapping of enzymes. Studies on *Bacillus subtilis* amylase. *Biochemistry.* 9: 1768–1775.
- Thoma, J. A., Rao, G. V. K., Brothers, C., Spradlin, J., Li, L. H. (1971). Subsite Mapping of Enzymes. Correlation of product patterns with Michaelis parameters and substrate-induced strains. *Biol. Chem.* 246: 5621–5635.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22 (22): 4673-4680.
- Thorpe, S. C., Kemeny, D. M., Panzani, R. C., McGurl, B., Lord, J. M. (1988). Allergy to castor bean – Identification of the major allergens in bean seeds. *J. Allergy Clin. Immunol.* 82, 67–72.
- Turcotte, G. E., Nadeau, L., Forest, J. C., Douville, P., Leclerc, P., Bergeron, J., Lacroix, B. F. (1994). A new rapid immunoinhibition pancreatic amylase assay: diagnostic value for pancreatitis. *Clin. Biochem.* 27 (2): 133-139.

- Uchôa, H. B., Jorge, G. E., Freitas Da Silveira, N. J., Câmera, J. C. Jr, Canduri, F., De Azevedo, W. F. Jr. (2004). Parmodel: a web server for automated comparative modeling of proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 325 (4): 1481-1486.
- Valleé, F., Kadziola, A., Bourne, Y., Juy, M., Rodenburg, K. W., Svensson, B., Haser, R. (1998). Barley α -amylase bound to its endogenous protein inhibitor BASI: crystal structure of the complex at 1.9 Å resolution. *Structure* 6: 649- 659.
- Valleé, B. L., Stein, E. A., Summerwell, W. N., Fisher, E.H. (1959). Metal content of α -amylases of various origins. *J. Biol. Chem.* 234: 2901-2905.
- Valência, A., Bustillo, A. E., Ossa, G. E., Chrispeels, M. J. (2000). α -Amylases of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) and their inhibition by two plant amylase inhibitors. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30: 207–213.
- Valois, A. C. C. (2001). Importância dos transgênicos para a agricultura. Caderno de ciência & tecnologia, Brasília V. 18, n. 1, p. 27-53.
- Vigers, A., Roberts, W., Sellitrennikoff, C. P. (1991). A new family of plant antifungal proteins. *Mol. Plant Microb. Interact.* 4: 315-323.
- Vértesy, L., Oeding, V., Bender, R., Zepf, K. Neemann, G. (1984). Tendamistat (HOE 467), a tight-binding α -amylase inhibitor from *Streptomyces tendae* 4158. *Eur. J. Biochem.* 141: 505–512.
- Whitaker, J. R., Finardi Filho, F. Lajolo, F. M. (1988). Parameters involved in binding of porcine pancreatic α -amylase with black bean inhibitor: role of sulfhydryl groups, chloride, calcium, solvent composition and temperature. *Biochimie.* 70: 1153-1161.
- Wijaya, R., Neumann, G. M., Condrón, R., Hughes, A. B., Polya, G. M. (2000). Defense proteins from seed of *Cassia fistula* include a lipid transfer protein homologue and a protease inhibitory plant defensin. *Plant Sci.* 159: 243-255.
- Wiegand, G., Epp, O. Huber, R. (1995). The crystal structure of porcine pancreatic α -amylase in complex with the microbial inhibitor Tendamistat. *J. Mol. Biol.* 247: 99–110.
- Wilcox, E. R., Whitaker, J. R. (1984). Characterization of two amylase inhibitors from black bean (*Phaseolus vulgaris*). *J. Food Biochem.* 8: 189-213.

- Xavier-filho, J. (1993). Sementes e suas defesas contra insetos. Projeto Multinacional de Biotecnologia e alimento. Organização dos Estados Americanos OEA. Editado pela Universidade Federal do Ceará.
- Yamada, T., Hattori, K., Ishimoto, M. (2001). Purification and characterization of two α -amylase inhibitors from seeds of tepary bean (*Phaseolus acutifolius* A. Gray). *Phytochemistry* 58: 59-66.
- Youle, R. J., Huang, A. H. (1978). Evidence that castor bean allergens are albumin storage proteins in protein bodies of castor bean. *Plant Physiol.* 61: 13-16.
- Zemke, K. J., Müller-Fahrnow, A., Jany, K.-D., Pal, G. P., Saenger, W. (1991). The three-dimensional structure of the bifunctional proteinase K/ α -amylase inhibitor from wheat (PK13) at 2.5 Å resolution. *FEBS Lett.* 279: 240-242.
- Zhi-Fei, Z., Ting-Ting, N., Zu-Min, X., Ge-Xin, Z., Yan-He, M. (2008). The crystal water affect in the linteraction between the *Tenebrio molitor* α -amylase and Its inhibitor. *Bioinorganic Chemistry and Applications* 2008: 1-6.

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](#)