

1 – INTRODUÇÃO

1 – Introdução

1.1 – As plantas e suas defesas

As plantas, durante todas as etapas do seu ciclo de vida, estão constantemente sujeitas a uma infinidade de estresses abióticos, como variações de temperatura, umidade, e pH e a estresses bióticos como a patogênese por vírus, bactérias e fungos, bem como também a herbivoria (Mithöfer e Boland , 2012).

Na impossibilidade de fuga de um ambiente, especialmente diante dos diferentes estresses bióticos e/ou abióticos que apresentem riscos à sobrevivência, as plantas necessitam desenvolver mecanismos bioquímicos ou morfológicos de defesa (Pichersky e Lewinsohn, 2011). Estes mecanismos são basicamente divididos em constitutivos, quando fazem parte do plano de desenvolvimento normal da planta e induzidos quando estão diretamente envolvidos na resposta a algum fator de estresse, que incluem diversas alterações físicas, moleculares, bioquímicas e morfológicas. Como exemplo dessas alterações pode-se citar principalmente a liberação de compostos oxidativos, expressão de genes relacionados à defesa, produção de compostos antimicrobianos e/ ou morte celular programada (Leitner *et al.*, 2005; Mithofer e Boland, 2012).

As plantas podem ainda, em resposta ao ataque de patógenos, sintetizar uma gama de substâncias antimicrobianas em diferentes órgãos. Essas substâncias inibem o crescimento e desenvolvimento dos organismos agressores, segundo a natureza química são divididas em: metabólitos secundários (Fitoalexinas e Fitoanticipinas) e em polipeptídeos antimicrobianos, os quais são divididos em dois grupos: polipeptídeos com massa molecular superior a 10 kDa e polipeptídeos com massa molecular inferior a 10 kDa chamados de peptídeos antimicrobianos (Egorov e Odintsova, 2012).

1.2– Peptídeos antimicrobianos

Os peptídeos antimicrobianos (AMPs) são moléculas evolucionariamente antigas, isoladas de uma infinidade de fontes como: microrganismos, invertebrados, peixes, anfíbios, aves, plantas e mamíferos, incluindo humanos. Esses peptídeos possuem uma importante função no sistema imune inato de diferentes organismos, agindo como a primeira linha de defesa para a proteção de superfícies internas e externas (Silva *et al.*, 2011; Porto *et al.*, 2012).

Esses peptídeos agem contra um grande número de microrganismos, incluindo vírus, bactérias, fungos filamentosos, leveduras, insetos e outros (Silva e Machado, 2012). Como consequência do extensivo uso de antibióticos durante as últimas décadas uma grande quantidade de microrganismos resistentes vem surgindo. Especialmente na medicina a resistência contra antibióticos clássicos como penicilina, estreptomicina, vancomicina e fluoroquinolonas vem sendo cada vez mais normal. Diante deste cenário os AMPs têm surgido como alternativas para o tratamento de infecções por bactérias resistentes (Peters *et al.*, 2010; Porto *et al.*, 2012) e alguns deles já estão sendo utilizados para fins clínicos comerciais, incluindo a polymixina B, a gramicidina S e a ambicina (Bradshaw, 2003).

Outros tipos de atividades também já foram descritas para os AMPs, incluindo: atividade antiprotozoária (Gwadz *et al.*, 1989), antitumoral e imunomodulatória através da indução ou modulação de citocinas e quimiocinas pro-inflamatórias, apoptose, inibição de resposta inflamatória, recrutamento estimulação e proliferação de macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e linfócitos T (Nijnik e Hancock, 2009; Porto *et al.*, 2012).

A grande maioria dos peptídeos antimicrobianos possui carga positiva, possuem de 12 a 100 resíduos de aminoácidos (Silva *et al.*, 2011), mas existe ainda uma classe, relativamente pequena, de peptídeos aniônicos (Schitteck *et al.*, 2001). Esses peptídeos apresentam estrutura tridimensional variável, incluindo folhas (herpcidina e -defensina 1 de humanos), -hélices (magainina, cecropina e cathelicidina), uma combinação de -hélices e folhas (-defensina 1 de humanos e defensinas de plantas), podem ainda apresentar uma configuração cíclica (ciclotídeos) ou estendida e com loops flexíveis (Indolicidinas) (Silva *et al.*, 2011).

Diversos mecanismos de ação têm sido recentemente propostos para os AMPs e incluem principalmente a permeabilização da membrana através da formação de poros estáveis (modelo barril ou poro toroidal), alterações na membrana (eletroporação molecular ou modelo barsa) ou micelização (modelo tapete). Logo após a entrada dos peptídeos ocorre uma extrusão de íons e metabólitos, baixa dos componentes intracelulares, dissipação do potencial eletroquímico e finalmente a morte da célula do patógeno, demonstrando o potencial lítico dos AMPs (Teixeira *et al.*, 2012).

No modelo barril, o peptídeo abrange a membrana e forma um poro com a porção hidrofílica voltada para o interior do poro. Este tipo de poro transmembranar é induzido por peptídeos muito hidrofóbicos, neste mecanismo os domínios hidrofóbicos interagem com o interior da membrana, ao passo que a face hidrofílica forma o revestimento poroso (Figura 1A).

No modelo tapete os peptídeos se ligam à membrana de forma paralela. Este modelo explica a atividade de peptídeos antimicrobianos como a ovispirina (Yamaguchi *et al.*, 2001), dermaseptina, cecropina (Shai, 1999) e algumas magaininas (Papo e Shai, 2002). Os peptídeos se ligam paralelamente à membrana formando uma espécie de tapete e impedem o rearranjo desta. Após a ligação os peptídeos formam buracos transientes na membrana a qual se desintegra em forma de micelas e os peptídeos desta forma se inserem na membrana (Figura 1B) (Yeaman e Yount, 2003; Teixeira *et al.*, 2012).

No modelo do poro toroidal o peptídeo se liga à membrana e se insere, e no momento em que há a inserção o peptídeo força um encurvamento da membrana e as faces polares dos peptídeos se associam com as cabeças polares dos lipídeos havendo assim a formação de um poro toroidal. Este tipo de poro transmembranar é induzido por alguns magaininas, protegrinas e melitina (Figura 1C) (Yeaman *et al.*, 2003; Teixeira *et al.*, 2012).

Outro mecanismo proposto para a ação de alguns AMPs é a eletroporação molecular (Figura 1D). Neste mecanismo a formação de poros na membrana ocorre sob a influência de um campo elétrico externo (Miteva *et al.*, 1999). A eletroporação molecular só ocorre quando os peptídeos apresentam uma densidade de carga suficiente para gerar um campo elétrico. Este modelo tem sido proposto para explicar a formação de poros de

membrana por anexina V (Karshikov *et al.*, 1992). Tamanhos de poros de 2-4 nm de diâmetro foram relatados por eletroporação convencional e por, pelo menos, dois outros peptídeos catiônicos, polimixina B e melitina. Este mecanismo é particularmente importante para descrever a ação dos peptídeos que apresentam atividade antimicrobiana sem formação aparente de poros transmembrana, fornecendo uma visão nova para os meios pelos quais os peptídeos aumentam a permeabilidade da membrana, sem necessariamente causar a sua ruptura (Teixeira *et al.*, 2012).

Mais recentemente um novo mecanismo de ação tem sido proposto para os AMPs, o modelo balsa. Este modelo propõe que o peptídeo ao se ligar a um domínio de lipídeos ocorre a produção de uma massa desproporcional, localmente, que direciona a translocação do peptídeo através do aumento da curvatura da membrana local (Figura 1E). Neste modelo ocorre a formação de poros transientes após a dissipação do desequilíbrio de massa induzido na membrana pelos peptídeos (Pokorny, *et al.*, 2002; 2004; Teixeira *et al.*, 2012).

Embora a permeabilização da membrana celular seja essencial para a atividade antimicrobiana dos AMPs, vários estudos indicam que a permeabilização sozinha não pode ser suficiente para explicar a atividade antimicrobiana (Jenssen *et al.*, 2006). Na verdade os AMPs podem causar defeitos transitórios sobre a estrutura da membrana alterando a sua topologia ou podem ainda modular vias metabólicas específicas essenciais depois de atravessar a membrana e atingir alvos específicos como DNA, RNA, enzimas e organelas como mitocôndrias (Teixeira *et al.*, 2012).

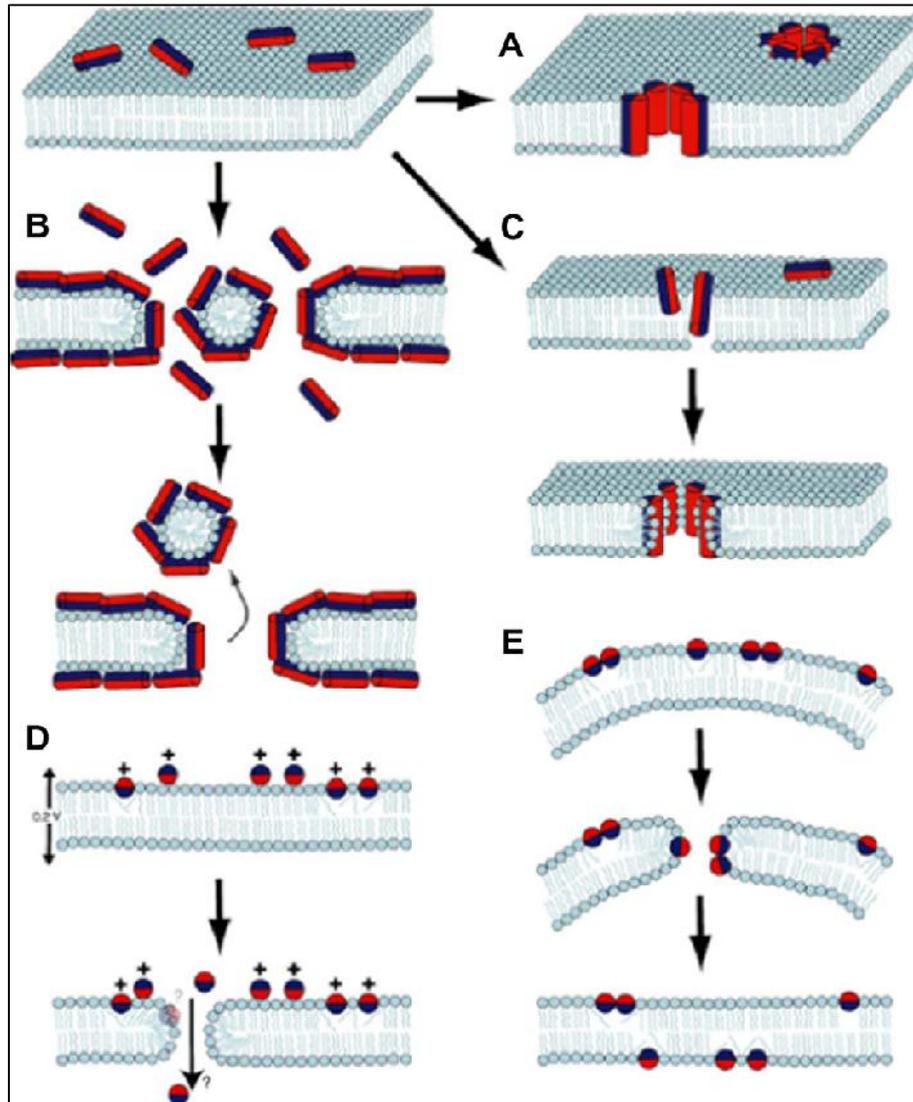


Figura 1 – Mecanismos de ação propostos para os peptídeos antimicrobianos (Teixeira *et al.*, 2012, adaptado de Chan *et al.*, 2006). A – Barril; B – Tapete; C – Poro Toidal; D – Eletroporação Molecular; E – Balsa.

1.3 – Peptídeos antimicrobianos de plantas

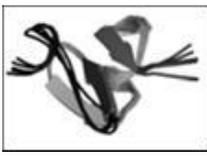
Uma grande quantidade de peptídeos antimicrobianos vem sendo descritos de uma infinidade de espécies de plantas. Esses peptídeos possuem características em comum, incluindo a presença de resíduos de cisteínas que formam pontes dissulfeto entre si (2, 3 ou 4) conferindo estabilidade a essas moléculas; massa molecular menor que 10 kDa; carga líquida positiva em pH fisiológico e propriedades anfipáticas. Já foram isolados AMPs de diversas partes da planta como flores, folhas, raízes, frutos e principalmente de

sementes, que é a principal fonte de peptídeos vegetais isolados (Benko-Iseppon *et al.*, 2010).

As características expostas acima permitem aos AMPs interagirem com as membranas dos microrganismos diretamente ou através de receptores promovendo a sua permeabilização (Egorov e Odintsova, 2012). Algumas defensinas de plantas mostraram uma grande especificidade a diferentes gêneros de levedura (Thevissen *et al.*, 2000; 2003a; 2003b). Foi visto que uma defensina isolada de *Dahlia merckii*, denominada DmAMP1, requer a presença do esfingolípido manosildiinositolceramida na membrana plasmática da levedura *Sacharomyces cerevisiae* para inibir o seu crescimento (Thevissen *et al.*, 2000; 2003b). Em contrapartida, as defensinas Rs-AFP1 e Rs-AFP2, isoladas de *Raphanus sativa*, não possuem atividade contra a levedura *S. cerevisiae*, mas são capazes de inibir o crescimento das leveduras *Candida albicans* e *Pichia pastoris*, as quais possuem, em suas membranas, o esfingolípido glicosilceramida (Thevissen *et al.*, 2004).

Os peptídeos antimicrobianos de plantas podem ser divididos levando-se em consideração, principalmente, suas características estruturais (Quadro 1). Dentre estes se encontram as proteínas transportadoras de lipídeos (LTPs), as quais inicialmente se acreditavam participar do transporte de lipídeos entre organelas; as snakinas, que foram inicialmente isoladas de batata (*Solanum tuberosum*); as defensinas de planta, inicialmente isoladas de sementes de cevada (*Hordeum vulgare*); as tioninas, sendo a purotionina, isolada de trigo (*Triticum aestivum*), a primeira proteína cuja atividade contra patógenos de plantas foi detectada *in vitro*; os peptídeos tipo-heveína, descritos inicialmente como os peptídeos mais abundantes do látex de seringueiras; os peptídeos tipo-knotinas, isolados inicialmente de sementes de maravilha (*Mirabilis jalapa*); peptídeos MBP-1, isolados de milho (*Zea mays*); pequenos peptídeos denominados Ib-AMPs isolados de sementes de balsamina (*Impatiens balsamina*); os peptídeos circulares, conhecidos como ciclotídeos encontrados nas famílias das Rubiaceae e Violaceae (Benko-Iseppon *et al.*, 2010) e, os inibidores de proteinase isolados de sementes de pimenta (*Capsicum annuum* L.) (Ribeiro, *et al.*, 2011).

QUADRO 1 - Famílias de peptídeos antimicrobianos de plantas incluindo: família, características estruturais, banco de dados e número de pontes dissulfeto.

FAMÍLIA	NOME	ESTRUTURA PROTÉICA	PDB ¹	DB ²	REFERÊNCIA
Defensina de planta	Rs-AFP2		1AYJ	4	- Terras <i>et al.</i> , 1992 - Aerts <i>et al.</i> , 2007 - Tavares <i>et al.</i> , 2008
α - e β -tioninas	Alpha-1 purotionina		1BHP	4	- Ohtani <i>et al.</i> , 1977
Tioninas	Crambina		1AB1	3	- Schrader-Fischer e Apel, 1994
Proteína transportadora de lipídeos	Ace-AMP1		1T12	4	-Cammue <i>et al.</i> , 1995 - Carvalho <i>et al.</i> , 2001 - Diz <i>et al.</i> , 2006 - Zottich <i>et al.</i> , 2011
Proteína do tipo heveína	Ace-AMP2		1HEV	4	-Broekaert <i>et al.</i> , 1992 - Lipkin <i>et al.</i> , 2005
Knotina	Mj-AMP1		1DKC	3	-Cammue <i>et al.</i> , 1992 - García-Olmedo <i>et al.</i> , 2001

Continuação ...

Macadamia	MiAMP1		1C01	3	- Marcus <i>et al.</i> , 1997 -McManus <i>et al.</i> , 1999 - Stephens <i>et al.</i> , 2005
Impatiens	ib-AMP1	-	-	-	- Tailor <i>et al.</i> , 1997 - Patel <i>et al.</i> , 1998 -Thevissen <i>et al.</i> 2005 - Wang <i>et al.</i> , 2009
Milho-AMP	MBP-1	-	-	-	- Duvick <i>et al.</i> , 1992
Puroindolinas	Puroindolina A	-	-	-	- Blochet <i>et al.</i> , 1993 -Gautier <i>et al.</i> , 1994 - Dhatwalia <i>et al.</i> , 2009
Snakinas	SN1	-	-	-	- Segura <i>et al.</i> , 1999 -Berrocal-Lobo <i>et al.</i> , 2002
Ciclotídeos	Kalata B1		1JJZ	3	- Jennings <i>et al.</i> , 2001 -Kamimori <i>et al.</i> , 2005
Inibidores de proteínase	CaTI	-	-	-	- Ribeiro <i>et al.</i> , 2007b

¹PDB refere-se ao *Protein Database* e, ²DB ao número de pontes dissulfeto.

. (-) Não determinado. (Ribeiro, 2011)

Recentemente uma nova classe de peptídeos de plantas contendo 4 resíduos de cisteína foi caracterizada e denominada 4-Cys-peptídeos. Anteriormente um único peptídeo, denominado MBP1, isolado de milho era conhecido com essas características, mas posteriormente outros 4-Cys-peptídeos foram isolados de outras plantas como trigo, grama de celeiro e flor de cetin (Nolde *et al.*, 2011).

Na literatura tem sido descrito peptídeos que possuem homologia com as vicilinas, portanto denominados vicilina-like. Ribeiro *et al* (2007) isolaram um peptídeo vicilina-like de 8 kDa de sementes de pimenta de uma fração com atividade antimicrobiana. Outras vicilina-like foram isoladas de sementes de *Nicotiana sylvestris*, por Gerlach *et al* (2009) e de sementes de melancia por Yadav *et al* (2011).

A análise de genomas de plantas completamente sequenciados mostra que existem centenas de sequências de AMP-like em plantas, os quais correspondem de 2 a 3 % do número total de genes em plantas modelo de *Arabidopsis* e arroz. Foi demonstrado que 59 % desses genes são expressos, mas as características da expressão desses genes foram pouco estudadas (Silverstein *et al.*, 2007; Egorov e Odintsova, 2012).

Os AMPs de plantas possuem uma vasta atividade antimicrobiana sobre vírus, fungos filamentosos, insetos, leveduras, protozoários, bactérias e alguns também apresentam a capacidade de inibir a α -amilase de insetos e mamíferos.

Vários trabalhos vem demonstrando o papel desses peptídeos contra diferentes espécies de fungos filamentosos e leveduras. Carvalho *et al.*, (2001) mostraram que uma LTP em sinergismo com uma defensina, ambas isoladas de sementes de feijão-de-corda, apresentavam atividade inibitória sobre o crescimento dos fungos *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani*. Pelegrini *et al.*, (2009) isolaram um peptídeo com massa molecular de aproximadamente 5 kDa de sementes de *Crotalaria pallida*, denominado CP-AMP, e que apresentava atividade antimicrobiana sobre o fungo *Fusarium oxysporum*. Foi descrito por Ma *et al.*, (2009) uma proteína homóloga a defensina, isolada de sementes de *Phaseolus angularis*, e que apresentava atividade inibitória sobre o crescimento do fungo *Fusarium oxysporum*.

Games *et al.*, (2008) isolaram uma defensina, denominada PvD1, de *Phaseolus vulgaris* que possuía atividade inibitória contra diversas leveduras como *Candida albicans*, *Candida guilliermondii* e *Candida tropicalis*, não possuindo o mesmo efeito sobre o crescimento dos fungos filamentosos *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani*.

Berrocal-Lobo *et al* (2009) demonstraram pela primeira vez peptídeos isolados de plantas que possuíam atividade leishmanicida. Tioninas de trigo (*Triticum aestivum*), LTPs de cevada (*Hordeum vulgare*), defensinas e snakinas de tomate foram capazes de inibir o crescimento, *in vitro*, da *Leishmania donovani*.

Nos últimos anos, uma nova propriedade para peptídeos antimicrobianos clássicos como as defensinas tem sido descrita: a capacidade de inibir a atividade da α -amilase de insetos praga como *Acanthoscelides obtectus* e *Zabrotes subfasciatus* e *Callosobruchus maculatus* (Pelegri *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2010). Recentemente nosso grupo mostrou, pela primeira vez, que além das defensinas, as LTPs isoladas de sementes de *Coffea canephora* e *Capsicum annum*, apresentam atividade inibitória contra a α -amilase de insetos e de mamíferos (Diz *et al.*, 2011; Zottich *et al.*, 2011).

