

PROTEÍNA TRANSPORTADORA DE LIPÍDEO DE *Vigna unguiculata*:
OBTENÇÃO RECOMBINANTE E ANÁLISE DE SUA ATIVIDADE
INIBITÓRIA SOBRE α -AMILASE SALIVAR HUMANA E O ESTUDO DA
CORRELAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA COM SUAS DIFERENTES
REGIÕES ESTRUTURAIS

FLÁVIA CAMILA VIEIRA DA SILVA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE - UENF
CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
Dezembro de 2014

PROTEÍNA TRANSPORTADORA DE LIPÍDEO DE *Vigna unguiculata*:
OBTENÇÃO RECOMBINANTE E ANÁLISE DE SUA ATIVIDADE
INIBITÓRIA SOBRE α -AMILASE SALIVAR HUMANA E O ESTUDO DA
CORRELAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA COM SUAS DIFERENTES
REGIÕES ESTRUTURAIS

FLÁVIA CAMILA VIEIRA DA SILVA

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

Orientador: Prof. André de Oliveira Carvalho

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos – LFBM, no Centro de Biociências e Biotecnologia – CBB

CAMPOS DOS GOYTACAZES/RJ

Dezembro/2014

PROTEÍNA TRANSPORTADORA DE LIPÍDEO DE *Vigna unguiculata*:
OBTENÇÃO RECOMBINANTE E ANÁLISE DE SUA ATIVIDADE
INIBITÓRIA SOBRE α -AMILASE SALIVAR HUMANA E O ESTUDO DA
CORRELAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA COM SUAS DIFERENTES
REGIÕES ESTRUTURAIS

FLÁVIA CAMILA VIEIRA DA SILVA

Aprovada em 02 de dezembro de 2014.

Comissão examinadora:

Prof^a. Katia Valevski Sales Fernandes (PhD. em Bioquímica e Biologia Molecular de
Plantas) – UENF

Prof. Francisco Jose Alves Lemos (Doutor em Ciências) – UENF

Prof^a. Flavia Emenegilda da Silva (Doutora em Biociências e Biotecnologia)
– UFF/UFRJ

Prof. André de Oliveira Carvalho (Doutor em Biociências e Biotecnologia) - UENF
Orientador

Agradecimentos

A Deus por seu amor imensurável e por ter me sustentado durante esse período.

A minha mãe por sempre acreditar em mim e nos meus sonhos. Por ser o colinho sempre presente nos momentos difíceis e por todo ensinamento de vida. Te amo!

Ao professor André de Oliveira Carvalho pela orientação e por todos os conselhos.

Ao professor Francisco José Alves Lemos, professora Kátia Valevski Sales Fernandes e professora Flávia Emenegilda da Silva por terem aceitado participar da banca.

À Dr^a Érica de Oliveira Mello por ser revisora da minha dissertação e por toda a ajuda durante esses anos de trabalho.

À Dr^a Viviane Veiga do Nascimento pela colaboração na realização dos testes com α -amilase e nos estudos de modelagem.

Aos colegas do grupo da professora Valdirene Moreira Gomes por toda ajuda e pelos momentos de descontração.

Aos técnicos Luís, Noil e Valéria por toda a ajuda e pela manutenção do laboratório.

A todos os alunos, professores e funcionários do LFBM.

Às amigas Géssika, Maria, Julia Fardin e Larinne pela amizade, por toda a ajuda prestada durante todo esse tempo, pelos momentos de descontração, pelos conselhos e por todo incentivo! Obrigada, meninas!

Índice

Agradecimentos.....	I
Índice.....	II
Lista de figuras.....	VI
Lista de tabelas.....	VII
Resumo.....	VIII
Abstract.....	X
1- Introdução.....	1
1.1 - Peptídeos antimicrobianos.....	1
1.2 - Peptídeos antimicrobianos de plantas.....	3
1.3 - Proteínas transportadoras de lipídeos de plantas.....	3
1.3.1 - Histórico.....	4
1.3.2 - Expressão gênica e localização.....	5
1.3.3 - Aspectos estruturais e classificação em famílias.....	6
1.3.4 - Atividades biológicas.....	10
1.4 – α -Amilases.....	12
1.4.1 - As α -amilases e amido.....	12
1.4.2 - Inibidores de α -amilases de plantas.....	14

1.4.3 - Aplicação dos inibidores.....	15
2 - Objetivos.....	17
2.1 - Objetivo geral	17
2.2 - Objetivos específicos.....	17
3 - Material e métodos.....	18
3.1- Materiais biológicos.....	18
3.1.1- Bactérias e manutenção da cultura.....	18
3.1.2- α -Amilase – obtenção e manutenção.....	20
3.1.3- LTP natural de <i>Vigna unguiculata</i>	20
3.1.4- Anticorpos.....	20
3.2- Expressão e purificação da Vu-LTPr.....	20
3.2.1- Indução da Vu-LTPr.....	20
3.2.2- Extração da Vu-LTPr.....	21
3.2.3- Purificação da Vu-LTPr.....	21
3.2.4- Dosagem de proteínas.....	22
3.2.5- Análise eletroforética da Vu-LTPr.....	22
3.2.5.1- Eletroforese descontínua em gel de poliacrilamida 12% sob condições desnaturantes.....	22
3.2.5.2- Preparo das amostras e condições de corrida.....	23
3.2.5.3- Coloração e descoloração do gel.....	23

3.2.6- Clivagem com enteroquinase da Trx-6His- Vu-LTPr.....	23
3.2.7- Eletroforese em gel tricina na presença de dodecil sulfato de sódio.....	24
3.2.8- Purificação da Vu-LTPr após clivagem - cromatografia de fase reversa em coluna C18.....	24
3.3- Caracterização funcional da Vu-LTPr.....	25
3.3.1- <i>Western blotting</i>	25
3.3.2- Análise das estruturas secundária da Vu-LTPr e da Vu-LTP através de dicroísmo circular.....	26
3.3.3- Ensaio de inibição da atividade da α -amilase salivar humana por Vu-LTPr.....	26
3.4- Estudo da relação estrutura atividade biológica da Vu-LTPr.....	27
3.4.1- Determinação da estrutura da Vu-LTPr por modelagem.....	27
3.4.2- Síntese química de regiões da Vu-LTPr.....	28
3.4.3- Ressuspensão e dosagem dos peptídeos.....	28
3.4.4- Teste inibição da α -amilase salivar humana com as regiões sintéticas.....	28
4- Resultados.....	29
4.1 -Superexpressão e extração da Vu-LTPr.....	29
4.2 - Purificação da Trx-6His- Vu-LTPr.....	30
4.3 - Clivagem com EK.....	32
4.4 - Purificação da Vu-LTPr após clivagem.....	33
4.4.1- Cromatografia de fase reversa em coluna C18.....	33
4.5- Caracterização funcional da Vu-LTPr.....	35
4.5.1- <i>Western blotting</i>	35

4.5.2- Análise das estruturas secundária da <i>Vu</i> -LTP _r e da <i>Vu</i> -LTP através de dicroísmo circular.....	36
4.5.3- Ensaio de inibição da atividade da α -amilase salivar humana por <i>Vu</i> -LTP _r	37
4.6- Estudo da relação estrutura atividade biológica da <i>Vu</i> -LTP _r	37
4.6.1- Estudos de modelagem por homologia da <i>Vu</i> -LTP _r	37
4.6.2- Análise dos elementos estruturais de LTPs e comparação com a <i>Vu</i> -LTP _r e seleção para síntese química.....	40
4.7- Teste inibição da α -amilase salivar humana com os peptídeos selecionados.....	42
5- Discussão.....	43
5.1- Superexpressão e purificação da <i>Vu</i> -LTP _r	43
5.2- Relação estrutura atividade dos peptídeos na inibição contra α -amilase salivar humana.....	46
6 – Conclusões.....	51
7- Bibliografia.....	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação gráfica da estrutura tridimensional dos peptídeos antimicrobianos de acordo com a classificação de Jenssen <i>et al.</i> (2006), Giuliani <i>et al.</i> (2007) e Guaní-Guerra <i>et al.</i> (2010).....	2
Figura 2 - Representação gráfica da estrutura terciária da LTP de <i>Vigna radiata</i> (feijão-mungo) pertencente à família LTP1.....	7
Figura 3 - Representação gráfica da estrutura terciária da LTP de <i>Oryza sativa</i> (arroz) pertencente à família LTP2.....	8
Figura 4 - Representação simplificada da estrutura primária das duas famílias LTPs com destaque para os resíduos de cisteínas e os arranjos das pontes dissulfeto entre as famílias das LTPs1 e das LTPs2.....	9
Figura 5 - Sobreposição da representação da estrutura tridimensional da LTP2 de arroz ligada e não ligada a uma molécula de colesterol.....	9
Figura 6 - Representação esquemática da estrutura tridimensional da α -amilase salivar humana complexada com substrato no sítio ativo.....	13
Figura 7 - Representação da construção pET-LTP com destaque para o mapa e região de policlonagem do vetor pET-32 Ek/LIC com a indicação da posição da inserção do clone da Vu-LTP.....	19
Figura 8 - Visualização eletroforética das amostras obtidas após indução da Vu-LTP _r (Trx-6His-Vu-LTP _r) com meio LB em gel Laemmli (12%) na presença de SDS.....	29
Figura 9 - Cromatograma do extrato solúvel de <i>Escherichia coli</i> contendo a Trx-6His-Vu-LTP _r em coluna de Ni ⁺ -NTA agarose.....	30
Figura 10 - Visualização eletroforética dos picos obtidos após cromatografia em coluna de Ni ⁺ -NTA agarose do extrato solúvel contendo a Trx-6His-Vu-LTP _r em SDS-Tricina-PAGE.....	31
Figura 11 - Visualização eletroforética da reação de clivagem com a endoproteínase EK em gel SDS-Tricina-PAGE.....	32
Figura 12 - Cromatograma da purificação da Vu-LTP _r após clivagem do pico P2 com EK em coluna de fase reversa C18.....	33
Figura 13 - Visualização eletroforética da purificação da Vu-LTP _r , após clivagem	

com EK, em coluna de fase reversa C18 em gel SDS-Tricina-PAGE.....	34
Figura 14 – (A) Visualização eletroforética do gel usado para o <i>Western blotting</i> , em gel SDS-Tricina-PAGE; (B) Visualização por sobreposição da imagem de fluorescência e da membrana do <i>Western blotting</i> após revelação por quimioluminescência.....	35
Figura 15 - Visualização gráfica da sobreposição dos espectros de dicroísmo circular da <i>Vu-LTP</i> e <i>Vu-LTPr</i>	36
Figura 16 - Visualização gráfica da inibição da atividade da enzima α -amilase salivar humana por diferentes concentrações da <i>Vu-LTPr</i>	37
Figura 17- (A) Alinhamento de sequências de aminoácidos da <i>Vu-LTPr</i> e da LTP de <i>Vigna radiata</i> MbnsLTP ₁ usada como molde para a construção do modelo tridimensional da <i>Vu-LTPr</i> . (B) Representação esquemática da estrutura tridimensional da <i>Vu-LTPr</i> (C) Sobreposição das representações esquemáticas das estruturas tridimensionais da <i>Vu-LTPr</i> com a LTP de <i>Vigna radiata</i>	38
Figura 18 - (A) Visualização gráfica do mapa de Ramachandran da estrutura da <i>Vu-LTPr</i> ; (B) Mapa estatístico das porcentagens de aminoácidos da <i>Vu-LTPr</i> nas regiões do mapa de Ramachandran.....	39
Figura 19 - Representação esquemática da sobreposição da estrutura dos peptídeos selecionados com a estrutura tridimensional da <i>Vu-LTPr</i> determinada por modelagem utilizando o programa Modeller.....	41
Figura 20 - Visualização gráfica da inibição da atividade da enzima α -amilase salivar humana com os diferentes peptídeos selecionados.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação dos inibidores proteicos de α -amilase de plantas de acordo com sua estrutura segundo Richardson (1990).....	14
Tabela 2 - Sequência primária dos peptídeos sintéticos.....	40

RESUMO

Na natureza, os organismos vivos estão expostos a uma grande variedade de agentes potencialmente patogênicos ou competidores. Neste contexto, ao longo do processo evolutivo, as plantas desenvolveram diferentes mecanismos para se defender de agentes externos e entre eles estão a produção de peptídeos antimicrobianos (AMPs, do inglês *antimicrobial peptides*). Os AMPs são moléculas efetoras da defesa imune inata, possuem baixa massa molecular e ampla atividade antimicrobiana. São encontrados em diversos organismos inclusive em plantas. Entre os AMPs de plantas estão as proteínas transportadoras de lipídeos (LTP, do inglês *lipid transfer protein*). As LTPs são pequenos peptídeos divididos em duas famílias, sendo a família 1 composta por peptídeos de 10 kDa e a família 2 de peptídeos de 7 kDa. As LTPs da família 1 são conhecidas por estarem envolvidas em um amplo espectro de atividades e fenômenos biológicos tais como transporte de lipídeos *in vitro*, a síntese de cutina, β -oxidação, embriogênese somática, alergenicidade de alimentos, adaptação de plantas à estresses abióticos, defesa de plantas e atividade inibitória sobre α -amilase. O objetivo deste trabalho foi superexpressar e purificar a LTP de sementes de *Vigna unguiculata* (*Vu-LTPr*) em sistema heterólogo, e estudar sua atividade inibitória sobre α -amilase salivar humana *in vitro*, e adicionalmente relacionar a atividade inibitória com aspectos estruturais da *Vu-LTPr*. Para alcançar este objetivo foi realizada a superexpressão da *Vu-LTP* clonada no vetor pET-32 EK/LIC em sistema bacteriano. Após a superexpressão, a *Vu-LTPr* foi semi-purificada utilizando coluna Ni^+ -NTA agarose. E o processo de purificação da *Vu-LTPr* foi concluído por cromatografia de fase reversa em coluna C18 em sistema de alto desempenho num gradiente de 2-propanol. O correto enovelamento da *Vu-LTPr* foi mostrado por dicroísmo circular que comparou os espectros das *Vu-LTP* (natural) e *Vu-LTPr*. Também foi confirmada a correta tradução da proteína por *Western blotting*. Para a construção do modelo da estrutura tri-dimensional da *Vu-LTPr*, foi realizada uma busca de sequências primárias similares a proteína com estrutura tri-dimensional resolvidas e depositadas no banco de dados Protein Data Bank (PDB). A sequência escolhida como molde apresentou alto grau de similaridade a *Vu-LTPr*. E a partir deste modelo tri-dimensional foram selecionados quatro peptídeos para serem sintetizados. Os testes de inibição contra

a α -amilase salivar humana revelaram que a Vu-LTPr se mantinha ativa biologicamente e mostrou que $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ do peptídeo recombinante inibe 86% da atividade da enzima. Os testes com os peptídeos sintéticos mostraram que as regiões que compreendem as voltas da Vu-LTPr, carregadas positivamente, inibiram mais de 90% a atividade da α -amilase salivar humana.

ABSTRACT

In nature, organisms are exposed to a variety of potentially pathogenic or competing agents. In this context, along the evolutionary process, plants have developed various mechanisms to defend themselves against external agents which include the production of antimicrobial peptides (AMPs). The AMPs are effector molecules of the innate immune defense, of low molecular weight and broad antimicrobial activity. They are found in many organisms including plants. Among the plants AMPs are the lipid transfer proteins (LTPs). LTPs are small peptides divided into two families, being family 1 composed of 10 kDa peptides and family 2 of 7 kDa peptides. The family 1 LTPs are known to be involved in a broad spectrum of biological activities such as lipid transport *in vitro*, cutin synthesis, β -oxidation, somatic embryogenesis, food allergenicity, adaptation of plants to abiotic stresses, plant defense and inhibitory activity against α -amylase. The aim of this study was to overexpress and purify the LTP from *Vigna unguiculata* seeds (*Vu*-LTP_r) in a heterologous system, to study its inhibitory activity against human salivary α -amylase *in vitro*, and additionally to relate the inhibitory activity with structural features of *Vu*-LTP_r. To accomplish this overexpression, the *Vu*-LTP gene was cloned into vector pET-32 EK/LIC, in a bacterial system. The recombinant *Vu*-LTP_r was semi-purified using Ni⁺NTA-agarose column. And further purified by reversed-phase chromatography on C18 column in high performance system applying a gradient of 2-propanol. The correct folding of *Vu*-LTP_r was shown by circular dichroism, which compared the spectra of *Vu*-LTP (natural) and *Vu*-LTP_r. The correct protein translation was also confirmed by Western blotting. To build the three-dimensional structure model of *Vu*-LTP_r, a search for primary sequences similar to proteins with tri-dimensional structure resolved and deposited in the database Protein Data Bank (PDB) was done. The chosen sequence for use as a template showed high degree of similarity to *Vu*-LTP_r sequence. From this three-dimensional model, four peptides were selected to be synthesized. The inhibition tests against human salivary α -amylase revealed that *Vu*-LTP_r remained biologically active and that a 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ of the recombinant peptide were able to inhibit 86% of the enzyme activity. The tests with the synthetic peptides showed that the regions comprising the turns of *Vu*-LTP_r, positively charged, inhibited over 90% the activity of human salivary α -amylase.

1- Introdução

1.1- Peptídeos antimicrobianos

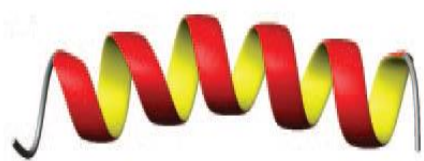
Os organismos vivos para se defenderem de infecções utilizam mecanismos sofisticados como a defesa imune inata que faz uso de diversos aparatos, indispensáveis ao combate de diferentes patógenos. Entre estes estão células de defesa e moléculas efetoras conhecidas como peptídeos antimicrobianos (AMPs, do inglês *antimicrobial peptides*). Durante os últimos anos vários destes AMPs foram isolados de animais, tanto vertebrados quanto invertebrados, assim como de plantas (Reddy *et al.*, 2004; Jenssen *et al.*, 2006).

A expressão destes AMPs pode ocorrer constitutivamente, ou seja, independe da presença de um microrganismo ou pode ocorrer de forma induzida com o aumento de sua expressão quando uma infecção é estabelecida (Bulet e Stocklin, 2005). Os AMPs são codificados por famílias multigênicas, sintetizados em ribossomos e em geral expressos como pró-peptídeos para posteriormente serem submetidos à ação enzimática de proteases para tornarem-se ativos (Lai e Gallo, 2009; Benko-Iseppon *et al.*, 2010; Carvalho e Gomes, 2011).

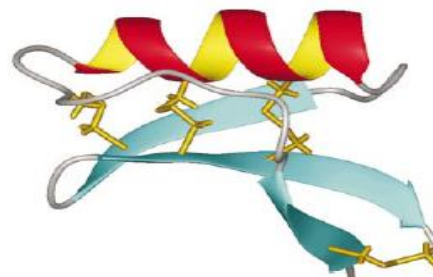
Os AMPs geralmente apresentam baixa massa molecular (aproximadamente 10 kDa) e se caracterizam por serem moléculas anfipáticas com carga líquida positiva (podendo variar de +2 a +9) em pH neutro, devido a presença de resíduos de lisina e arginina. Muitos AMPs são ricos em resíduos de cisteína, os quais conectam-se em pares formando as pontes dissulfeto, o que confere uma alta estabilidade para esses peptídeos, tornando-os mais resistentes a condições físico-químicas extremas (Giuliani *et al.*, 2007; Brandenburg *et al.*, 2012).

Em função da diversidade e semelhanças encontradas entre AMPs, torna-se difícil a divisão destes em classes. Segundo Jenssen *et al.* (2006), Giuliani *et al.* (2007) e Guaní-Guerra *et al.* (2010) os AMPs podem ser classificados em quatro grupos: (1) AMPs que apresentam estrutura em α -hélice, como a magainina (originalmente isolada da pele de sapo *Xenopus laevis*) (Gesell *et al.*, 1997); (2) AMPs com estrutura secundária formada por folha- β exemplificadas pelas defensinas de plantas (Almeida *et al.*, 2002); (3) AMPs com estruturas em “volta” como a polifemusina (originalmente isolada do caranguejo ferradura *Limulus*

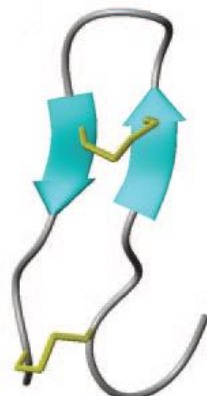
polyphemus) (Powers *et al.*, 2004) e (4) AMPs estendidos com predominância de um ou dois aminoácidos regulares na estrutura primária, como a indolidina, rica em resíduos de triptofano (originalmente isolada de neutrófilos de boi *Bos taurus*) (Rozek *et al.*, 2000). Apesar destas classificações muitos AMPs estão incluídos em mais de uma classe como a indolidina que é um AMP rico em aminoácido regular (triptofano) e também tem configuração espacial em α -hélice quando associado a membranas. Outros autores como Wang (2010), utilizaram o critério estrutura secundária para a classificação dos AMPs e os separou em quatro classes: família α , formada pelos peptídeos com α -hélice como a magainina-2; família β , que consiste nos AMPs com folha- β como a polifemusina; família $\alpha\beta$, que possui peptídeos com estrutura secundária composta tanto de α -hélice como por folha- β como as defensinas de planta e a família sem- $\alpha\beta$, formada por peptídeos que não apresentam α -hélice nem folha- β em sua estrutura tridimensional como a indolidina.



magainina-2
isolada da pele de *Xenopus laevis*
(sapo), (Gesell *et al.*, 1997)



defensina de planta
Pisum sativum (ervilha), (Almeida *et al.*, 2002)



polifemusina
isolada de *Limulus polyphemus*
(caranguejo ferradura), (Powers *et al.*, 2004)



indolidina
isolada de *Bos taurus* (boi), (Rozek *et al.*, 2000)

Figura 1 - Representação gráfica da estrutura tridimensional dos peptídeos antimicrobianos de acordo com a classificação de Jenssen *et al.* (2006), Giuliani *et al.* (2007) e Guaní-Guerra *et al.* (2010). As α -hélices são mostradas em amarelo e vermelho, as fitas- β em cinza-azulado e as pontes dissulfeto são mostradas em traços amarelos (Adaptada de Almeida *et al.*, 2002; Jenssen *et al.*, 2006).

Em plantas, diversos AMPs já foram identificados e a grande maioria deles se encaixa na classificação dos AMPs que possuem estrutura secundária formada por folha- β , segundo Jenssen *et al.* (2006), Giuliani *et al.* (2007) e Guaní-Guerra *et al.* (2010).

1.2- Peptídeos antimicrobianos de plantas

Nos últimos anos muitos AMPs de plantas têm sido isolados, caracterizados e estudados em relação à elucidação dos seus mecanismos de ação. Como desdobramento posterior, sua aplicação em tratamentos contra doenças que acometem tanto homens como plantas tem sido proposta. Um dos primeiros AMPs de plantas isolado foi a purotionina oriunda do endosperma de *Triticum aestivum* (trigo) que apresentou atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (De Caleyá *et al.*, 1972).

Os AMPs de plantas são sintetizados constitutivamente principalmente em órgãos reprodutivos como flores e sementes, e de maneira induzida em resposta a patógenos nos tecidos do local da infecção ou de forma sistêmica (Maróti *et al.*, 2011). Os AMPs de plantas são moléculas importantes na barreira de defesa contra patógenos e pestes, principalmente contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas e fungos (Benko-Iseppon *et al.*, 2010). Ensaios *in vitro* mostram que plantas que expressam AMPs tem a expressão destes genes aumentada em resposta a stress e se tornam mais resistentes a infecções (Odintsova e Egorov, 2012).

Nos últimos anos muitos AMPs de plantas têm sido isolados e de acordo com suas características estruturais, foram agrupados em diferentes famílias, sendo as principais: tioninas, defensinas de plantas, peptídeos similares à knotina, peptídeos similares à heveína, ciclotídeos e proteínas transportadoras de lipídeos (Benko-Iseppon *et al.*, 2010).

1.3- Proteínas transportadoras de lipídeos de plantas

As proteínas transportadoras de lipídeos (LTPs, do inglês *lipid transfer proteins*) de plantas são peptídeos que apresentam caráter básico em pH fisiológico

e ponto isoelétrico em torno de 9. Estas proteínas já foram encontradas em várias espécies de plantas como *Vigna radiata* (feijão mungo) (Lin *et al.*, 2005), *Vigna unguiculata* (feijão-de-corda) (Carvalho *et al.*, 2001), *Oryza sativa* (arroz) (Lee *et al.*, 1998), *Triticum durum* (trigo) (Dieryck *et al.*, 1992), *Hordeum vulgare* (cevada) (Skriver *et al.*, 1992), *Prunus persica* (pêssego) (Pastorello *et al.*, 1999), *Nicotiana tabacum* (tabaco) (Fleming *et al.*, 1992), *Capsicum annuum* (pimenta) (Diz *et al.*, 2011) e *Coffea canefora* (café) (Zottich *et al.*, 2011), entre outras espécies.

1.3.1- Histórico

As LTPs de plantas foram descobertas durante a década de 1970, a partir de experimentos *in vitro* com extratos proteicos de tubérculo de batata sendo que estes extratos estimulavam o transporte de fosfolipídeos marcados entre a fração microsomal (membrana doadora) e a mitocôndria (membrana aceptora). Estes experimentos foram inspirados pela ideia de que o transito de lipídeos na célula entre o local de síntese e o local de deposição era diferente, e que, portanto, um fator facilitaria o transporte destes lipídeos no meio aquoso celular (Kader, 1975). O isolamento e caracterização de outras LTPs em plantas deu-se apenas anos mais tarde, a partir do extrato proteico de folhas de espinafre com semelhante atividade de transporte de lipídeos *in vitro* e foram nomeadas de proteínas transportadoras de fosfolipídeos (Kader *et al.*, 1984).

Anos mais tarde, o nome dessa proteína foi trocado por proteína transportadora de lipídeos, quando foi descoberta a capacidade destas proteínas de transportar diferentes lipídeos assim como ácidos graxos. A princípio foi sugerido que estas proteínas participassem de maneira intracelular da biogênese de membranas e regulação da síntese e degradação de ácidos graxos (Arondel e Kader, 1990; Tsuboi *et al.*, 1992). Pouco tempo depois, estudos revelaram a presença de peptídeo sinal na porção N-terminal, de grande parte das LTPs mostrando que elas também se encontravam em ambiente extracelular ou/e associadas com a parede celular (Thoma *et al.*, 1993). Diante dessa informação, foi sugerida a participação das LTPs na via de transporte de lipídeos, atribuindo a esta proteína várias funções fisiológicas em plantas como a biossíntese de cutina através da sua habilidade de transportar monômeros de cutina (Wang *et al.*, 2008; Lee *et al.*,

2009), o papel de defesa de plantas contra patógenos fúngicos e bacterianos (Molina e García-Olmedo, 1997; Regente e De La Canal, 2000), oxidação de ácidos graxos (Tsuboi *et al.*, 1992) e sinalização {Blein *et al.*, 2002}; {Maldonado *et al.*, 2002}.

1.3.2- Expressão gênica e localização

A análise de expressão gênica de algumas plantas revelou que as LTPs são codificadas por famílias multigênicas. Em *Arabidopsis thaliana* (dicotiledônea) foi revelada a presença de 15 genes que codificam para LTPs e em *O. sativa* (monocotiledônea) foram identificados pelo menos três genes que codificam para LTPs ocorrendo em diversos tecidos e órgãos de plantas como folhas, flores, frutos, troncos, sementes e mais raramente em raízes (Salcedo *et al.*, 2007). Os órgãos aéreos são responsáveis pelos maiores níveis de expressão de LTPs em plantas, porém os padrões de expressão são modulados de acordo com a variação das condições ambientais (seca, frio e estresse salino), estresses bióticos e idade dos tecidos. Experimentos mostraram que a expressão das LTPs em *Brassica oleracea* (brócolis) é de 50% do total de proteínas sintetizadas por folhas jovens enquanto que as folhas mais velhas expressam apenas 4% (Pyee *et al.*, 1994). Os níveis de expressão de LTPs também podem ser aumentados quando a planta é atacada por microrganismos como bactérias e fungos e até mesmo vírus (Sohal *et al.*, 1999; Jung *et al.*, 2003; Carvalho *et al.*, 2006).

A localização das LTPs nas células é dependente da espécie vegetal da proteína. As LTPs são normalmente sintetizadas com peptídeo sinal que as

direciona para o ambiente extracelular onde podem se associar com a parede celular ou permanecer no espaço extracelular (Kader, 1997; Carvalho e Gomes, 2007). Porém existem algumas LTPs que fogem à regra e se estabelecem em diferentes organelas, tais como as LTPs de sementes de *Ricinus communis* (mamona) que se encontram em glioxissomos (Tsuboi *et al.*, 1992), as LTPs de sementes de *Triticum aestivum* (trigo) que se encontram em pequenas inclusões de granulos de aleurona (Dubreil *et al.*, 1998) e as LTPs de sementes de *Vigna unguiculata* (feijão-de-corda) que são acumuladas em vacúolos proteicos, além da parede celular (Carvalho *et al.*, 2004).

1.3.3- Aspectos estruturais e classificação em famílias

Os peptídeos que constituem as LTPs de plantas são agrupados em duas famílias, a família 1 (LTPs1) e a família 2 (LTPs2). Ambas as famílias compartilham características em comum como (1) pequeno tamanho, (2) a presença de oito resíduos de cisteínas distribuídos na estrutura primária, (3) a estrutura terciária formada por α -hélices e (4) a presença de uma cavidade hidrofóbica na estrutura terciária que possibilita estes AMPs de se ligarem e transportarem moléculas lipídicas. (Carvalho e Gomes, 2007; Kirubakaran *et al.*, 2008; Yeats e Rose, 2008; Odintsova e Egorov, 2012). Estas características serão descritas abaixo.

As LTPs da família 1 foram as primeiras a serem descobertas, possuem massa molecular de aproximadamente 10 kDa e tem de 90 a 95 resíduos de aminoácidos. A família LTP1 é rica em glicina, prolina, serina e alanina, com baixo número de resíduos aromáticos. As LTPs1 são formadas por quatro α -hélices (40% da estrutura terciária) conectadas por voltas, além de um braço flexível na porção C-terminal da proteína. Nesta região em algumas LTPs existe uma volta do tipo 3_{10} (Shin *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1998). Nesta família é possível observar a presença de uma cavidade hidrofóbica flexível, constituindo uma estrutura no formato de túnel que atravessa toda a molécula e possui duas entradas, uma pequena e outra grande. Estudos computacionais sobre a dinâmica molecular da família LTP1 e a caracterização estrutural do complexo entre a LTP de *Zea mays* (milho) e o ácido palmítico (C16:0) evidenciaram a interação do lipídeo com a cavidade hidrofóbica da LTP. Na entrada grande da cavidade da LTP de milho existe um resíduo de tirosina conservado que ajuda na estabilização do ácido palmítico dentro da cavidade formando uma ligação de hidrogênio entre o hidroxil da tirosina e o grupo carboxil da cabeça polar do ácido graxo. Esse túnel é recoberto por cadeias laterais de resíduos de aminoácidos em sua maioria hidrofóbicos (alanina, arginina, isoleucina, leucina, lisina, prolina, serina, treonina, tirosina e valina), o que confere caráter hidrofóbico a esta cavidade. (Arondel e Kader, 1990; Kader, 1996; Sodano *et al.*, 1997; Han *et al.*, 2001; Carvalho e Gomes, 2007; Yeats e Rose, 2008). Lin *et al.* (2005) também realizaram o estudo da ligação da LTP de *V. radiata* com lipídeos e os resultados mostraram que a cavidade hidrofóbica acomoda moléculas lipídicas e a figura 2B mostra esta LTP complexada ao ácido mirístico com LTP de *V. radiata*.

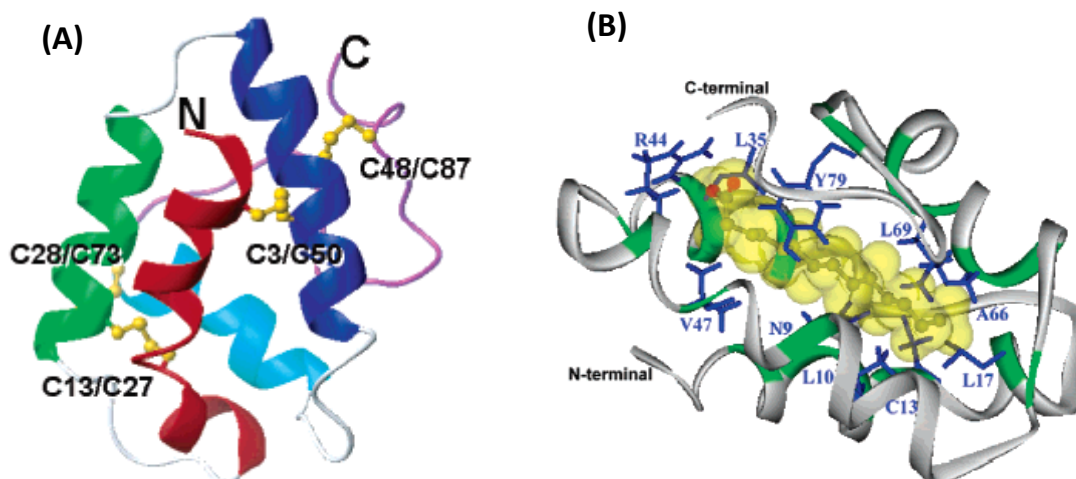


Figura 2 – Representação gráfica da estrutura terciária da LTP de *Vigna radiata* (feijão-mungo) pertencente à família LTP1. (A) Representação das quatro α -hélices mostradas nas cores verde, vermelha, azul e roxa e os padrões de pareamento de suas cisteínas que formam as pontes dissulfeto mostradas em amarelo. (B) Representação da LTP de *V. radiata* complexada com ácido mirístico (C14:0) mostrando a cavidade hidrofóbica da proteína. Em azul estão representados diferentes resíduos de aminoácidos, e seu posicionamento em relação à estrutura primária, que interagem com o ácido mirístico (Adaptada de Lin *et al.*, 2005).

Em comparação com as LTPs da família 1, as LTPs da família 2 têm sido consideravelmente menos estudadas. As LTPs2 possuem massa molecular de cerca de 7 kDa e têm em média 70 resíduos de aminoácidos. Sua estrutura secundária é semelhante as das LTPs1 diferindo apenas no número de α -hélices, já que as LTPs2 possuem três α -hélices e duas voltas simples na região C-terminal. Para a família LTPs2 existem poucos estudos estruturais. Mas já se sabe que sua cavidade hidrofóbica é menor quando comparada com a família LTP1 e possui um formato triangular (diferente da cavidade que forma uma espécie de túnel na família LTP1), sendo forrada pelos seguintes aminoácidos: alanina, cisteína, isoleucina, leucina, fenilalanina e valina. A cavidade da família LTP2 é mais flexível, permitindo a acomodação de moléculas hidrofóbicas ainda maiores do que as transportadas pela família LTP1 (Samuel *et al.*, 2002; Yeats e Rose, 2008).

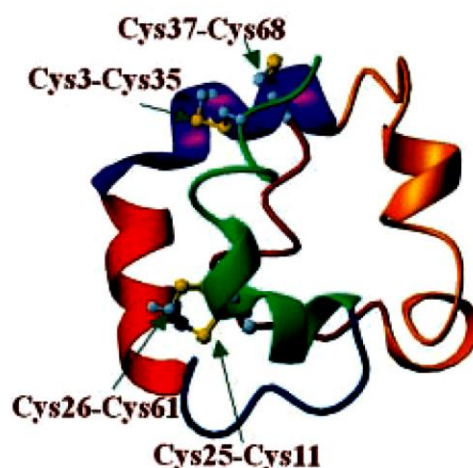


Figura 3 – Representação gráfica da estrutura terciária da LTP de *Oryza sativa* (arroz) pertencente à família LTP2. As três α -hélices estão representadas em verde, vermelho e azul, duas voltas simples na região C-terminal são mostradas em laranja e os padrões de pareamento de suas cisteínas que formam as pontes dissulfeto mostradas em amarelo (Adaptada de Samuel *et al.*, 2002).

Entre as duas famílias de LTPs ainda existem diferenças nos padrões de pareamento dos resíduos de cisteínas para a formação das pontes dissulfeto. Na família LTP1 as pontes dissulfeto são formadas entre Cys1-Cys6 e Cys5-Cys8 e na família LTP2 ocorre o pareamento da Cys1-Cys5 e Cys6-Cys8 (Odintsova e Egorov, 2012). A diferença mais importante ocorre nos resíduos entre as Cys5 e Cys6, sendo estes resíduos hidrofílicos na família 1 e hidrofóbicos na família 2 (Fig. 4). As LTPs da família 1 são conhecidas por sua multifuncionalidade (atividades descritas no item 1.3.4), já as LTPs da família 2 possuem genes essenciais para a defesa de plantas.

Como citado anteriormente a cavidade hidrofóbica das LTPs da família 2 é mais flexível do que a da família 1 o que torna mais fácil a acomodação de moléculas rígidas como as de esteróis. As pontes dissulfeto das LTP2 formam uma espécie de dobradiça que permite a abertura da cavidade para acomodar moléculas de colesterol, expondo resíduos que formam ligações hidrofóbicas com os ligantes (Fig. 5). Já na LTP1 as hélices são conectadas por pontes dissulfeto formando um túnel e não permitindo a ligação de moléculas volumosas e flexíveis. Esse complexo

LTP-esterol é reconhecido por receptores nas células de plantas que por meio de sinalização, desencadeiam o processo de defesa (Cheng *et al.*, 2004).

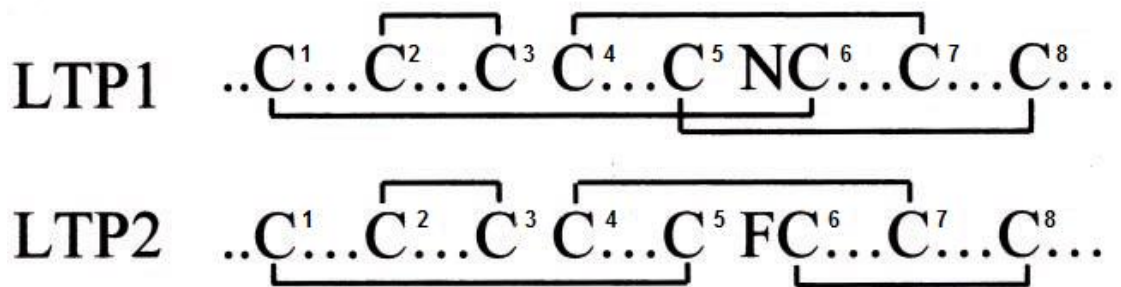


Figura 4 - Representação simplificada da estrutura primária das duas famílias de LTPs com destaque para os resíduos de cisteínas e os arranjos das pontes dissulfeto entre as famílias das LTPs1 e das LTPs2. As cisteínas são indicadas pela letra C e as pontes dissulfeto pelas linhas, os demais aminoácidos são representados por (•). N representa resíduos de aminoácidos hidrofílicos e F os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (Adaptada de Samuel *et al.*, 2002).

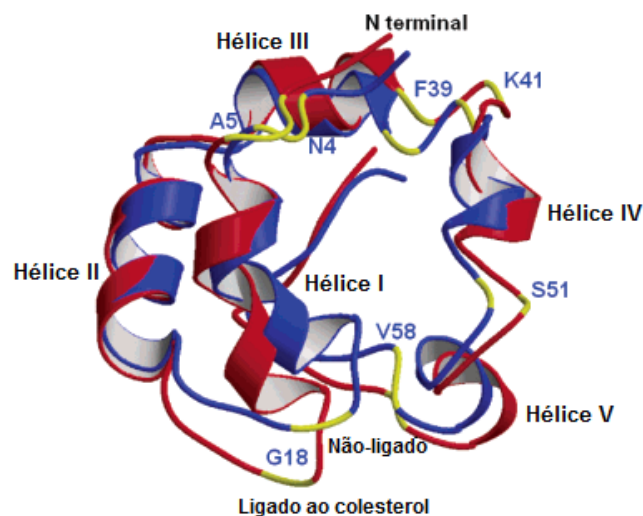


Figura 5 - Sobreposição da representação gráfica da estrutura tridimensional da LTP2 de arroz ligada (vermelha) e não ligada (azul) a uma molécula de colesterol. A maior diferença se encontra na volta entre as hélices I e II onde a estrutura é esticada 3.10 Å. Os resíduos mais envolvidos no movimento/perturbação da molécula quando complexada ao colesterol estão destacados em amarelo (Adaptada de Cheng *et al.*, 2004).

1.3.4- Atividades biológicas

Em contraste com as múltiplas atividades biológicas já descritas para as LTPs1, as atividades das LTPs2 já reportadas são o transporte de lipídeos *in vitro* e provável participação na sinalização em vias de resposta de defesa de plantas. Para as LTPs1 foram descritas várias atividades biológicas, entre elas transporte de lipídeos *in vitro* (Pyee *et al.*, 1994), síntese de cutina Lee *et al.*, 2009), defesa de plantas contra fitopatógenos (Kristensen *et al.*, 2000), atividade inibitória sobre bactérias e fungos *in vitro* (Segura *et al.*, 1993) e atividade inibitória sobre α -amilase *in vitro* (Diz *et al.*, 2011). Para as LTPs a única atividade biológica que apresenta estudos de relação estrutura-atividade biológica é o transporte de lipídeos *in vitro*. Esta atividade está relacionada à presença de uma cavidade hidrofóbica no interior das LTPs (Han *et al.*, 2001). O transporte de lipídeos observado *in vitro* pode ser relacionado com algumas prováveis funções biológicas, como a síntese de cutina (Wang *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2009) e a β -oxidação (Tsuboi *et al.*, 1992). No entanto ainda não se tem nenhum dado conclusivo sobre estas funções biológicas. A atividade biológica melhor entendida e que está diretamente relacionada à função de defesa de plantas é a atividade antimicrobiana (Molina e García-Olmedo, 1993; Regente e De La Canal, 2000).

A direta correlação com defesa de plantas é claramente demonstrada por análise de expressão gênica onde foi mostrando o aumento da expressão de genes de LTP1 em resposta a infecção por patógenos (Jiang *et al.*, 2011), atividade antimicrobiana direta demonstrada *in vitro* (Segura *et al.*, 1993; Regente e De La Canal, 2000) e a produção de plantas transgênicas resistentes à patógenos produzidas de maneira recombinante expressando os genes das LTP1s (Zhu *et al.*, 2012). Sendo assim, a atividade antimicrobiana se consolidou como a atividade melhor descrita para as LTPs desta família, como exemplo nos temos as LTPs extraídas de folhas de *Spinacia oleracea* (espinafre), *Hordeum vulgare* (cevada), *Zea mays* (milho) e *Beta vulgaris* (beterraba) e de sementes de *Triticum aestivum* (trigo), *Raphanus sativus* (rabanete), *Helianthus annuus* (girassol) e *Z. mays* que apresentaram propriedades inibitórias contra fitopatógenos, como, por exemplo, *Pseudomonas solanacearum*, *Clavibacter michiganensis*, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, *Trichoderma viride* e *Cercospora beticola* (Segura *et al.*, 1993;

Dubreil *et al.*, 1998; Kristensen *et al.*, 2000; Regente e De La Canal, 2000; Velazhahan *et al.*, 2001). Existem também LTPs de algumas espécies de plantas, como o feijão (*Phaseolus mungo*), que possuem ampla ação antifúngica contra *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* *Sclerotium rolfsii* e *Pythium aphanidermatum* e ação antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* (Wang *et al.*, 2004). Apesar de conhecida a atividade antimicrobiana das LTPs, pouco se conhece do seu mecanismo de ação. Acredita-se que as LTPs interagem com membranas biológicas levando a sua permeabilização. Regente *et al.* (2005) mostraram pela primeira vez a capacidade de uma LTP isolada de girassol, Ha-AP10, de permeabilizar a membrana plasmática do fitopatógeno *F. oxysporum*. Para detectar esse mecanismo de ação foi utilizado o corante Sytox green, que penetra na célula quando a sua membrana está desestabilizada e se liga aos ácidos nucleicos gerando fluorescência. Diz *et al.* (2006), utilizando o mesmo corante Sytox green, relatou a capacidade da LTP de pimenta em permeabilizar a membrana plasmática de levedura. Estes resultados indicam que possivelmente a permeabilização de membrana de microrganismos está envolvido no mecanismo de ação antifúngico destas proteínas.

Como já foi citado anteriormente as LTPs da família apresenta múltiplas atividades biológicas e acredita-se que esta multifuncionalidade foi dada a partir da duplicação gênica levando a formação de genes parálogos (que possuem a mesma origem), porém ao longo do tempo o gene duplicado sofreu especialização, assim criando e agregando diferentes funções à LTPs (Wang *et al.*, 2012). Nos últimos anos foi mostrada mais uma atividade biológica para as LTPs de plantas da família 1, a de inibir a atividade de α -amilases (Diz *et al.*, 2011; Zottich *et al.*, 2011).

1.5- α -amilases

α -amilases (α -1,4-D-glicano-4-glicanohidrolases, enquadradas na classe enzimática EC 3.2.1.1), são proteínas monoméricas amplamente distribuídas em todos os reinos (Bactéria, Archaea e Eukarya) (Payan, 2004). As enzimas pertencentes à família das α -amilases possuem grupos catalíticos altamente específicos e conservados que promovem a hidrólise da ligação α -D-(1-4) em amido, glicogênio e outros carboidratos permitindo a sua utilização como fonte energética para diversos organismos (Svensson, 1994; Ramasubbu *et al.*, 1996; Sales *et al.*, 2012).