1.4 – As α -amilases e seus inibidores

As α -amilases (α -1,4 glucano-4-glucanohidrolases) constituem o maior produto de secreção do pâncreas e das glândulas salivares. Essas enzimas catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas α -1,4 do amido, glicogênio e outros carboidratos e não estão restritas apenas aos humanos sendo amplamente distribuídas em plantas, animais e microrganismos, tendo uma importância crucial no metabolismo de carboidratos desses organismos (Sales *et al.*, 2012).

A digestão do amido por α -amilases intestinais de insetos foi demonstrada em diversos estudos e claramente descrita em diferentes espécies tais como: *Shophilus granarius* L (Silano *et al.*, 1975); *Drosophila melanogaster* (Doane, 1969); *Prostephanus truncatus* (Mendiola-Olaya *et al.*, 2000); *Tribolium castaneum* (Krishna e Saxena, 1962); *Epiphyas postvittana*, *Planotortrix octo*, *Ctenopseustis obliquana* (Markwick *et al.*, 1996); *Sitophilus*

orizae (Yetter *et al.*, 1969); *Callosobruchus maculatus* (Campos *et al.*, 1989); *Tenebrio molitor* (Applebaum, 1964); e *Zabrotes subfasciatus* (Lemos *et al.*, 1990). Desta forma a inibição de α -amilases foi uma das estratégias desenvolvidas pelas plantas para se defender de seus agressores amidolíticos, principalmente os insetos. O bloqueio da atividade destas enzimas causa uma redução na assimilação de carboidratos, provocando uma diminuição do crescimento larval e, conseqüentemente, prejudicando todo o seu ciclo de vida (Kluh *et al.*, 2005). Assim, uma vez que esses insetos dependem diretamente do bom funcionamento de suas α -amilases para a sua sobrevivência, essas enzimas se tornam bons alvos para o desenvolvimento de bioinseticidas através da utilização de inibidores de α -amilase (Jiménez, 2009; Kalve *et al.*, 2012).

Diante deste potencial inseticida os inibidores de α -amilases apresentam tem se tornado cada vez mais alvos de estudos para o desenvolvimento de bioinseticidas, que podem ser mais baratos e eficientes além de não causarem danos ao meio ambiente como os pesticidas e agrotóxicos comuns (Mehrabadi *et al.*, 2012; Capocchi *et al.*, 2013).

Os inibidores de α -amilase vem sendo isolados de microrganismos e plantas (Franco *et al.*, 2000), sendo que um maior número desses inibidores tem sido isolado de diferentes espécies de plantas como *Phaseolus vulgaris* (Gupta *et al.*, 2012), *Albizia lebbbeck* (Kalve *et al.*, 2012), *Ricinus communis* (Nascimento *et al.*, 2011), trigo (Heidari *et al.*, 2005), *Vigna radiata* (Wisessing *et al.*, 2010), *Sorghum bicolor* (Bloch e Richardson, 1991), *Hordeum vulgareum* (Abe *et al.*, 1993), *Oryza sativa* (Yamagata *et al.*, 1998), *Vigna unguiculata* (Melo *et al.*, 1999).

Os diferentes inibidores de α -amilase possuem estruturas moleculares diferentes, distintos modos de inibição e diferentes especificidades por determinadas α -amilases (Franco *et al.*, 2002; Mehrabadi *et al.*, 2012). Alguns inibidores tem especificidade por apenas um tipo de α -amilase ou pelas α -amilases de uma determinada espécie (Sevensson *et al.*, 2004), outros possuem uma grande afinidade por α -amilases de insetos e de mamíferos que compartilham cerca de 35 % de similaridade em suas seqüências primárias (Franco *et al.*, 2002; Kalve *et al.*, 2012).

A classificação dos inibidores protéicos existentes na natureza é feita de acordo com a sua similaridade de sequência primária e estrutura tridimensional. Existem sete classes de inibidores de α -amilase, sendo uma classe corresponde a inibidores isolados de espécies de *Streptomyces* (Murao *et al.*, 1980) e outras seis classes de origem vegetal: os peptídeos do tipo knotinas, as CM-proteínas, os inibidores do tipo Kunitz, as taumatinas, as lectinas e os Inibidores similares às β -purotioninas (defensinas) (Mehrabadi *et al.*, 2012). Esses inibidores protéicos foram capazes de reduzir efetivamente o desenvolvimento de vários insetos da ordem Coleoptera, como, *Tribolium castaneum* (Oppert *et al.*, 2003), *Ceratitidis capitata* e *Callosobruchus maculatus* (Gomes *et al.*, 2005).

Peptídeos do tipo knotinas – O representante desta classe é o inibidor específico para α -amilase de insetos isolado de sementes de *Amaranthus hypocondriacus* denominado (AAI) que por sua vez é o menor inibidor de α -amilase já descrito, possuindo apenas 32 resíduos de aminoácidos, três pontes dissulfeto e três fitas β -antiparalelas em sua estrutura (Chagolla-Lopez *et al.*, 1994). Em seu trabalho Nascimento (2002) identificou, em sementes de *R. communis*, um peptídeo designado Rc-Kinottin, que apresenta semelhança com os inibidores da família “Kinottin”, este peptídeo tem massa molecular de 3,4 kDa e possui atividade inibitória sobre a α -amilase salivar humana, e dos insetos *Zabrotes subfasciatus* e *Callosobruchus maculatus* sendo porém inativo contra α -amilase de *Tenebrio molitor*.

CM-proteínas – Essa classe possui este nome devido ao aparecimento desses inibidores em extratos de farinha na presença de clorofórmio/metanol, mas também é conhecida por alguns autores como inibidores do tipo cereal Os representantes desta classe apresentam de 120-160 resíduos de aminoácidos estabilizados por 5 pontes dissulfeto (Franco *et al.*, 2002), e normalmente apresentam-se como inibidores bifuncionais α -amilase/tripsina. Os membros desta classe são conhecidos como agentes sensibilizantes a humanos causando alergias, dermatites e asma, associadas à farinha do cereal (Sevensson *et al.*, 2004).

Inibidores de *Streptomyces* – Os inibidores dessa família possuem cerca de 75 resíduos de aminoácidos e são isolados de diferentes espécies de *Streptomyces* (Sevensson *et al.*, 2004), como o Tendamistat de *Streptomyces*

tendae, Z-2685 (Parvulatat) de *Streptomyces parvulus*, Haim II de *Streptomyces griseosporus*, Paim I de *Streptomyces olivaceoviridis*, AI-409 de *Streptomyces Chartreuses*, AI-3688 de *Streptomyces aureofaciens*, T-76 de *Streptomyces nitrosporeus* e MA-4680 de *Streptomyces avermitilis* (Soko evi *et al.*, 2011).

Inibidores similares a lectina – Os inibidores desta família podem ser obtidos de diferentes variedades de feijão. Duas isoformas já foram bem caracterizadas bioquimicamente, o AI1 e o AI2 que apresentam 78 % de similaridade de sequência entre si, mas possuem especificidades diferentes para determinadas -amilases (Sevensson *et al.*, 2004). Por exemplo, o inibidor -AI1 isolado de sementes de feijão comum possui atividade inibitória sobre a -amilase salivar humana, -amilase pancreática de porco e as -amilases dos insetos *Callosobruchus chinensis* e *Callosobruchus maculatus*, mas não é capaz de inibir a -amilase do inseto *Zabrotes subfasciatus* (Berre-anton *et al.*, 2000). Já o inibidor -AI2 isolados de cultivares de feijão selvagem inibe a -amilase de *Zabrotes subfasciatus*, mas não apresenta inibição sobre a -amilase pancreática de porco (Grossi de Sá *et al.*, 1997). Outros inibidores de -amilase também estão sendo isolados de outros tipos de feijões, Wisessing *et al.*, (2010) isolaram o inibidor KPS1, de massa molecular 27 kDa, de sementes de feijão mungo (*Vigna radiata* L) com atividade contra a -amilase de *C. maculatus*.

Inibidores similares às -purotioninas – Os inibidores desta classe apresentam 47 ou 48 resíduos de aminoácidos estabilizados por quatro pontes dissulfeto e fazem parte da superfamília das -tioninas. Três isoformas denominadas SL -1, SL -2 e SL -3, isoladas de *Sorghum bicolor*, apresentam forte atividade inibitória sobre a -amilase de insetos como baratas e gafanhotos, sendo menos efetiva contra a -amilase de mamíferos (Bloch e Richardson, 1991). As -purotioninas apresentam similaridade estrutural com as defensinas apresentando, porém, diferenças em relação às pontes dissulfeto (Carvalho e Gomes, 2009). Algumas defensinas vem sendo identificadas também como inibidores de -amilase. Santos *et al.*, (2010) isolaram uma defensina de sementes de feijão-de-corda que apresenta atividade inibitória contra a -amilase dos insetos *C. maculatus* e *Z. subfasciatus*. Em seu trabalho Pelegrini *et al.*, (2008) isolaram uma defensina

de sementes de *Vigna unguiculata*, capaz de inibir a α -amilase dos insetos *Acanthoscelides obtectus* e *Zabrotes subfasciatus*. A defensina Alpha-TvD1 gerada por mutagênese a partir da defensina TvD1, isolada da leguminosa *Tephrosia villosa*, apresentou atividade inibitória sobre a α -amilase do inseto *Zabrotes subfasciatus* (Vijayan *et al.*, 2012).

Inibidores similares a Taumatina – Os representantes dessa família apresentam massa molecular em torno de 22 kDa e similaridade de sequência com as proteínas relacionadas a patogênese do grupo 5 (PR-5) (Cornelissen *et al.*, 1986; Vigers *et al.*, 1991). Em sua grande maioria as taumatinas não são capazes de inibir a atividade da α -amilase, no entanto um homólogo da família das taumatinas, denominada Zeamatina e isolada de *Zea Mays*, possui um importante potencial inibitório sobre α -amilases de insetos (Schimoler-O'Rourke *et al.*, 2001) .

Inibidores do tipo Kunitz – Os inibidores deste tipo possuem por volta de 180 resíduos de aminoácidos e 4 resíduos de cisteínas. Estes inibidores vêm sendo isolados de cereais como trigo (Gvozdeva *et al.*, 1993), cevada (Rodenburg *et al.*, 1995) e arroz (Ohtsubo e Richardson, 1992). O inibidor mais bem estudado e caracterizado desta família é o inibidor bifuncional de α -amilase e subtilisina (BASI) isolado de cevada. Este inibidor está relacionado com a regulação da degradação de carboidratos da semente, evitando que a α -amilase 2 hidrolise o amido durante o estágio de brotamento prematuro (Kadziola *et al.*, 1998). Além desta atividade endógena o inibidor BASI também protege as sementes contra a atividade de proteinases e α -amilases, produzidas por diversos patógenos e pragas. Mais recentemente três inibidores de α -amilase, com massas de 6, 20 e 24 kDa, com elevado grau de semelhança com os inibidores do tipo Kunitz, foram isolados de sementes de Flamboyant (*Delonix regia*) (Alves *et al.*, 2009).

1.5 – Gênero *Capsicum*

O gênero *Capsicum* compreende um grupo diverso de pimentas e pimentões originários da região tropical do continente americano, contudo, atualmente são utilizados por um quarto da população mundial (Bosland e Votava, 1999; Moreira *et al.*, 2006). Este gênero, que pertence a família das

Solanaceae possui 31 espécies confirmadas (Moscone *et al.*, 2007), sendo que estas são agrupadas de acordo com o seu nível de domesticação em: domesticadas, semidomesticadas e silvestres. O Brasil é um grande produtor mundial de pimenta (Ristori *et al.*, 2002) e detém uma grande diversidade de espécies deste gênero, abrigando representantes dos três níveis de domesticação (Carvalho *et al.*, 2003). Entre as espécies cultivadas encontramos quatro espécies domesticadas (*C. annuum* var. *annuum*, *C. baccatum* var. *pendulum*, *C. chinense*, *C. frutescens*) e pelo menos três espécies semidomesticadas (*C. annuum* var. *glabriusculum*, *C. praetermissum* e *C. baccatum* var. *baccatum*) (Gonçalves, 2010). O cultivo de pimentas está difundido em todas as regiões do Brasil, sendo que as principais áreas são as regiões Sudeste e Centro-Oeste (Wagner, 2003).

Os nomes vulgares das espécies do gênero *Capsicum* variam em diversos sinônimos, como, pimenta, colorau, malagueta, pimentão, pimenta espanhola, páprica, entre outros, dependendo do continente e tradições locais (Derera *et al.*, 2005). Uma característica importante neste gênero é a grande variabilidade de tipos de frutos, cores, formas, tamanhos e pungência, sendo que esta última característica é atribuída à presença de alcalóides, mais precisamente de dois capsaicinóides: a diidrocapsaicina e em especial a capsaicina que são substâncias encontradas quase que exclusivamente na placenta e nas sementes e, em menor quantidade no pericarpo, sendo que as variedades de pimentas possuem diferentes teores de capsaicinóides (Reifschneider, 2000 ; Carvalho *et al.*, 2003), que apresentam propriedades antimicrobianas (Carvalho *et al.*, 2003), antioxidantes (Howard *et al.*, 2000) e analgésicas (Dasgupta e Fowler, 1997).

Atualmente são vários os genes identificados nas pimentas relacionados à expressão de proteínas de defesa com atividade contra diferentes espécies de microorganismos, tornando-as fortes candidatas para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (Reiffchneider *et al.*, 2000). Shin *et al.*, (2001), mostraram que folhas de pimenta infectadas com o vírus do mosaico do tabaco (TMV), apresentaram uma maior expressão de genes de proteínas relacionadas a patogênese (PRs), sendo um destes genes para proteinase cisteínica, dois para inibidores de proteinases e um para nsLTP.

Em 2007, Ribeiro e colaboradores mostraram que AMPs isolados de sementes de pimenta (*C. annuum*) foram capazes de inibir o crescimento de leveduras dos gêneros *Saccharomyces*, *Candida*, *Pichia* e *Kluyveromyces* além de provocar alterações morfológicas em suas estruturas.

Outro grupo de proteínas, denominada fração F1, também isolado de pimenta (*C. annuum*), apresentaram a capacidade de inibir o desenvolvimento das leveduras *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans* levando a alterações morfológicas como por exemplo, a formação de pseudohifas nas células da levedura *C.albicans*. Foi observado que nesta fração F1 existiam três diferentes peptídeos e um deles apresentou homologia de sequência com proteínas pertencentes a família das LTPs de outras espécies de plantas (Diz *et al.*, 2006).

Em um trabalho recente de 2011, Diz e colaboradores caracterizaram a LTP de sementes de *C. annuum*, presente na fração F1, a qual foi denominada Ca-LTP1, estando esta localizada em vesículas densas. Ca-LTP1 apresentou atividade inibitória sobre o crescimento do fungo *Colletotrichum lindemuthianum* e principalmente sobre a levedura *Candida tropicalis*, levando a alterações morfológicas como a formação de pseudohifas. Além da atividade antifúngica ainda foi constatado que esta LTP foi capaz de inibir a atividade *in vitro* da α -amilase salivar humana.

2. OBJETIVOS

2 – Objetivos

2.1 – Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo geral a purificação de peptídeos de sementes de pimenta da espécie *Capsicum baccatum* e a caracterização das atividades antimicrobianas e inibitórias de α -amilase

2.2 – Objetivos específicos

– Obter frações e caracterizar bioquimicamente (massa molecular e estrutura primária) peptídeos de sementes de *Capsicum baccatum*;

– Estudar o efeito das frações sobre o desenvolvimento das leveduras *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida tropicalis* e *Kluyveromyces marxianus* através da determinação das curvas de crescimento;

– Estudar o efeito das frações sobre a permeabilização de membranas de leveduras através de microscopia óptica de fluorescência;

– Estudar o efeito morfológico dos peptídeos purificados sobre células de leveduras através de microscopia óptica e eletrônica de varredura;

– Estudar o efeito das frações sobre a atividade da α -amilase da saliva humana e α -amilase larval do intestino dos insetos *Callosobruchus maculatus* e *Tribolium castaneum*

3. MATERIAIS

3 – Materiais

3.1 – Materiais biológicos

3.1.1 – Microrganismos

As espécies de leveduras *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida tropicalis* e *Kluyveromyces marxianus* foram cultivadas em meio ágar Sabouraud e mantidas conservadas na geladeira a 4 °C, no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos (LFBM) do Centro de Biociências e Biotecnologia (CBB) da Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil.

3.1.2 – Insetos

Os insetos da espécie *Callosobruchus maculatus* foram cedidos pela Prof^a. Dr^a. Antônia Elenir Amâncio de Oliveira e os insetos da espécie *Tribolium castaneum* foram cedidos pelo professor Prof. Dr. Gustavo Lázaro Rezende, ambos do Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos (LQFPP), do Centro de Biociências e Biotecnologia (CBB) da Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil.

3.1.3 – Sementes

Sementes de *Capsicum baccatum* foram fornecidas pela Prof^a. Dr^a. Rosana Rodrigues, do Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal (LMGV), do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil.

3.2 – Reagentes e outros materiais

- Ágar Sabouraud e Caldo Sabouraud 2 % de glicose (Merck S/A Indústrias Químicas).
- Acrilamida e N'N'metilenobisacrilamida (Sigma Co, St. Louis, EUA).
- Azul de bromofenol (Sigma Co, St. Louis, EUA).
- Membrana de celulose para diálise (poro de retenção 1.000 Da) (Sigma Co, St. Louis, EUA).
- Dodecil sulfato de sódio (SDS) (Sigma Co, St. Louis, EUA).
- Tris (hidroximetilaminometano). (Sigma Co, St. Louis, EUA).
- Resina DEAE – Sepharose (Pharmacia Fine Chemicals, Suécia).
- N'N'N'N'- tetrametiletilenodiamino (Temed) (Sigma Co, St. Louis, EUA).
- Persulfato de amônio (Sigma Co, St. Louis, EUA).
- Sacarose (Sigma Co, St. Louis, EUA).
- Tricina (Sigma Co, St. Louis, EUA).
- Glicerol (Sigma Co, St. Louis, EUA).
- Marcadores de peso molecular (Sigma Co, St. Louis, EUA).
- NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , EDTA. (Produtos Merck).
- Amido solúvel (Sigma Co, St. Louis, EUA).
- Placa de polietileno para cultura de células, estéreis, com 96 poços, diâmetro de 6.4 mm, fundo redondo, com tampa (Corning Glass Works, New York, USA).

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

4. MÉTODOS

4 – MÉTODOS

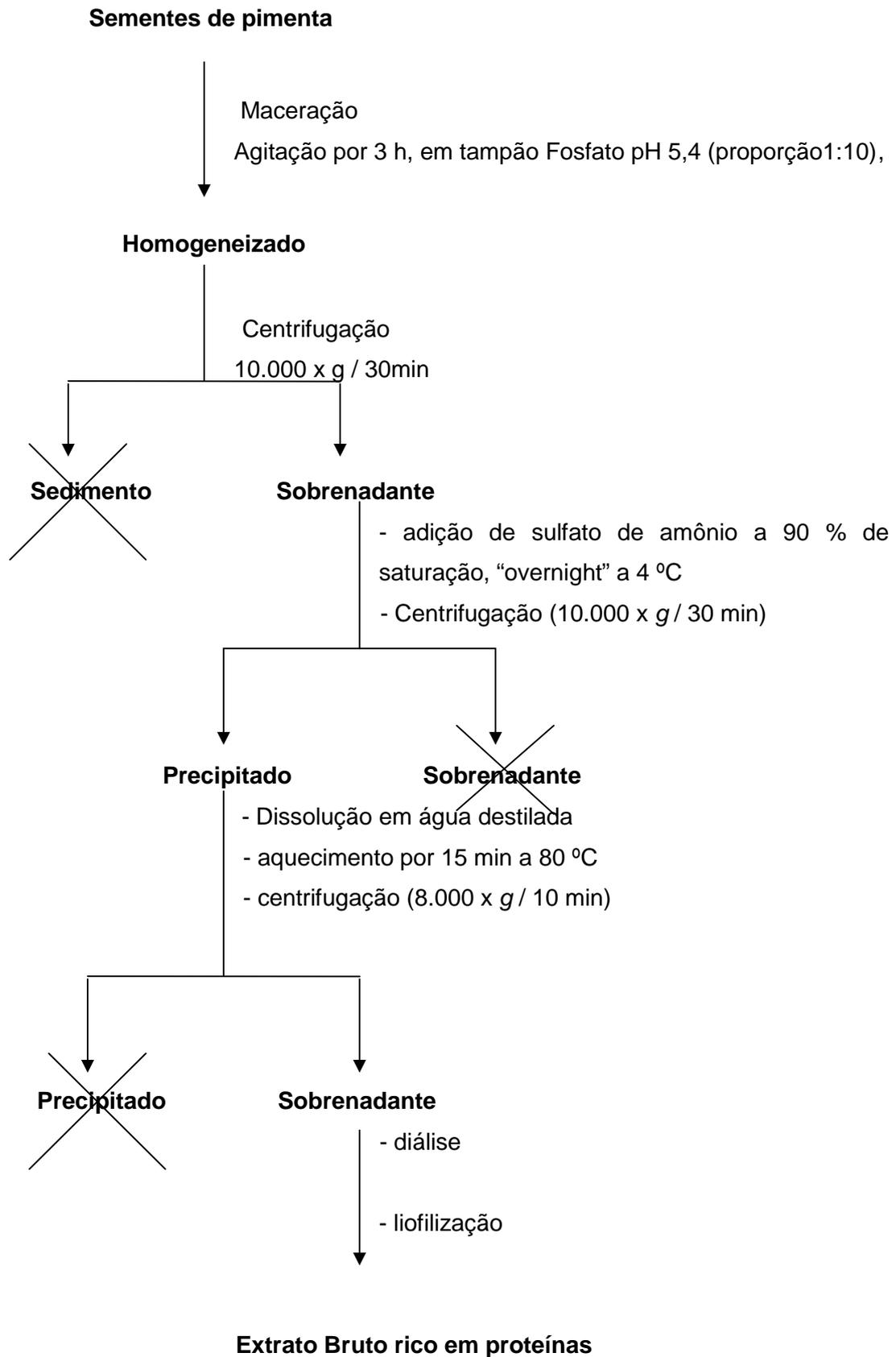
4.1 – Extração protéica

4.1.1 – Preparo da farinha

As sementes de *C. baccatum* foram maceradas com o auxílio de gral, pistilo e nitrogênio líquido, até a formação de uma farinha de granulação bem fina. E em seguida submetidas à extração protéica.