A principal fonte de armazenamento de carboidratos em plantas é o amido, um dos principais componentes da dieta animal. Ele é um carboidrato complexo de reserva nutritiva, sintetizado pelas plantas como produto da fotossíntese. O amido é formado por dois tipos de macromoléculas, a amilose, um polímero linear de glicose em ligações α -1,4 que perfazem cerca de 18-33%, e a amilopectina um polímero ramificado de glicose em que as cadeias lineares são interconectadas com ligações α -1,6, e constitui de 72 a 82% de todo amido da planta (Van Der Maarel *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2014). A clivagem do amido pelas α -amilases constitui a primeira etapa na degradação enzimática de polissacarídeos, sendo essencial para assimilação de carboidratos (Payan, 2004).

As α -amilases possuem uma estrutura tridimensional capaz de se ligar ao substrato e hidrolisar suas ligações glicosídicas através da ação de resíduos específicos de seu sítio ativo (Hiteshi e Gupta, 2014). São compostas de três domínios estruturais, chamados de A, B e C. O domínio A contém importantes resíduos do sítio ativo que inclui duas Asp e uma Glu e consiste na estrutura $(\beta/\alpha)_8$ -barril que é formada por oito cadeias β -barril paralelas envolvidas por cilindro de 8 segmentos α -helicoidais. E também contém ligação ao íon cloreto que é capaz de ativar a enzima alostericamente por facilitar a protonação de um importante grupo carboxil (Butterworth *et al.*, 2011; Mótyán *et al.*, 2011).

O domínio B é uma pequena região formada por segmentos estendidos e uma hélice curta, localizada entre a terceira folha- β e uma α -hélice na $(\beta/\alpha)_8$ -barril, este domínio contém ligação ao íon cálcio, importante para manter a conformação da proteína. O local de ligação do substrato está entre o domínio A e B. E domínio C

é formado pela porção N-terminal que forma uma estrutura β -barril antiparalela (Butterworth *et al.*, 2011; Mótyán *et al.*, 2011) (Fig. 6).

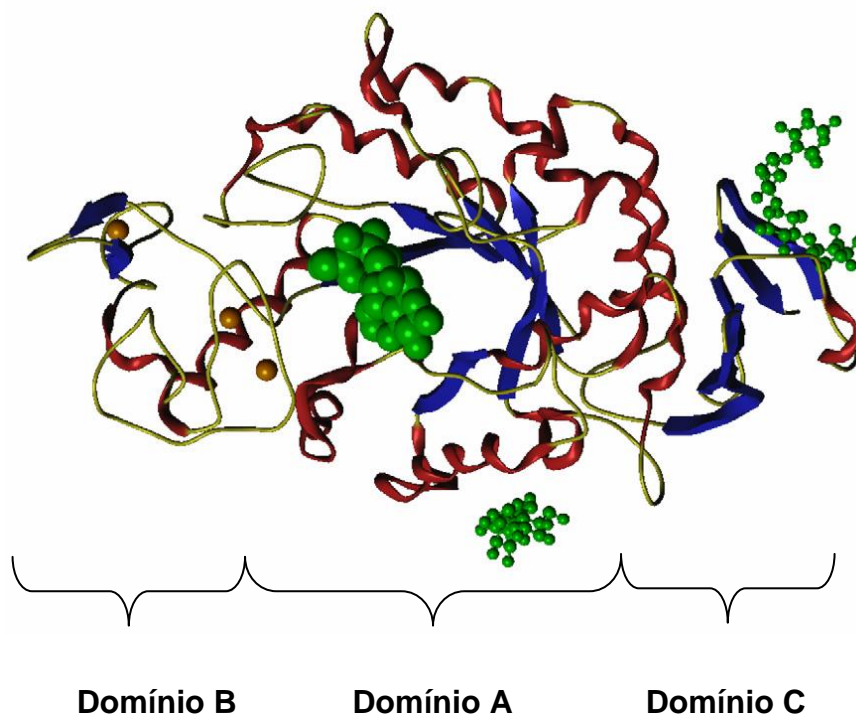


Figura 6 - Representação esquemática da estrutura tridimensional da α -amilase salivar humana complexada com substrato no sítio ativo. As bolas verdes maiores representam o substrato (amido) e as menores representam unidades de monossacarídeos. As bolas marrons são os íons cálcio e cloreto. Em azul estão representadas as folhas- β e em vermelho as α -hélices (Adaptada de Mótyán *et al.*, 2011).

Nos últimos anos muitos pesquisadores tem se dedicado ao estudo dos mecanismos de ação enzimático das amilases a fim de descobrir proteínas com função inibitória sobre essas enzimas digestivas. Buscando a produção de inibidores de α -amilase com alta seletividade e afinidade à enzima com diversas aplicações biotecnológicas que serão discutidas abaixo. (Oliveira-Neto *et al.*, 2003; Dias *et al.*, 2005; Zhi-Fei *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2013).

1.5.1 - Inibidores de α -amilases de plantas

Diversas plantas durante a evolução interagiram com seus agressores amidolíticos e para se defenderem da predação adquiriram mecanismos de resistência e entre eles estão os inibidores de α -amilase. Estes inibidores são encontrados em sementes e órgãos vegetativos das plantas (Oneda *et al.*, 2004). Os inibidores de α -amilase são classificados em não proteicos e proteicos (Svensson *et al.*, 2004).

Os inibidores proteicos de α -amilase podem ser extraídos de várias espécies de plantas incluindo leguminosas e cereais. De acordo com sua sequência primária e estrutura terciária, estes inibidores são divididos em seis classes: inibidores similares à lectinas, inibidores similares à knotina, proteínas CM (clorofórmio-metanol), inibidores similares à kunitz, inibidores similares à γ -purotionina e inibidores similares à taumatina (Richardson, 1990; Payan, 2004; Svensson *et al.*, 2004) (Tabela 1).

Tabela 1 - Classificação dos inibidores proteicos de α -amilase de plantas de acordo com sua estrutura segundo Richardson (1990).

Classe do inibidor	Planta de origem	Amilase alvo	Número de resíduos (aa)	Referências
semelhante à lectina	Feijão	Inseto mamífero fungo	240-250	(Marshall e Lauda, 1975)
semelhante à knotina	Amaranto	Inseto	32	(Chagolla-Lopez <i>et al.</i> , 1994)
semelhante à kunitz	trigo cevada arroz milho feijão-de-corda	Inseto Planta	176-181	(Mundy <i>et al.</i> , 1983; Mundy <i>et al.</i> , 1984; Svensson <i>et al.</i> , 1986)
semelhante à γ -purotionina	Sorgo	inseto mamífero	47-48	(Bloch Jr e Richardson, 1991)
semelhante à taumatina	Milho	Inseto	173-235	(Franco <i>et al.</i> , 2002)
proteínas CM	Trigo cevada rey ragi	Inseto mamífero bactéria	124-160	(Mundy <i>et al.</i> , 1984)

(Adaptada de Mehrabadi *et al.*, 2012).

Além dos inibidores de α -amilase descritos acima as defensinas de plantas, representantes da classe dos AMPs de planta, vem se tornando alvo de muitos estudos devido a sua capacidade de inibir α -amilases. Esta atividade foi inicialmente descrita por (Bloch Jr e Richardson, 1991), que relataram a presença de uma defensina de sementes de *Sorghum bicolor* com atividade inibitória contra α -amilases dos insetos *Periplaneta americana* e *Locusta migratoria migratorioides*, porém apresentaram pouca atividade inibitória contra α -amilases salivar humana e do fungo *Aspergillus oryzae*.

Anos mais tarde descobriu-se a existência de outras defensinas de plantas capazes de inibir a atividade de α -amilases, como as defensinas de sementes de *Vigna radiata* (Chen *et al.*, 2002); *Vigna angularis* (Chen *et al.*, 2005) e *Vigna unguiculata* (Santos *et al.*, 2010).

1.5.2 - Aplicação dos inibidores

Inibidores de α -amilase tem se destacado pelo seu amplo potencial biotecnológico. Uma possibilidade de uso seria a sua aplicação como nutracêuticos e fitofármacos para o tratamento de algumas doenças relacionadas a distúrbios de absorção de carboidratos (Pereira *et al.*, 2010; Porcelli *et al.*, 2011). Visto que dietas hipercalóricas associadas a um estilo de vida sedentário estão relacionadas a graves doenças metabólicas como obesidade e diabetes mellitos que ameaçam uma crescente população mundial (Sales *et al.*, 2012). Outra aplicação seria no controle de pragas agrícolas, onde os inibidores de α -amilases seriam usados no desenvolvimento de plantas transgênicas que os superexpressam, restringindo a digestibilidade de carboidratos por pragas, como exemplificado pela expressão de inibidores de α -amilase em ervilha (De Sousa-Majer *et al.*, 2007).

Além das atividades biológicas das LTPs descritas no item 1.3.4, estas também possuem atividade inibitória contra α -amilase (Diz *et al.*, 2011; Zottich *et al.*, 2011). Essa atividade foi inicialmente sugerida na década de 1980 por um estudo de (Svensson *et al.*, 1986) no qual foi isolada uma proteína de semente de *H. vulgare* com 10 kDa, que possuía sequência primária semelhante a de um inibidor de protease/amilase. Estudos de homologia revelaram que essa proteína (ainda não se sabia que era uma LTP) possuía identidade de 50% com o inibidor I-2 (*Eleusine*

coracana), um inibidor de amilases de origem animal. No entanto, em testes de inibição essa proteína não se mostrou capaz de inibir enzimas, incluindo amilases. (Bernhard e Somerville, 1989) realizaram um alinhamento das sequências primárias da proteína de *H. vulgare* e do inibidor I-2 com sequências de LTPs de várias espécies, contidas em bancos de dados. Este alinhamento revelou alto grau de similaridade entre os inibidores e as LTPs sendo possível classificar essas proteínas como pertencentes à família de proteínas transportadoras de fosfolipídeos (antigo nome da família das LTPs). Durante mais de 20 anos essa atividade das LTPs não foi estudada e a retomada do estudo da atividade inibitória *in vitro* se deu anos mais tarde com Zottich *et al.* (2011) onde estes autores mostraram a atividade inibitória da LTP de *C. canephora* sobre α -amilase salivar humana. Posteriormente a mesma atividade foi mostrada para LTP de *Capsicum annuum* (pimenta) (Diz *et al.*, 2011).

Ainda não é conhecido se alguma região estrutural das LTPs é responsável pelas atividades biológicas descritas, além da já caracterizada atividade de transporte de lipídeos. Em relação à estrutura e função, esta atividade é devido à presença de uma cavidade hidrofóbica que permite às LTPs se ligar e transportar moléculas hidrofóbicas (Carvalho e Gomes, 2007). No entanto, já foi demonstrado que a sua atividade antimicrobiana não é dependente da sua capacidade de transportar lipídeos como mostrado no trabalho de (Cammue *et al.*, 1995) onde a Ace-AMP1 mostrou grande espectro de ação contra bactérias e fungos apesar de não possuir a capacidade de transportar fosfolipídeos. Dados da estrutura tridimensional de Ace-AMP1 revelaram que esta deficiência no transporte de lipídeos em comparação com outras LTPs era devido a sua cavidade hidrofóbica estar obstruída por cadeias laterais de aminoácidos aromáticos. A partir das informações expostas acima, nós desenvolvemos esse trabalho com o intuito de estudar os aspectos estruturais-funcionais da atividade inibitória *in vitro* da LTP de *Vigna unguiculata* recombinante (*Vu-LTP*r) contra α -amilase.

2- Objetivos

2.1- Objetivo geral

O objetivo geral deste projeto foi superexpressar e purificar a proteína transportadora de lipídeos recombinante de sementes de *Vigna unguiculata* L. Walp. (*Vu-LTPr*) em sistema heterólogo, e utilizar a *Vu-LTPr* para estudar sua atividade inibitória sobre a atividade da α -amilase salivar humana *in vitro* e adicionalmente relacionar a inibição com regiões estruturais da *Vu-LTPr*.

2.2- Objetivos específicos

1. Superexpressar de forma heteróloga a *Vu-LTPr*, originalmente obtida de sementes de *V. unguiculata*, em *Escherichia coli*;
2. Purificar a *Vu-LTPr*;
3. Testar a atividade inibitória da *Vu-LTPr* sobre a α -amilase salivar humana;
4. Resolver o modelo tridimensional da *Vu-LTPr* por modelagem;
5. Analisar o modelo tridimensional da *Vu-LTPr* para identificação das regiões estruturais;
6. Sintetizar peptídeos baseados em regiões estruturais da *Vu-LTPr* e avaliar a sua capacidade de inibir α -amilase salivar humana.

3 - Material e métodos

3.1- Materiais biológicos

3.1.1- Bactérias e manutenção da cultura

Células de *Escherichia coli*, linhagem Rosetta-gami₂ (DE₃) pLysS [genótipo: $\Delta(\text{ara-leu})7697 \Delta\text{lacX74} \Delta\text{phoA P}_{\text{vull}} \text{phoR} \text{araD139} \text{ahpC} \text{galE} \text{galk} \text{rpsL}$ (DE3) F'[*lac*⁺ *lacI*^q *pro*] *gor522::Tn10 trxB* pLysSRARE2 (Cam^R, Str^R, Tet^R)] foram adquiridas da Novagen, Inc, onde foi inserido o gene da LTP de *V. unguiculata* (*Vu-LTP*) ligado ao plasmídeo pET-32 EK/LIC (Novagen), resultando na construção pET-LTP. Este procedimento foi feito pelo prof. André de Oliveira Carvalho.

O plasmídeo pET-32 EK/LIC utilizado neste trabalho para a expressão da *Vu-LTP*, funde à porção amino terminal da proteína recombinante, uma cauda que possui duas regiões (Figura 7). Uma região é composta pela proteína tioredoxina, que promove a solubilização de proteínas expressas no citoplasma da *E. coli*. A segunda região é composta por seis histidinas (His) consecutivas, que ajudam na purificação (via cromatografia de afinidade em coluna de Ni²⁺-NTA agarose). e também na identificação da proteína recombinante (via anticorpo que reconhece esta região). Após a purificação, esta cauda pode ser completamente eliminada pela reação de clivagem com a endoproteínase enteroquinase bovina recombinante (EK, do inglês *enteroquinase*), uma enzima altamente específica que cliva logo após quatro resíduos consecutivos de Asp e uma Lys sendo este sítio proteolítico dado pelo vetor.

As células de *E. coli* Rosetta-gami₂ (DE₃) pLysS contendo a construção pET-LTP foram mantidas em meio Luria-Bertani (LB) líquido (Sigma) [1 g de triptona, 0,5 g de extrato de levedura, 1 g de NaCl, 2 g de ágar e 100 mL de água destilada, pH 7,0 ajustado com NaOH, suplementado com ampicilina (50 µg/mL) (Ge Healthcare) e cloranfenicol (35 µg/mL) (Ge Healthcare)] em *stab* de glicerol a -70 °C. A cepa de *E. coli* foi repicada em placas de Petri contendo 20 mL de meio LB sólido suplementado com antibióticos e crescidas em estufa (modelo 317.B242, Quimis) por 18 h a 37 °C. Estrias em quadrantes foram feitas para a obtenção de colônias isoladas. Todo o material referente à cultura de microrganismos foi manipulado usando capela de fluxo laminar (Technik, Trox).

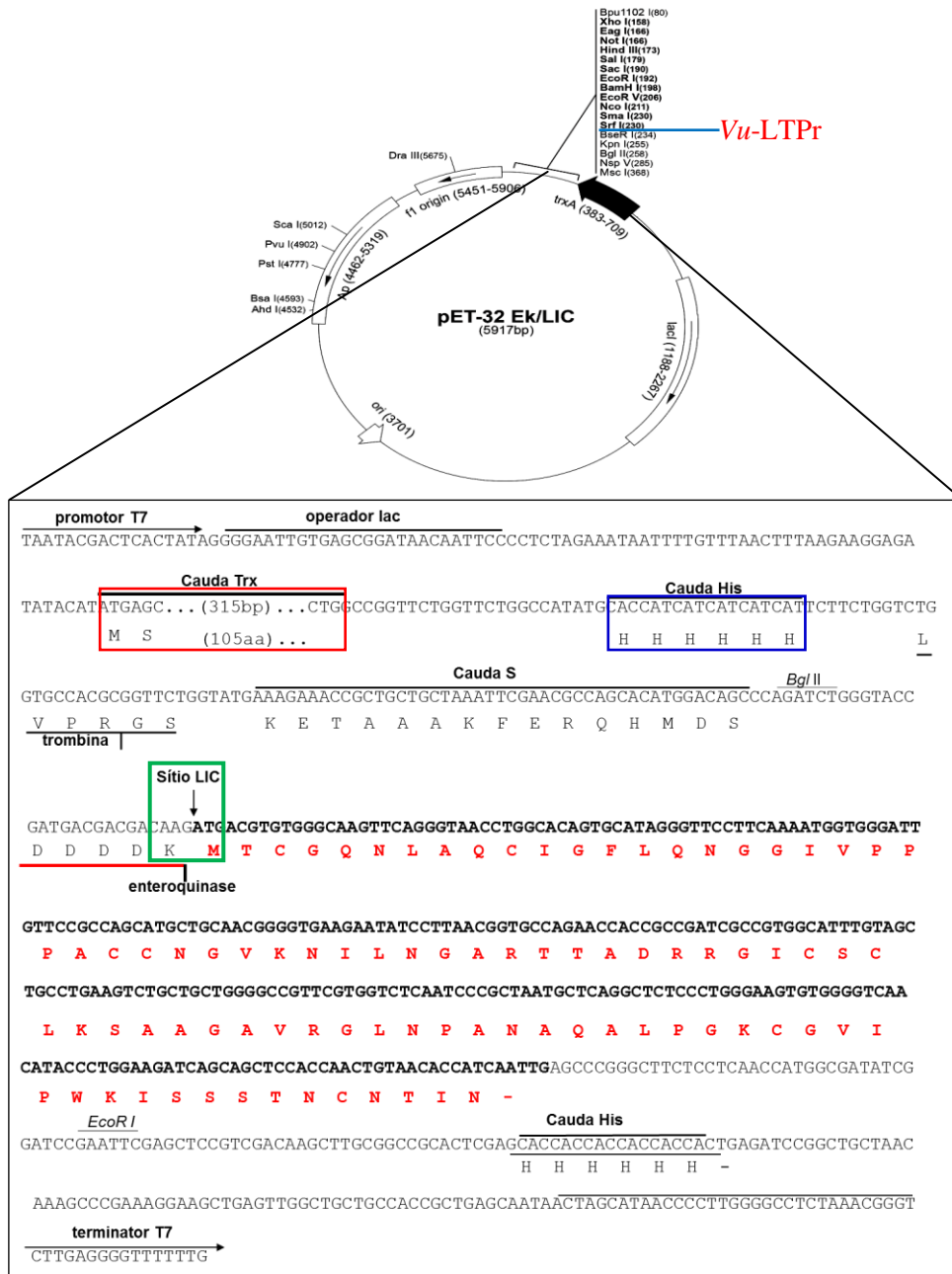


Figura 7 - Representação da construção pET-LTP com destaque para o mapa e região de policlonagem do vetor pET-32 Ek/LIC (retirada do manual do vetor, *User Protocol* TB163, Novagen) com a indicação da posição da inserção do clone da Vu-LTP (linha azul). No detalhe do sítio de policlonagem, o quadro vermelho indica a região da cauda composta pela tioredoxina (Cauda Trx). O quadro azul indica região da cauda composta pelas seis His consecutivas (Cauda His). O sublinhado em vermelho está o sítio de clivagem específico para enteroquinase (DDDDK). O quadro verde indica o sítio de clonagem independente de ligação (LIC, do inglês *ligation-independent cloning*). Destacado em negrito está a sequência de nucleotídeo e em vermelho está a sequência de aminoácidos do clone da Vu-LTP que foi inserida dentro do sítio LIC. (-) indica códon de parada de tradução. (aa) indica resíduos de aminoácidos. Outras regiões também são mostradas como a região promotora e terminadora (T₇) e operadora (lac), sítios de enzimas de restrição, sítio da trombina e Cauda S.

3.1.2- α -Amilase – obtenção e manutenção

A α -amilase salivar humana (EC 3.2.1.1) é uma proteína monomérica codificada pelo gene humano AMY1A. A amilase utilizada nos ensaios deste trabalho foi adquirida comercialmente pela empresa Sigma-Aldrich.

3.1.3- LTP natural de *Vigna unguiculata*

A LTP natural de sementes de *V. unguiculata* (*Vu*-LTP) foi cedida pela Dr^a. Viviane Veiga do Nascimento. A *Vu*-LTP foi purificada de acordo com Carvalho *et al.* (2001).

3.1.4- Anticorpos

Anticorpo contra a *Vu*-LTP foi preparado em coelho como descrito por Carvalho *et al.* (2001).

Anticorpo contra imunoglobulina G (IgG) de coelho conjugado com peroxidase foi adquirido comercialmente da Sigma.

3.2- Expressão e purificação da *Vu*-LTP_r

3.2.1- Indução da *Vu*-LTP_r

A indução da expressão da *Vu*-LTP_r foi feita seguindo a metodologia indicada pelo fabricante do kit do vetor (*User protocol* TB055, Novagen). Onde uma colônia bacteriana de *E. coli*, linhagem Rosetta-gami₂ (DE₃) pLysS contendo a construção pET-LTP, mantida como descrita no item 3.1.1, foi inicialmente incubada em 20 mL de meio LB suplementado com os antibióticos a 30 °C por 16 h e a 250 rpm (pré-inóculo) em incubador orbital (modelo NT.1.712, Novatécnica). Desse pré-inóculo foi retirada uma alíquota de 20 mL e transferida para 400 mL de meio LB fresco contendo os antibióticos (inóculo). O inóculo foi, então, incubado a 30 °C por aproximadamente 3 h a 250 rpm onde a densidade celular atingiu valores de absorbância a 600 nm entre 0,5 e 1, medida em espectrofotômetro (LGS53, BEL Photonics). Após esse período, 1 mM de isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG,

do inglês *isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*, Ge HealthCare) foi adicionado à cultura e esta foi novamente incubada a 30 °C por 3 h e a 250 rpm. Uma alíquota de 1 mL foi retirada imediatamente antes da adição do IPTG e esta foi considerada o controle da indução. Esta alíquota foi centrifugada 16.000 x g por 3 min a 4 °C e ao sedimento de células foi adicionado tampão de amostra (100 µL) para eletroforese e preparado como descrito no item 3.2.5.2. Uma alíquota também foi retirada do induzido sendo esta de 700 µL e o restante do tratamento foi feito igual ao do não induzido.

3.2.2- Extração da Vu-LTPr

Após a indução, as bactérias contendo a Vu-LTPr expressa, foram centrifugadas (10.000 x g por 10 min a 4 °C) e as células foram ressuspensas em 25 mL de tampão de lise (50 mM de NaH₂PO₄ pH 8,0 contendo 300 mM de NaCl) e então foram rompidas por pulsos de sonicação (3 pulsos de 30 s, na potência de 7 watts) na presença de 1 mM de fenilmetilasulfonila (PMSF, do inglês *phenylmethanesulfonyl fluoride*) (Ge HealthCare), pepstatina A (1 µg/mL, Sigma), inibidores de protease (2 mM de AEBSF, 0,3 µM de aprotinina, 130 µM de bestatina, 1 mM de ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA do inglês *ethylenediaminetetraacetic acid*), 14 µM de E-64 e 1 µM de leupeptina (*Protease inhibitor cocktail for general use*, Sigma) e 1% de Triton-X 100.