4.1.2 – Extração de proteínas da farinha e precipitação com sulfato de amônio

As proteínas da farinha foram extraídas segundo metodologia descrita por Terras *et al.*, 1993 (Esquema 1), com algumas modificações. Inicialmente as proteínas foram extraídas em tampão fosfato pH 5,4 (Na_2HPO_4 0,01 M, NaH_2PO_4 0,015 M, KCl 0,1 M, EDTA 1,5 %) na proporção de 1:10 (farinha:tampão), por 3 h, sob agitação constante a 4 °C. O homogeneizado foi submetido a centrifugação (10.000 x g por 30 min a 4 °C), o sedimento foi descartado e ao sobrenadante foi adicionado sulfato de amônio a 90 % de saturação. Esta solução foi mantida por 16 h a 4 °C. Após este processo, o sobrenadante resultante do fracionamento a 90 % de saturação foi submetido a nova centrifugação (10.000 x g por 30 min a 4 °C) e o precipitado resultante ressuspenso em 6 mL de água destilada e aquecido a 80 °C por 15 min e em seguida submetido a uma última centrifugação (8.000 x g por 10 min a 4 °C). As proteínas precipitadas resultantes desta última centrifugação foram descartadas e o sobrenadante dialisado contra água destilada (membranas com poros de 1.000 Da) a 4 °C, durante 3 dias (3 trocas por dia), e em seguida liofilizado para então ser utilizado em passos posteriores de purificação.



Esquema 1 – Obtenção do extrato bruto a partir de sementes de *C. baccatum*, (Adaptado de Terras *et al.*, 1993)

4.2 – Purificação protéica

4.2.1 – Cromatografia de troca iônica

Uma coluna de troca iônica foi preparada utilizando-se a resina DEAE – Sepharose e empacotada sob a ação da gravidade. Posteriormente, para ativação da resina, a coluna foi lavada sucessivamente com água destilada, NaOH 0,1 M, água destilada, HCl 0,1 M, novamente com água destilada e por fim equilibrada com tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8,0.

Para preparo da amostra, 30 mg de extrato bruto protéico de *C. baccatum* foram dissolvidas em 5 mL de tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0. A solução foi centrifugada a 16.000 x *g* por 5 min e o sobrenadante aplicado na coluna. Foram coletadas frações de 3 mL a um fluxo constante de 50 mL.h⁻¹. Os primeiros 30 tubos foram eluídos com tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0 e, aos 30 tubos restantes, foram adicionados tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0 contendo NaCl 1 M para eluição das proteínas retidas. O perfil protéico da cromatografia foi monitorado com leituras de absorvâncias em espectrofotômetro a 280 nm.

4.2.2 – Cromatografia de Fase Reversa em sistema HPLC

Uma coluna de fase reversa C2C18, foi equilibrada com TFA 0,1 % contendo 2 % de acetonitrila (solvente A). A eluição das amostras foi efetuada por gradiente de acetonitrila 80 % contendo TFA 0,1 % (solvente B), sob fluxo de 0,7 mL/min. Inicialmente (10 primeiros minutos) a coluna foi lavada com TFA 0,1 % em água ultrapura (solvente A) e, em seguida um gradiente foi sendo formado pela mistura da solução A e 80 % de ACN em TFA 0,1 % (solvente B), até 50 min. Após este período a coluna foi lavada com 100 % do solvente B até 60 min. A eluição da coluna foi monitorada por um detector do tipo DAD, sendo as absorvâncias 220 e 280 nm.

4.3 – Quantificação de proteínas

A determinações quantitativas de proteínas foram feitas através do método do ácido bicinconínico, descrito por Smith *et al* (1985), com modificações. A ovalbumina foi utilizada como proteína padrão.

4.4 – Eletroforese em Gel de Tricina

Todos os passos de purificação foram monitorados através de eletroforese descontínua, sob condições desnaturantes, em gel de tricina (Schagger e Von Jagow, 1987). Foram usadas placas de vidro de 8x10 cm e 7x10 cm e espaçadores de 0,75 mm. O gel de separação foi preparado numa concentração de 16,4 % de acrilamida/bis-acrilamida e o gel de concentração foi preparado numa concentração de 3,9 % de acrilamida/bis-acrilamida.

4.4.1 – Preparo da amostra e condições da “corrida”

As frações obtidas da cromatografia de troca aniônica e da cromatografia de fase reversa em sistema HPLC foram concentradas por liofilização, em seguida ressuspensas em água destilada. Posteriormente, ao tampão de amostra contendo 5 % de β -mercaptoetanol foi adicionado 20 μ g de cada amostra, e estas foram aquecidas por 5 min a 100 °C e centrifugadas a 16.000 x g por 2 min. Após estes procedimentos as amostras foram aplicadas no gel de concentração. A corrida foi realizada em voltagem constante de 24 V por um período de aproximadamente 16 h.

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

4.4.2 – Coloração e descoloração do gel

Após o término da corrida, o gel foi cuidadosamente retirado das placas e colocado na solução corante, de Coomassie Blue R (0,05 %) dissolvido em metanol 40 % e ácido acético 70 %, por meia hora. Depois desse período a solução corante foi retirada e o gel colocado na solução descorante de metanol 40 % e ácido acético 7 %, até a visualização das bandas.

4.5 – Sequenciamento de proteínas

4.5.1 – Preparo de amostras para sequenciamento

As amostras contendo os peptídeos a serem sequenciados foram tratadas com tampão de amostra contendo 5 % de β -mercaptoetanol, para redução das pontes dissulfeto e vinil piridina (5 μ l para 60 μ l da amostra), para alquilar os resíduos de cisteína, e posteriormente, foram incubadas por 30 min. a 37 °C, depois por 15 min a 60 °C. Após este período de incubação as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de tricina na presença de SDS, sendo que uma pré corrida de 45 min foi realizada na presença de 5 μ M de glutathiona reduzida e 0,1 mM de tioglicolato de sódio antes das amostras serem aplicadas no gel.

4.5.2 – Eletrotransferência de proteínas para sequenciamento

Após o término da eletroforese, o gel foi retirado das placas e as proteínas foram eletrotransferidas para uma membrana de PVDF utilizando uma célula comercial “Trans-blot” semi-seco. Foi empregado o seguinte procedimento:

1- O gel foi imerso em tampão de transferência (glicina 182 mM, Tris 25 mM e metanol 20 %) por 20 min.;

2- A membrana de PVDF foi cortada nas mesmas dimensões do gel e imersa, rapidamente, em metanol 100 %, imersa em água para retirar o excesso de metanol e, então, imersa no tampão de transferência por 20 min.;

3- Foi montado sobre a célula de transferência um “sanduíche” com oito folhas de papel de filtro Whatman 3 mm previamente embebidas em tampão de transferência. Sobre essa camada de papel foi colocada a membrana e acima da membrana o gel sendo então finalizado com mais uma camada de oito folhas do mesmo papel já embebidas no tampão de transferência. Durante a montagem desse “sanduíche” teve-se o cuidado de retirar as bolhas de ar entre as camadas, para que estas não interferissem com a transferência das proteínas. Após esse procedimento, a célula de transferência foi fechada e aplicada uma corrente constante de 1 mA/cm^2 por duas horas no sentido gel-membrana;

4- Após a transferência, o “sanduíche” foi cuidadosamente desfeito, sendo a membrana submetida à coloração com Ponceau S (0,1 %) para determinação do sucesso da transferência (Método descrito por Towbin *et al.*, (1979), com modificações);

5- As bandas de interesse foram, então, recortadas do gel e submetidas ao sequenciamento.

4.5.3 - Determinação da sequência de aminoácidos

Foi empregada a metodologia introduzida e desenvolvida por Edman (1950), na qual é empregado um sequenciador automático de proteínas. Este é um processo cíclico de três etapas onde resíduos de aminoácidos são clivados um a um, a cada ciclo, a partir do N-terminal da proteína e são identificados como derivados feniltioidantoína. A primeira etapa do ciclo é o acoplamento do fenilisotiocianato (PITC) com resíduo N-terminal; a segunda, a clivagem do resíduo N-terminal via ciclização em meio ácido; a terceira, a conversão do derivativo tiozolinona (ATZ) formado para um derivativo mais estável, a tioidantoína (PTH), o qual pode ser identificado por cromatografia (Allen, 1989).

4.6 – Análise da atividade antimicrobiana dos peptídeos

4.6.1 – Obtenção das células de levedura

Alíquotas das leveduras *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *C. tropicalis* e *K. marxianus* foram retiradas de uma placa de Petri que possuía colônias crescidas e colocadas em uma nova placa contendo ágar Sabouraud fazendo estriações sobre o meio para obtenção de um crescimento homogêneo. Essa nova placa foi deixada na estufa a 30 °C por 48 h e em seguida usada para a obtenção das células para o ensaio. Com o auxílio de uma alça, uma alíquota (colônia) de células da placa nova foi retirada e adicionada em 10 mL de caldo Sabouraud (2 % de glicose) para quantificação dessas células em câmara de Neubauer.

4.6.2 – Ensaio de inibição

Inicialmente as células das leveduras (1×10^4 cel.mL⁻¹) foram incubados em 200 µL de caldo Sabouraud contendo 100 µg.mL⁻¹ e 200 µg.mL⁻¹ das frações (H1, H2, H3 e H4) obtidas após cromatografia de fase reversa em sistema HPLC. O ensaio foi realizado em placas de cultura de células (96 poços), a 30 °C por um período de 24 h para as leveduras. O reflexo do crescimento celular foi determinado pela densidade ótica, monitorada a cada 6 h, em um “leitor de ELISA,” num comprimento de onda de 670 nm. Todo ensaio foi realizado em triplicata e sob condições de assepsia, em capela de fluxo laminar, segundo metodologia adaptada de Broekaert *et al.* (1990).

4.7 – Análise morfológica das células de leveduras tratadas com as frações H3 e H4

4.7.1 – Microscopia óptica

Após 24 h de crescimento as células das leveduras crescidas, na presença e na ausência, das frações H3 e H4, obtidas após cromatografia de

fase reversa em sistema HPLC, foram transferidas para lâminas, cobertas por lamínulas e analisadas por microscópio óptico (Zeiss, Axioplan).

4.7.2 – Microscopia eletrônica de varredura

Para análise por microscopia eletrônica de varredura, células das leveduras *C. albicans* e *C. tropicalis*, crescidas por 24 h em meio Sabourand, na ausência e na presença da fração H4, obtida por cromatografia de fase reversa, foram fixadas por 30 min a temperatura ambiente em uma solução contendo 2,5 % de glutaraldeído (v/v) e 4 % de paraformaldeído (v/v) em tampão cacodilato 0,05 M, pH 7,0. Subsequentemente, as células foram lavadas por três vezes em tampão cacodilato 0,05 M, pH 7,0, pós-fixadas por 30 min, a temperatura ambiente, com tetróxido de ósmio 2,0 %, diluído no mesmo tampão e lavado novamente no mesmo tampão. Após este procedimento, as células das leveduras foram desidratadas em álcool, foi feito o ponto crítico seco em CO₂, coberto com 20 nm de ouro e observado no microscópio eletrônico de varredura (DSEM 962 Zeiss).

4.8 – Efeito das frações H3 e H4 sobre a permeabilização de membranas de células de levedura

A permeabilização da membrana das células das leveduras *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *C. tropicalis* e *K. marxianus* tratadas com as frações H3 e H4, obtidas após cromatografia de fase reversa em sistema HPLC, foi avaliada através da utilização do corante fluorescente SYTOX Green, segundo metodologia adaptada de Thevissen *et al.* (1999). Imediatamente após as 24 h do ensaio de inibição do crescimento, alíquotas das leveduras foram incubadas com o corante fluorescente SYTOX Green a uma concentração final de 0,2 µM, de acordo com instruções fornecidas pelo fabricante e, deixadas sob leve agitação por 2h. Após este período, estas células foram transferidas para lâminas, cobertas com lamínulas e analisadas por fluorescência em microscópio óptico (Zeiss; Axioplan).

4.9 – Avaliação da inibição da atividade α -amilásica

4.9.1 – Obtenção das α -amilases

Larvas de aproximadamente 16 dias do inseto *C. maculatus* e 19 dias do inseto *T. castaneum* foram dissecadas, e seus intestinos, juntamente com o conteúdo luminal extraídos. Os intestinos das larvas dos insetos foram macerados em salina e submetidos à centrifugação por 10 min a 12000 x g. O sobrenadante foi dosado pelo método de Bradford 1976, e utilizado em ensaios de atividade α -amilásica.

Amostras de saliva humana (500 μ L) foram coletadas e centrifugadas a 12.000 x g por 10 min a 4 °C. O sedimento contendo restos celulares e muco foi descartado e o sobrenadante coletado, dosado pelo método de Bradford 1976, e utilizado em ensaios de atividade α -amilásica.

4.9.2 – Ensaios de inibição da atividade da α -amilase salivar e dos insetos *C. maculatus* e *T. castaneum*

As frações (H1, H2, H3, H4, H5, H6 e H7), obtidas após cromatografia de fase reversa em sistema HPLC, foram suspensas em água ultrapura e, posteriormente, incubadas com 10 U de cada α -amilase (α -amilase salivar humana e α -amilase larval dos insetos *C. maculatus* e *T. castaneum*), posteriormente essa mistura foi incubada em banho-maria a 37 °C por 15 min. Após este período foram adicionados 25 μ L de solução de amido 1 % e novamente as amostras foram incubadas em banho-maria a 37 °C por 15 min. (α -amilase salivar humana) , por 30 min. (α -amilase de *C. maculatus*) e 45 min. (α -amilase de *T. castaneum*). Em seguida as amostras retiradas do banho foram adicionados 400 μ L de 3,5 ácido dinitrossalicílico (DNS). O material foi então fervido por 5 min e após o resfriamento 400 μ L de água foram adicionados a cada amostra. A hidrólise do substrato pela enzima foi determinada após leitura da absorbância a 540 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata e foi calculado o desvio padrão para cada experimento. Uma unidade de α -amilase

foi definida como uma variação de 0,1 de ABS a 540 nm por 30 minutos de reação, como descrito por Franco *et al.*, (2000).

4.9.3 – Gel de atividade para determinação da inibição da atividade da -amilase salivar e dos insetos *C. maculatus* e *T. castaneum*

Para determinação da atividade -amilásica em gel, foi preparado gel nativo 8 % contendo 1,5 mg de amido por mL de gel. As amostras de -amilase foram incubadas com as frações H3 e H4, obtidas após cromatografia de fase reversa em sistema HPLC. A mistura foi incubada em banho maria por 15 min. A 37 °C. A proporção enzima inibidor foi de 1:1 (Nascimento, 2009).

As amostra de amilase, na presença e ausência, das frações H3 e H4 foram adicionadas separadamente ao tampão de amostra, aplicadas no gel e submetidas a uma corrente de 20 mA por aproximadamente 1 h e 30 min.

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

5. RESULTADOS

5 – Resultados

5.1 – Purificação protéica

O extrato bruto protéico obtido das sementes de *C. baccatum* após extração com tampão fosfato e precipitação com sulfato de amônio a 90 % de saturação, foi submetido à cromatografia em coluna de troca aniônica (DEAE-Sepharose) onde se obteve duas frações denominadas D1 e D2 (Figura 2A). Sendo D1 a fração básica, não retida, eluída com tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8,0. A fração D2 corresponde a fração protéica ácida, retida na coluna, e eluída com 1,0 M de NaCl em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8,0. As frações D1 e D2 foram dialisadas contra água destilada por 3 dias com 3 trocas diárias, e após este processo foram secas e utilizadas para passos posteriores de purificação.

Como continuação do processo de purificação a fração D2, que apresentou maior atividade biológica determinada em um estudo prévio (Vieira, 2011), foi submetida à cromatografia de fase reversa em sistema HPLC, utilizando uma coluna C2C18, onde foram obtidos sete picos majoritários, os quais foram denominados H1, H2, H3, H4, H5, H6 e H7 (Figura 2B).

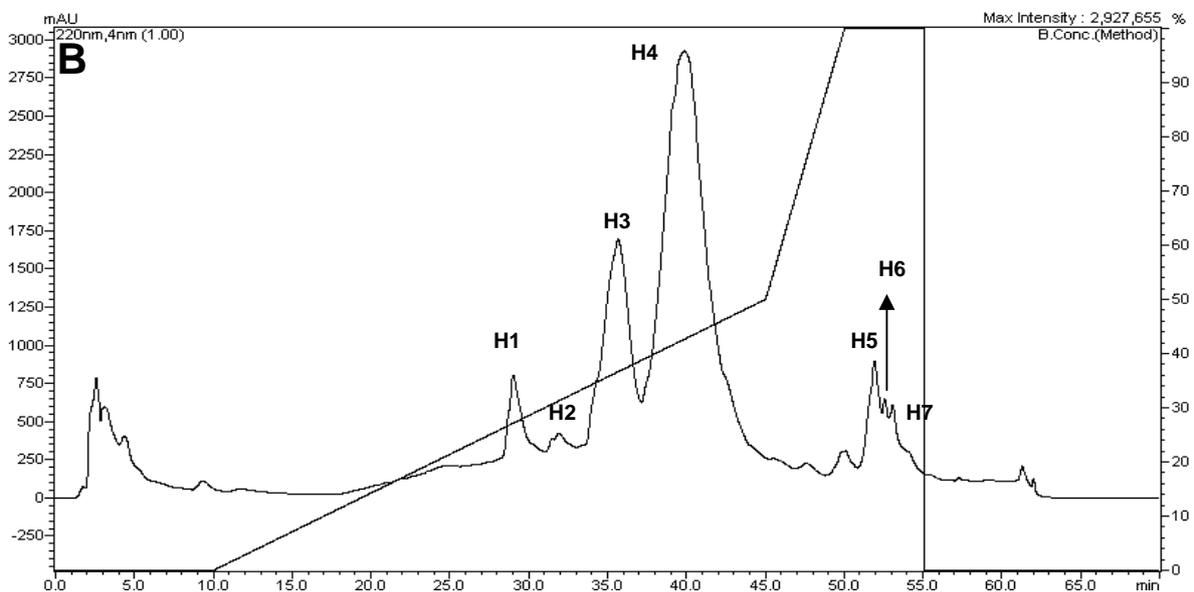
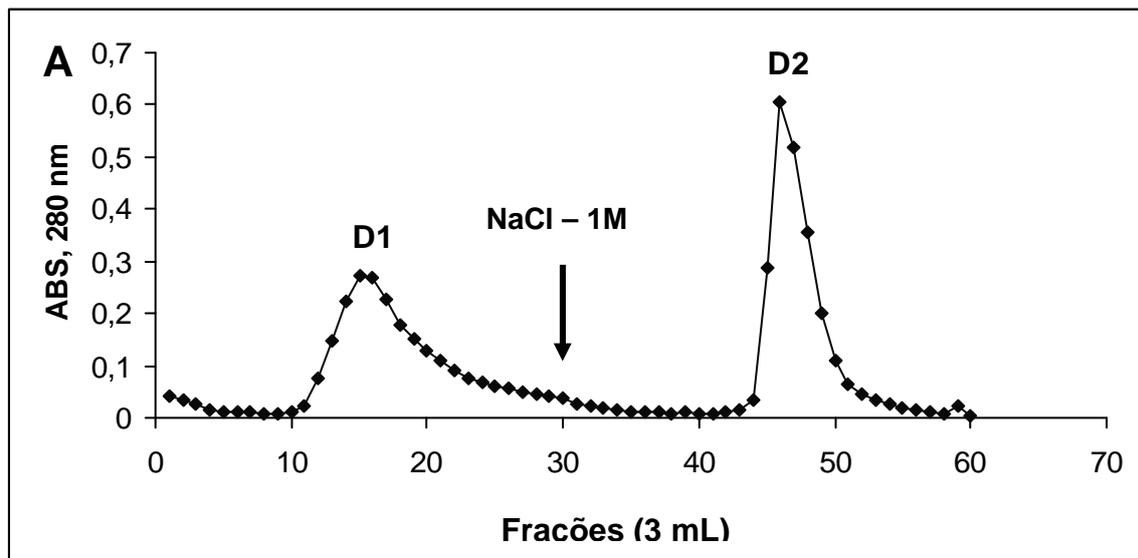


Figura 2: Perfis cromatográficos do processo de purificação protéica de sementes de *C. baccatum*: (A) Cromatografia de troca iônica utilizando resina DEAE-Sepharose. A coluna foi equilibrada com tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8,0. A eluição foi realizada com o tampão de equilíbrio da coluna contendo NaCl 1,0 M. O fluxo foi de $50 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ e foram coletadas frações de 3 mL. (B) Cromatografia de fase reversa em sistema HPLC, em coluna C2C18, da fração D2, obtida após cromatografia de troca iônica. Eluentes A: TFA 0,1 %, contendo 2 % de acetonitrila e B: ACN 80 %, contendo TFA 0,1 %, Fluxo $0,7 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

5.2 – Eletroforese em gel de tricina na presença de SDS

O perfil protéico do extrato bruto e das frações D1 e D2 de sementes de *C. baccatum*, obtidas após cromatografia de troca aniônica em resina DEAE-Sepharose, foi avaliado por eletroforese em gel de tricina na presença de SDS, como apresentado na figura 3A.

Como podemos observar o extrato bruto apresenta bandas de diferentes massas moleculares, e a fração D1 apresenta três bandas de massa molecular acima de 16 kDa, sendo que duas destas estão em menor concentração e três bandas majoritárias de baixa massa molecular, uma em torno de 11 kDa, outra próxima de 8 kDa e uma terceira com massa molecular em torno de 7 kDa. A fração D2 apresenta quatro bandas de massa molecular acima de 16 kDa, em baixas concentrações, e três bandas majoritárias de baixa massa molecular, uma em torno de 11 kDa, outra em torno de 8 kDa e uma terceira com massa molecular abaixo de 6 kDa.

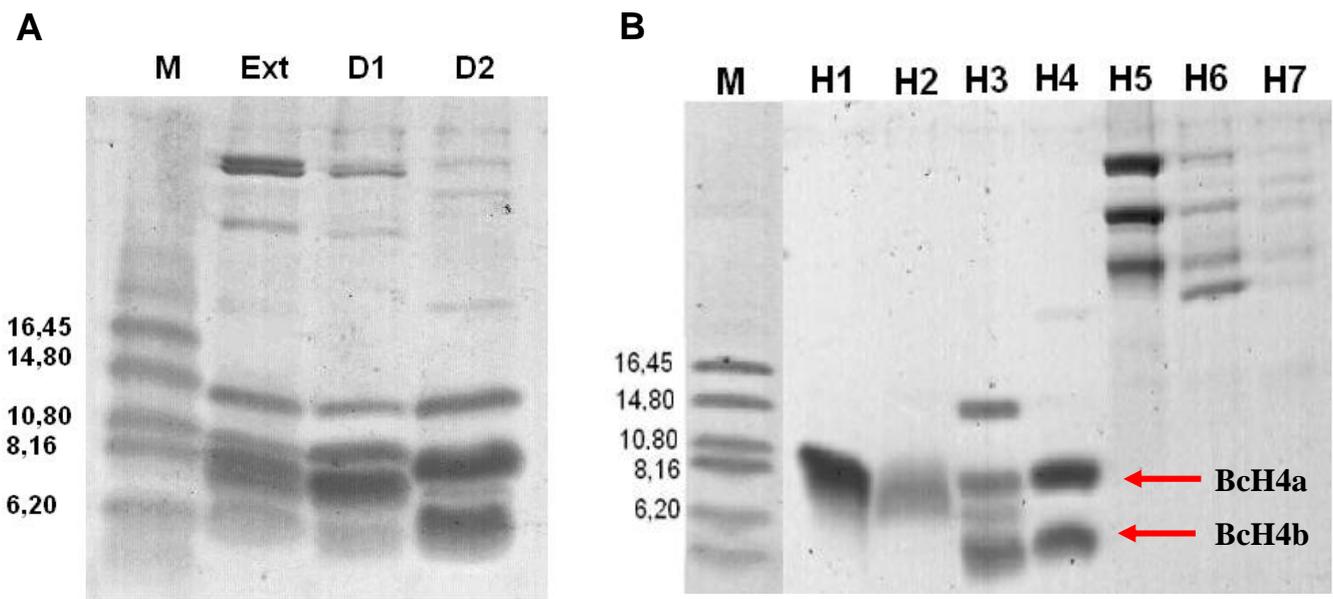
Como a fração D2, em um trabalho prévio (Vieira, 2011), apresentou maior atividade biológica, em relação a fração D1, esta foi submetida à cromatografia de fase reversa, e o perfil eletroforético das frações obtidas está apresentado na figura 3B. As frações H1 e H2 apresentam um pool protéico entre 6 e 10 kDa. A fração H3 apresenta quatro bandas majoritárias de baixas massas moleculares, sendo uma em torno de 14 kDa, outra em torno de 8 kDa e outras duas com massas moleculares abaixo de 6 kDa. A fração H4 apresenta duas bandas majoritárias de baixa massa molecular, uma em torno de 8 kDa e a outra com massa molecular inferior a 6 kDa. Já as frações H5, H6 e H7 apresentam predominantemente bandas de altas massas moleculares.

5.3 – Determinação da sequência de aminoácidos

Como a fração H4 apresentou uma alta atividade biológica, os dois peptídeos contidos nessa fração, denominados BcH4a e BcH4b (Figura 3B), foram eletrotransferidos para membrana de PVDF e as bandas de interesse separadas para o sequenciamento. Os peptídeos BcH4a e BcH4b foram submetidos a seqenciamento N-terminal pelo método de degradação de Edman. Obtivemos a mesma sequência de aminoácidos para os dois

peptídeos, BcH4a e BcH4b, e a sequência de 21 aminoácidos é apresentada na figura 3C. Este resultado sugere que estes peptídeos façam parte de uma proteína dimérica, maior presente nesta fração. A análise da sequência N-terminal encontrada para os dois peptídeos (GMCEMSQRCEQQFCRAQNLRT) apresentou similaridade com proteínas de plantas do tipo vicilinas isoladas de *Solanum lycopersicum*, *Gossypium hirsutum*, *Gossypium arboreum*, *Carya illinoensis* e *Juglans nigra* sugerindo que esta proteína seja uma vicilina like (Figura 3C).

Os peptídeos presentes nas frações H1, H2 e H3 foram também submetidos ao sequenciamento, porém nenhuma sequência foi obtida. Estes estão novamente sendo submetidos à novo sequenciamento.



C

BCH4a	-	G	M	C	E	M	S	Q	R	C	E	Q	Q	F	C	R	A	Q	N	L	R	T
BCH4b	-	G	M	C	E	M	S	Q	R	C	E	Q	Q	F	C	R	A	Q	N	L	R	T
<i>Solanum lycopersicum</i>	-	-	-	-	-	-	-	Q	R	C	E	Q	Q	Y	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Gossypium hirsutum</i>	-	-	-	C	E	-	-	D	R	C	E	R	Q	F	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Gossypium arboreum</i>	-	-	-	C	E	-	-	D	R	C	E	R	Q	F	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Carya illinoensis</i>	-	-	-	C	E	-	-	R	R	C	E	R	Q	F	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Juglans nigra</i>	-	-	-	-	-	-	-	Q	R	C	E	R	Q	Y	-	-	-	-	-	-	-	-

- Resíduos de cisteína conservados
- Resíduos ácidos (Ac. Glutâmico) conservados
- Resíduos básicos (Arginina) conservados
- Resíduos de glutamina conservados

Figura 3 – (A) Gel de tricina 16,4 % do extrato bruto e frações das sementes de *C. baccatum*, obtidas após cromatografia de troca aniônica em resina DEAE-Sepharose; (B) Gel de tricina 16,4 % das frações de sementes de *C. baccatum*, obtidas após cromatografia de fase reversa em coluna C2C18, em sistema HPLC da fração D2; (M) refere-se ao marcador de massa molecular (Da). (C) Alinhamento do peptídeo BcH4a e BcH4b com proteínas do tipo vicilinas.

5.4 – Efeito das frações H1, H2, H3 e H4 sobre a inibição do crescimento de células de leveduras em meio líquido

As frações H1, H2, H3 e H4 de sementes de *C. baccatum*, obtidas após cromatografia de fase reversa em sistema HPLC em coluna C2C18, por apresentarem baixa massa molecular, foram avaliadas quanto a sua capacidade em inibir o crescimento das leveduras *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *C. tropicalis* e *K. marxianus*, em meio líquido (Figuras 4 – 7).

Na figura 4 observa-se o efeito das frações H1, H2, H3 e H4, nas concentrações de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 4A) e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 4B) sobre o crescimento da levedura *S. cerevisiae*, onde foi possível notar que na concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ nenhuma das frações testadas foi capaz de inibir o crescimento da levedura *S. cerevisiae* (Figura 4A). Já na concentração de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ apenas a fração H2 exibiu atividade inibitória de cerca de 20 % sobre o crescimento da levedura (Figura 4B). Quando visualizamos diretamente nas placas o crescimento das células de *S. cerevisiae*, na presença das frações H1, H2, H3 e H4, na concentração de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, não foi possível verificarmos diferenças no padrão de crescimento entre as células controle e as tratadas (Figura 4C).

Na figura 5 observa-se o efeito das frações H1, H2, H3 e H4, nas concentrações de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 5A) e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 5B) sobre o crescimento da levedura *C. albicans*. Observa-se que nenhuma das frações testadas, na concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 5A) foi capaz de inibir o crescimento da levedura *C. albicans*. Quando esta concentração foi aumentada para 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 5B) foi possível notar que as frações H3 e H4 inibiram, respectivamente, cerca de 50 % e 60 % do crescimento da levedura *C. albicans*. Ao analisar o crescimento desta levedura na presença das frações testadas, na concentração de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, diretamente na placa, é possível observar uma considerável redução no crescimento da levedura em questão na presença das frações H3 e H4 (Figura 5C).

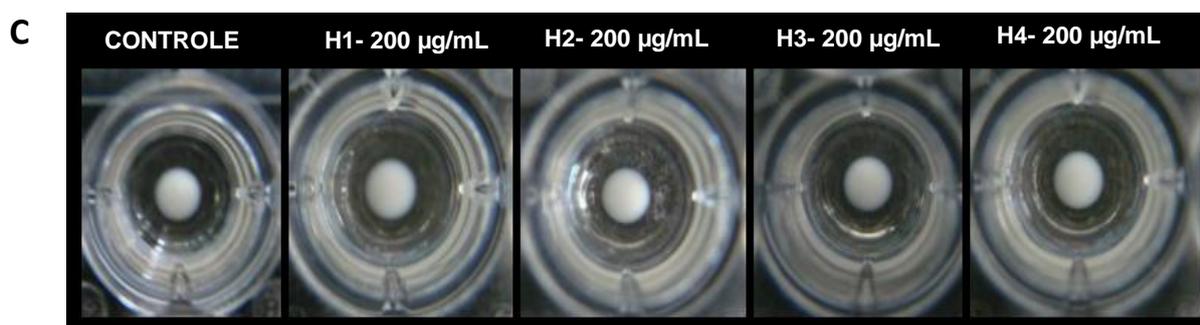
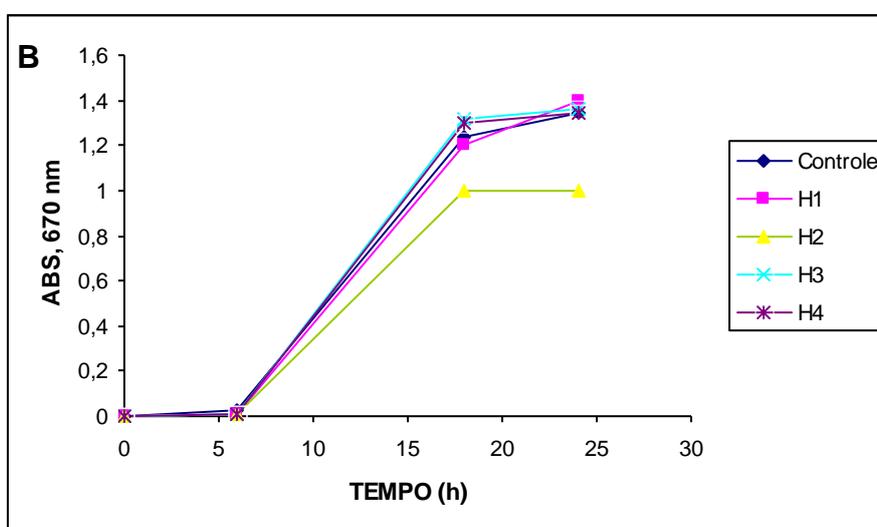
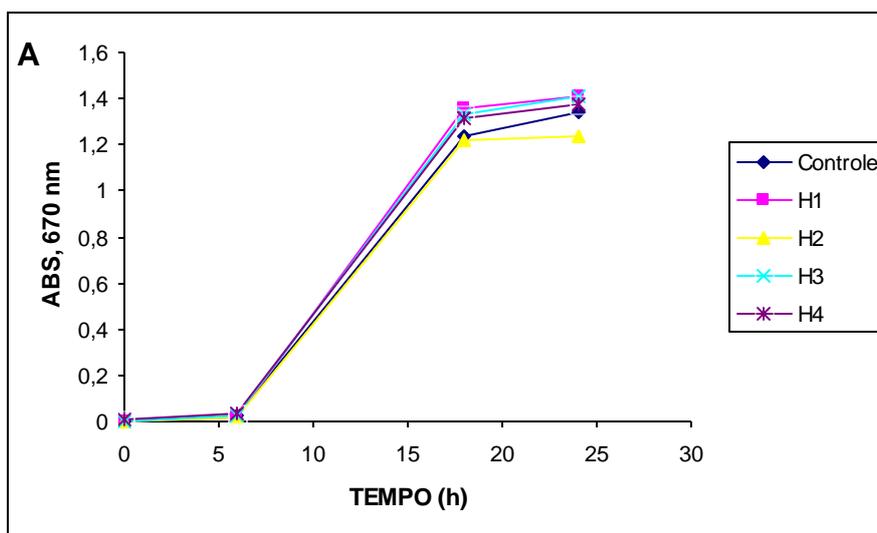


Figura 4 – Ensaio de inibição do crescimento da levedura *S. cerevisiae*, na presença de (A) $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e (B) $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ das frações H1, H2, H3 e H4, obtidas após a cromatografia de fase reversa em sistema HPLC. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os erros padrão (coeficientes de variação foram inferiores a 20 %) foram omitidos para maior clareza dos gráficos. (C) Visualização do crescimento da levedura *S. cerevisiae* em placas de cultura de 96 poços.

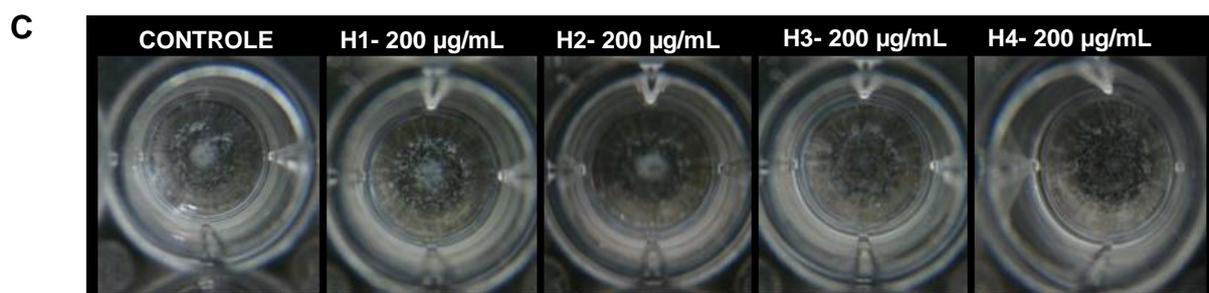
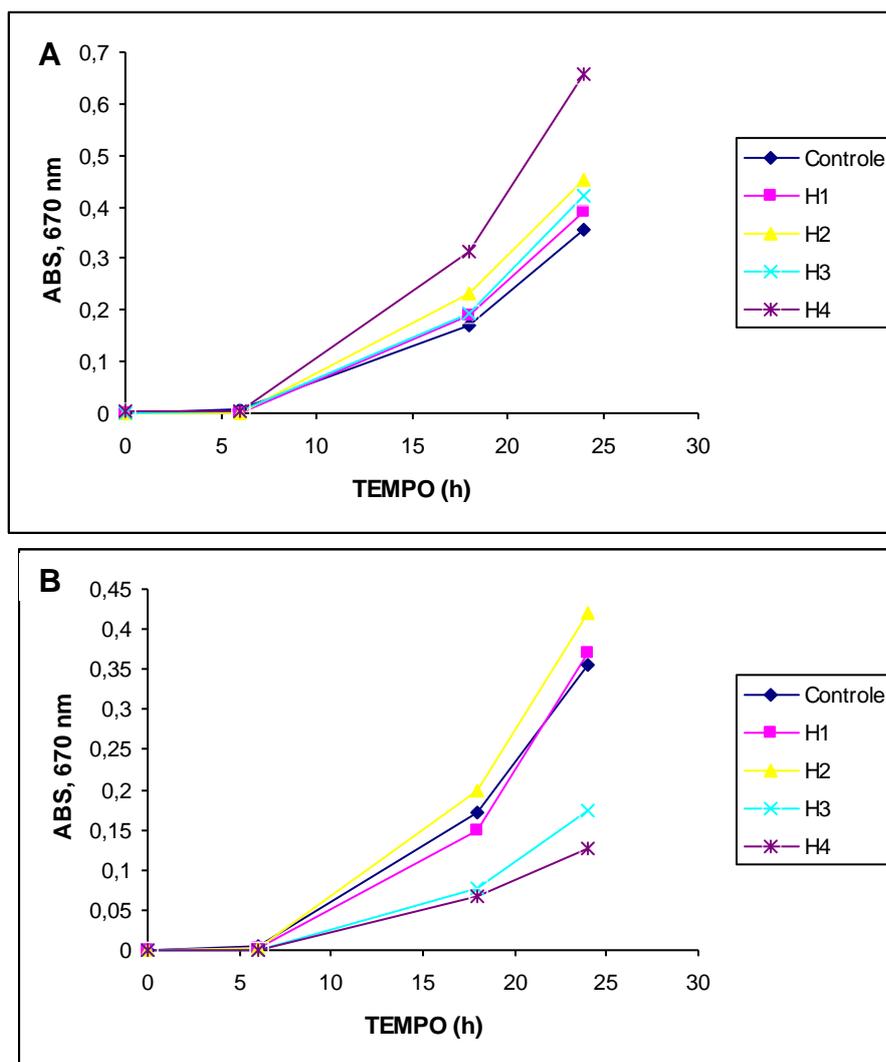
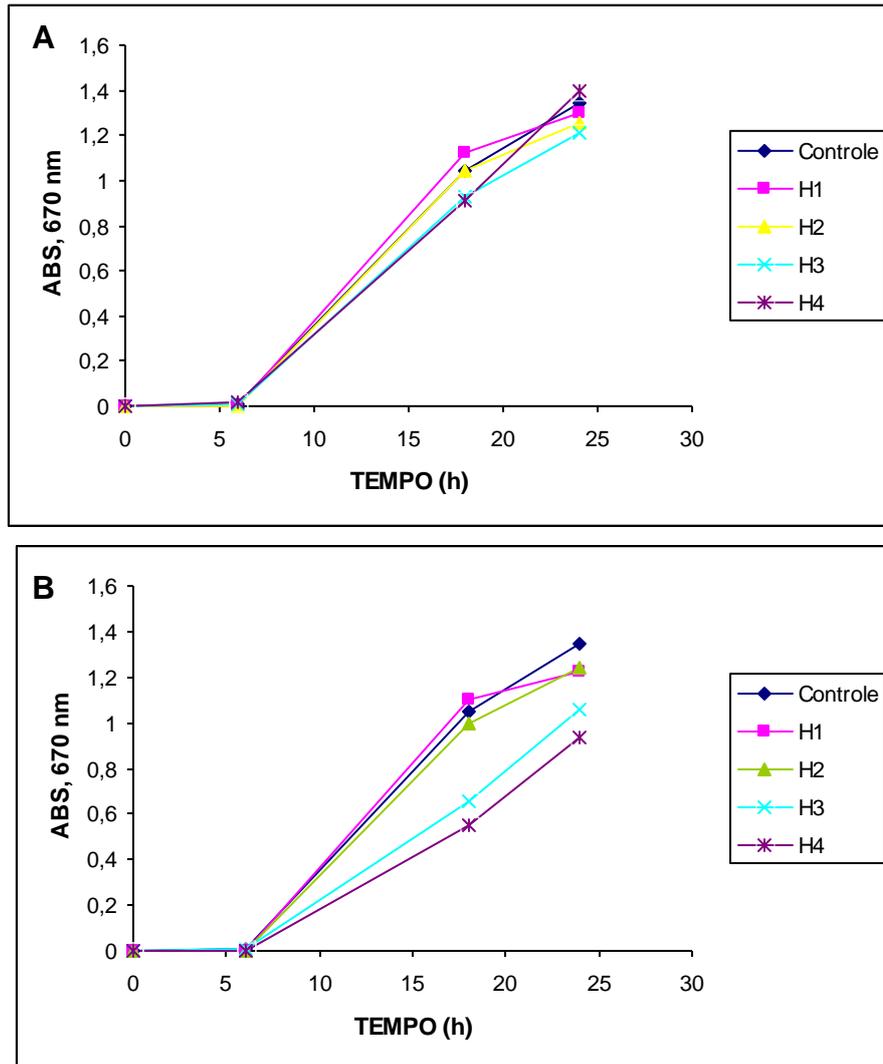


Figura 5 – Ensaio de inibição do crescimento da levedura *C. albicans*, na presença de (A) $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e (B) $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ das frações H1, H2, H3 e H4, obtidas após a cromatografia de fase reversa em sistema HPLC. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os erros padrão (coeficientes de variação foram inferiores a 20 %) foram omitidos para maior clareza dos gráficos. (C) Visualização do crescimento da levedura *C. albicans* em placas de cultura de 96 poços.