Depois de sonicada a solução celular foi centrifugada a 10.000 x g por 10 min a 4 °C. O sobrenadante, contendo a fração solúvel do extrato bacteriano, resultante desta centrifugação foi recuperado e armazenado a -20 °C.

3.2.3- Purificação da Vu-LTPr

Para purificar a Vu-LTPr da fração solúvel do extrato bacteriano, este foi aplicado na coluna Ni⁺-NTA agarose (Qiagen) e todo o processo cromatográfico foi realizado de acordo com o manual da coluna. Brevemente, a coluna Ni⁺-NTA agarose (20x3 cm) foi preparada com 30 mL de resina empacotada sob a ação da gravidade sendo esta previamente equilibrada com tampão de equilíbrio (20 mM de fosfato de sódio pH 7,4 e 500 mM de NaCl). À coluna foram aplicados 75 mL da

fração solúvel do extrato bacteriano e esta foi lavada com tampão de equilíbrio e em seguida eluída com tampão de eluição (tampão de equilíbrio acrescido a duas diferentes concentrações de imidazol (40 e 500 mM), cada um com três vezes o volume da coluna. O fluxo foi de 1 mL/min ajustado em uma bomba peristáltica (P1, GE HealthCare) e foram coletadas frações de 7 mL.

Para avaliar a presença dos picos foram retiradas alíquotas de 35 µL de cada tubo e estes foram diluídos com 15 µL de água destilada em placa de 96 poços e adicionado posteriormente 50 µL de solução de Bradford (Bradford, 1976). Após a incubação de 10 min foi feita leitura a 540 nm para identificação dos tubos que continham as proteínas eluídas. Como branco foram usados cada um dos tampões (de equilíbrio e eluição) do mesmo modo que as amostras retiradas dos tubos.

Os tubos oriundos da cromatografia foram reunidos por picos, não retido e retido, e as amostras foram dialisadas contra água destilada em membrana de alto peso (retém proteínas acima de 12.400 Da) (Tubo de diálise de celulose de alta retenção sem costura, Sigma), com 3 trocas diárias, por 3 dias, a 4°C, liofilizados e então analisados por eletroforese descontínua em gel de poliacrilamida 12% sob condições desnaturantes como descrito no item 3.2.5.1.

3.2.4- Dosagem de proteínas

As amostras foram dosadas pelos métodos de Bradford (1976) e/ou ácido bicinconínico (BCA, do inglês *bicinchoninic acid*) (Sigma) segundo protocolo fornecido com o produto *technical bulletin* B9643 (Smith *et al.*, 1985). Como proteína padrão foi usada a lisozima (Sigma).

3.2.5- Análise eletroforética da Vu-LTPr

3.2.5.1- Eletroforese descontínua em gel de poliacrilamida 12% sob condições desnaturantes

Para a análise dos picos cromatográficos foi realizada a eletroforese em gel de poliacrilamida, usando o sistema de gel descontínuo, esta foi feita segundo método descrito por Laemmli (1970). Foram usadas placas de vidro de 8 x 10 cm e 7 x 10 cm, espaçadores e pentes de 0,75 mm (Mini protean tetra cell, BioRad).

Foram usados como marcadores de alta massa molecular uma mistura das seguintes proteínas: albumina bovina, 66.000 Da (Sigma A 7517), albumina de ovo, 45.000 Da (Sigma A 7642), triosefosfato isomerase, 35.200 (Sigma T 9400), anidrase carbônica 29.000 Da (Sigma C 2273) e tripsinogênio 20.100 (Sigma T 9767).

3.2.5.2- Preparo das amostras e condições de corrida

Dez microgramas de cada uma das amostras foram misturadas com tampão de amostra (125 mM de Tris-HCl pH 6,8, 2% de dodecilsulfato de sódio (SDS, do inglês *sodium dodecyl sulfate*), 10% de sacarose e 0,25% de azul de bromofenol) e 5% de β -mercaptoetanol, a mistura foi então aquecida a 100 °C por 5 min e centrifugada a 16.000 x g por 3 min. Após esses procedimentos, as amostras foram aplicadas no gel de concentração e submetidas à eletroforese sob condições desnaturantes. A corrida foi feita a 100 V por um período de, aproximadamente, 2 h. O tampão de corrida utilizado continha 0,05 M de Tris-HCl, 0,192 M de glicina e 0,1% de SDS.

3.2.5.3- Coloração e descoloração do gel

Após o término da corrida, o gel foi cuidadosamente retirado das placas de vidro e colocado em uma solução corante (40% de metanol, 7% de ácido acético e 0,5% de azul de Coomassie R em água destilada) por aproximadamente 30 min. Passado esse período, o gel foi transferido para uma solução descorante (ácido acético 10% e metanol 30% em água destilada) e mantido nesta solução até a visualização das bandas proteicas e armazenado em água destilada até ser registrado em fotodocumentador (ImageQuant LS500, Ge HealthCare).

3.2.6- Clivagem com enteroquinase da Trx-6His-Vu-LTP_r

O vetor de superexpressão codifica para uma cauda em que parte dela é composta de seis histidinas consecutivas que foi fusionada à proteína recombinante no momento de sua síntese. Esta é posteriormente removida através de clivagem

com uma endoproteínase. Neste trabalho foi utilizada uma EK bovina recombinante (Sigma). A reação de clivagem foi montada seguindo normas do fabricante. À fração proteica retida na coluna de Ni⁺-NTA agarose foram adicionados tampão 50 mM de Tris-HCl pH 8,0 contendo 50 mM de NaCl, 1 mM de cloreto de cálcio e 0,1% de Tween 20 e 0,028 unidades da enzima, suficiente para clivar 1.000 µg de proteína recombinante. Esta solução foi incubada a 25 °C por 16 h em estufa (TE- 371, TECNAL) e sob leve agitação em placa agitadora orbital (MS3 Digital, IKA).

3.2.7- Eletroforese em gel tricina na presença de dodecil sulfato de sódio

As amostras provenientes da clivagem com EK foram analisadas em gel de poliacrilamida segundo método por Schägger e Von Jagow (1987). Foram usadas placas de vidro de 8 x 10 cm e 7 x 10 cm e espaçadores de 0,75 mm (BioRad). Para o preparo de amostra, coloração por Coomassie foi usado o mesmo procedimento descrito nos itens 3.2.5.2 e 3.2.5.3, sendo que o tampão de amostra tinha pH 8,0 (Mini protean II tetra cell, BioRad).

Como marcador de baixa massa molecular foi utilizado MWSDS-17S (Sigma) composto das seguintes proteínas com massa molecular em Da [Mioglobina (peptídeo inteiro 1-153 aminoácidos) peso molecular = 16.950, Mioglobina (fragmentos I + II, 1-131 aminoácidos) peso molecular = 14.440, Mioglobina (fragmentos I + III, 56-153 aminoácidos) peso molecular = 10.600, Mioglobina (fragmento I, 56-131 aminoácidos) peso molecular = 8.160, Mioglobina (fragmento II, 1-55 aminoácidos) peso molecular = 6.210 e Mioglobina (fragmento III, 132-153 aminoácidos) peso molecular = 2.510].

A corrida foi feita a uma voltagem constante de 20 V por um período de, aproximadamente, 16 h.

3.2.8- Purificação da Vu-LTP_r após clivagem - cromatografia de fase reversa em coluna C18

Após a clivagem com a EK, a amostra proteica com a Vu-LTP_r foi cromatografada na coluna C18 (Shim-pak VP-ODS, 250 x 4,6 mm, Shimadzu) acoplada a uma coluna guarda C8 (Pelliguard, 20 x 4,6 mm, Sigma). A corrida foi realizada a 38 °C num fluxo de 0,6 mL/min. A amostra oriunda da clivagem foi

solubilizada em 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA, do inglês *trifluoroacetic acid*) e injetada na coluna de fase reversa. A corrida foi desenvolvida em gradiente de 2-propanol (Merck), onde de 0 a 5 min foi passada somente a solução A, de 5-15 min, a concentração da solução B (0,1% de TFA em 100% de 2-propanol) foi aumentada para 10%, de 15,01-30 min, para 20%, de 30,01-150 min, para 65% e foi mantida nesta concentração por 2 min, e então a concentração de B foi baixada para 0% até 160 min. A eluição da coluna foi acompanhada por um detector de arranjo de diodo, sendo as absorvâncias lidas a 220 ± 4 nm.

Os picos resultantes foram concentrados e seu conteúdo proteico foi dosado como descrito no item 3.2.4. As amostras foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida como descrito no item 3.2.7.

3.3- Caracterização funcional da Vu-LTPr

3.3.1- Western blotting

De acordo com o protocolo adaptado de Towbin *et al.* (1979), as seguintes amostras: pico 2 oriundo da purificação em coluna de Ni⁺-NTA agarose (antes da clivagem) e a Vu-LTPr purificada oriunda da coluna de fase reversa C18 foram submetidas à eletroforese descontínua em gel de tricina na presença de SDS (item 3.2.7). Ao término da corrida, o gel foi retirado das placas e imerso em tampão de transferência (182 mM de glicina, 25 mM de Tris e 20% de metanol) sob agitação por 20 min. De forma semelhante, a membrana de polivinilideno difluoreto (PVDF, do inglês *polyvinylidene difluoride*) (cortada nas mesmas dimensões do gel) foi imersa no tampão de transferência sob agitação por 20 min. Após este período, o conteúdo proteico foi transferido para a membrana de PVDF utilizando um sistema de blotting semi-seco (Muiltphor II, Pharmacia Biotech). Para a eletrotransferência foi montado um “sanduíche” composto respectivamente de folhas de papel filtro cortadas com as dimensões do gel e embebidas em tampão de transferência, a membrana, o gel e mais uma camada de folhas de papel filtro, embebidas em tampão de transferência. A transferência foi realizada em uma corrente constante de 1 mA/cm² de membrana por 2 h no sentido gel-membrana. Em seguida, a membrana foi submetida à coloração reversível com 0,1% de Ponceau S (Sigma) para verificação do sucesso

da transferência. Após a transferência, a membrana foi submersa em solução bloqueadora (tampão fosfato salino (PBS, do inglês *phosphate buffer saline*) 0,1 M de NaHPO pH 7,6, 0,15 M de NaCl e 2% de leite desnatado em pó) por 2 h, sob agitação. A membrana foi posteriormente lavada 3 vezes com PBS por 5 min. O anticorpo anti-LTP foi diluído (1:1.000) na solução bloqueadora e a membrana foi incubada por 18 h a 4 °C. Após o período de incubação a membrana foi lavada por 10 vezes com PBS contendo 0,2% de Tween 20 por 5 min cada lavagem. E em seguida o anticorpo anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase, diluído 1:2.000 em solução bloqueadora, foi adicionado, mantendo-se a incubação por 2 h a temperatura ambiente. A membrana foi novamente lavada 10 vezes com PBS por 5 min e então reveladas com a solução reveladora para quimioluminescência de acordo com as instruções do kit *ECL Western Blotting Analysis System* (Ge HealthCare). A imagem foi captada pelo sistema Image Quant LAS500 (Ge HealthCare).

3.3.2- Análise das estruturas secundárias da Vu-LTP_r e da Vu-LTP através de dicroísmo circular

A fim de confirmar se todo o processo de produção e enovelamento da Vu-LTP_r ocorreu corretamente foi feita a análise do dicroísmo circular (CD, do inglês *circular dichroism*) comparando os espectros da Vu-LTP_r e da Vu-LTP (LTP natural). Ambas LTPs foram testadas com a mesma concentração de proteína, 10 µg.mL⁻¹. Estas foram dissolvidas em água ultrapura (TEDIA) e foram transferidas para uma cubeta de quartzo com comprimento óptico de 5 mm. O espectro do CD de ambos os peptídeos foram registrados separadamente no espectro CD J815 (Jasco) em uma faixa ultravioleta (185 a 275 nm) a 20 °C. Para cada peptídeo foram feitos 5 *scanners* por espectro em uma velocidade de 10 nm/min e a curva foi desenhada baseada na média dos 5 *scanners*. O gráfico foi feito com a sobreposição da média das leituras obtidas de ambos os peptídeos.

3.3.3- Ensaio de inibição da atividade da α-amilase salivar humana por Vu-LTP_r

O ensaio de atividade enzimática para α-amilases foi realizado de acordo com o método de Bernfeld (1955). A mistura de reação para a determinação da atividade

enzimática foi feita em água a 37 °C por 15 min usando 1% de amido (Sigma) como substrato e α -amilase salivar humana. As amostras foram retiradas do banho e após o resfriamento foram adicionados 200 μ L da solução DNS (4,5% de hidróxido de sódio, 1% de 3,5-ácido dinitrosalicílico, 45 g de tartarato duplo de sódio e potássio, 2 g de fenol cristalino) (DNS, do inglês *dinitrosalicylic acid*). As amostras do ensaio foram então fervidas por 5 min e 200 μ L de água foi adicionada a cada amostra. A hidrólise do substrato pela enzima foi determinada após leitura da absorbância a 540 nm no espectrofotômetro (LGS53, BEL Photonics). Após este ensaio, uma unidade de α -amilase foi definida como uma variação de 0,1 de ABS a 540 nm por 15 min de reação.

Para o ensaio de inibição da atividade α -amilásica foi feito o mesmo procedimento, sendo que foi feito um pré-tratamento de 5 u de α -amilase por 15 min a 37 °C com diferentes concentrações da Vu-LTPr (50 a 250 μ g.mL⁻¹) num volume final de 50 μ L. Após esse período foram adicionados 12,5 μ L de solução de amido 1% e novamente as amostras serão incubadas em banho-maria a 37 °C por 15 min. Os experimentos foram realizados em triplicata e foi calculado o desvio padrão para cada experimento.

3.4- Estudo da relação estrutura atividade biológica da Vu-LTPr

3.4.1- Determinação da estrutura da Vu-LTPr por modelagem

Para encontrar o molde mais adequado para a Vu-LTPr foi realizada a busca de sequências primárias (utilizando a ferramenta BLAST) (Altschul *et al.*, 1990) que apresentaram similaridade com a proteína alvo, depositadas no banco de dados *Protein Data Bank*. A partir dessa seleção, foi escolhido o molde da LTP que apresentou maior similaridade com a Vu-LTPr.

Após a escolha do molde, as estruturas primárias da proteína utilizada como molde e da Vu-LTPr foram alinhadas utilizando o programa Clustal-W (Larkin *et al.*, 2007).

Para a modelagem foi utilizada o programa Modeller que com base na sobreposição de regiões conservadas estruturalmente, identificadas por alinhamento

entre a *Vu*-LTPr e a sequência escolhida, gerou um conjunto de restrições espaciais e construiu o modelo.

A qualidade estereoquímica do modelo foi validada utilizando o programa PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993), que analisa diversos parâmetros incluindo ligações peptídicas, planaridade dos anéis das cadeias laterais, torção dos ângulos Phi e Psi da cadeia principal.

3.4.2- Síntese química de regiões da *Vu*-LTPr

A partir da estrutura da *Vu*-LTPr determinada por modelagem foi feita uma análise, onde diferentes regiões estruturais (α -hélices e voltas) foram identificadas e separadas.

Após a análise da sequência e da estrutura da *Vu*-LTPr que compõem suas diferentes regiões estruturais, foram escolhidas as regiões de interesse e estas foram sintetizadas sob encomenda pelas empresas aminotech e invitrogen. As regiões selecionadas que apresentaram resíduos de Cys, tiveram estes resíduos substituídos pelo aminoácido não proteico α -aminoisobutírico (Aminotech). Nas regiões onde ocorre a formação de pontes dissulfeto, estas foram mantidas e reduzidas (Invitrogen).

3.4.3- Ressuspensão e dosagem dos peptídeos

Foram adquiridos 1 mg de cada peptídeo sintético e estes foram ressuspensos em 500 μ L de água ultrapura e separados em pequenas alíquotas de 50 μ L, sendo a concentração final de 2 μ g. μ L⁻¹. As alíquotas foram estocadas em temperatura de -20 °C.

3.4.4- Teste de inibição da α -amilase salivar humana com as regiões sintéticas

Por fim foram realizados testes de inibição da α -amilase salivar humana com os peptídeos sintéticos, utilizando como parâmetro o experimento com a *Vu*-LTPr. A concentração escolhida foi aquela que teve maior efeito inibitório contra a α -amilase humana. O teste foi realizado como descrito no item 3.3.3.

4- Resultados

4.1- Superexpressão e extração da *Vu*-LTPr

As células bacterianas transformadas com construção pET-LTP foram induzidas a expressar a Trx-6His-*Vu*-LTPr (*Vu*-LTPr fusionada às caudas de Trx e 6His) através da adição de IPTG no meio de cultivo. Após a incubação de IPTG, uma banda de aproximadamente 29 kDa foi superexpressa no extrato bruto bacteriano induzido, mostrando que a indução foi bem sucedida (Fig. 8).

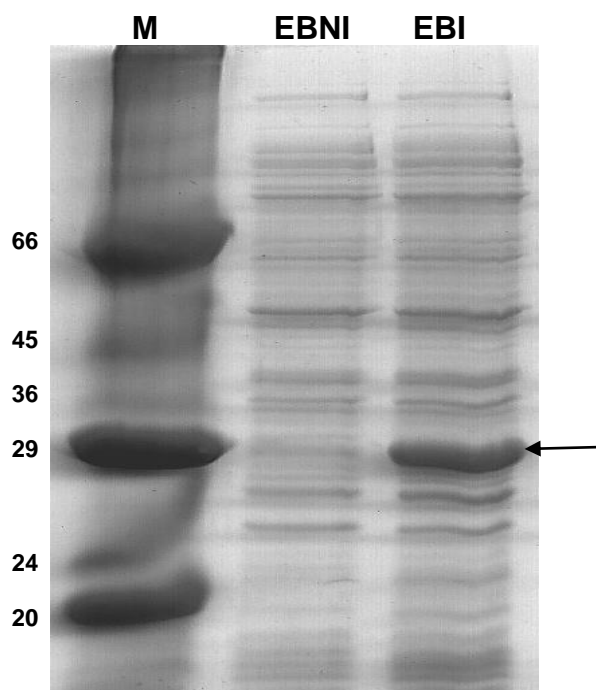


Figura 8 - Visualização eletroforética das amostras obtidas após indução da *Vu*-LTPr (Trx-6His-*Vu*-LTPr) com meio LB em gel Laemmli (12%) na presença de SDS. (EBNI) Extrato bruto bacteriano não induzido; (EBI) extrato bruto bacteriano induzido com 1 mM de IPTG; (M) marcador de alta massa molecular em kDa. A seta indica a presença da Trx-6His-*Vu*-LTPr no extrato bruto induzido. Gel corado com Coomassie.

4.2- Purificação da Trx-6His-Vu-LTPr

O extrato solúvel bacteriano foi submetido à cromatografia de afinidade à metal em coluna de Ni⁺-NTA agarose, mostrando um perfil cromatográfico de dois picos, denominados P1 (pico contendo a fração não retida e retida e eluída 40 mM de imidazol) e P2 (fração retida e eluída com 500 mM de imidazol) (Fig. 9). O perfil eletroforético mostra que os picos obtidos da cromatografia de afinidade a metal permitiu enriquecimento da Trx-6His-Vu-LTPr no P2 ao fim do processo, já que é possível observar a presença de contaminantes de baixa massa molecular (Fig. 10).

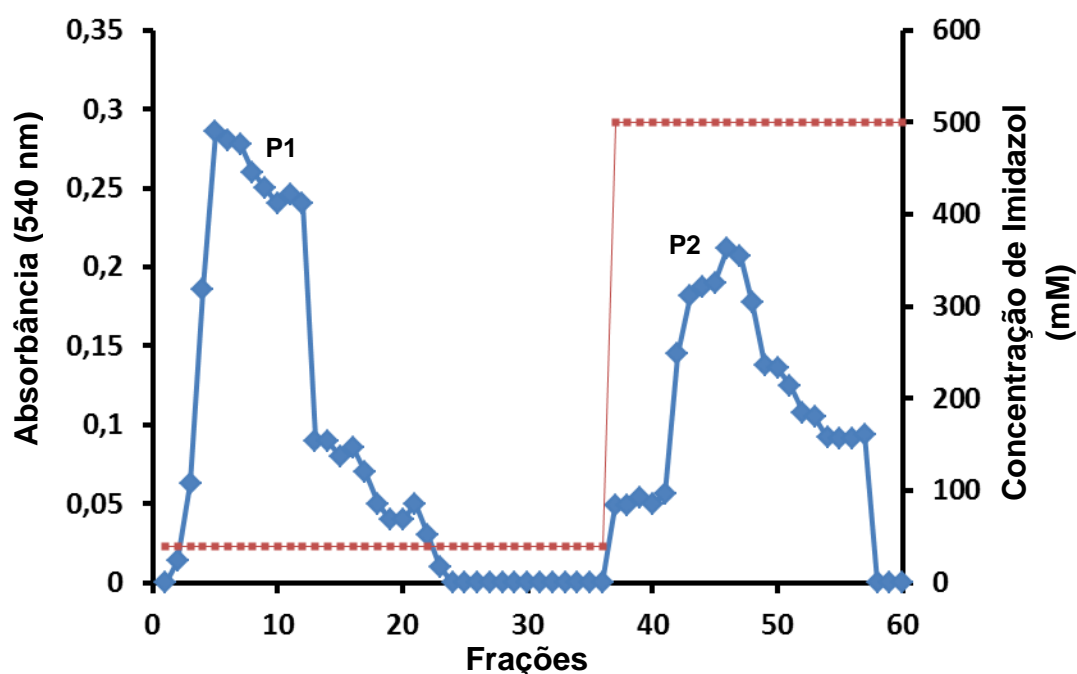


Figura 9 - Cromatograma do extrato solúvel de *Escherichia coli* contendo a Trx-6His-Vu-LTPr em coluna de Ni⁺-NTA agarose. A coluna foi previamente equilibrada com 50 mM de tampão fosfato, pH 8,0, contendo 300 mM de NaCl, e em seguida lavada com o mesmo tampão contendo 40 e 500 mM de imidazol, respectivamente. Foram coletadas frações de 7 mL e o fluxo foi de 1 mL/min. (P1) pico que contém a fração não retida e a fração retida e eluída com 40 mM de imidazol e (P2) pico retido e eluído com 500 mM de imidazol. A linha vermelha indica a concentração de Imidazol.