Na figura 6 observa-se o efeito das frações H1, H2, H3 e H4, nas concentrações de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 6A) e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 6B) sobre o crescimento da levedura *C. tropicalis*. Observa-se que nenhuma das frações testadas, na concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 6A) foi capaz de inibir o crescimento da levedura *C. tropicalis* (Figura 6A). Já na presença de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ as frações H3 e H4 inibiram cerca de 30 % e 40 %, respectivamente, do crescimento da levedura em questão. Ao visualizarmos o crescimento da levedura *C. tropicalis*, diretamente na placa, na presença de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ das frações H3 e H4 é possível observar uma acentuada redução da massa celular.

Na figura 7 observa-se o efeito das frações H1, H2, H3 e H4, nas concentrações de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 7A) e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 7B) sobre o crescimento da levedura *K. marxianus*. Nenhuma das frações testadas, na concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 7A) foi capaz de inibir o crescimento da levedura *K. marxianus*, mas quando esta concentração foi aumentada para 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, as frações H3 e H4 inibiram 65 % e 72 %, respectivamente, do crescimento desta levedura (Figura 7B), o que pode ser claramente constatado ao visualizar o crescimento da levedura *K. marxianus*, diretamente na placa (Figura 7C).



C

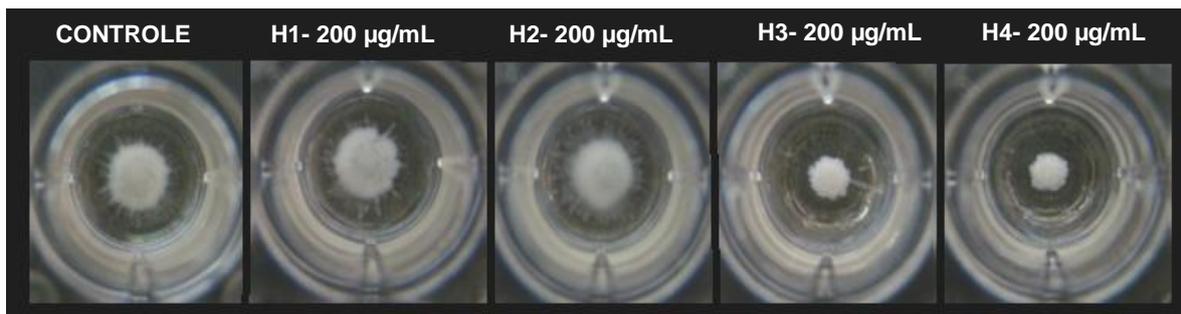


Figura 6 – Ensaio de inibição do crescimento da levedura *C. tropicalis*, na presença de (A) $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e (B) $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ das frações H1, H2, H3 e H4, obtidas após a cromatografia de fase reversa em sistema HPLC. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os erros padrão (coeficientes de variação foram inferiores a 20 %) foram omitidos para maior clareza dos gráficos. (C) Visualização do crescimento da levedura *C. tropicalis* em placas de cultura de 96 poços.

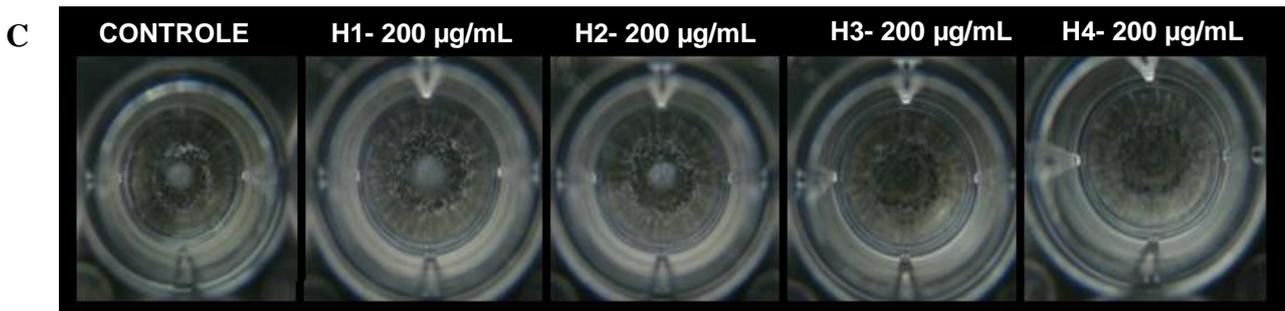
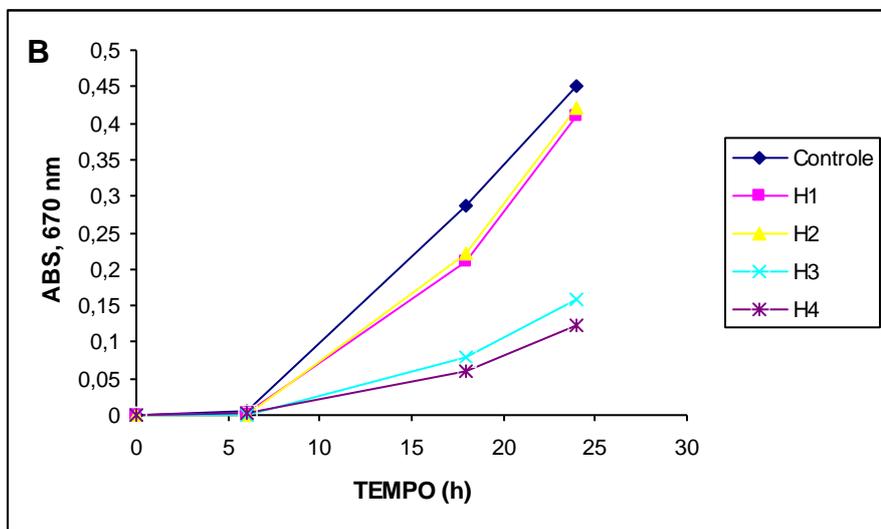
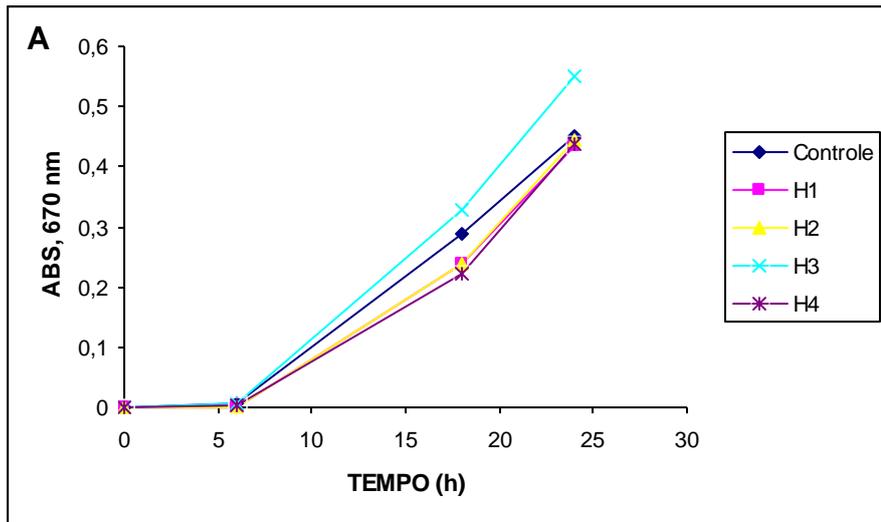


Figura 7 – Ensaio de inibição do crescimento da levedura *K. marxianus*, na presença de (A) $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e (B) $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ das frações H1, H2, H3 e H4, obtidas após a cromatografia de fase reversa em sistema HPLC. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os erros padrão (coeficientes de variação foram inferiores a 20 %) foram omitidos para maior clareza dos gráficos. (C) Visualização do crescimento da levedura *K. marxianus* em placas de cultura de 96 poços.

5.5 – Efeito das frações H3 e H4 sobre a morfologia das células

5.5.1 – Microscopia óptica

Na figura 8 podemos visualizar as imagens feitas através de microscopia óptica das leveduras *C. albicans*, *C. tropicalis* e *K. marxianus* crescidas em meio sem adição das frações H3 e H4 (controle) e, na presença destas frações em uma concentração de 200 µg.mL⁻¹, após 24 h de incubação, a 30 °C.

Observamos na figura 8 (A, B e C) as células da levedura *C. albicans*. Notamos que na presença da fração H3 houve uma aglomeração das células (Figura 8B) e na presença da fração H4 ocorreu a formação de pseudohifas (Figura 8C), fatos que não foram observados nas células crescidas na ausência dessas frações (Figura 8A).

Na figura 8 (D, E e F) observamos as células da levedura *C. tropicalis*. Na presença da fração H3 foi observado uma aglomeração celular (Figura 8E) e na presença da fração H4 a formação de pseudohifas (Figura 8F), alterações que não foram observadas nas células crescidas na ausência dessas frações (Figura 8 D).

Na figura 8 (G, H e I) observamos as células da levedura *K. marxianus*. Notamos que as células crescidas na presença das frações H3 (Figura 8H) e H4 (Figura 8I) apresentaram-se de forma aglomerada, o que não foi observado nas células crescidas na ausência destas frações (Figura 8G).

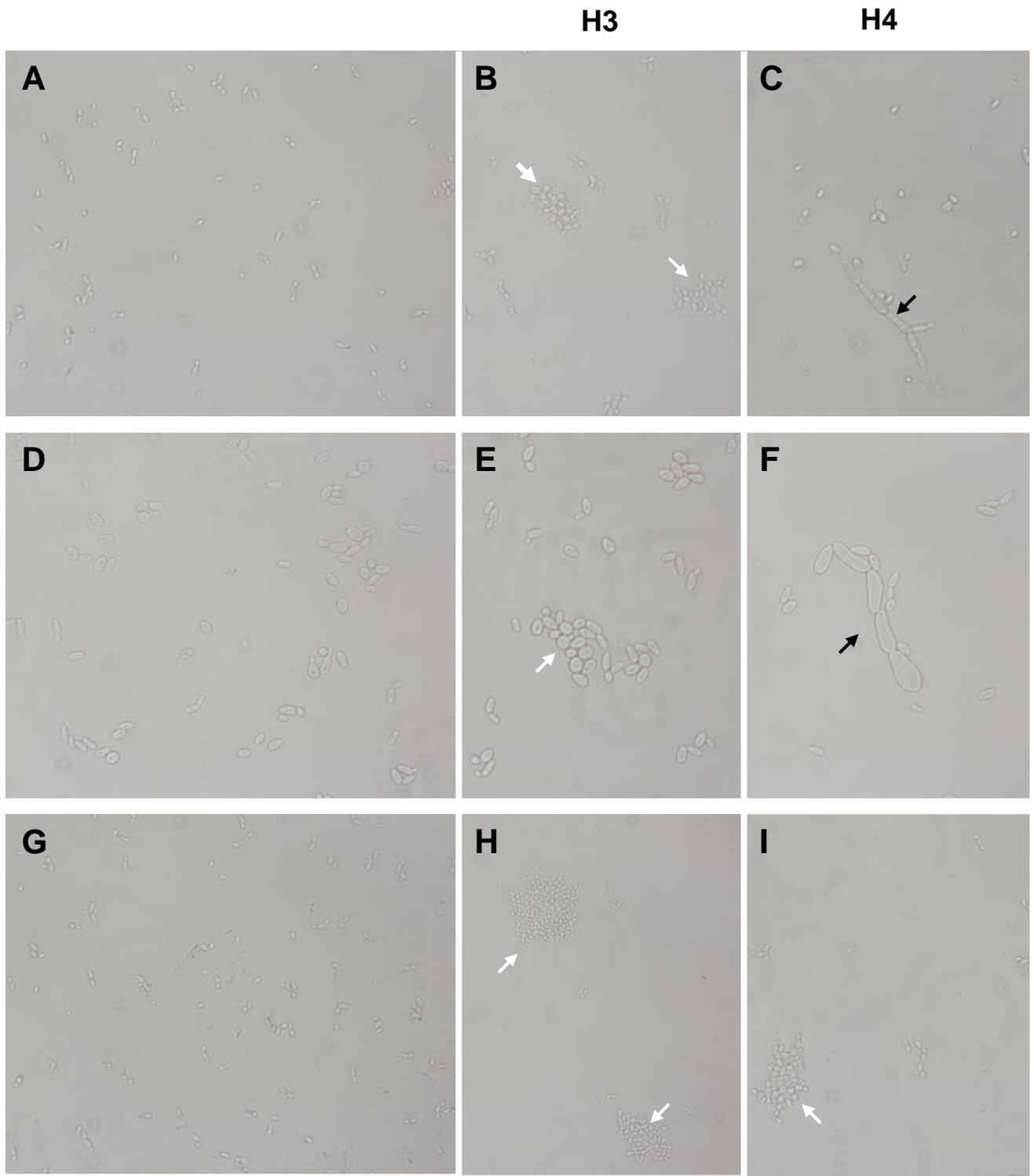


Figura 8 – Células das leveduras *C. albicans*, *C. tropicalis* e *K. marxianus* visualizadas por microscopia óptica após ensaio de inibição do crescimento. (A, D e G) células controle (não tratadas); (B, E e H) células tratadas com a fração H3; (C, F e I) célula tratadas com a fração H4; (A, B e C) *C. albicans*; (D, E, F) *C. tropicalis*; (G, H e I) *K. marxianus*. Seta branca - aglomeração celular; Seta preta – pseudohifa.

5.5.2 – Microscopia eletrônica de varredura

Nas figuras 9 e 10 visualizamos as imagens feitas através de microscopia eletrônica de varredura das leveduras *C. albicans* (Figura 9) e *C. tropicalis* (Figura 10), provenientes do ensaio de inibição do crescimento, após 24 h de incubação na ausência (controle) e na presença da fração H4, na concentração de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Na figura 9 observamos as células da levedura *C. albicans*. Notamos que na presença da fração H4 ocorreram alterações morfológicas como a formação de pseudohifas (Figura 9D e 9E), podemos observar também uma intensa aglomeração celular (Figura 9E) e a ocorrência de um material ao redor das células que pode ser decorrente da liberação de conteúdo citoplasmático (Figura 9F). Ao compararmos as células tratadas (Figuras 9D, 9E e 9F) com as células controles (Figuras 9A, 9B e 9C), verificamos que nenhuma destas alterações celulares foram observadas nas células controle.

Quando observamos as imagens das células de *C. tropicalis* (Figura 10), notamos que as células crescidas na presença da fração H4 (Figuras 10D, 10E e 10F) apresentaram alterações morfológicas como a formação de pseudohifas e aglomeração celular. Também foi possível observar a presença de material aglutinado sobre a superfície das células (Figura 10F), que pode estar ocorrendo devido a liberação de material citoplasmático. Estas alterações não foram observadas nas células do controle (Figuras 10A, 10B e 10C).

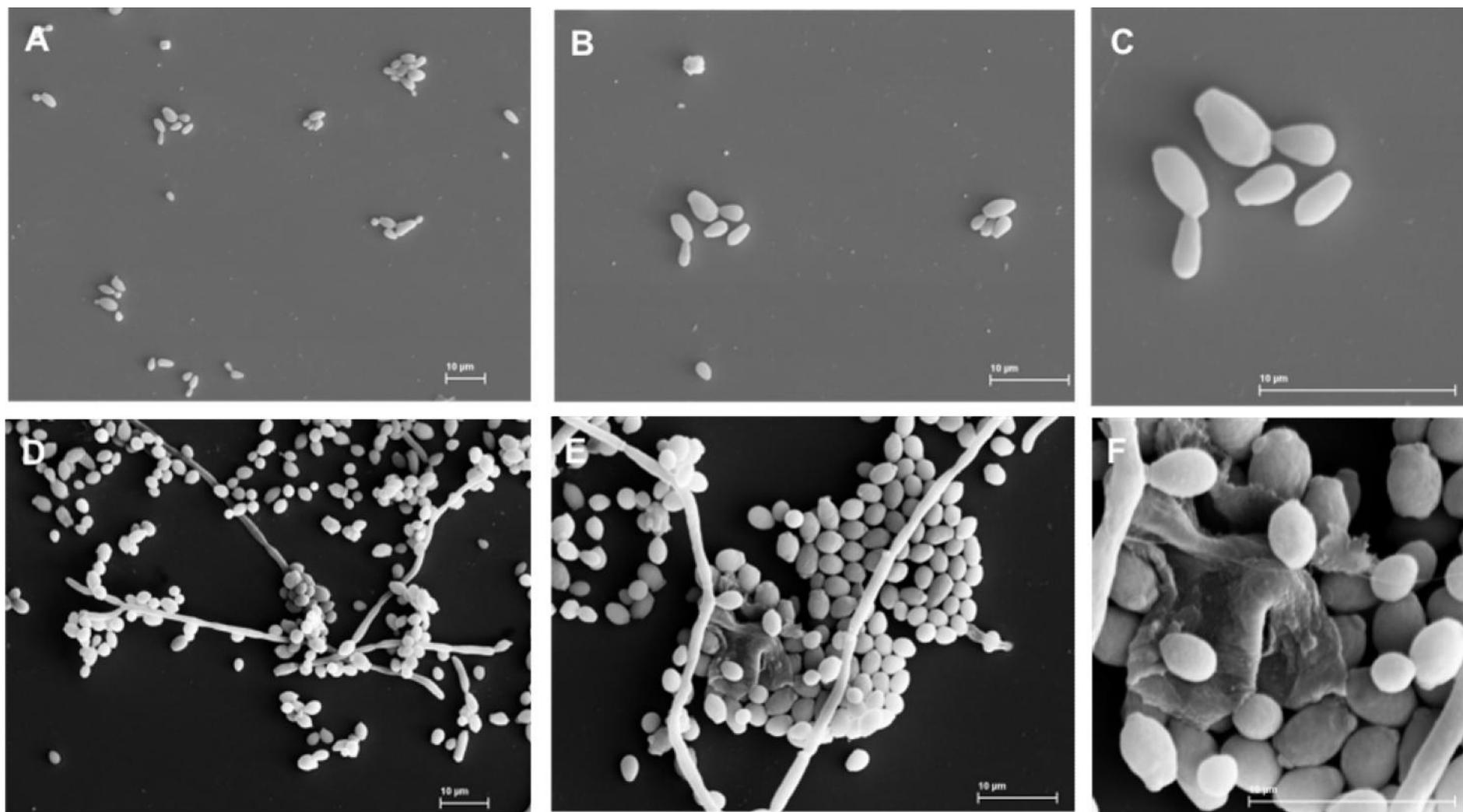


Figura 9 – Células de *C. albicans* visualizadas por microscopia eletrônica de varredura após ensaio de inibição do crescimento. (A, B e C) células controle (crescidas na ausência da fração H4); (D, E e F) células crescidas na presença de $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ da fração H4. (Barra $10 \mu\text{m}$).

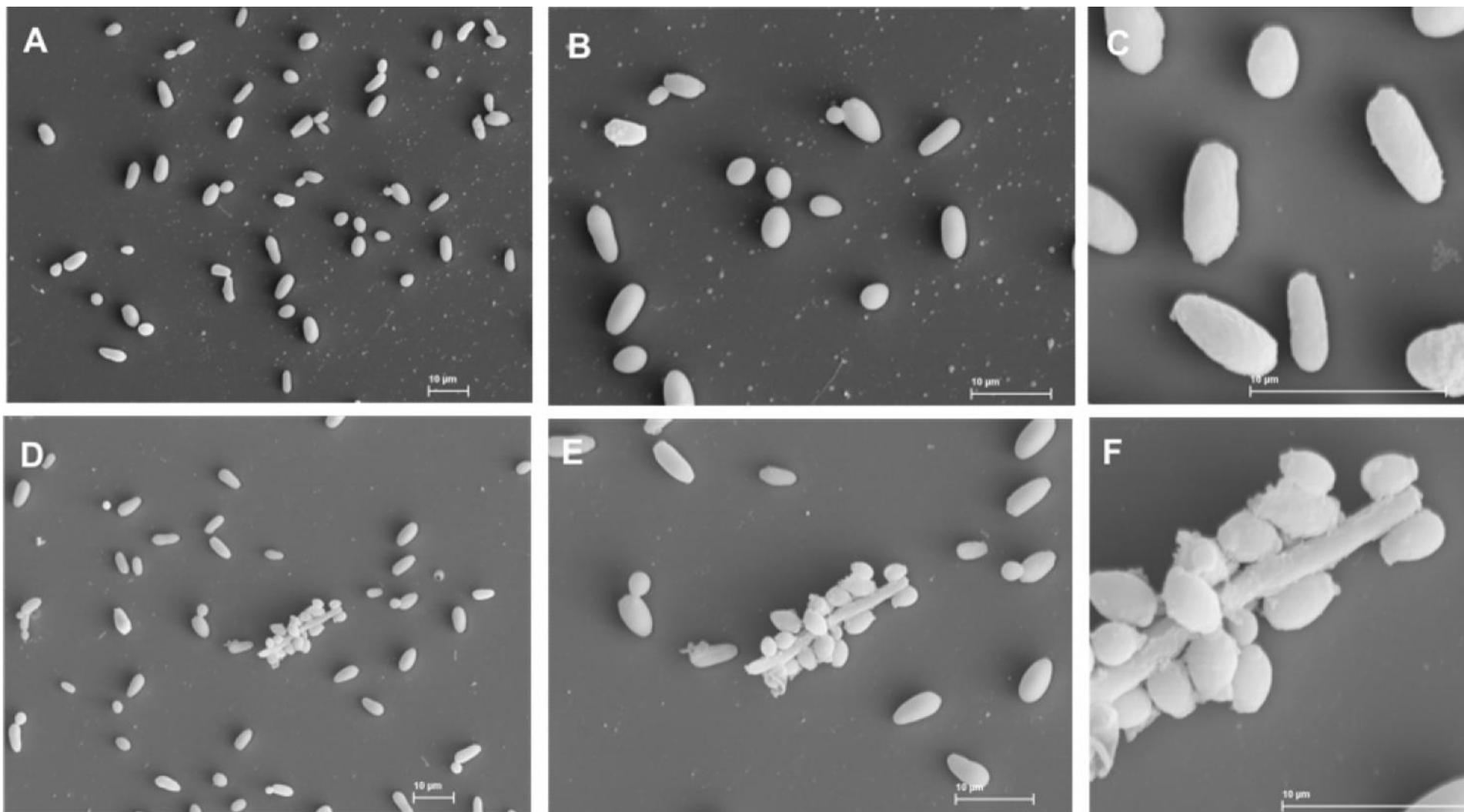


Figura 10 – Células de *C. tropicalis* visualizadas por microscopia eletrônica de varredura após ensaio de inibição do crescimento. (A, B e C) células controle (crescidas na ausência da fração H4); (D, E e F) células crescidas na presença de 200 µg.mL⁻¹ da fração H4. (Barra 10 µm).

5.6 – Efeito das frações H3 e H4 sobre a permeabilização das células de leveduras

Nas figuras 11, 12, 13 e 14 observamos o resultado obtido sobre a permeabilização de membranas de células das leveduras *S. cerevisiae* (Figura 11), *C. albicans* (Figura 12), *C. tropicalis* (Figura 13) e *K. marxianus* (Figura 14) quando incubadas na presença e na ausência de $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ das frações H3 e H4.

Podemos observar que nas células controle (não tratadas) de *S. cerevisiae* (Figura 11A e 11B), *C. albicans* (Figura 12A e 12B), *C. tropicalis* (Figura 13A e 13B) e *K. marxianus* (Figura 14A e 14B) nenhuma fluorescência foi observada, indicando que a membrana das células encontram-se íntegras, ou seja, não houve permeabilização.

Conforme podemos observar nas figuras 11D, 12D, 13D e 14D as células de todas as leveduras previamente tratadas com a fração H3 apresentaram-se marcadas pelo corante sytox Green, sugerindo que a fração H3 foi capaz de causar danos as membranas das células e permitir a penetração do corante quando comparadas aos respectivos controles os quais não tiveram marcação.

As células de *S. cerevisiae* (Figura 11F), *C. albicans* (Figura 12F) e *K. marxianus* (Figura 14F) previamente tratadas com a fração H4 também apresentaram-se marcadas com o corante Sytox Green, sugerindo que a fração H4 também foi capaz de causar danos as membranas das células e permitir a entrada do marcador, sendo que o mesmo não foi observado nas células da levedura *C. tropicalis* previamente tratadas com a fração H4 (Figura 13F), uma vez que as células não exibiram marcação.

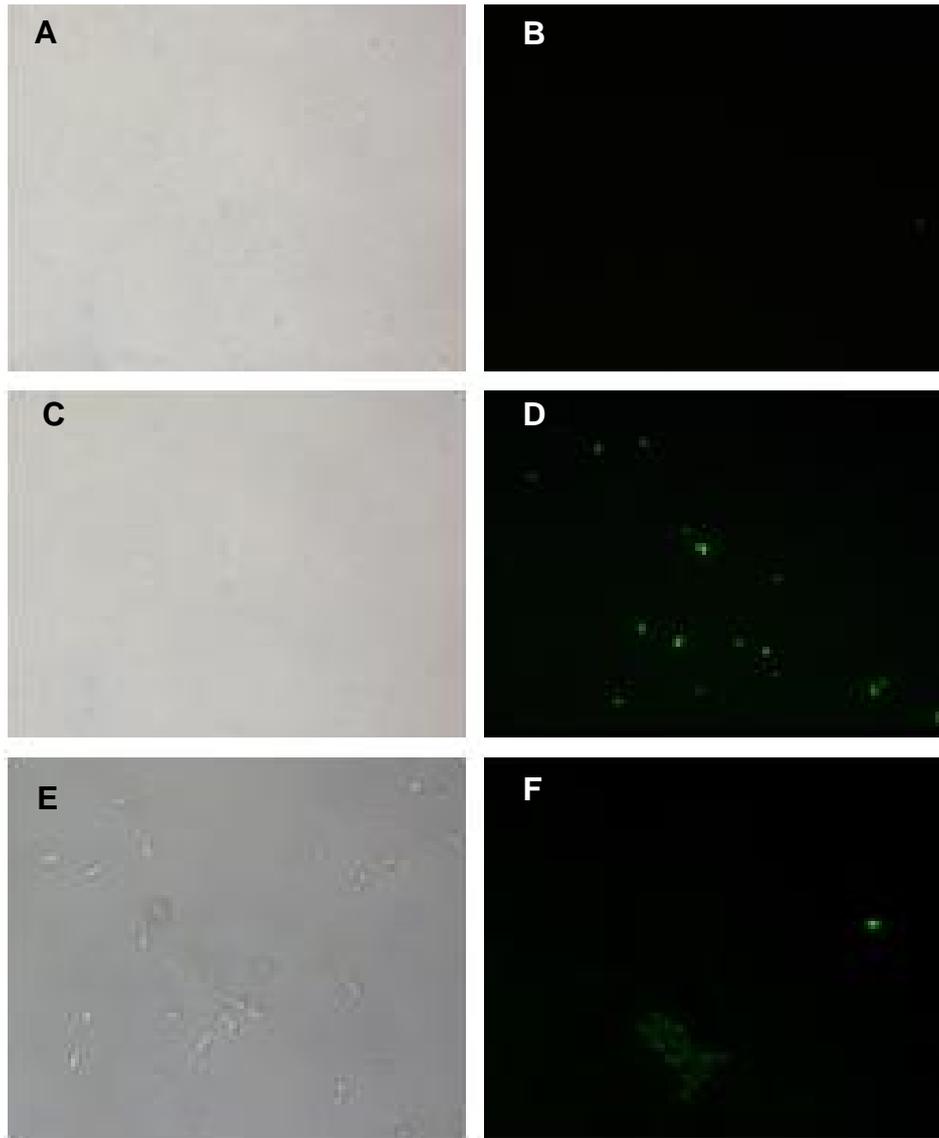


Figura 11 – Microscopia de fluorescência de células da levedura *S. cerevisiae* incubadas com o corante SYTOX Green. (A e B) controles (células não tratadas); (C e D) células de *S. cerevisiae* tratadas com $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ da fração H3; (E e F) células de *S. cerevisiae* tratadas com $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ da fração H4. (A, C e E) células visualizadas por microscopia óptica de campo claro; (B, D e F) células visualizadas por microscopia de fluorescência. Aumento de 400X.

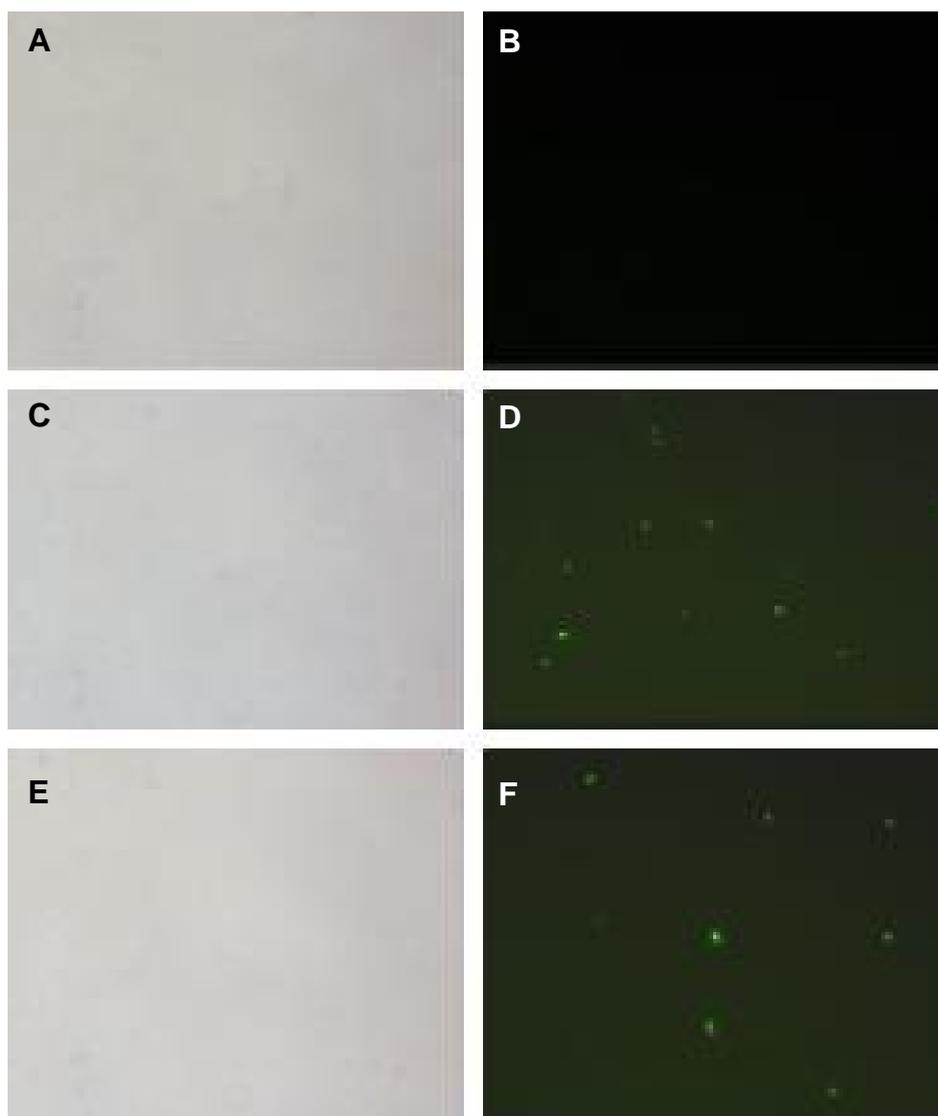


Figura 12 – Microscopia de fluorescência de células da levedura *C. albicans* incubadas com o corante SYTOX Green. (A e B) controles (células não tratadas); (C e D) células de *C. albicans* tratadas com $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ da fração H3; (E e F) células de *C. albicans* tratadas com $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ da fração H4. (A, C e E) células visualizadas por microscopia óptica de campo claro; (B, D e F) células visualizadas por microscopia de fluorescência. Aumento de 400X.

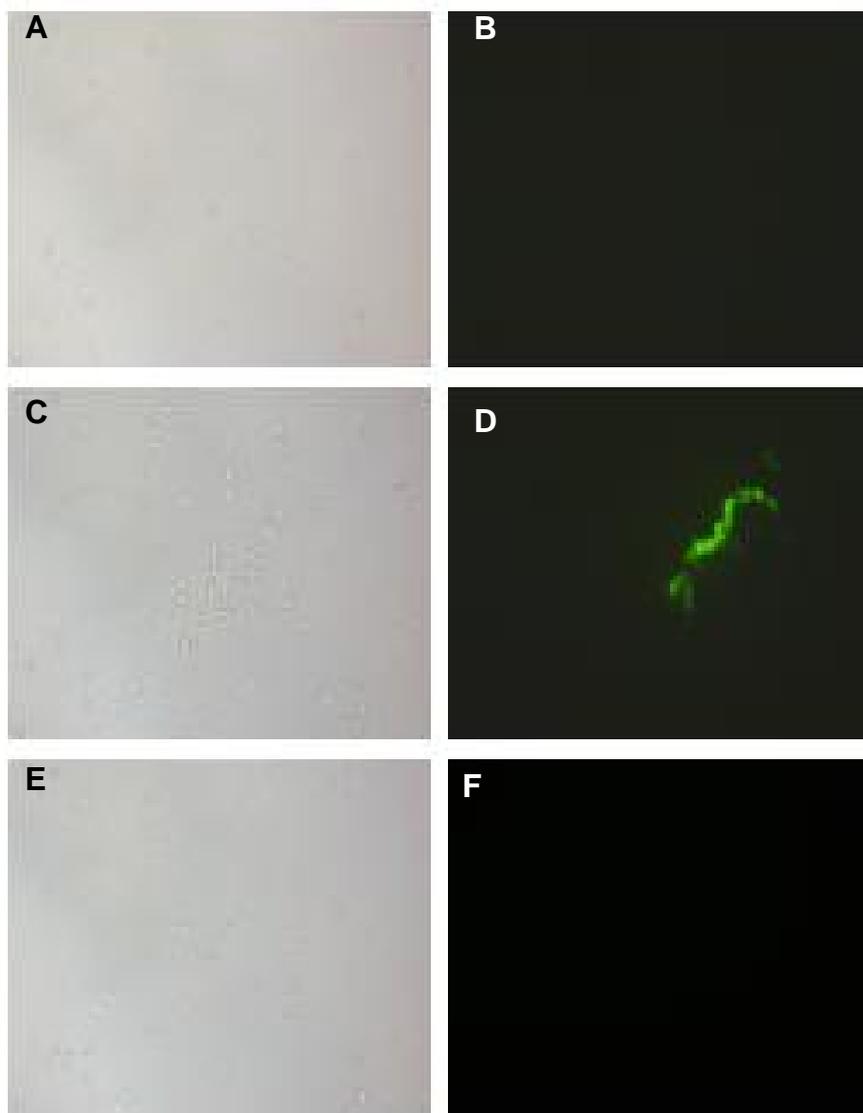


Figura 13 – Microscopia de fluorescência de células da levedura *C. tropicalis* incubadas com o corante SYTOX Green. (A e B) controles (células não tratadas); (C e D) células de *C. tropicalis* tratadas com 200 µg.mL⁻¹ da fração H3; (E e F) células de *C. tropicalis* tratadas com 200 µg.mL⁻¹ da fração H4. (A, C e E) células visualizadas por microscopia óptica de campo claro; (B, D e F) células visualizadas por microscopia de fluorescência. Aumento de 400X.

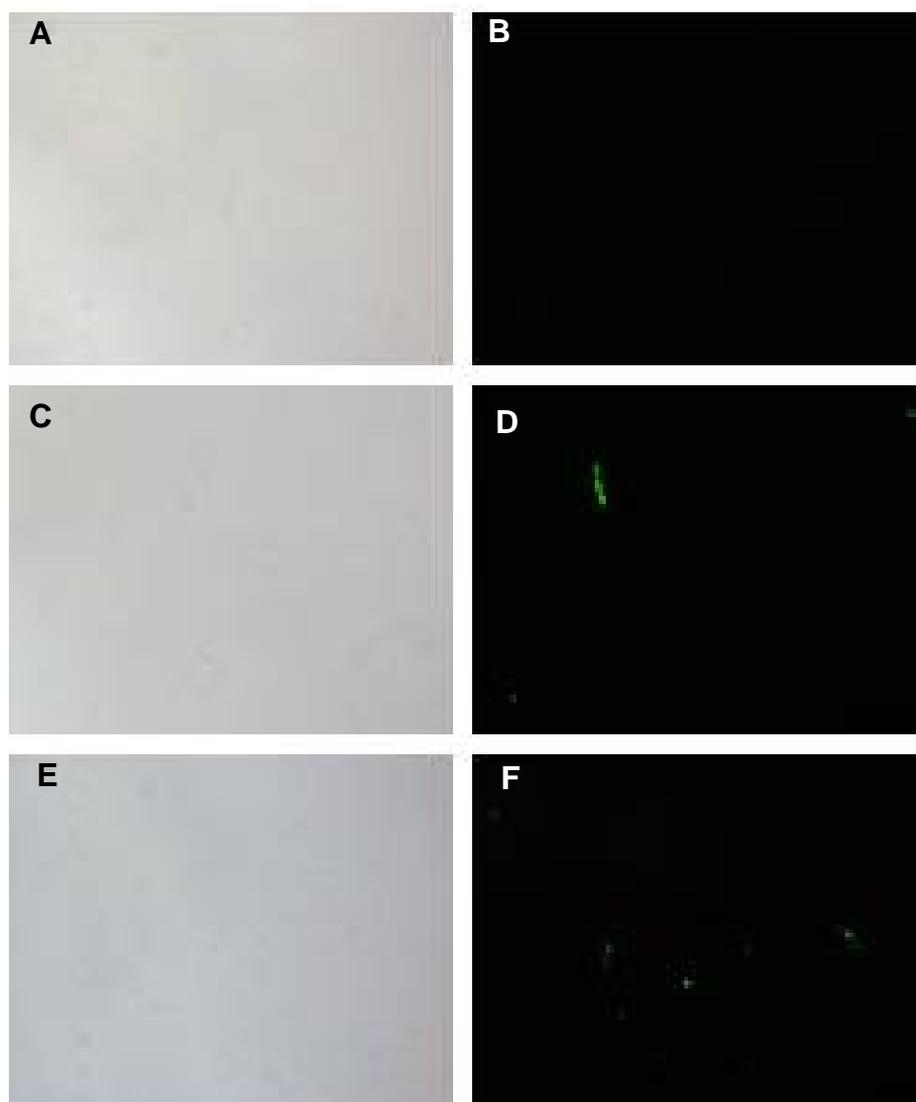


Figura 14 – Microscopia de fluorescência de células da levedura *K. marxianus* incubadas com o corante SYTOX Green. (A e B) controles (células não tratadas); (C e D) células de *K. marxianus* tratadas com $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ da fração H3; (E e F) células de *K. marxianus* tratadas com $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ da fração H4. (A, C e E) células visualizadas por microscopia óptica de campo claro; (B, D e F) células visualizadas por microscopia de fluorescência. Aumento de 400X.

5.7 – Análise da inibição da atividade da α -amilase salivar humana e larval dos insetos *C. maculatus* e *T. castaneum*

5.7.1 – Ensaio enzimático

As frações obtidas após cromatografia de fase reversa em coluna C2C18, em sistema HPLC da fração D2 foram submetidas ao protocolo de inibição da atividade da enzima α -amilase salivar humana e larval dos insetos *C. maculatus* e *T. castaneum*.

Como podemos observar na figura 15A todas as frações testadas, em uma concentração de $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, foram capazes de inibir a atividade α -amililásica da saliva humana, alcançando a 100 % de inibição com as frações H3 e H4.

Na figura 15B podemos observar que apenas a fração H4, em uma concentração de $200 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, foi capaz de inibir a atividade da α -amilase larval do inseto *C. maculatus* em apenas 20 %.

Na figura 15C podemos observar que as frações H3, H4, H5 e H7, em uma concentração de $200 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, foram capazes de inibir a atividade da α -amilase larval do inseto *T. castaneum*, sendo que esta inibição foi superior a 99 % na presença das frações H3, H4 e H5.