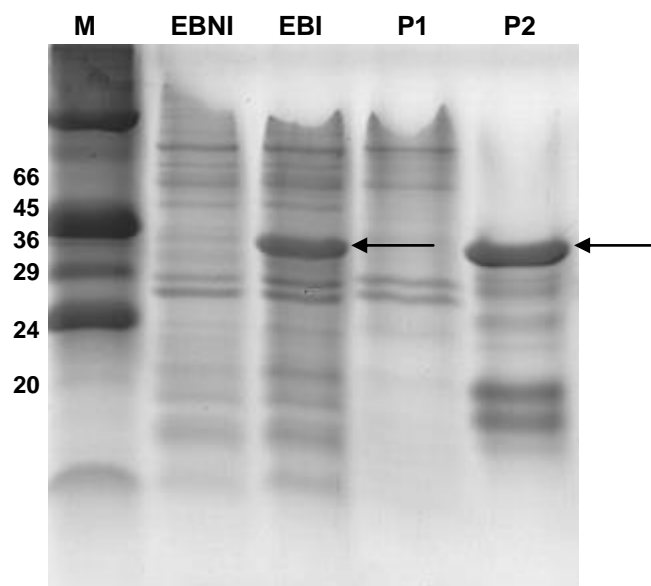


Figura 10 - Visualização eletroforética dos picos obtidos após cromatografia em coluna de Ni^+ -NTA agarose do extrato solúvel contendo a Trx-6His-Vu-LTPr em SDS-Tricina-PAGE. (EBNI) Extrato bruto bacteriano não induzido; (EBI) extrato bruto bacteriano induzido com 1 mM de IPTG; (P1) pico que contém a fração não retida e a fração retida e eluída com 40 mM de imidazol e (P2) pico retido e eluído com 500 mM de imidazol; (M) marcador de alta massa molecular em kDa. Gel corado com Coomassie. As setas indicam a posição da Trx-6His-Vu-LTPr no EBI e P2.

4.3- Clivagem com EK

Após o tratamento do P2, amostra enriquecida com a Trx-6His-Vu-LTPr, com a EK foi possível observar em análise eletroforética que a banda de aproximadamente 29 kDa (Ctr), após o tratamento com a EK desaparece e concomitantemente aparecem duas novas bandas, uma de aproximadamente 13 kDa e outra de aproximadamente 9 kDa (Cli) (Fig. 11). Esta última banda apresenta massa molecular da Vu-LTPr previamente purificada. Este resultado indica que a EK permitiu a separação das proteínas fusionadas a Vu-LTPr (Trx-6His), com o reconhecimento do sítio de clivagem dado à proteína recombinante pelo vetor pET-32 EK/LIC.

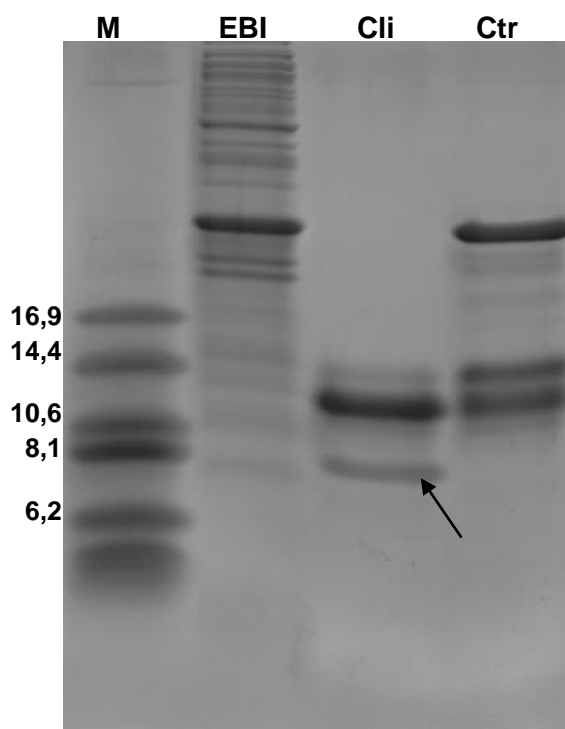


Figura 11 - Visualização eletroforética da reação de clivagem com a endoproteínase EK em gel SDS-Tricina-PAGE. (EBI) extrato bruto bacteriano induzido com 1 mM de IPTG; (Cli) P2 após tratamento com a EK; (Ctr) alíquota da reação de clivagem (pico 2 oriundo da purificação em coluna de Ni⁺-NTA agarose) retirada imediatamente antes da adição da EK; (M) marcador de baixa massa molecular em kDa. Gel foi corado com Coomassie. A seta indica a posição da Vu-LTPr.

4.4- Purificação da Vu-LTPr após clivagem

4.4.1- Cromatografia de fase reversa em coluna C18

Após a clivagem com a EK a amostra foi submetida à cromatografia de fase reversa em coluna C18, a fim de purificar a Vu-LTPr. Esta cromatografia revelou um pico não retido e 6 retidos que foram eluídos em gradiente de 2-propanol (Fig. 12).

Na análise eletroforética foi possível observar no pico 2 a presença de um peptídeo com a massa característica da Vu-LTP (Fig. 13). Este pico contendo a Vu-LTPr foi selecionado para os ensaios de caracterização funcional e inibição enzimática. No gel também podemos observar a presença do pico 3 que nós acreditamos que seja a cauda de Trx-6His.

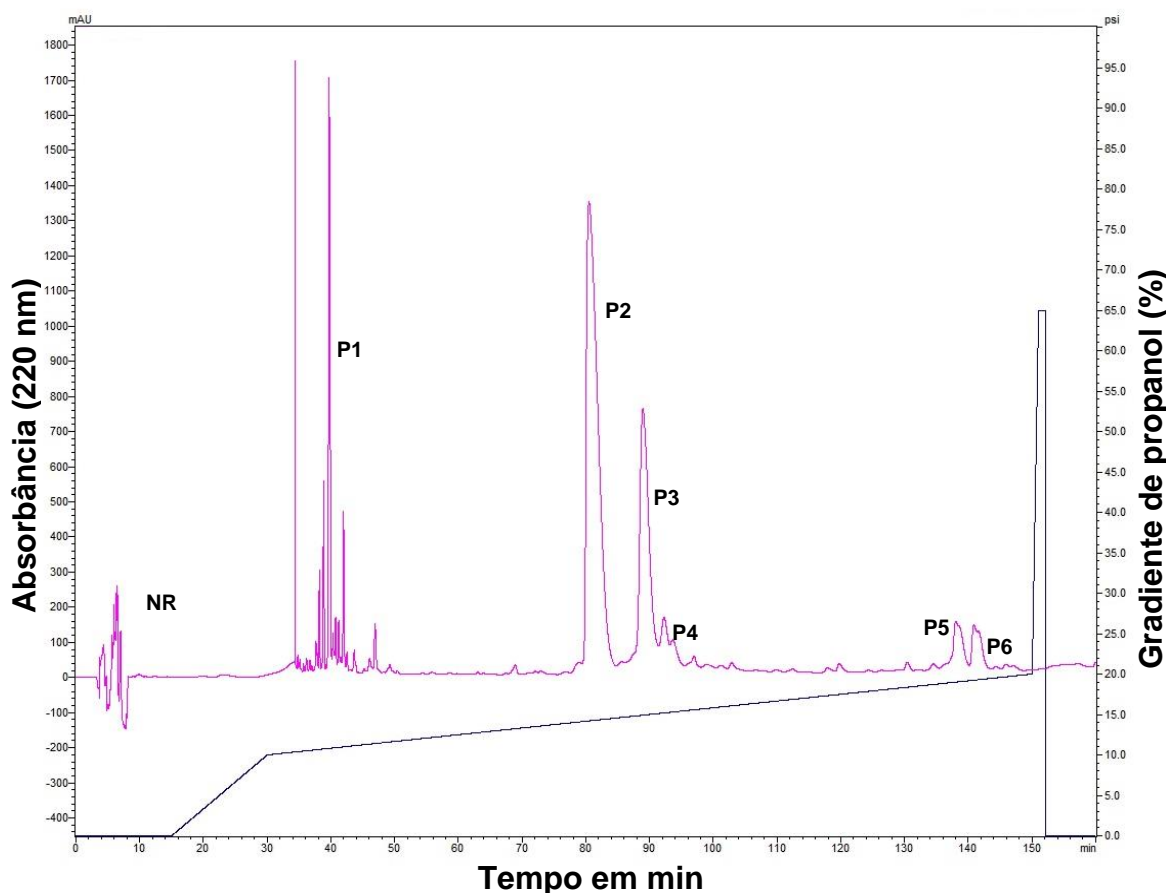


Figura 12 - Cromatograma da purificação da Vu-LTPr após clivagem do pico P2 com EK em coluna de fase reversa C18. Para a eluição das proteínas foi utilizado um gradiente de 2-propanol de 0 a 65% em 160 min. A cromatografia foi realizada utilizando-se um fluxo de 0,6 mL/min a temperatura de 38 °C em HPLC. (NR) pico não retido; (P1, P2, P3, P4, P5 e P6)

picos retidos e eluídos com o gradiente de 2-propanol; A linha oblíqua representa o gradiente de propanol. O padrão de eluição dos peptídeos foi monitorado a 220nm.

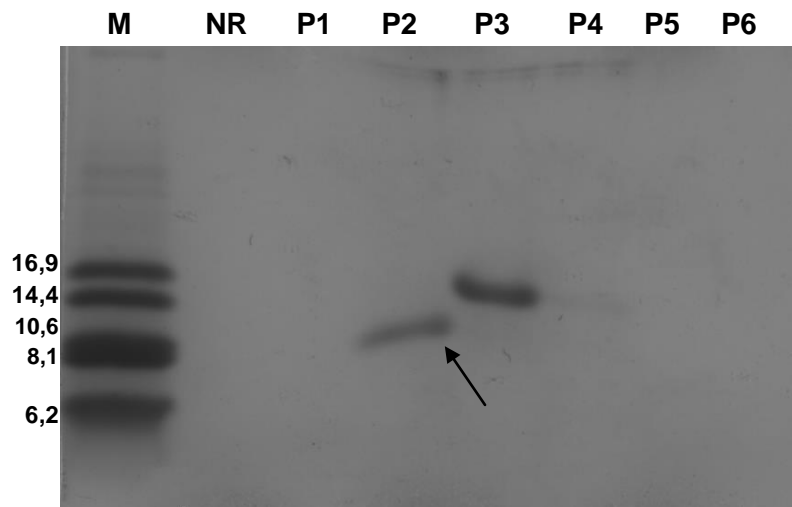


Figura 13 - Visualização eletroforética da purificação da *Vu-LTPr*, após clivagem com EK, em coluna de fase reversa C18 em gel SDS-Tricina-PAGE. (NR) pico não retido; P1, P2, P3, P4, P5 e P6 foram eluídos com o gradiente de propanol; (M) marcador de baixa massa molecular. Gel foi corado com Coomassie. A seta indica a posição da *Vu-LTPr*.

4.5- Caracterização funcional da Vu-LTPr

4.5.1- Western blotting

Após o processo de purificação, a análise do *Western blotting* revelou a presença da Vu-LTPr antes da clivagem com massa molecular próxima de 29 kDa, vista em gel de tricina acima do marcador de 17 kDa, correspondente à fusão da Vu-LTPr com a cauda Trx-6His e a Vu-LTPr purificada após a clivagem, com massa molecular de 9 kDa, através do reconhecimento do anticorpo anti-LTP (Fig.14). Este resultado demonstra que a Vu-LTPr foi corretamente traduzida no citoplasma da *E. coli*.

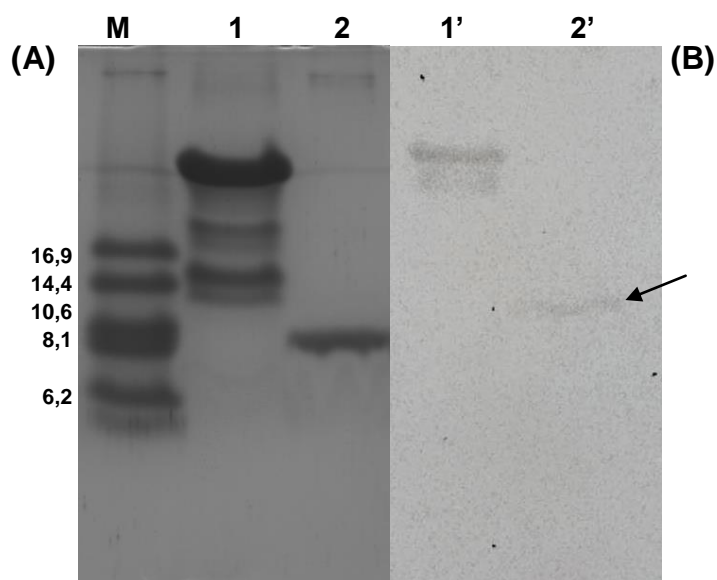


Figura 14 - (A) Visualização eletroforética do gel espelho usado para o *Western blotting*, em gel SDS-Tricina-PAGE; (1) pico 2 oriundo da purificação em coluna de Ni⁺-NTA agarose (antes da clivagem); (2) Vu-LTPr purificada oriunda da coluna de fase reversa C18. (M) marcador de baixa massa molecular. Gel corado com Coomassie. (B) Visualização por sobreposição da imagem de fluorescência e da membrana do *Western blotting*, após revelação por quimioluminescência. (1' e 2') mesmas amostras que em (A). A seta indica a posição da Vu-LTPr.

4.5.2- Análise das estruturas secundária da *Vu*-LTP_r e da *Vu*-LTP através de dicroísmo circular

A análise da estrutura secundária da *Vu*-LTP e *Vu*-LTP_r utilizando CD mostrou que os espectros gerados, indicam que estas proteínas possuem a mesma estrutura secundária e são predominantemente compostas por α -hélices (Fig. 15), uma característica das LTPs de plantas. Este resultado é importante porque mostram que a *Vu*-LTP_r foi corretamente enovelada no citoplasma de *E. coli*.

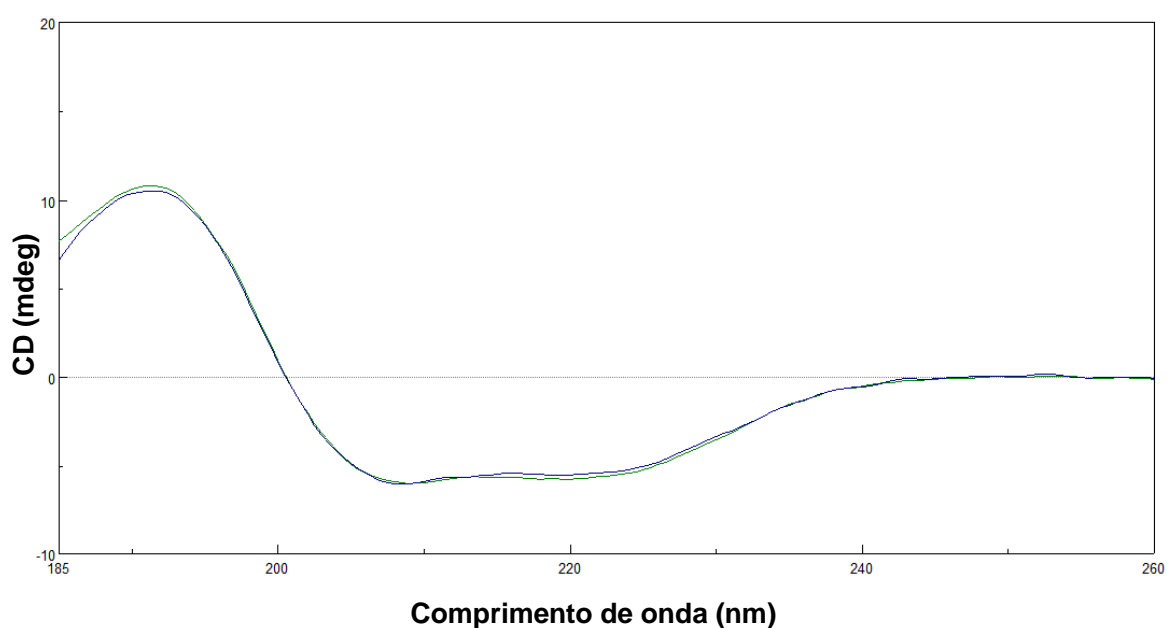


Figura 15 - Visualização gráfica da sobreposição dos espectros de dicroísmo circular da *Vu*-LTP (peptídeo natural) (linha verde) e *Vu*-LTP_r (linha azul).

4.5.3- Ensaio de inibição da atividade da α -amilase salivar humana por *Vu*-LTPr

No ensaio de inibição da atividade da α -amilase salivar humana a *Vu*-LTPr apresentou atividade inibitória em cerca de 50% com $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ da proteína recombinante. A $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a *Vu*-LTPr inibiu cerca de 86% da atividade da enzima (Fig. 16). O resultado deste ensaio nos confirma que após todo o processo de produção recombinante e purificação, a *Vu*-LTPr se manteve biologicamente ativa.

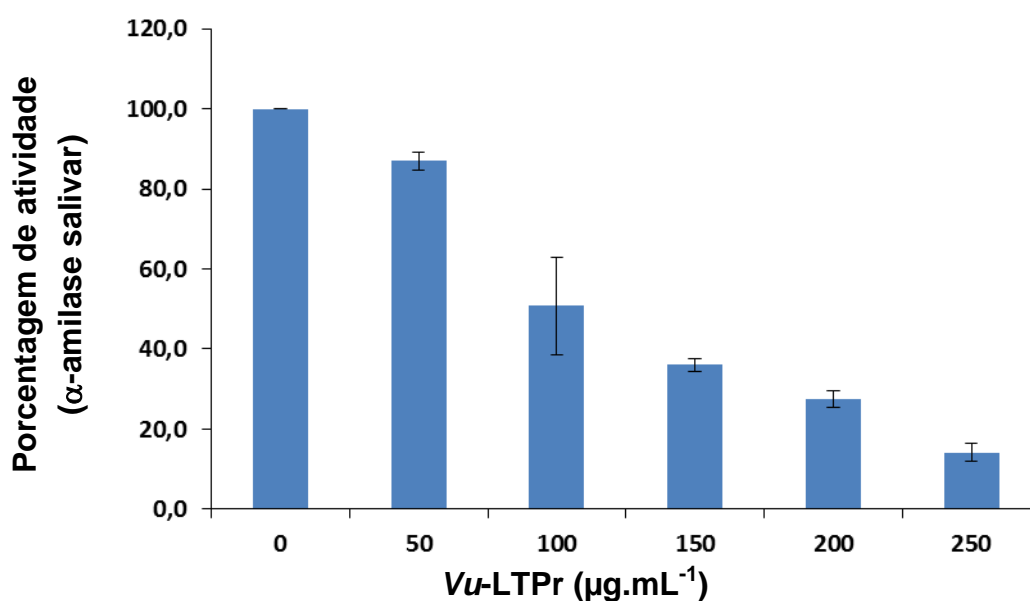


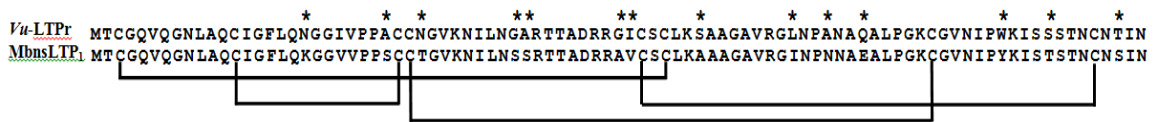
Figura 16 - Visualização gráfica da inibição da atividade da enzima α -amilase salivar humana, por diferentes concentrações da *Vu*-LTPr. O experimento foi realizado em triplicata.

4.6- Estudo da relação estrutura atividade biológica da *Vu*-LTPr

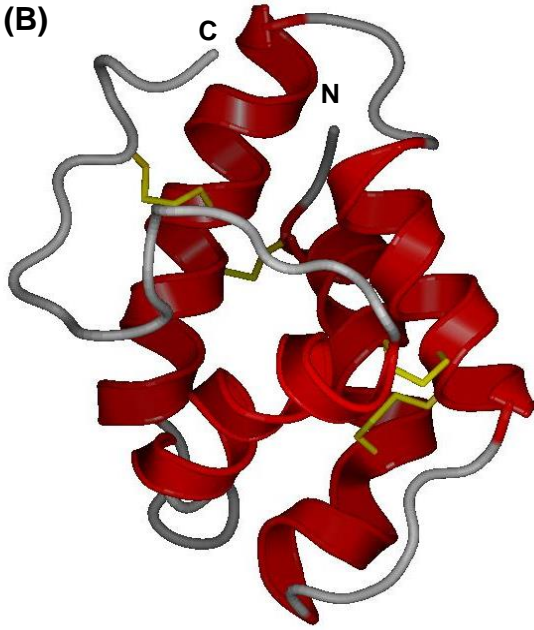
4.6.1- Estudos de modelagem por homologia da *Vu*-LTPr

A estrutura tridimensional da *Vu*-LTPr foi modelada utilizando como molde a estrutura da LTP de *Vigna radiata* determinada por ressonância nuclear magnética (pdb 1SIY 1). A estrutura de *Vu*-LTPr revelou a presença de quatro α -hélices (em vermelho) e várias sequências de voltas (em cinza) (Fig. 17).

(A)



(B)



(C)

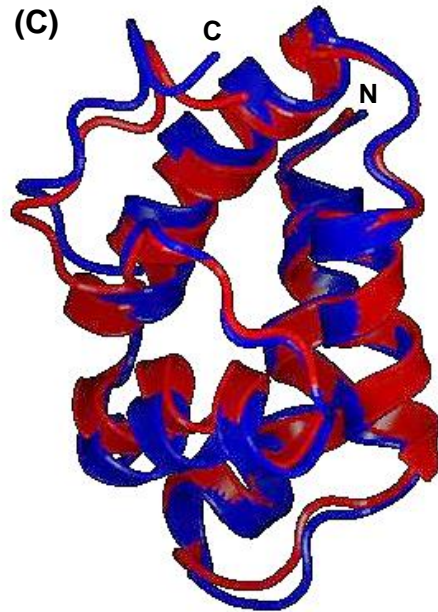
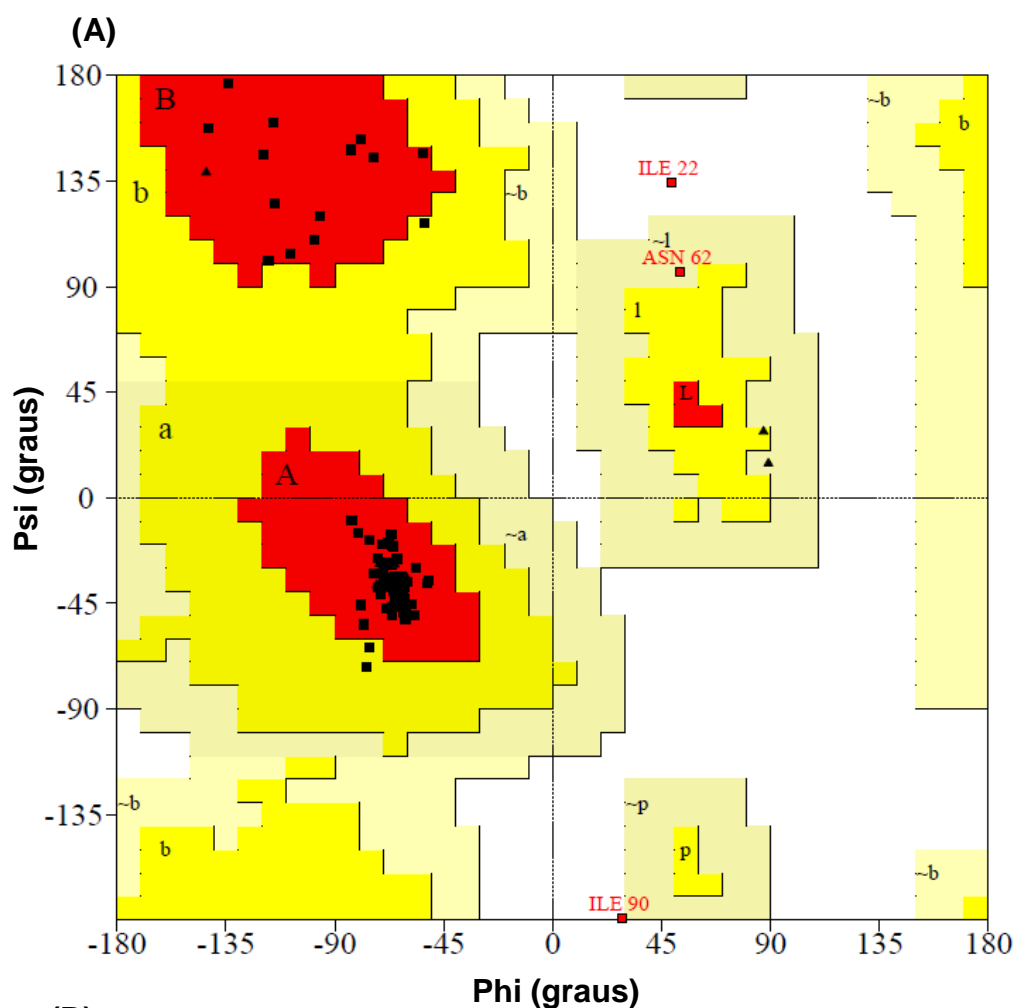


Figura 17- (A) Alinhamento de seqüências de aminoácidos da *Vu*-LTPr e da LTP de *Vigna radiata* MbnsLTP₁ (pdb 1SIY 1) usada como molde para a construção do modelo tridimensional da *Vu*-LTPr. As linhas abaixo das cisteínas da MbnsLTP₁ indicam a formação de pontes dissulfeto e pareamento entre os resíduos de cisteínas. Os quatorze diferentes resíduos de aminoácidos entre as duas seqüências são indicados por asteriscos. (B) Representação esquemática da estrutura tridimensional da *Vu*-LTPr, modelada com o programa Modeller e baseada na estrutura da MbnsLTP₁ (pdb 1SIY 1). Elementos não estruturados representados em cinza e as α -hélices são representadas em vermelho. As quatro pontes dissulfeto são mostradas em amarelo pela interconexão de resíduos de cisteínas. C e N indicam as porções C e N terminal, respectivamente. (C) Sobreposição das representações esquemáticas das estruturas tridimensionais da *Vu*-LTPr (vermelho) com a LTP de *Vigna radiata* MbnsLTP₁ (azul) (pdb 1SIY 1).

Para avaliar a qualidade estereoquímica do modelo criado para a *Vu*-LTPr foi calculado, utilizando o programa Procheck, o mapa de Ramachandran para esta estrutura. Este revelou qualidade estereoquímica aceitável, visto que 91,7% dos

resíduos de aminoácidos se encontram em regiões mais favoráveis, 4,2% dos resíduos de aminoácidos se encontram em regiões permitidas 1,4 % em regiões menos permitidas e 2,8% em regiões não permitidas (Fig. 18 A e B).



(B)
Mapa estatístico da análise estrutural da Vu-LTPr

	Vu-LTPr
Resíduos em regiões favoráveis [Vermelho – A,B,L]	91,7%
Resíduos em regiões permitidas [Amarelo – a,b,l,p]	4,2%
Resíduos em regiões menos favoráveis [Bege - ~a, ~b, ~l, ~p]	1,4%
Resíduos em regiões não permitidas [Branco- Ile]	2,8%

Figura 18 - (A) Visualização gráfica do mapa de Ramachandran da estrutura da Vu-LTPr. Em vermelho estão representadas as regiões favoráveis; em amarelo, as regiões permitidas; em bege, as regiões menos favoráveis; em branco as regiões não permitidas. (B) Mapa estatístico das porcentagens de aminoácidos da Vu-LTPr nas regiões do mapa de Ramachandran.

4.6.2- Análise dos elementos estruturais de LTPs e comparação com a Vu-LTPr e seleção para síntese química

Após uma avaliação da estrutura modelada da Vu-LTPr, foram escolhidas pequenas sequências cobrindo a sequência da Vu-LTPr, de acordo com suas características estruturais de α -hélices e voltas. Portanto os quatro peptídeos selecionados abrangem a estrutura primária da Vu-LTPr, separados em seus elementos estruturais secundários, com exceção dos 12 resíduos de aminoácidos iniciais. Para os peptídeos escolhidos que possuíam resíduos de Cys, como nos peptídeos S₄₉-K₇₂ e G₇₄-N₉₁, estes foram substituídos por L-ácido α -aminoisobutírico, uma molécula de carga neutra. Um dos peptídeos escolhidos (C₁₃-C₂₇) compreendia uma região delimitada por duas Cys. Neste caso os resíduos de Cys foram mantidos e para que este peptídeo ficasse com a ponte dissulfeto, estes foram reduzidos tornando o peptídeo cíclico (Tabela 2).

Tabela 2. Sequência primária dos peptídeos sintéticos

Peptídeo	Sequência de aminoácidos	Carga
C ₁₃ -C ₂₇	*CIGFLQNGGIVPPAC*	0
N ₂₉ -I ₄₇	NGVKNILNGARTTADRRGI	4+
S ₄₉ -K ₇₂	S α LKSAAGAVRGLNPANAQALPGK	3+
G ₇₄ -N ₉₁	GVNIPWKISSSTN α NTIN	1+

α indica a posição da substituição do resíduo de Cys da sequência pelo L-ácido α -aminoisobutírico;

* indica os resíduos de Cys que foram mantidos e reduzidos para formarem uma ponte dissulfeto. Este peptídeo, portanto, é cíclico.

Para uma melhor visualização dos peptídeos selecionados foi realizada a marcação de suas seqüências na estrutura tridimensional da *Vu*-LTP_r modelada (Fig. 19 A, B, C e D).

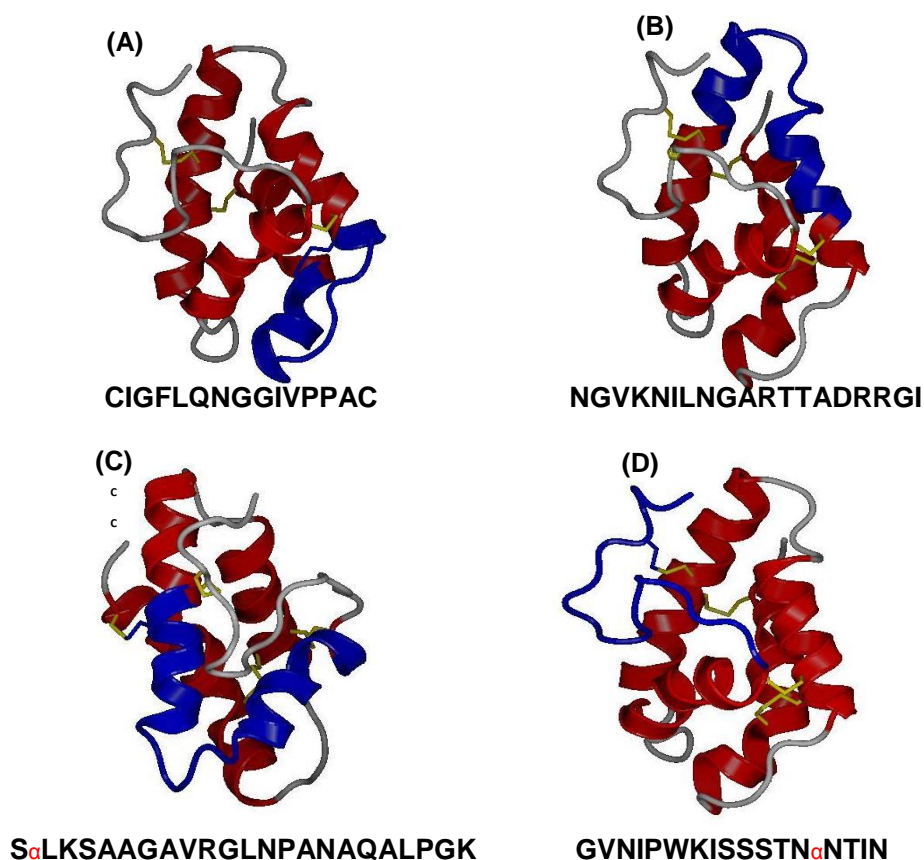


Figura 19- Representação esquemática da sobreposição da estrutura dos peptídeos selecionados (destacados em azul) com a estrutura tridimensional da *Vu*-LTP_r determinada por modelagem utilizando o programa Modeller. Como molde foi usada a estrutura da LTP de *Vigna radiata* (pdb 1SIY 1) (A) C₁₃-C₂₇, indica o peptídeo compreendido entre os resíduos de Cys₁₃ e Cys₂₇ (B) N₂₉-I₄₇, indica o peptídeo compreendido entre os resíduos de Asn₁₃ e Iso₄₇; (C) S₄₉-K₇₂, indica o peptídeo compreendido entre os resíduos de Ser₄₉ e Lys₇₂ e (D) G₇₄-N₉₁, indica o peptídeo compreendido entre os resíduos de Gly₇₄ e Asn₉₁. As α-hélices estão representadas em vermelho, as voltas em cinza, as pontes dissulfeto em amarelo e as seqüências dos peptídeos selecionados em azul. Abaixo das estruturas é mostrada as seqüências dos peptídeos selecionados.

4.7- Teste de inibição da α -amilase salivar humana com os peptídeos selecionados

No ensaio de inibição os peptídeos selecionados N₂₉-I₄₇(B) e G₇₄-N₉₁ (D) apresentaram significativa ação inibitória contra a enzima, cerca de 93% e 94%, respectivamente. O peptídeo S₄₉-K₇₂ (C) mostrou atividade inibitória de apenas 11%, enquanto o peptídeo C₁₃-C₂₇ (A) não inibiu a atividade da α -amilase (Fig. 20).

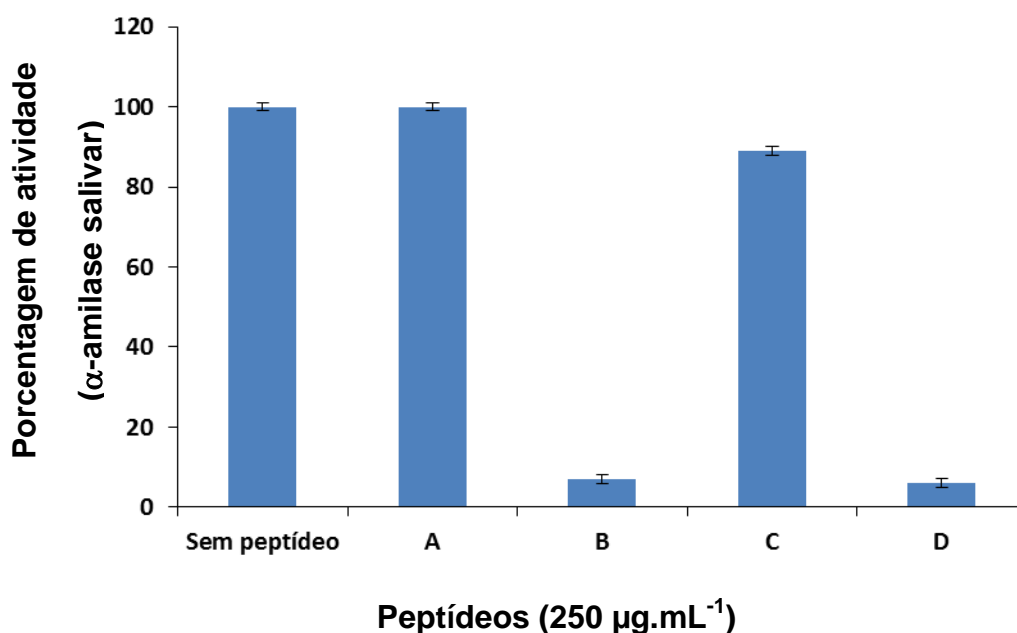


Figura 20 - Visualização gráfica da inibição da atividade da enzima α -amilase salivar humana com os diferentes peptídeos selecionados. As letras A, B, C e D representam respectivamente os peptídeos C₁₃-C₂₇, N₂₉-I₄₇, S₄₉-K₇₂ e G₇₄-N₉₁. O experimento foi realizado em triplicata.

5- Discussão

O *Vigna unguiculata* (feijão-de-corda) é uma das leguminosas mais importantes e amplamente cultivadas na maioria das regiões tropicais do mundo, inclusive no Brasil, mais precisamente na região nordeste. *V. unguiculata* possui alto valor nutritivo e é a principal fonte de nutrientes em populações pobres (Andrade Júnior, 2002). Estudos que revelem as suas características bioquímicas são de grande importância para a melhora no manejo dessa cultura, além de sua aplicação em outras áreas como a manipulação genética. O grupo de pesquisa no qual estou inserida isolou uma LTP da semente de *V. unguiculata* (Carvalho *et al.*, 2001) e utilizando a técnica de imunolocalização, relatou pela primeira vez a presença de LTPs em vacúolos de armazenamento de proteínas (Carvalho *et al.*, 2004). Posteriormente, Carvalho *et al.* (2006) realizaram a clonagem molecular e a caracterização do cDNA que codifica para LTP de *V. unguiculata*, além de analisar os níveis de expressão da LTP em plantas de *V. unguiculata* sob estresses. Neste trabalho é apresentada a expressão heteróloga desta LTP recombinante (*Vu*-LTP_r) e sua purificação; e também é analisada a sua atividade inibitória sobre a α -amilase salivar humana, além do estudo das regiões da *Vu*-LTP_r responsáveis por essa inibição.

Para estudos estruturais e biológicos é requerida uma grande quantidade de AMPs com elevada qualidade. A obtenção destes peptídeos a partir de fontes naturais é, em alguns casos, inviável, pois o processo é trabalhoso e demorado ocasionando num baixo rendimento ao final do processo. Sendo assim é necessária a utilização de métodos eficientes para a obtenção de grandes quantidades de peptídeos. Para a produção em massa de AMPs, os pesquisadores têm utilizado como ferramenta a tecnologia do DNA recombinante usando diferentes sistemas heterólogos, sendo a bactéria *E. coli* o sistema de expressão mais utilizado (Ingham e Moore, 2007; Li, 2011).

5.1- Superexpressão e purificação da *Vu*-LTP_r

A superexpressão de AMPs em bactérias é marcada por algumas dificuldades, entre elas: a proteína pode ser incorretamente enovelada (problemas na formação das pontes dissulfeto) levando a formação de corpos de inclusão (Valore e Ganz, 1997); as proteínas recombinantes podem ser degradadas pelas proteases sintetizadas pela *E. coli*, a proteína recombinante pode ser tóxica para a célula hospedeira (Wei *et al.*, 2005) e algumas proteínas nem chegam a ser expressas por causa do fenômeno de uso preferencial de códons (Lavallie *et al.*, 2003; Elmorjani *et al.*, 2004).

Para sanar estes problemas foi escolhido neste trabalho como sistema de expressão, *E. coli* da linhagem Rosetta gami 2 (DE3) pLysS em conjunto com o plasmídeo pET-32 EK/LIC. A linhagem Rosetta gami 2 (DE3) pLysS, permite a expressão de proteínas eucarióticas que contem códons raros usados pela *E. coli* e adicionalmente esta cepa tem mutados os genes *trxB* e *gor*, estas mutações permitem a formação de pontes dissulfeto no citoplasma da *E. coli*. Este sistema de expressão também pode favorecer a não degradação dos peptídeos recombinantes, pois apresenta mutação no gene que codifica uma protease de membrana externa conhecida como ompT, responsável pela degradação de muitas proteínas no citosol bacteriano (Grodberg e Dunn, 1988; Baneyx e Georgiou, 1990).

O plasmídeo usado contém duas regiões (Fig. 7). Uma delas é a tioredoxina, uma proteína de fusão, que ajuda na solubilização da proteína recombinante. Elmorjani *et al.* (2004) fusionaram a tioredoxina à LTP recombinante de trigo,, garantindo a solubilidade deste peptídeo e também um maior rendimento na produção das proteínas recombinantes quando comparado a outros métodos. A segunda região é composta por seis histidinas consecutivas, que auxilia no processo de purificação. O sistema utilizado neste trabalho possui o promotor T7 que está sob o controle do operador *lac* induzido na presença de IPTG. Este sistema controla a expressão da proteína recombinante, evitando uma possível toxicidade que pode ser causada pela proteína recombinante, não permitindo a paralisação ou a diminuição do crescimento da bactéria transformada (Gräslund *et al.*, 2008).

A Vu-LTP_r após o processo de expressão se apresentou solúvel indicando que o enovelamento da proteína ocorreu corretamente. Porém algumas proteínas recombinantes são expressas acumuladas no citoplasma da bactéria em corpos de

inclusão sendo necessárias etapas de extração e purificação em condições desnaturantes (Marques *et al.*, 2009).

Como antes mencionado o plasmídeo pET-32 EK/LIC, utilizado neste trabalho, fusiona uma cauda de histidina na porção amino-terminal que possui afinidade ao metal Ni^{2+} . Cromatografias de afinidade a íons metálicos imobilizados (IMACs do inglês *immobilized-metal affinity chromatography*) utilizando caudas de histidinas vêm sendo utilizadas rotineiramente, e se tornou o sistema mais popular para este fim (Grundy *et al.*, 1998; Loughran *et al.*, 2006; Lin, P *et al.*, 2007). Para a purificação da Vu-LTPr foi utilizada a coluna de afinidade Ni^{+} -NTA agarose (Qiagen). O sistema de purificação IMAC não foi eficiente para purificar Vu-LTPr em apenas uma etapa cromatográfica. Outros autores como, Elmorjani *et al.* (2004); Santos *et al.* (2010) e Souza *et al.* (2013) relataram que o uso de uma IMAC para a purificação da proteína recombinante não foi o suficiente, sendo necessárias outras etapas na purificação. Porém é possível realizar purificação de proteína recombinante com apenas uma etapa de purificação, Chen *et al.* (2014) conseguiram purificar um anticorpo bi-específico para fluoroquinolonas e sulfonamida, produzido de maneira heteróloga usando apenas uma IMAC.

A etapa seguinte foi a remoção da tioredoxina ligada à cauda de histidina fusionada pelo vetor pET-32 e para isso fez-se a digestão proteolítica com a endoprotease EK. Posteriormente foi realizada a última etapa de purificação da Vu-LTPr através da cromatografia de fase reversa em coluna C18 (Fig. 12).

Após a purificação foi realizado um ensaio de *Western blotting* que revelou a capacidade do anticorpo anti-LTP reconhecer a Trx-6His-Vu-LTP antes da clivagem e também a Vu-LTPr após o tratamento com a EK, revelando o sucesso no processo de superexpressão da proteína recombinante (Fig. 14).

Para confirmar o correto enovelamento da Vu-LTPr e fazer a comparação do seu conteúdo de estrutura secundária com a Vu-LTP, foi realizada análise por dicroísmo circular (CD). Os espectros de CD obtidos evidenciaram que a proteína recombinante e a natural apresentaram uma conformação típica de LTPs, (Fig. 15) em que sua estrutura secundária é formada principalmente por α -hélices, fato este que está em acordo com a estrutura já determinada para várias LTPs (Carvalho e Gomes, 2007; Marion *et al.*, 2007; Yeats e Rose, 2008). A sobreposição dos espectros da Vu-LTPr sobre o da Vu-LTP também indica que o peptídeo

recombinante possui a mesma estrutura do peptídeo obtido naturalmente das sementes de *V. unguiculata*. Palacin *et al.* (2009) para confirmar o correto enovelamento de uma LTP recombinante de trigo, conhecida como um importante alérgeno, fez o sequenciamento da porção N-terminal, espectrometria MOLDI, análise de dicroísmo circular além da imunodeteção por IgE do soro de pacientes alérgicos a essa proteína, comparando assim suas estruturas primárias, secundárias e terciárias além do reconhecimento de seu epítipo.

As LTPs de plantas são multifuncionais e muitas atividades têm sido descritas *in vitro*, entre elas, a capacidade de inibir a atividade da α -amilase salivar humana (Diz *et al.*, 2011; Zottich *et al.*, 2011).

Para verificar a funcionalidade biológica da *Vu*-LTP_r após todo o processo de produção recombinante e purificação, foi realizado um teste de inibição sobre a α -amilase salivar humana. O experimento mostrou que a *Vu*-LTP_r na concentração 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ inibiu cerca de 50% e que 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ inibiu cerca de 86% da atividade da α -amilase salivar humana, comprovando que a *Vu*-LTP_r estava funcional (Fig. 16). Em outros trabalhos onde foi feita a produção de LTP recombinante, também foi comprovada a sua funcionalidade com testes biológicos. (Ooi *et al.*, 2008). viram que uma LTP recombinante de *Narcissus tazetta* (Narciso) se mostrou ativa inibindo os vírus H1N1 e vírus sincicial respiratório após sua expressão e purificação. Além das LTPs, outros peptídeos recombinantes mostraram ter sua atividade biológica conservada após a superexpressão. Alves *et al.* (1994) expressaram em levedura *Saccharomyces cerevisiae* uma defensina de *Raphanus sativus*, que apresentou atividade antifúngica após o processo de purificação, sendo essa atividade já relatada para a proteína natural.

Além da atividade antimicrobiana, os AMPs também podem apresentar a capacidade de inibir α -amilases como as defensinas de plantas, cuja atividade inibitória tem sido relacionada com a defesa contra ataque de herbívoros (Bloch Jr e Richardson, 1991; Chen *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2010).

5.2- Relação estrutura e atividade dos peptídeos na inibição sobre α -amilase salivar humana

Devido as suas características, incluindo a ampla atividade biológica e a amenidade de serem manipulados por biologia molecular, os AMPs são considerados com grande potenciais biotecnológicos. Pesquisadores estão realizando modificações na estrutura destas moléculas com o objetivo de criar AMPs biologicamente mais ativos, com propriedades únicas e que possuam sequências de aminoácidos diminuídas, mas com a intensidade da atividade antimicrobiana preservada (Brogden e Brogden, 2011). Exemplos destes peptídeos modificados são os peptídeos híbridos, sendo estes sintetizados a partir da junção de regiões ativas de AMPs. Um exemplo é o híbrido CEME (cecropinaA-melitina), onde a união de sequências ativas dos dois peptídeos cecropina A (encontrada na hemolinfa de insetos) e melitina (encontrada no veneno de abelha) tornaram o peptídeo mais hábil para permeabilizar a membrana de *Pseudomonas aeruginosa* (Piers e Hancock, 1994). Outro exemplo é a β -defensina-1 humana (HBD1) que sofreu redução das pontes dissulfeto e com isso foi observado o aumento da atividade antimicrobiana contra *Candida albicans* (Schroeder *et al.*, 2011). Vários peptídeos foram diminuídos fazendo um estudo com fragmentos de suas regiões estruturais para se determinar se havia uma região específica responsável pela atividade (Schaaper *et al.*, 2001; Romestand *et al.*, 2003). Um destes estudos mostrou que a porção C-terminal da β -defensina-3 de humano, chamada de Y2, exibiu alta atividade antimicrobiana contra a bactéria Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* além de revelar baixa citotoxicidade às células de mamíferos, quando comparada ao peptídeo inteiro (Bai *et al.*, 2009).