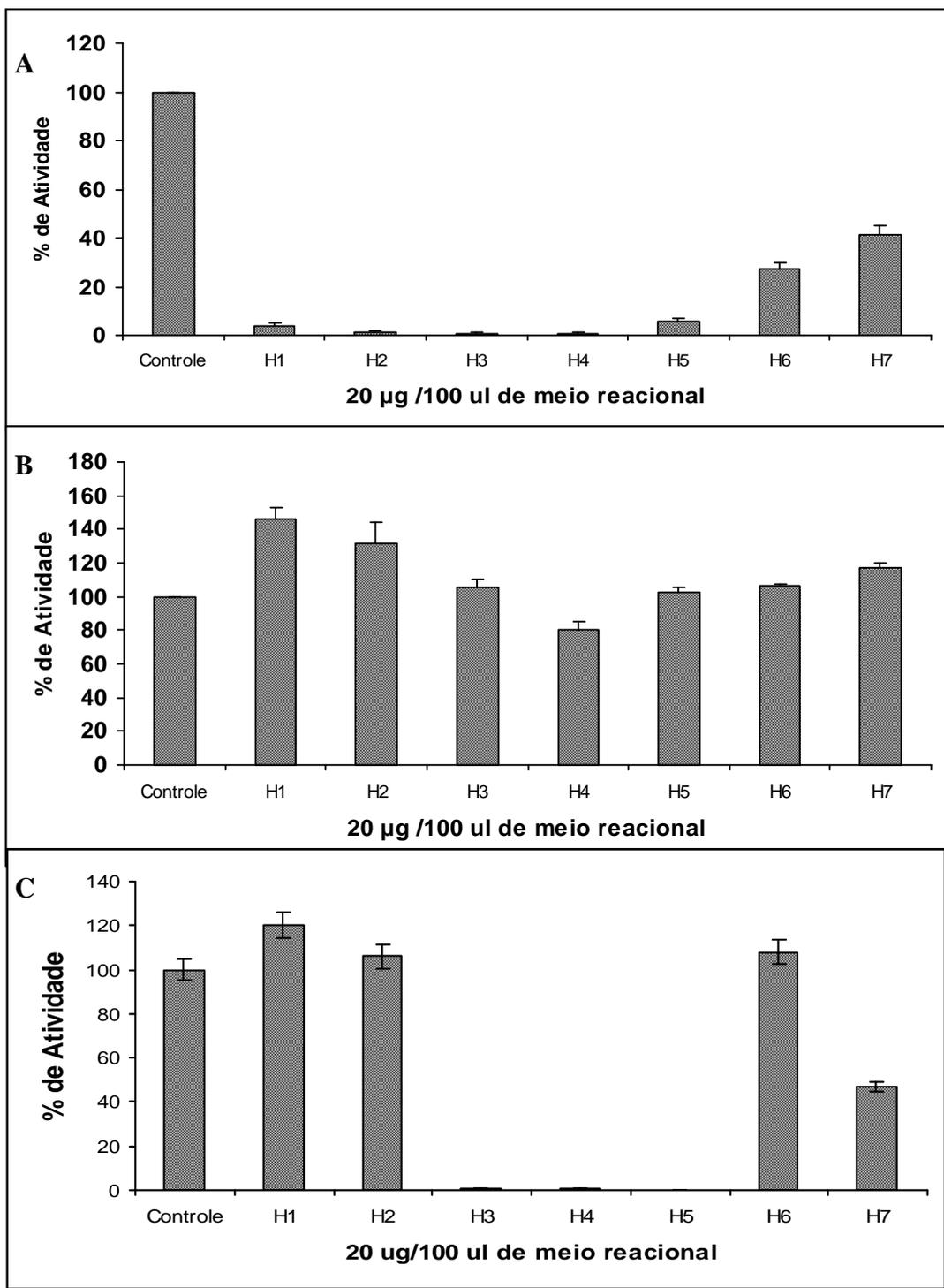


Figura 15 – Efeito das frações de sementes de *C. baccatum* obtidas após cromatografia de fase reversa em sistema HPLC utilizando coluna C2C18, da fração D2 sobre a atividade da α -amilase salivar humana (A) e α -amilase larval dos insetos *C. maculatus* (B) e *T. castaneum* (C).

5.7.2 – Ensaio em gel de atividade da inibição da atividade da α -amilase salivar e da α -amilase dos insetos *C. maculatus* e *T. castaneum*

Para avaliar se todas as isoformas de α -amilase presentes na saliva humana e no intestino dos insetos *C. maculatus* e *T. castaneum* estavam sendo inibidas pelas frações H3 e H4, realizamos ensaios de atividade em gel contendo amido.

Na figura 16 é apresentado um gel de atividade α -amilásica, onde as α -amilases salivar humana e larval do inseto *C. maculatus* são testadas na presença e na ausência da fração H3. Na raia 1 observamos a atividade da α -amilase salivar humana na ausência da fração H3, e pela marcação no gel notamos a presença de 3 isoformas. Na raia 2 observamos a atividade da α -amilase salivar humana na presença da fração H3 e pela ausência de marcação é possível notar que a atividade dessa enzima foi inibida. Na raia 3 observamos a atividade da α -amilase de *C. maculatus* na ausência da fração H3 e notamos a presença de 6 isoformas, na raia 4, na presença da fração H3 observamos que a atividade enzimática foi inibida.

Quando testamos as atividades em gel das α -amilases salivar humana e larval do inseto *C. maculatus* na presença da fração H4 (Figura 17) o resultado é semelhante ao observado com a fração H3. Na raia 1 observamos a atividade normal da α -amilase salivar humana na ausência da fração H4, já na raia 2, na presença dessa fração, essa atividade foi inibida. Em relação a enzima de *C. maculatus* na raia 3 observamos a atividade normal dessa enzima, na ausência da fração H4, já na raia 4, na presença dessa fração, essa atividade não foi observada.

Na figura 18 é apresentado o gel de atividade α -amilásica, onde a α -amilase larval do inseto *T. castaneum* é testada na presença e na ausência das frações H3 e H4. Na raia 1 observamos a atividade da α -amilase larval desse inseto na ausência da fração H3 e podemos a presença de 3 isoformas, já na raia 2 na presença da fração H3 está atividade é consideravelmente reduzida, o mesmo acontece na presença da fração H4. Na raia 3, na ausência da fração

H4, a enzima apresenta atividade normal, já na raia 4, na presença da fração H4, a atividade da enzima também foi consideravelmente reduzida.

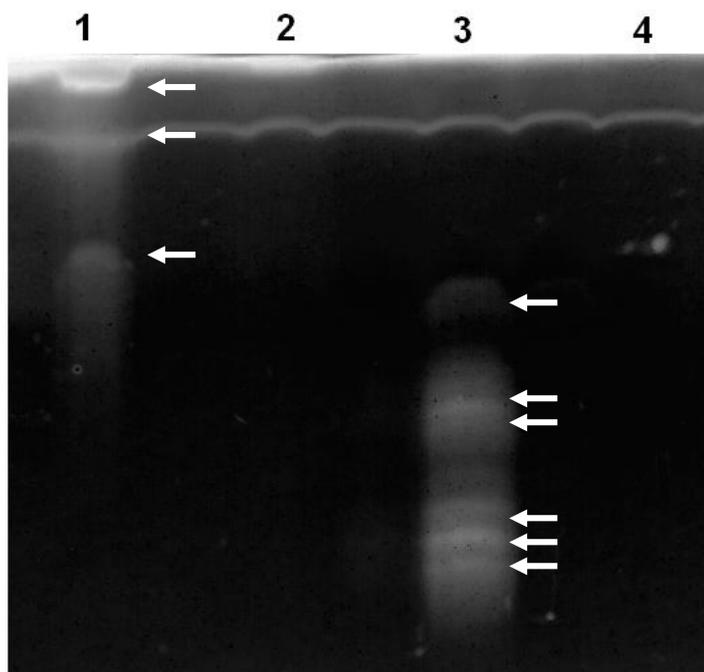


Figura 16 – Gel de atividade α -amilásica. 1 – α -amilase salivar humana; 2 - α -amilase salivar humana + fração H3; 3 - α -amilase larval do inseto *C. maculatus*; 4 - α -amilase larval do inseto *C. maculatus* + fração H3. () representam as isoformas.

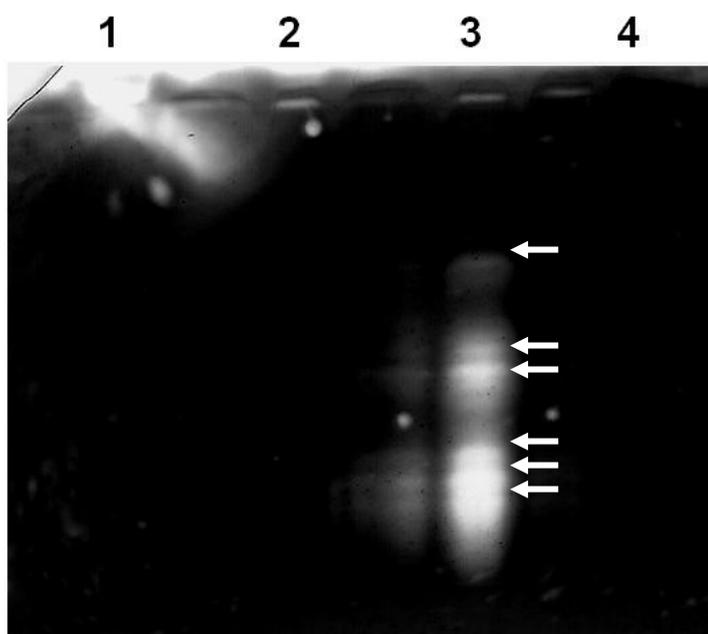


Figura 17 – Gel de atividade α -amilásica. 1 – α -amilase salivar humana; 2 - α -amilase salivar humana + fração H4; 3 - α -amilase larval do inseto *C. maculatus*; 4 - α -amilase larval do inseto *C. maculatus* + fração H4. () representam as isoformas.

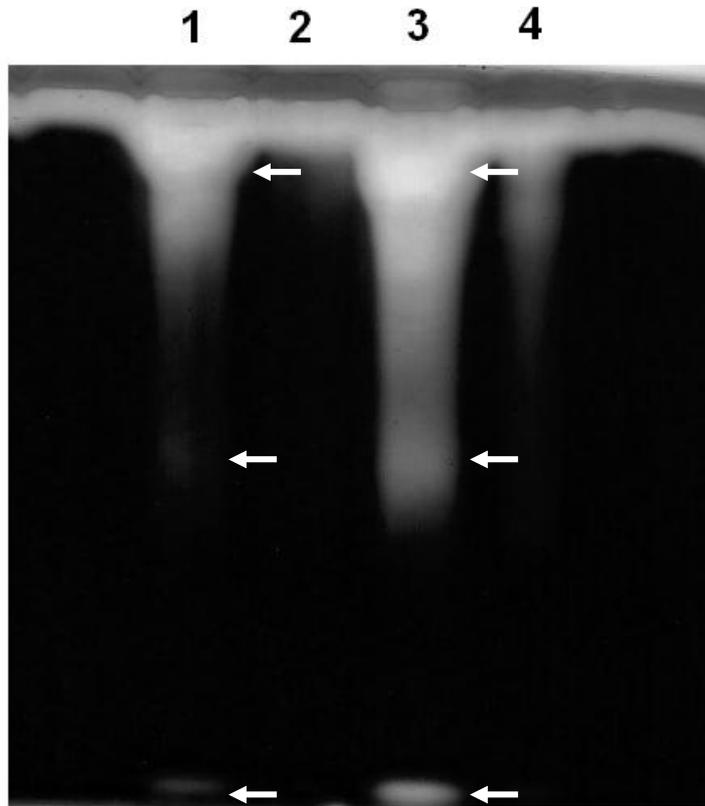


Figura 18 – Gel de atividade α -amilásica. 1 – α -amilase larval do inseto *T. castaneum*; 2 - α -amilase larval do inseto *T. castaneum* + fração H3; 3 - α -amilase larval do inseto *T. castaneum*; 4 - α -amilase larval do inseto *T. castaneum* + fração H4. () representam as isoformas.

6. DISCUSSÃO

6 – Discussão

Os peptídeos antimicrobianos são moléculas de baixa massa molecular que possuem uma vasta atividade antimicrobiana contra vírus, bactérias, protozoários, fungos e insetos e estão presentes em uma infinidade de organismos desde insetos até seres humanos (Marcos *et al.*, 2008). A atividade antimicrobiana desses peptídeos tem despertado o interesse de muitos pesquisadores que vem isolando estes componentes de diferentes espécies vegetais no intuito de estudar o modo como esses peptídeos agem sobre os diversos microorganismos. Com base nestes estudos tem tornado-se claro que estes peptídeos tem um importante papel na defesa de plantas contra infecções podendo servir como ferramentas úteis para a engenharia genética de plantas para aumentar a resistência a doenças (Carvalho *et al.*, 2001; Jha e Chattoo, 2010) e alguns AMPs estão sendo desenvolvidos como novos antibióticos potenciais com aplicações médicas (Peters *et al.*, 2010). Diante da grande importância dos AMPs este trabalho teve como foco principal caracterizar e estudar as atividades antimicrobianas e inibitórias de α -amilase de peptídeos isolados de sementes de pimenta.

Iniciamos o nosso trabalho a partir da extração protéica das sementes de *Capsicum baccatum*, segundo metodologia descrita por Terras *et al.*, (1993). A potente atividade antimicrobiana desse extrato bruto já havia sido determinada em um estudo prévio (Vieira, 2011). Na literatura, diversos extratos brutos de pimentas com atividade antimicrobiana têm sido relatados. Carvalho *et al.*, (2010) relataram a inibição do crescimento da bactéria *Staphylococcus aureus* pelos extratos de pimenta de jardim (*C. annum* L.), pimenta malagueta (*C. frutescens* L.), pimenta cambuci (*C. baccatum* L.) e pimentão amarelo (*C. annum* L.), sendo que dentre todos os extratos testados a pimenta malagueta (*C. frutescens* L.) foi a que apresentou a maior atividade antibacteriana. Posteriormente o extrato bruto protéico de *C. baccatum* foi submetido a cromatografia de troca aniônica em coluna DEAE-Sepharose, resultando em duas frações distintas, a fração não retida, denominada D1, eluída com o tampão de equilíbrio da coluna e representante das proteínas básicas, e, uma fração retida,

denominada D2, eluída com o tampão de equilíbrio da coluna com adição de NaCl 1M, correspondente as proteínas ácidas (Figura 1A). O perfil eletroforético destas frações foi analisado em gel de tricina em condições desnaturantes onde pode-se observar maior concentração de proteínas de baixo peso, menores que 14 kDa (Figura 3A).

Em um trabalho prévio nós identificamos que o potencial antimicrobiano da fração D2 era muito superior ao da fração D1 (Vieira, 2011) e, portanto, essa fração foi submetida a passos posteriores de purificação, sendo submetida a cromatografia de fase reversa em sistema HPLC onde obtivemos sete frações (H1, H2, H3, H4, H5, H6 e H7) (Figura 2B) as quais foram submetidas a eletroforese, onde constatamos que as quatro primeiras frações eram constituídas predominantemente por proteínas de baixa massa molecular, portanto concentramos os nossos estudos nestas frações.

Com o objetivo de analisarmos o papel antimicrobiano dessas frações, ensaios antifúngicos foram realizados para que pudéssemos analisar a capacidade que estas teriam sobre a inibição do crescimento de diferentes espécies de leveduras (*S. cerevisiae*, *C. albicans*, *C. tropicalis* e *K. marxianus*). Para estes ensaios foram utilizadas concentrações de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo que apenas esta última foi capaz de inibir o crescimento das leveduras testadas (Figuras 4, 5, 6 e 7). Em relação a *S. cerevisiae* apenas a fração H2 foi capaz de inibir o seu crescimento (Figura 4B) já em relação as outras leveduras as frações H3 e H4 promoveram inibição (Figuras 5B, 6B e 7B) e podemos facilmente visualizar a redução da massa celular ao observarmos o crescimento destas leveduras diretamente na placa (Figuras 5C, 6C e 7C).

Inúmeros são os trabalhos que demonstram a atividade antimicrobiana relacionada às pimentas, seja dos extratos brutos ou de proteínas e peptídeos. Como no estudo de Carvalho *et al.*, (2010), já discutido acima, em que diversos extratos de diferentes pimentas apresentam atividade antibacteriana. Em outro estudo Kappel (2007) mostrou que o extrato de *C. baccatum* foi capaz de inibir o crescimento de diversas cepas de *C. albicans spp*, e do fungo *Cryptococcus neoforms*. Muitas proteínas com atividade antimicrobiana já foram isoladas de plantas de pimenta seja de frutos, folhas ou sementes. Dentre essas proteínas podemos citar as quitinases, as LTPs, as tioninas, as albuminas 2S e os inibidores de proteases (Hong *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2000; Cruz *et al.*, 2010; Diz *et al.*, 2011; Ribeiro *et al.*, 2011). Diz *et al.*, (2006) isolaram

uma fração com proteínas variando de 6 kDa a 10 kDa, que foi denominada de F1, e apresentava atividade inibitória sobre o crescimento das leveduras *C. albicans*, *S. cerevisiae* e *S. pombe* além de promover alterações morfológicas em sua células como a formação de pseudohifas. Mais recentemente, Diz *et al.*, (2011) caracterizaram uma LTP de sementes de *C. annuum*, denominada Ca-LTP1, capaz de inibir o crescimento do fungo *Colletotrichum lindemuthianum* e da levedura *C. tropicalis* promovendo alterações morfológicas em sua membrana. Ainda utilizando *C. annuum* como modelo, Ribeiro *et al.*, (2011) isolaram uma albumina 2S, denominada Ca-Alb que apresentou atividade inibitória sobre as leveduras *K. marxianus*, *C. tropicalis*, *C. albicans* e *S. cerevisiae*.

Na literatura existem diversos trabalhos que relatam a capacidade de AMPs de promover alterações morfológicas nas células de fungo, assim como já foi exposto acima em alguns trabalhos com pimentas (Diz *et al.*, 2006;2011; Ribeiro *et al.*, 2011; Cruz *et al.*, 2010) e em tantos outros trabalhos com peptídeos isolados de café (*Coffea canephora*) (Zottich *et al.*, 2011), feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*) (Santos *et al.*, 2010), feijão comum *Phaseolus vulgaris* (Mello *et al.*, 2011). Osborn *et al.*, (1995) relatou que defensinas isoladas de sementes de diferentes espécies de plantas eram capazes de promover diversas alterações morfológicas em algumas espécies de fungos. Ainda neste trabalho as defensinas foram classificadas em morfogênicas que causavam redução na elongação hifal e aumento na deformação das hifas e não morfogênicas que não induziam nenhuma alteração morfológica.

A fim de avaliar os possíveis efeitos das frações H3 e H4 na morfologia das leveduras, visualizamos essas células por microscopia óptica (Figura 8) e eletrônica de varredura (Figuras 9 e 10). Em relação a fração H3 podemos observar que ela foi capaz de promover aglomeração celular nas células de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *K. marxianus* (Figura 8). Na presença da fração H4 podemos observar, através da microscopia óptica, para as células de *K. marxianus* (Figura 8) e através de microscopia eletrônica de varredura, para as células de *C. albicans* (Figura 9), e *C. tropicalis* (Figuras 10) que estas apresentaram intensa aglomeração celular. Esta fração ainda foi capaz de induzir a formação de pseudohifas nas células das leveduras *C. albicans* e *C. tropicalis*. Foi observado, também, a existência de material não identificado ao redor de células de *C. albicans* tratadas com a fração H4, que

acreditamos ser proveniente da extrusão de componentes citosólicos, que pode ser observado em detalhes por microscopia eletrônica de varredura na figura 9F.

Como as frações H3 e H4 apresentaram uma maior atividade antimicrobiana promovendo diversas alterações morfológicas nas células das leveduras, nós, submetemos estas na presença destas frações a ensaios de permeabilização de membranas a fim de avaliar possíveis mecanismos de ação destes peptídeos. A fração H3 foi capaz de promover a permeabilização das membranas de todas as leveduras testadas como podemos observar nas figuras 11D (*S. cerevisiae*), figura 12D (*C. albicans*), figura 13D (*C. tropicalis*) e figura 14D (*K. marxianus*). Em relação a fração H4 ela foi capaz de induzir a permeabilização das membranas de *S. cerevisiae* (Figura 11F), *C. albicans* (Figura 12F) e *K. marxianus* (Figura 14F), mas não a de *C. tropicalis* (Figura 13F). Resultados semelhantes em que peptídeos modulam o influxo de íons através das membranas pela sua permeabilização, já foram observados para diversas proteínas e peptídeos isolados de diferentes espécies vegetais inclusive pimentas. Desta forma esses peptídeos se tornam modelos populares para o estudo do funcionamento das proteínas de canal iônico (Osborn *et al.*, 1995).