A elucidação dos aspectos estruturais de uma molécula, carrega muita informação a respeito de sua atividade biológica (Bishop *et al.*, 2008) e para correlacionarmos a estrutura com o mecanismo inibitório da Vu-LTP sobre a α -amilase salivar humana, foi resolvido o modelo tridimensional da Vu-LTP_r por modelagem.

A modelagem da Vu-LTP_r foi realizada utilizando como molde a estrutura da LTP de *Vigna radiata* determinada por ressonância nuclear magnética (pdb 1SIY 1) (Lin *et al.*, 2005), devido a similaridade entre as sequências primárias dessas moléculas, apresentando cerca de 84% de identidade entre si. O modelo resolvido utilizando o software Modeller revelou na estrutura tridimensional da Vu-LTP_r, a presença de estruturas secundárias similares à de outras LTPs, como quatro α -

hélices e várias sequências de volta interligando as hélices, sendo esta estrutura estabilizada por quatro pontes dissulfeto (Fig. 17 A). Como revelado em diversos estudos estruturais, as LTPs também podem apresentar uma hélice 3_{10} na porção N-terminal (Pons *et al.*, 2003; RamíRez-Medeles *et al.*, 2003; Lascombe *et al.*, 2008), que existe inclusive na estrutura da proteína utilizada como molde (Lin *et al.*, 2005). A estrutura da Vu-LTP_r revelada por modelagem, não apresentou hélice 3_{10} , porém apenas estudos mais aprofundados de RMN e cristalografia poderiam responder se de fato essa estrutura existe ou não nesta proteína.

A qualidade estereoquímica do modelo criado foi avaliada através do mapa de Ramachandran (Fig. 17 B). Este revelou qualidade aceitável, visto que 91,7% dos resíduos de aminoácidos se encontram em regiões mais favoráveis, 4,2% dos resíduos de aminoácidos se encontram em regiões permitidas e 1,4 % em regiões menos permitidas e 2,8% em regiões não permitidas (sendo aceitáveis, pois se encontraram nas regiões de voltas).

Após uma avaliação da estrutura modelada da Vu-LTP_r, foram escolhidas regiões estruturais que estavam bem definidas, como regiões de volta na molécula, juntamente com as extremidades das hélices conectadas a essas voltas. Somente a região N-terminal (12 resíduos de aminoácidos iniciais) foi exceção, porque estava numa região em que ocorria a formação de pontes dissulfeto que a prendiam na molécula, impedindo qualquer tipo de mobilidade, além do processo de síntese dos peptídeos ter um custo muito elevado levando a priorizar regiões mais propensas a possível inibição da enzima α -amilase.

Para os peptídeos escolhidos que possuíam resíduos de Cys, como nos peptídeos S₄₉-K₇₂ e G₇₄-N₉₁, estes foram substituídos pelo aminoácido L-ácido α -aminoisobutírico, uma molécula de carga neutra e que não é muito volumosa, não interferindo na carga total do peptídeo e nem na configuração estereoquímica do peptídeo. Esta estratégia de substituição também foi usada por Schaaper *et al.* (2001) onde sintetizaram a volta entre as folhas $\beta 1$ e $\beta 2$ da Rs-AFP (defensina de *R. sativus*) e substituíram as Cys por ácido α -aminobutírico. Testes biológicos mostraram que essa substituição não interferiu na atividade antifúngica deste peptídeo. No trabalho de Romestand *et al.* (2003) foram sintetizados peptídeos que simulavam regiões da volta 3 da defensina de *Mytilus galloprovincialis* (mexilhão) em que os resíduos de Cys foram substituídos por Ser e nos testes biológicos os

peptídeos apresentaram atividade contra bactérias Gram-positivas e fungos filamentosos.

Um dos peptídeos escolhidos (C₁₃-C₂₇) compreendia uma região delimitada por duas Cys, neste caso os resíduos de Cys foram mantidos e para que este peptídeo ficasse com a ponte dissulfeto, estes foram reduzidos tornando o peptídeo cíclico mimetizando uma alça encontrada na estrutura tri-dimensional da Vu-LTPr.

Estudos realizados por Liu *et al.* (2006) com o intuito de elucidar as regiões responsáveis pela inibição da α -amilase, revelaram através de experimentos de acoplamento *in silico*, que as regiões de volta da defensina de *Vigna radiata* VrD1 interagem com o sítio ativo da amilase, inibindo a atividade desta enzima. Lin *et al.* (2005) realizaram a transferência da volta funcional da VrD1 para a defensina 2 de *V. radiata* (VrD2) que antes não apresentava a capacidade de inibir amilase e após esta modificação a VrD2 tornou-se capaz de inibir a amilase.

Após a escolha das regiões estruturais dos peptídeos e sua síntese, foi realizado o teste de inibição da α -amilase salivar humana. No ensaio de inibição com os peptídeos selecionados N₂₉-I₄₇ e G₇₄-N₉₁, que são peptídeos básicos (carga líquida total positiva), apresentaram significativa ação inibitória sobre a enzima cerca de 93% e 94%, respectivamente. Já o peptídeo S₄₉-K₇₂ mesmo sendo carregado positivamente, apresentou uma baixa atividade inibitória de apenas 11%. E o peptídeo cíclico C₁₃-C₂₇, com carga líquida neutra, não inibiu a atividade da α -amilase (Fig. 20).

Estudos estruturais sobre as α -amilases revelaram que esta enzima possui em sua superfície externa uma alta concentração de resíduos de aminoácidos carregados negativamente e apresentam um sítio catalítico com potencial eletrostático negativo, composto por dois resíduos de Asp e um de Glu (Ramasubbu *et al.*, 2004; Butterworth *et al.*, 2011). Os resíduos negativos do sítio catalítico são fatores determinantes para o processo de catálise, mas também são necessários para as interações enzima com inibidores. Muitos estudos mostraram que os inibidores carregados positivamente interagem com o sítio ativo da enzima, bloqueando a entrada do substrato na região catalítica (Wiegand *et al.*, 1995; Pereira *et al.*, 1999; Lin, KF *et al.*, 2007).

Vijayan *et al.* (2012) construíram peptídeos com variações nos resíduos de aminoácidos, através de mutagênese da região de volta entre as folhas β 2- β 3 da

defensina de *Tephrosia villosa* (TvD1), onde houve inserção de outros aminoácidos não presentes na defensina selvagem e também mudança na posição de alguns aminoácidos. Entre os peptídeos estudados o Alpha-TvD1 se destacou com atividade antifúngica e inibição sobre a α -amilase de *T. molitor*. Estudos computacionais revelaram que a estabilidade do complexo α -amilase de *T. molitor* e Alpha-TvD1 se dá através da formação de pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e iônicas. Uma dessas interações é ligação de hidrogênio que ocorre entre o grupo -NH da cadeia lateral da Arg (resíduo carregado positivamente) do peptídeo mutado, com átomos de oxigênio da cadeia lateral do Asp, presente no sítio catalítico da amilase de *T. molitor*.

A substituição de aminoácidos também foi realizada por De Samblanx *et al.* (1997), onde foi realizada a troca de resíduos de aminoácidos em regiões não conservadas da Rs-AFP2 por resíduos de Arg, mudando a carga eletrostática da proteína e aumentando a sua atividade antifúngica. Neste trabalho também foi mostrado, que a troca de um resíduo de Ala por Trp (resíduo de aminoácido volumoso) na Rs-AFP2 levou a uma mudança na configuração estereoquímica da molécula e uma consequente redução na atividade antifúngica desta defensina.

Diante dos resultados obtidos neste trabalho sugerimos que a carga eletrostática e a posição dos resíduos de aminoácidos presentes nos peptídeos são importantes para ação inibitória sobre a amilase. Para aprofundar os conhecimentos já adquiridos, são necessários estudos computacionais simulando a ligação do peptídeo inibidor com a enzima, para esclarecer quais são os resíduos de aminoácidos participantes da inibição da α -amilase salivar humana.

6- Conclusões

- A expressão da Trx-6His-Vu-LTPr no citoplasma de *Escherichia coli* foi bem sucedida;
- A Trx-6His-Vu-LTPr foi parcialmente purificada do extrato bacteriano pela cromatografia de afinidade a metal em coluna de Ni⁺-NTA agarose, após a purificação a Trx-6His-Vu-LTPr foi tratada com a endoprotease enteroquinase e o corte da cauda Trx-6His foi bem sucedido. A Vu-LTPr após a clivagem foi purificada por cromatografia de fase reversa em coluna C18 em gradiente de 2-propanol. Após expressão e purificação da Vu-LTPr, anticorpo anti-LTP reconheceu a proteína recombinante indicando que a tradução da Vu-LTPr no citoplasma de *E. coli* ocorreu corretamente;
- A sobreposição dos espectros de dicroísmo circular da Vu-LTPr e da Vu-LTP indica que estes peptídeos possuem a mesma estrutura secundária e, portanto, o enovelamento da Vu-LTPr ocorreu corretamente no citoplasma da *E. coli*. E o ensaio de inibição da atividade enzimática da α -amilase salivar humana pela Vu-LTPr confirmou que a Vu-LTPr está ativa após todo o processo de expressão recombinante e purificação;
- A modelagem da estrutura da Vu-LTPr mostrou uma estrutura tridimensional constituída de quatro α -hélices e várias sequências de voltas, estrutura esta que é comum a LTPs de plantas já caracterizadas estruturalmente;
- A partir da estrutura da Vu-LTPr foram escolhidos e sintetizados quatro peptídeos e dois destes peptídeos sintéticos foram capazes de inibir a atividade da α -amilase salivar humana, este resultado nos leva a crer que a estrutura tridimensional da proteína não é fundamental para a sua atividade inibitória contra α -amilase salivar humana.

7- Bibliografia

ALMEIDA, MS; CABRAL, K; KURTENBACH, E; ALMEIDA, FC; VALENTE, AP. Solution structure of *Pisum sativum* defensin 1 by high resolution NMR: plant defensins, identical backbone with different mechanisms of action. **Journal of Molecular Biology**, v. 315, n. 4, p. 749-757, 2002.

ALTSCHUL, SF; GISH, W; MILLER, W; MYERS, EW; LIPMAN, DJ. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.

ALVES, ALV; DE SAMBLANX, GW; TERRAS, FR; CAMMUE, B; BROEKAERT, WF. Expression of functional *Raphanus sativus* antifungal protein in yeast. **FEBS Letters**, v. 348, n. 3, p. 228-232, 1994.

ANDRADE JÚNIOR, A. **Cultivo do feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp)**. Embrapa Meio-Norte, 2002.

ARONDEL, V; KADER, J-C. Lipid transfer in plants. **Experientia**, v. 46, n. 6, p. 579-585, 1990.

BAI, Y; LIU, S; JIANG, P; ZHOU, L; LI, J; TANG, C; VERMA, C; MU, Y; BEUERMAN, RW; PERVUSHIN, K. Structure-dependent charge density as a determinant of antimicrobial activity of peptide analogues of defensin. **Biochemistry**, v. 48, n. 30, p. 7229-7239, 2009.

BANEYX, F; GEORGIOU, G. In vivo degradation of secreted fusion proteins by the Escherichia coli outer membrane protease OmpT. **Journal of Bacteriology**, v. 172, n. 1, p. 491-494, 1990.

BENKO-ISEPPON, AM; LINS GALDINO, S; CALSA, J; AKIO KIDO, E; TOSSI, A; CARLOS BELARMINO, L; CROVELLA, S. Overview on plant antimicrobial peptides. **Current Protein and Peptide Science**, v. 11, n. 3, p. 181-188, 2010.

BERNFELD, P. Amylases, α and β . **Methods in Enzymology**, v. 1, p. 149-158, 1955.

BERNHARD, WR; SOMERVILLE, CR. Coidentity of putative amylase inhibitors from barley and finger millet with phospholipid transfer proteins inferred from amino acid sequence homology. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 269, n. 2, p. 695-697, 1989.

BISHOP, A; DE BEER, TA; JOUBERT, F. Protein homology modelling and its use in South Africa. **South African Journal of Science**, v. 104, n. 1-2, p. 2-6, 2008.

BLEIN, J P; COUTOS-THÉVENOT, P; MARION, D; PONCHET, M. From elicitors to lipid-transfer proteins: a new insight in cell signalling involved in plant defence mechanisms. **Trends in Plant Science**, v. 7, n. 7, p. 293-296, 2002.

BLOCH JR, C; RICHARDSON, M. A new family of small (5 kDa) protein inhibitors of insect α -amylases from seeds of sorghum *Sorghum bicolor* (L) have sequence homologies with wheat γ -purothionins. **FEBS Letters**, v. 279, n. 1, p. 101-104, 1991.

BRADFORD, MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976.

BRANDENBURG, L-O; MERRES, J; ALBRECHT, L-J; VAROGA, D; PUFE, T. Antimicrobial peptides: multifunctional drugs for different applications. **Polymers**, v. 4, n. 1, p. 539-560, 2012.

BROGDEN, NK; BROGDEN, KA. Will new generations of modified antimicrobial peptides improve their potential as pharmaceuticals? **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 38, n. 3, p. 217-225, 2011.

BULET, P; STOCKLIN, R. Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation. **Protein and Peptide Letters**, v. 12, n. 1, p. 3-11, 2005.

BUTTERWORTH, PJ; WARREN, FJ; ELLIS, PR. Human α -amylase and starch digestion: An interesting marriage. **Starch-Stärke**, v. 63, n. 7, p. 395-405, 2011.

CAMMUE, BPA; THEVISSSEN, K; HENDRIKS, M; EGGERMONT, K; GODERIS, IJ; PROOST, P; VAN DAMME, J; OSBORN, RW; GUERBETTE, F; KADER, J-C. A potent antimicrobial protein from onion seeds showing sequence homology to plant lipid transfer proteins. **Plant Physiology**, v. 109, n. 2, p. 445-455, 1995.

CARVALHO, AO; GOMES, VM. Role of plant lipid transfer proteins in plant cell physiology - a concise review. **Peptides**, v. 28, n. 5, p. 1144-1153, 2007.

CARVALHO, AO; GOMES, VM. Plant defensins and defensin-like peptides-biological activities and biotechnological applications. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, n. 38, p. 4270-4293, 2011.

CARVALHO, AO; MACHADO, OLT; DA CUNHA, M; SANTOS, IS; GOMES, VM. Antimicrobial peptides and immunolocalization of a LTP in *Vigna unguiculata* seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 39, n. 2, p. 137-146, 2001.

CARVALHO, A; SOUZA-FILHO, G; FERREIRA, B; BRANCO, A; ARAÚJO, I; FERNANDES, K; RETAMAL, C; GOMES, V. Cloning and characterization of a cowpea seed lipid transfer protein cDNA: expression

analysis during seed development and under fungal and cold stresses in seedlings' tissues. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 44, n. 11, p. 732-742, 2006.

CARVALHO, AO; TEODORO, DS; EDUARDO, C; DA CUNHA, M; OKOROKOVA-FAÇANHA, AL; OKOROKOV, LA; FERNANDES, KV; GOMES, VM. Intracellular localization of a lipid transfer protein in *Vigna unguiculata* seeds. **Physiologia Plantarum**, v. 122, n. 3, p. 328-336, 2004.

CHAGOLLA-LOPEZ, A; BLANCO-LABRA, A; PATTHY, A; SÁNCHEZ, R; PONGOR, S. A novel alpha-amylase inhibitor from amaranth (*Amaranthus hypocondriacus*) seeds. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 38, p. 23675-23680, 1994.

CHEN, G-H; HSU, M-P; TAN, C-H; SUNG, H-Y; KUO, CG; FAN, M-J; CHEN, H-M; CHEN, S; CHEN, C-S. Cloning and characterization of a plant defensin VaD1 from azuki bean. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 4, p. 982-988, 2005.

CHEN, K-C; LIN, C-Y; KUAN, C-C; SUNG, H-Y; CHEN, C-S. A novel defensin encoded by a mungbean cDNA exhibits insecticidal activity against bruchid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 25, p. 7258-7263, 2002.

CHEN, M; WEN, K; TAO, X; XIE, J; WANG, L; LI, Y; DING, S; JIANG, H. Cloning, expression, purification and characterization of a bispecific single-chain diabody against fluoroquinolones and sulfonamides in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, v. 100, p. 19-25, 2014.

CHENG, C-S; SAMUEL, D; LIU, Y-J; SHYU, J-C; LAI, S-M; LIN, K-F; LYU, P-C. Binding mechanism of nonspecific lipid transfer proteins and their role in plant defense. **Biochemistry**, v. 43, n. 43, p. 13628-13636, 2004.

DE CALEYA, RF; GONZALEZ-PASCUAL, B; GARCÍA-OLMEDO, F; CARBONERO, P. Susceptibility of phytopathogenic bacteria to wheat purothionins in vitro. **Applied Microbiology**, v. 23, n. 5, p. 998-1000, 1972.

DE SAMBLANX, GW; GODERIS, IJ; THEVISSSEN, K; RAEMAEEKERS, R; FANT, F; BORREMANS, F; ACLAND, DP; OSBORN, RW; PATEL, S; BROEKAERT, WF. Mutational analysis of a plant defensin from radish (*Raphanus sativus* L.) reveals two adjacent sites important for antifungal activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 2, p. 1171-1179, 1997.

DE SOUSA-MAJER, MJ; HARDIE, DC; TURNER, NC; HIGGINS, TJ. Bean α -amylase inhibitors in transgenic peas inhibit development of pea weevil larvae. **Journal of Economic Entomology**, v. 100, n. 4, p. 1416-1422, 2007.

DIAS, SC; FRANCO, OL; MAGALHAES, CP; DE OLIVEIRA-NETO, OB; LAUMANN, RA; FIGUEIRA, EL; MELO, FR; GROSSI-DE-SÁ, MF. Molecular cloning and expression of an α -amylase inhibitor from rye with potential for controlling insect pests. **The Protein Journal**, v. 24, n. 2, p. 113-123, 2005.

DIERYCK, W; GAUTIER, M-F; LULLIEN, V; JOUDRIER, P. Nucleotide sequence of a cDNA encoding a lipid transfer protein from wheat (*Triticum durum Desf.*). **Plant Molecular Biology**, v. 19, n. 4, p. 707-709, 1992.

DIZ, MS; CARVALHO, AO; RIBEIRO, SF; DA CUNHA, M; BELTRAMINI, L; RODRIGUES, R; NASCIMENTO, VV; MACHADO, OL; GOMES, VM. Characterisation, immunolocalisation and antifungal activity of a lipid transfer protein from chili pepper (*Capsicum annuum*) seeds with novel α -amylase inhibitory properties. **Physiologia Plantarum**, v. 142, n. 3, p. 233-246, 2011.

DIZ, MS; CARVALHO, AO; RODRIGUES, R; NEVES-FERREIRA, AGC; DA CUNHA, M; ALVES, EW; OKOROKOVA-FAÇANHA, AL; OLIVEIRA, MA; PERALES, J; MACHADO, OL. Antimicrobial peptides from chilli pepper seeds causes yeast plasma membrane permeabilization and inhibits the acidification of the medium by yeast cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1760, n. 9, p. 1323-1332, 2006.

DUBREIL, L; GABORIT, T; BOUCHET, B; GALLANT, DJ; BROEKAERT, WF; QUILLIEN, L; MARION, D. Spatial and temporal distribution of the major isoforms of puroindolines (puroindoline- α and puroindoline- β) and non specific lipid transfer protein (ns-LTP1) of *Triticum aestivum* seeds. Relationships with their in vitro antifungal properties. **Plant Science**, v. 138, n. 2, p. 121-135, 1998.

ELMORJANI, K; LURQUIN, V; LELION, A; ROGNIAUX, H; MARION, D. A bacterial expression system revisited for the recombinant production of cystine-rich plant lipid transfer proteins. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 316, n. 4, p. 1202-1209, 2004.

FLEMING, AJ; MANDEL, T; HOFMANN, S; STERK, P; VRIES, SC; KUHLEMEIER, C. Expression pattern of a tobacco lipid transfer protein gene within the shoot apex. **The Plant Journal**, v. 2, n. 6, p. 855-862, 1992.

FRANCO, OL; RIGDEN, DJ; MELO, FR; GROSSI-DE-SÁ, MF. Plant α -amylase inhibitors and their interaction with insect α -amylases. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 2, p. 397-412, 2002.

GESELL, J; ZASLOFF, M; OPELLA, SJ. Two-dimensional ^1H NMR experiments show that the 23-residue magainin antibiotic peptide is an α -helix in dodecylphosphocholine micelles, sodium dodecylsulfate micelles, and trifluoroethanol/water solution. **Journal of Biomolecular NMR**, v. 9, n. 2, p. 127-135, 1997.

GIULIANI, A; PIRRI, G; NICOLETTO, SF. Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. **Central European Journal of Biology**, v. 2, n. 1, p. 1-33, 2007.

GRÄSLUND, S; NORDLUND, P; WEIGELT, J; BRAY, J; GILEADI, O; KNAPP, S; OPPERMANN, U; ARROWSMITH, C; HUI, R; MING, J. Protein production and purification. **Nature Methods**, v. 5, n. 2, p. 135-146, 2008.

GRODBERG, J; DUNN, JJ. ompT encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. **Journal of Bacteriology**, v. 170, n. 3, p. 1245-1253, 1988.

GRUNDY, JE; WIRTANEN, LY; BEAUREGARD, M. Addition of a poly-(6X) His tag to Milk Bundle-1 and purification using immobilized metal-affinity chromatography. **Protein Expression and Purification**, v. 13, n. 1, p. 61-66, 1998.

GUANÍ-GUERRA, E; SANTOS-MENDOZA, T; LUGO-REYES, SO; TERÁN, LM. Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease. **Clinical Immunology**, v. 135, n. 1, p. 1-11, 2010.

HAN, GW; LEE, JY; SONG, HK; CHANG, C; MIN, K; MOON, J; SHIN, DH; KOPKA, ML; SAWAYA, MR; YUAN, HS. Structural basis of non-specific lipid binding in maize lipid-transfer protein complexes revealed by high-resolution X-ray crystallography. **Journal of Molecular Biology**, v. 308, n. 2, p. 263-278, 2001.

HITESHI, K; GUPTA, R. Thermal adaptation of α -amylases: a review. **Extremophiles**, p. 1-8, 2014.

INGHAM, AB; MOORE, RJ. Recombinant production of antimicrobial peptides in heterologous microbial systems. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 47, n. 1, p. 1-9, 2007.

JENSSEN, H; HAMILL, P; HANCOCK, RE. Peptide antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 3, p. 491-511, 2006.

JIANG, H; SONG, W; LI, A; YANG, X; SUN, D. Identification of genes differentially expressed in cauliflower associated with resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* **Molecular Biology Reports**) n. 38 p. 621–629, 2011

JUNG, HW; KIM, W; HWANG, BK. Three pathogen-inducible genes encoding lipid transfer protein from pepper are differentially activated by pathogens, abiotic, and environmental stresses. **Plant, Cell & Environment**, v. 26, n. 6, p. 915-928, 2003.

KADER, J-C. Lipid-transfer proteins in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 47, n. 1, p. 627-654, 1996.

KADER, J-C. Lipid-transfer proteins: a puzzling family of plant proteins. **Trends in Plant Science**, v. 2, n. 2, p. 66-70, 1997.

KADER, J. Proteins and the intracellular exchange of lipids: I. stimulation of phospholipid exchange between mitochondria and microsomal fractions by proteins isolated from potato tuber. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism**, v. 380, n. 1, p. 31-44, 1975.

KADER, JC; JULIENNE, M; VERGNOLLE, C. Purification and characterization of a spinach-leaf protein capable of transferring phospholipids from liposomes to mitochondria or chloroplasts. **European Journal of Biochemistry**, v. 139, n. 2, p. 411-416, 1984.

KIRUBAKARAN, IS; BEGUM, SM; ULAGANATHAN, K; SAKTHIVEL, N. Characterization of a new antifungal lipid transfer protein from wheat. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46, n. 10, p. 918-927, 2008.

KRISTENSEN, AK; BRUNSTEDT, J; NIELSEN, KK; ROEPSTORFF, P; MIKKELSEN, JD. Characterization of a new antifungal non-specific lipid transfer protein (nsLTP) from sugar beet leaves. **Plant Science**, v. 155, n. 1, p. 31-40, 2000.

LAEMMLI, UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LAI, Y; GALLO, RL. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. **Trends in Immunology**, v. 30, n. 3, p. 131-141, 2009.

LARKIN, MA; BLACKSHIELDS, G; BROWN, N; CHENNA, R; MCGETTIGAN, PA; MCWILLIAM, H; VALENTIN, F; WALLACE, IM; WILM, A; LOPEZ, R. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, n. 21, p. 2947-2948, 2007.

LASCOMBE, MB; BAKAN, B; BUHOT, N; MARION, D; BLEIN, JP; LARUE, V; LAMB, C; PRANGÉ, T. The structure of "defective in induced resistance" protein of Arabidopsis thaliana, DIR1, reveals a new type of lipid transfer protein. **Protein Science**, v. 17, n. 9, p. 1522-1530, 2008.

LASKOWSKI, RA; MACARTHUR, MW; MOSS, DS; THORNTON, JM. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, n. 2, p. 283-291, 1993.

LAVALLE, ER; DIBLASIO-SMITH, EA; COLLINS-RACIE, LA; LU, Z; MCCOY, JM. Thioredoxin and related proteins as multifunctional fusion tags for soluble expression in E. coli. In: (Ed.). **E. coliGene Expression Protocols**: Springer, 2003. p.119-140.

LEE, JY; MIN, K; CHA, H; SHIN, DH; HWANG, KY; SUH, SW. Rice non-specific lipid transfer protein: the 1.6 Å crystal structure in the unliganded state reveals a small hydrophobic cavity. **Journal of Molecular Biology**, v. 276, n. 2, p. 437-448, 1998.

LEE, SB; GO, YS; BAE, H-J; PARK, JH; CHO, SH; CHO, HJ; LEE, DS; PARK, OK; HWANG, I; SUH, MC. Disruption of glycosylphosphatidylinositol-anchored lipid transfer protein gene altered cuticular lipid composition, increased plastoglobules, and enhanced susceptibility to infection by the fungal pathogen *Alternaria brassicicola*. **Plant Physiology**, v. 150, n. 1, p. 42-54, 2009.

LI, Y. Recombinant production of antimicrobial peptides in *Escherichia coli*: A review. **Protein Expression and Purification**, v. 80, n. 2, p. 260-267, 2011.

LIN, K-F; LIU, Y-N; HSU, S-TD; SAMUEL, D; CHENG, C-S; BONVIN, AM; LYU, P-C. Characterization and structural analyses of nonspecific lipid transfer protein 1 from mung bean. **Biochemistry**, v. 44, n. 15, p. 5703-5712, 2005.

LIN, KF; LEE, TR; TSAI, PH; HSU, MP; CHEN, CS; LYU, PC. Structure-based protein engineering for α -amylase inhibitory activity of plant defensin. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 68, n. 2, p. 530-540, 2007.

LIN, P; XIA, L; NG, T. First isolation of an antifungal lipid transfer peptide from seeds of a *Brassica* species. **Peptides**, v. 28, n. 8, p. 1514-1519, 2007.

LIU, X-H; YE, C-X; YE, J-D; SHEN, B-D; WANG, C-Y; WANG, A-L. Effects of dietary amylose/amylopectin ratio on growth performance, feed utilization, digestive enzymes, and postprandial metabolic responses in juvenile obscure puffer Takifugu obscurus. **Fish Physiology and Biochemistry**, p. 1-14, 2014.

LIU, YJ; CHENG, CS; LAI, SM; HSU, MP; CHEN, CS; LYU, PC. Solution structure of the plant defensin VrD1 from mung bean and its possible role in insecticidal activity against bruchids. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 63, n. 4, p. 777-786, 2006.

LOUGHRAN, ST; LOUGHRAN, NB; RYAN, BJ; D'SOUZA, BN; WALLS, D. Modified His-tag fusion vector for enhanced protein purification by immobilized metal affinity chromatography. **Analytical Biochemistry**, v. 355, n. 1, p. 148-150, 2006.

MALDONADO, A M; DOERNER, P; DIXON, R A; LAMB, C J; CAMERON, R K. A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in Arabidopsis. **Nature**, v. 419, n. 6905, p. 399-403, 2002.

MARION, D; BAKAN, B; ELMORJANI, K. Plant lipid binding proteins: properties and applications. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 2, p. 195-197, 2007.

MARÓTI, G; KERESZT, A; KONDOROSI, E; MERGAERT, P. Natural roles of antimicrobial peptides in microbes, plants and animals. **Research in Microbiology**, v. 162, n. 4, p. 363-374, 2011.

MARQUES, L; OOMEN, R; AUMELAS, A; LE JEAN, M; BERTHOMIEU, P. Production of an Arabidopsis halleri foliar defensin in Escherichia coli. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, n. 5, p. 1640-1648, 2009.

MARSHALL, JJ; LAUDA, CM. Purification and properties of phaseolamin, an inhibitor of alpha-amylase, from the kidney bean, Phaseolus vulgaris. **Journal of Biological Chemistry**, v. 250, n. 20, p. 8030-8037, 1975.

MEHRABADI, M; FRANCO, OL; BANDANI, AR. **Plant proteinaceous alpha-amylase and proteinase inhibitors and their use in insect pest control**. *New Perspectives in Plant Protection*,. BANDANI, P. A. R. Available from: <http://www.intechopen.com/books/new-perspectives-in-plant-protection/plant-proteinaceous-amylase-and-proteinase-inhibitors-and-their-use-in-insect-pest-control> 2012.

MOLINA, A; GARCÍA-OLMEDO, F. Developmental and pathogen-induced expression of three barley genes encoding lipid transfer proteins. **The Plant Journal**, v. 4, n. 6, p. 983-991, 1993.

MÓTYÁN, JA; GYÉMÁNT, G; HARANGI, J; BAGOSSI, P. Computer-aided subsite mapping of α -amylases. **Carbohydrate Research**, v. 346, n. 3, p. 410-415, 2011.

MUNDY, J; HEJGAARD, J; SVENDSEN, I. Characterization of a bifunctional wheat inhibitor of endogenous α -amylase and subtilisin. **FEBS Letters**, v. 167, n. 2, p. 210-214, 1984.

MUNDY, J; SVENDSEN, I; HEJGAARD, J. Barley α -amylase/subtilisin inhibitor. I. Isolation and characterization. **Carlsberg Research Communications**, v. 48, n. 2, p. 81-90, 1983.

ODINTSOVA, T; EGOROV, T. Plant antimicrobial peptides. In: (Ed.). **Plant Signaling Peptides**: Springer, 2012. p.107-133.

OLIVEIRA-NETO, OB; BATISTA, JA; RIGDEN, DJ; FRANCO, OL; FALCÃO, R; FRAGOSO, RR; MELLO, LV; DOS SANTOS, RC; GROSSI-DE-SÁ, MF. Molecular cloning of α -amylases from cotton boll weevil, Anthonomus grandis and structural relations to plant inhibitors: an approach to insect resistance. **Journal of Protein Chemistry**, v. 22, n. 1, p. 77-87, 2003.

ONEDA, H; LEE, S; INOUE, K. Inhibitory effect of 0.19 α -amylase inhibitor from wheat kernel on the activity of porcine pancreas α -amylase and its thermal stability. **Journal of Biochemistry**, v. 135, n. 3, p. 421-427, 2004.

OOI, LS; TIAN, L; SU, M; HO, W-S; SUN, SS; CHUNG, H-Y; WONG, HN; OOI, VE. Isolation, characterization, molecular cloning and modeling of a new lipid transfer protein with antiviral and antiproliferative activities from *Narcissus tazetta*. **Peptides**, v. 29, n. 12, p. 2101-2109, 2008.

PALACIN, A; VARELA, J; QUIRCE, S; DEL POZO, V; TORDESILLAS, L; BARRANCO, P; FERNANDEZ-NIETO, M; SASTRE, J; DIAZ-PERALES, A; SALCEDO, G. Recombinant lipid transfer protein Tri a 14: a novel heat

and proteolytic resistant tool for the diagnosis of baker's asthma. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 39, n. 8, p. 1267-1276, 2009.

PASTORELLO, EA; FARIOLI, L; PRAVETTONI, V; ORTOLANI, C; ISPANO, M; MONZA, M; BAROGLIO, C; SCIBOLA, E; ANSALONI, R; INCORVAIA, C. The major allergen of peach (*Prunus persica*) is a lipid transfer protein. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 103, n. 3, p. 520-526, 1999.

PAYAN, F. Structural basis for the inhibition of mammalian and insect α -amylases by plant protein inhibitors. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1696, n. 2, p. 171-180, 2004.

PEREIRA, LLS; SANTOS, C; PEREIRA, CA; MARQUES, TR; SÁTIRO, LC. Precipitação do inibidor de α -amilase de feijão branco: avaliação dos métodos Precipitation of α -amylase inhibitor from white beans: evaluation of methods. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 21, n. 1, p. 15-20, 2010.

PEREIRA, PJB; LOZANOV, V; PATTHY, A; HUBER, R; BODE, W; PONGOR, S; STROBL, S. 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**, v. 7, n. 9, p. 1079-1088, 1999.

PIERS, KL; HANCOCK, RE. The interaction of a recombinant cecropin/melittin hybrid peptide with the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. **Molecular Microbiology**, v. 12, n. 6, p. 951-958, 1994.

PONS, J-L; DE LAMOTTE, F; GAUTIER, M-F; DELSUC, M-A. Refined solution structure of a liganded type 2 wheat nonspecific lipid transfer protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 16, p. 14249-14256, 2003.

PORCELLI, F; OLIVIERI, C; MASTERSON, LR; WANG, Y; VEGLIA, G. Templating α -amylase peptide inhibitors with organotin compounds. **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 16, n. 8, p. 1197-1204, 2011.

POWERS, J-PS; ROZEK, A; HANCOCK, RE. Structure–activity relationships for the β -hairpin cationic antimicrobial peptide polyphemusin I. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1698, n. 2, p. 239-250, 2004.

PYEE, J; YU, H; KOLATTUKUDY, P. Identification of a lipid transfer protein as the major protein in the surface wax of *Broccoli Brassica oleracea* Leaves. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 311, n. 2, p. 460-468, 1994.

RAMASUBBU, N; PALOTH, V; LUO, Y; BRAYER, G; LEVINE, M. Structure of human salivary-amylase at 1.6 Å resolution: implications for its role in the oral cavity. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 52, n. 3, p. 435-446, 1996.

RAMASUBBU, N; RAGUNATH, C; MISHRA, PJ; THOMAS, LM; GYÉMÁNT, G; KANDRA, L. Human salivary α -amylase Trp58 situated at subsite- 2 is critical for enzyme activity. **European Journal of Biochemistry**, v. 271, n. 12, p. 2517-2529, 2004.

RAMÍREZ-MEDELES, MADC; AGUILAR, MB; MIGUEL, RN; BOLAÑOS-GARCÍA, VCM; GARCÍA-HERNÁNDEZ, E; SORIANO-GARCÍA, M. Amino acid sequence, biochemical characterization, and comparative modeling of a nonspecific lipid transfer protein from *Amaranthus hypochondriacus*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 415, n. 1, p. 24-33, 2003.

REDDY, K; YEDERY, R; ARANHA, C. Antimicrobial peptides: premises and promises. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 24, n. 6, p. 536-547, 2004.

REGENTE, M; GIUDICI, A; VILLALAIN, J; CANAL, L. The cytotoxic properties of a plant lipid transfer protein involve membrane permeabilization of target cells. **Letters in Applied Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 183-189, 2005.

REGENTE, MC; DE LA CANAL, L. Purification, characterization and antifungal properties of a lipid-transfer protein from sunflower (*Helianthus annuus*) seeds. **Physiologia Plantarum**, v. 110, n. 2, p. 158-163, 2000.

RICHARDSON, M. **Methods in Plant Biochemistry**. London: Academic Press, 1990.

ROMESTAND, B; MOLINA, F; RICHARD, V; ROCH, P. Key role of the loop connecting the two beta strands of mussel defensin in its antimicrobial activity. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, n. 13, p. 2805-2813, 2003.

ROZEK, A; FRIEDRICH, CL; HANCOCK, RE. Structure of the bovine antimicrobial peptide indolicidin bound to dodecylphosphocholine and sodium dodecyl sulfate micelles. **Biochemistry**, v. 39, n. 51, p. 15765-15774, 2000.

SALCEDO, G; SANCHEZ-MONGE, R; BARBER, D; DIAZ-PERALES, A. Plant non-specific lipid transfer proteins: an interface between plant defence and human allergy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1771, n. 6, p. 781-791, 2007.

SALES, PM; SOUZA, PM; SIMEONI, LA; MAGALHÃES, PO; SILVEIRA, D. α -Amylase inhibitors: a review of raw material and isolated compounds from plant source. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 15, n. 1, p. 141-183, 2012.

SAMUEL, D; LIU, Y-J; CHENG, C-S; LYU, P-C. Solution structure of plant nonspecific lipid transfer protein-2 from rice (*Oryza sativa*). **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 38, p. 35267-35273, 2002.

SANTOS, IS; CARVALHO, ADO; DE SOUZA-FILHO, GA; DO NASCIMENTO, VV; MACHADO, OL; GOMES, VM. Purification of a defensin isolated from *Vigna unguiculata* seeds, its functional expression in *Escherichia coli*, and assessment of its insect α -amylase inhibitory activity. **Protein Expression and Purification**, v. 71, n. 1, p. 8-15, 2010.

SCHAAPER, W; POSTHUMA, G; MELOEN, R; PLASMAN, H; SIJTSMA, L; VAN AMERONGEN, A; FANT, F; BORREMANS, F; THEVISSSEN, K; BROEKAERT, W. Synthetic peptides derived from the β 2- β 3 loop of *Raphanus sativus* antifungal protein 2 that mimic the active site. **The Journal of Peptide Research**, v. 57, n. 5, p. 409-418, 2001.

SCHÄGGER, H; VON JAGOW, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Analytical biochemistry**, v. 166, n. 2, p. 368-379, 1987.

SCHROEDER, BO; WU, Z; NUDING, S; GROSCURTH, S; MARCINOWSKI, M; BEISNER, J; BUCHNER, J; SCHALLER, M; STANGE, EF; WEHKAMP, J. Reduction of disulphide bonds unmasks potent antimicrobial activity of human [bgr]-defensin 1. **Nature**, v. 469, n. 7330, p. 419-423, 2011.

SEGURA, A; MORENO, M; GARCÍA-OLMEDO, F. Purification and antipathogenic activity of lipid transfer proteins (LTPs) from the leaves of *Arabidopsis* and spinach. **FEBS Letters**, v. 332, n. 3, p. 243-246, 1993.

SHIN, DH; LEE, JY; HWANG, KY; KYU KIM, K; SUH, SW. High-resolution crystal structure of the non-specific lipid-transfer protein from maize seedlings. **Structure**, v. 3, n. 2, p. 189-199, 1995.

SILVA, MCMD; DEL SARTO, RP; LUCENA, WA; RIGDEN, DJ; TEIXEIRA, FR; BEZERRA, CDA; ALBUQUERQUE, ÉVS; GROSSI-DE-SA, MF. Employing in vitro directed molecular evolution for the selection of α -amylase variant inhibitors with activity toward cotton boll weevil enzyme. **Journal of Biotechnology**, v. 167, n. 4, p. 377-385, 2013.

SKRIVER, K; LEAH, R; MÜLLER-URI, F; OLSEN, F-L; MUNDY, J. Structure and expression of the barley lipid transfer protein gene Ltp1. **Plant Molecular Biology**, v. 18, n. 3, p. 585-589, 1992.

SMITH, P; KROHN, RI; HERMANSON, G; MALLIA, A; GARTNER, F; PROVENZANO, M; FUJIMOTO, E; GOEKE, N; OLSON, B; KLENK, D. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 150, n. 1, p. 76-85, 1985.

SODANO, P; CAILLE, A; SY, D; DE PERSON, G; MARION, D; PTAK, M. NMR and fluorescence studies of the complexation of DMPG by wheat non-specific lipid transfer protein. Global fold of the complex. **FEBS Letters**, v. 416, n. 2, p. 130-134, 1997.

SOHAL, AK; LOVE, AJ; CECCHINI, E; COVEY, SN; JENKINS, GI; MILNER, JJ. Cauliflower mosaic virus infection stimulates lipid transfer protein gene expression in Arabidopsis. **Journal of Experimental Botany**, v. 50, n. 341, p. 1727-1733, 1999.

SOUZA, GS; DO NASCIMENTO, VV; DE CARVALHO, LP; DE MELO, EJT; FERNANDES, KV; MACHADO, OLT; RETAMAL, CA; GOMES, VM; CARVALHO, ADO. Activity of recombinant and natural defensins from *Vigna unguiculata* seeds against *Leishmania amazonensis*. **Experimental Parasitology**, v. 135, n. 1, p. 116-125, 2013.

SVENSSON, B. Protein engineering in the α -amylase family: catalytic mechanism, substrate specificity, and stability. **Plant Molecular Biology**, v. 25, n. 2, p. 141-157, 1994.

SVENSSON, B; ASANO, K; JONASSEN, I; POULSEN, FM; MUNDY, J; SVENDSEN, I. A 10 kD barley seed protein homologous with an α -amylase inhibitor from Indian finger millet. **Carlsberg Research Communications**, v. 51, n. 7, p. 493-500, 1986.

SVENSSON, B; FUKUDA, K; NIELSEN, PK; BONSAGER, BC. Proteinaceous α -amylase inhibitors. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1696, n. 2, p. 145-156, 2004.

THOMA, S; KANEKO, Y; SOMERVILLE, C. A non-specific lipid transfer protein from Arabidopsis is a cell wall protein. **The Plant Journal**, v. 3, n. 3, p. 427-436, 1993.

TOWBIN, H; STAHELIN, T; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979.

TSUBOI, S; OSAFUNE, T; TSUGEKI, R; NISHIMURA, M; YAMADA, M. Nonspecific lipid transfer protein in castor bean cotyledon cells: subcellular localization and a possible role in lipid metabolism. **Journal of Biochemistry**, v. 111, n. 4, p. 500-508, 1992.

VALORE, EV; GANZ, T. Laboratory production of antimicrobial peptides in native conformation. In: (Ed.). **Antibacterial Peptide Protocols**: Springer, 1997. p.115-131.

VAN DER MAAREL, MJ; VAN DER VEEN, B; UITDEHAAG, J; LEEMHUIS, H; DIJKHUIZEN, L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. **Journal of Biotechnology**, v. 94, n. 2, p. 137-155, 2002.

VELAZHAHAN, R; RADHAJEYALAKSHMI, R; THANGAVELU, R; MUTHUKRISHNAN, S. An antifungal protein purified from pearl millet seeds shows sequence homology to lipid transfer proteins. **Biologia Plantarum**, v. 44, n. 3, p. 417-421, 2001.

VIJAYAN, S; IMANI, J; TANNEERU, K; GURUPRASAD, L; KOGEL, K; KIRTI, P. Enhanced antifungal and insect α -amylase inhibitory activities of Alpha-TvD1, a peptide variant of Tephrosia villosa defensin (TvD1) generated through in vitro mutagenesis. **Peptides**, v. 33, n. 2, p. 220-229, 2012.

WANG, C; XIE, W; CHI, F; HU, W; MAO, G; SUN, D; LI, C; SUN, Y. BcLTP, a novel lipid transfer protein in Brassica chinensis, may secrete and combine extracellular CaM. **Plant Cell Reports**, v. 27, n. 1, p. 159-169, 2008.

WANG, G. **Antimicrobial peptides: discovery, design and novel therapeutic strategies**. CABI, 2010. ISBN 1845936574.

WANG, HW; HWANG, S-G; KARUPPANAPANDIAN, T; LIU, A; KIM, W; JANG, CS. Insight into the molecular evolution of non-specific lipid transfer proteins via comparative analysis between rice and sorghum. **DNA Research**, v. 19, n.2, p. 179-194, 2012.

WANG, SY; WU, JH; NG, T; YE, XY; RAO, PF. A non-specific lipid transfer protein with antifungal and antibacterial activities from the mung bean. **Peptides**, v. 25, n. 8, p. 1235-1242, 2004.

WEI, Q; KIM, YS; SEO, JH; JANG, WS; LEE, IH; CHA, HJ. Facilitation of expression and purification of an antimicrobial peptide by fusion with baculoviral polyhedrin in Escherichia coli. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 9, p. 5038-5043, 2005.

WIEGAND, G; EPP, O; HUBER, R. The crystal structure of porcine pancreatic α -amylase in complex with the microbial inhibitor Tendamistat. **Journal of Molecular Biology**, v. 247, n. 1, p. 99-110, 1995.

YEATS, TH; ROSE, JK. The biochemistry and biology of extracellular plant lipid-transfer proteins (LTPs). **Protein Science**, v. 17, n. 2, p. 191-198, 2008.

ZHI-FEI, Z; TING-TING, N; ZU-MIN, X; GE-XIN, Z; YAN-HE, M. The crystal water affect in the interaction between the Tenebrio molitor alpha-amylase and its inhibitor. **Bioinorganic Chemistry and Applications**, v. 2008, 2008.

ZHU, X; LI, Z; XU, H; ZHOU, M; DU, L; ZHANG, Z. Overexpression of wheat lipid transfer protein gene TaLTP5 increases resistances to *Cochliobolus sativus* and *Fusarium graminearum* in transgenic wheat. **Functional & integrative genomics**, v. 12, n. 3, p. 481-488, 2012.

ZOTTICH, U; DA CUNHA, M; CARVALHO, AO; DIAS, GB; SILVA, N; SANTOS, IS; DO NACIMENTO, VV; MIGUEL, EC; MACHADO, OL; GOMES, VM. Purification, biochemical characterization and antifungal activity of a new lipid transfer protein (LTP) from Coffea canephora seeds with α -amylase inhibitor properties. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1810, n. 4, p. 375-383, 2011.