Recentemente, um peptídeo de 6 kDa isolado de sementes de *C. annuum*, denominado CaTI, apresentava atividade de inibidor de tripsina e quimiotripsina e foi capaz de promover a permeabilização das membranas das células das leveduras *C. albicans* e *S. cerevisiae* (Ribeiro *et al.*, 2012). Um LTP isolada de sementes de *C. annuum*, denominada Ca-LTP1 foi capaz de permeabilizar a membrana da levedura *C. tropicalis* (Diz *et al.*, 2011). Uma defensina, desta vez isolada de sementes de feijão comum, chamada PvD1 exibiu a capacidade de permeabilizar as membranas de diferentes leveduras (Mello *et al.*, 2011).

É importante ressaltar que a permeabilização de membranas e a inibição do crescimento não são fatos que estão necessariamente relacionados, embora isso aconteça em muitos casos, pode ocorrer inibição do crescimento sem haver permeabilização de membrana e vice e versa (Teixeira *et al.*, 2012).

A fração H4 foi a que apresentou maior atividade antimicrobiana e, portanto, foi submetida ao seqenciamento amino-terminal (Edmam, 1950). Esta fração apresentava dois peptídeos, que nós chamamos de BcH4a e BcH4b (Figura 3B), que foram submetidos ao sequenciamento onde obtivemos a mesma sequencia

(GMCEMSSQRCEQQFCRAQNLRT) para ambos, a qual apresentou homologia com vicilinas de *Solanum lycopersicum*, *Gossypium hirsutum*, *Gossypium arboreum*, *Carya illinoensis* e *Juglans nigra* (Figura 3C). Diante disso nós sugerimos que esses dois peptídeos sejam fragmentos de uma proteína maior, dimérica, uma vicilina-like.

As vicilinas são proteínas grandes que possuem a função primária de armazenamento, normalmente são encontradas em sementes de leguminosas e fazem parte da classe das globulinas 7S. Além de armazenar energia as vicilinas podem desempenhar papéis importantes na defesa de plantas, especialmente contra insetos (Macedo *et al.*, 1995), mas também contra fungos interferindo na germinação dos esporos ou conídios de fungos fitopatogênicos e inibindo o crescimento de leveduras (Gomes *et al.*, 1997, 1998). Alguns estudos relataram que as vicilinas exercem efeitos tóxicos para o crescimento de fungos, devido à sua capacidade para se ligar a parede celular e a componentes da membrana plasmática dos fungos (Gomes *et al.*, 1998; Rose *et al.*, 2003).

Na literatura já tem sido descrito outros peptídeos que possuem homologia com as vicilinas, portanto denominados vicilina-like. O peptídeo RP1, isolado de sementes de *C. annuum* é proveniente de uma fração com forte atividade antimicrobiana contra diversas leveduras como *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *K. marxianus*, *C. parapsilosis*, *Candida guilliermondii* e *Pichia membranifaciens*. Este peptídeo apresentou homologia com um AMP vicilina-like precursor isolado de *Gossypium hirsutum* e *Macadamia integrifolia* (Ribeiro *et al.*, 2007). Recentemente Gerlach *et al.*, (2009) isolaram uma vicilina-like de sementes de *Nicotiana glauca*. Outro peptídeo vicilina-like com massa em torno de 11 kDa, foi isolado de sementes de *Citrullus lanatus* (Yadav *et al.*, 2011).

Assim como os fungos os insetos são responsáveis por prejuízos anuais muito grandes na agricultura, assim nos últimos anos muitos trabalhos tem sido desenvolvidos com o intuito de isolar proteínas, entre estas, inibidores de α -amilase de plantas, para atuarem na defesa contra estes insetos pragas. Segundo Titarenko e Chrispeels, (2000) todos os vegetais possuem um grau de resistência aos insetos e segundo Payan (2004), essa resistência pode ser devido à produção de substâncias que impedem a ação das enzimas intestinais dessas pragas.

Muitos insetos, principalmente os amidolíticos, dependem diretamente da atividade das α -amilases existentes em seu intestino para a sua sobrevivência. Isto ocorre pelo fato dos insetos amidolíticos utilizarem o amido como principal fonte de carboidrato, o qual tem que ser quebrado para que a energia possa ser assimilada e isto é feito pelas suas α -amilases intestinais (Kalve *et al.*, 2012).

Diante disso nós avaliamos as atividades inibitórias de todas as frações (H1-H7), a uma concentração de $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$, sobre a atividade das α -amilases salivar humana e larval dos insetos *C. maculatus* e *T. castaneum* (Figura 15). Em relação a α -amilase salivar humana a inibição foi mais acentuada na presença das frações H1, H2, H3 e H4, que correspondem as frações ricas em proteínas de baixa massa molecular (Figura 15A). Em relação as α -amilases de *C. maculatus* e *T. castaneum*, apesar de ambas serem de insetos da mesma ordem (Coleoptera) o perfil de inibição foi bem diferente. Segundo Mehrabadi *et al.*, (2012) os inibidores de α -amilase possuem diferentes especificidades devido a estruturas moleculares distintas e eles podem ser específicos para determinadas espécies e ordens ou não. Para a enzima de *C. maculatus* apenas a fração H4 foi capaz de inibir a sua atividade em cerca de 20 % (Figura 15B), já em relação à enzima de *T. castaneum* as frações H3, H4 e H5 inibiram mais de 95 % da atividade dessa enzima, como observado na figura 15C.

Kalve *et al.*, (2012) isolaram um inibidor de α -amilase de sementes de *Albizia lebbbeck*, de massa molecular 14.4 kDa e que possuía atividade inibitória sobre as α -amilase de duas ordens de insetos uma lepdoptera, *Helicoverpa armigera*, e um coleóptero, *Tribolium confusum*, essa inibição foi demonstrada em um gel de atividade o qual possuía amido em sua constituição e as α -amilases foram aplicadas no gel na presença e ausência do inibidor e o gel foi corado com iodo. Na ausência do inibidor o amido era consumido, mas na presença isso não acontecia, pois a atividade das α -amilases estava inibida. Um resultado semelhante foi observado no nosso estudo ao utilizarmos géis de atividade para determinar o potencial inibitório das frações H3 e H4 sobre a atividade das α -amilases. Tanto na presença da fração H3 como na presença da fração H4 houve uma considerável redução da atividade observada no gel, das três α -amilases como observado nas figuras 16, 17 e 18.

Interessantemente, nos últimos anos AMPs como LTPs e defensinas tem sido descritos como potentes inibidores de α -amilase de insetos e mamíferos. Vijayan *et al.*,

(2012) demonstraram a atividade inibitória sobre a α -amilase larval do inseto *Zabrotes subfasciatus* de uma defensina Alpha-TvD1 que foi gerada através de mutagênese da defensina já conhecida por sua atividade antimicrobiana tvD1, isolada de *Tephrosia villosa*. Uma outra defensina isolada de sementes de feijão-de-corda apresentou atividade inibitória sobre a α -amilase de *C. maculatus* e *Z. subfasciatus* (Santos *et al.*, 2010). Recentemente duas LTPs, isoladas de sementes de café (*C. canephora*) e pimenta (*C. annuum*) também foram descritas como capazes de inibir a atividade das α -amilases de insetos e de mamíferos, respectivamente (Diz *et al.*, 2011; Zottich *et al.*, 2011). Neste trabalho relatamos pela primeira vez o potencial de AMPs relacionados à vicilinas com propriedades inibitórias de α -amilases. Fato este que corrobora com a multifuncionalidade dos AMPs isolados de plantas. A significação biológica dessa multifuncionalidade e os mecanismos que a levam a se estabelecer ainda não são claros. O esclarecimento desses mecanismos pode tornar-se uma etapa importante no estudo de proteínas envolvidas com defesa de plantas, favorecendo o possível desenvolvimento de métodos adequados para o controle de pragas e patógenos e o uso no controle de diversas doenças.

7. CONCLUSÕES

7 – Conclusões

- Após cromatografia de fase reversa em sistema HPLC da fração D2 foram obtidas sete frações, sendo as quatro primeiras compostas majoritariamente por proteínas de baixa massa molecular;
- Os peptídeos BcH4a e BcH4b, presentes na fração H4, ao serem submetidos ao sequenciamento amino terminal apresentaram homologia com vicilinas de diferentes espécies de plantas;
- Em uma concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ nenhuma das frações testadas foram capazes de inibir o crescimento das leveduras *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *C. tropicalis* e *K. marxianus*, sendo que a fração H1 não inibiu nem em uma concentração de $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$;
- A fração H2, na concentração de $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$, inibiu apenas o crescimento da levedura *S. cerevisiae*, em cerca de 20 %;
- A fração H3, na concentração de $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$, inibiu cerca de 50 % do crescimento da levedura *C. albicans*, 30 % do crescimento de *C. tropicalis* e 65 % do crescimento de *K. marxianus*;
- A fração H4, na concentração de $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$, inibiu cerca de 60 % do crescimento da levedura *C. albicans*, 40 % do crescimento de *C. tropicalis* e 72 % do crescimento de *K. marxianus*;
- As frações H3 e H4 induziram alterações morfológicas, como aglomeração celular e formação de pseudohifas, nas células das leveduras *C. albicans*, *C. tropicalis* e *K. marxianus*;
- As frações H3 e H4, na concentração de $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$, foram capazes de promover a permeabilização da membrana das células das leveduras *S.*

cerevisiae, *C. albicans* e *K. marxianus*, mas apenas a fração H3 foi capaz de promover a permeabilização da membrana das células da levedura *C. tropicalis*;

- Todas as frações testadas, na concentração de $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$, foram capazes de inibir a atividade da α -amilase salivar humana;
- Apenas a fração H4 foi capaz de inibir, cerca de 20 %, da atividade da α -amilase larval do intestino do inseto *C. maculatus*;
- As frações H3, H4 e H5, na concentração de $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$, foram capazes de inibir mais de 98 % da atividade da α -amilase larval do intestino do inseto *T. castaneum*, e a fração H7 inibiu cerca de 50 % dessa atividade;

8 - REFERÊNCIAS

8 – Referências

- Abe, J. I., Sidenius, U., Svensson, B. (1993). Arginine is essential for the α -amylase inhibitory activity of the α -amylase/subtilisin inhibitor (BASI) from barley seeds, *Biochem. J.* 293:51-155.
- Aerts, A. M., François, I. E. J. A., Meert, E. M. K., Li, Q. T., Cammue, B. P. A., Thevissen, K. (2007). The antifungal activity of Rs-AFP2, a plant defensin from *Raphanus sativus*, involves the induction of reactive oxygen species in *Candida albicans*. *J. Mol Microbiol Biotechnol.* 13: 24-37.
- Allen, G., (1989). Sequencing of proteins and peptides. In: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Elsevier, Bondon, R. H. e Knipferg, P. H., editors, 2^o edition.
- Alves, D. T., Vasconcelos, I. M., Oliveira, J. T. A., Farias, L. R., Dias, S. C., Chiarello, M. D., Maria-neto, S., Franco, O. L. (2009). Identification of four novel members of Kunitz-like α -amylase inhibitors family from *Delonix regia* with activity toward Coleopteran insects. *Pestic. Biochem. Phys.* 95: 166-172.
- Applebaum, S. W. (1964). The action pattern and physiological role of α -amylase in *Tenebrio* larval amylase. *J. Insect Physiol.* 10: 897-906.
- Benko-Iseppon, A. M., Galdino, S. L., Calsa, T. J., Kido, E. A., Tossi, A., Belarmino, L. C., Crovella, S. (2010). Overview on Plant antimicrobial peptides. *Curr. Protein. Pep. Sci.* 11: 181-188.
- Berre-Anton, L. V., Bompard-Gilles, C., Payan, F., Rouge, P. (1997). Characterization and functional properties of α -amylase inhibitor (α -AI) from Kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. *Biochem. Biophys. Acta.* 1343: 31-40.
- Berre-Anton, L. V., Nahoum, V., Payan, F. Rougé, P. (2000). Molecular basis for the specific binding of different α -amylase inhibitors from *Phaseolus vulgaris* seeds to the active site of α -amylase. *Plant. Physiol. Biochem.* 38: 657-665.
- Berrocal-Lobo, M., Segura, A., Moreno, M., López, G., Garcia-Olmedo, F. Molina, A. (2002). Snakin-2, an antimicrobial peptide from potato whose gene is locally

- induced by wounding and responds to pathogen infection. *Plant. Physiol.* 128: 951-961.
- Berrocal-Lobo, M., Molina, A., Rodríguez-Palenzuela, Pablo., García-Olmedo, F., Rivas, L. (2009). *Leishmania donovani*: thionins, plant antimicrobial peptides with leishmanicidal activity. *Exp. Parasitol.* 122(3):247-249.
- Bloch, C., Richardson, M. (1991). A new family of small (5kDa) protein inhibitor of insect α -amylases from seeds of sorghum (*Sorghum bicolor* L Moench) have sequence homologies with wheat α -purothionins. *FEBES Lett.* 279: 101-104.
- Bloch, J. E., Chevalier, C., Forest, E., Pebay-peryoula, E., Gautier, M. F., Joudrier, P., Pézolet, M e Marion, D. (1993). Complete amino acid sequence of puroindoline, a new basic and cysteine-rich protein with a unique tryptophan-rich domain, isolated from wheat endosperm by Triton X-114 phase partitioning. *FEBS Lett.* 329: 336-340.
- Bosland, P. W., Votava, E. (1999). Peppers: vegetable and spice *Capsicums*. Crop production science in horticulture 12. Wallingford: CAB. International, 204p.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Bradshaw, J. (2003). Cationic antimicrobial peptides: issues for potential clinical use. *BioDrugs.* 17: 233-240.
- Broekaert, W. F., Terras, F. R., Cammue, B., & Vanderleyden, J. (1990). An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. *FEMS microbiology letters*, 69: 55-59.
- Broekaert, W. F., Mariën, W., Terras, F. R. G., De Bolle, M. F. C., Proost, P., Van Damme, J., Dillen, L., Claeys, M., Rees, S. B., Vanderleyden, J. Cammue, B. P. A., (1992). Antimicrobial peptides from *Amaranthus caudatus* seeds with sequence homology to the cysteine/glycine-rich domain of chitin-binding proteins. *Biochem.* 31: 4308-4314.
- Cammue, B. P. A., De Bolle, M. F. C., Terras, F. R. G., Proost, P., Van Damme, J., Rees, S. B., Vanderley, J., Broekaert, W. F. (1992). Isolation and characterization of a novel class of plant antimicrobial peptides from *Mirabilis jalapa* L. seeds. *J. Biol. Chem.* 267: 2228-2233.

- Cammue, B. P. A., Thevissen, K., Hendriks, M., Eggermont, K., Goderis, I.J., Proost, P., *et al.*, (1995). A potent antimicrobial protein from onion seeds showing sequence homology to plant lipid transfer proteins. *Plant Physiol.* 109:445-455.
- Campos, F. A. P., Xavier-Filho, J., Silva, C. P., Ary, M. B. (1989). Resolution and partial characterization of proteinases and α -amylase from midguts of larvae of the bruchid beetle *Callosobruchus maculatus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 92: 51-57.
- Capocchi, A., Muccilli, V., Cunsolo, V., Saletti, R., Foti, S., Fontaninijk, D. (2013). A heterotetrameric α -amylase inhibitor from emmer (*Triticum dicoccon* Schrank) seeds. *Phytochem.* 1-9.
- Carvalho, A. O., Machado, O. L. T., Da Cunha, M., Santos, I. S., Gomes, V. M. (2001). Antimicrobial peptides and immunolocalization of a LTP in *Vigna unguiculata* seeds. *Plant. Physiol. Biochem.* 39(2): 137-146.
- Carvalho, S. I. C., Bianchetti, L. B., Bustamante, P. G., Silva, D. B. (2003). Catálogo de germoplasma de pimentas e pimentões (*Capsicum spp*) da Embrapa Hortaliças. Brasília: Embrapa Hortaliças. 49p.
- Carvalho, A. O., Gomes, V. M. (2009). Plant defensins prospects for the biological function and biotechnological properties. *Peptides.* 30: 1007-1020.
- Carvalho, H. H., Wiest, J. M., Cruz, F. T. (2010). Atividade antibacteriana *in vitro* de pimentas e pimentões (*Capsicum sp.*) sobre quatro bactérias toxinfecivas alimentares. *Rev. Bras. Pl. Med.* 12: 8-12.
- Chan, D. I., Prenner, E. J., Vogel, H. J. (2006). Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: structures and mechanisms of action. *Biochim Biophys Acta.* 1758: 1184–202.
- Chagolla-López, A., Blanco-Labra, A., Pathy, A., Sánchez, R., Pongor, S. (1994). A novel α -amylase inhibitor from Amaranth (*Amaranthus hypocondriacus*) seeds. *J. Biol. Chem.* 269:23675-23680.
- Connors, R., Konarev, A. V., Forsyth, J., Lovegrove, A., Marsh, J., Joseph_Horne, T., Shewry, P., Brady, R. L. (2007). *J. Biol. Chem.* 38:27760–27768.
- Cornelissen, B. J. C., Hooft Van Huijsduijnen, R. A. M., Bol, J. F. (1986). A tobacco mosaic virus-induced tobacco protein is homologous to the sweet-tasting protein thaumatin. *Nature.* 231: 531-532.

- Cruz, L. P., Ribeiro, S. F., Carvalho, A. O., Vasconcelos, I. M., Rodrigues, R., Cunha, M. D., Gomes, V. M. (2010). Isolation and partial characterization of a novel lipid transfer protein (LTP) and antifungal activity of peptides from chilli pepper seeds. *Protein and Pept. Lett.* 17:311-318.
- Dasgupta, P., Folwer, C. J. (1997). Chillies: from antiquity to urology. *J. Urol.* 80: 845-852.
- Derera, F. N., Nagy, N. e Hoxha, A. (2005). Condiment paprika research in Australia. *J. Bus. Chem.* 2: 4-18.
- Dhatwalia, V. K., Sati, O. P., Tripathi, M. K., Kumar, A. (2009). Isolation, characterization and antimicrobial activity at diverse dilution of wheat puroindoline protein. *World, J. Agric. Sci.* 5: 297-3000.
- Diz, M. S. S., Carvalho, A. O., Rodrigues, R., Neves-Ferreira, A. G. C., Da Cunha, M., Alves, E. W., Okorokova-Façanha, A. L., Oliveira, M. A., Perales, J., Machado, O. L. T., Gomes, V. M. (2006). Antimicrobial peptides from chili pepper seeds causes yeast plasma membrane permeabilization and inhibits the acidification of the medium by yeast cells. *Biochem. Biophys. Acta.* 1760: 1323-1332.
- Diz, M. S. S., Carvalho, A. O., Ribeiro, S. F. F., Da Cunha, M., Beltramini, L., Rodrigues, R., Nascimento, V. V., Machado, O. L. T., Gomes, V. M. (2011). Characterisation, immunolocalisation and antifungal activity of a lipid transfer protein from chili pepper (*Capsicum annuum*) seeds with novel α -amylase inhibitory properties. *Physiol. Plantarum.* 142: 233–246.
- Doane, W. W. (1969). *Amylase variants in Drosophila melanogaster*: linkage studies and characterization of enzyme extracts. *J. Exp. Zool.* 171:321.
- Duvick, J. P., Rood, T., Rao, A. G e Marshak, D. R. (1992). Purification and characterization of a novel antimicrobial peptides from maize (*Zea mays* L.) Kernels. *J. Biol. Chem.* 267: 18814-18820.
- Edman, P. (1950). Method for determination of amino acids sequence in peptides. *Acta. Chem. Scandinavia.* 28: 283:293.
- Egorov, Ts. A., Odintsova, T. I. (2012). Defense peptides of plant immunity. *Russian J. of Bioorganic Chem.* 38:1-9.

- Franco, O. L., Rigden, D. J., Melo, F. R., Bloch, C. JR., Silva, C. P. E Grossi de Sá, M. F. (2000). Activity of wheat alpha-amylase inhibitors towards bruchid alpha-amylases and structural explanation of observed specificities. *J. Biochem.* 267: 73 – 2166.
- Franco, O. L., Rigden, D. J., Melo, F. R., Grossi-de-Sá. (2002). Plant a-amylase inhibitors and their interaction with insect -amylases. Structure, function and potential for crop protection. *Eur. J. Biochem.* 269: 397-412.
- Games, P. D., Santos, I. S., Mello, E. O., Diz, M. S. S., Carvalho, A. O., Souza-Filho, G. A., Da Cunha, M., Vasconcelos, I. M., Ferreira, B. S., Gomes, V. M. (2008). Isolation, characterization and cloning of a cDNA encoding a new antifungal defensin from *Phaseolus vulgaris* L. seeds. *Peptides.* 29: 2090-2100.
- Garcia-Olmedo, F., Rodríguez-Palenzuela, P., Molina, A., Alamillo, J. M., López-Solanilla, E., Berrocal-Lobo, M., Poza-Carrión, C. (2001). Antibiotic activities of peptides, hydrogen peroxide and peroxyxynitrite in plant defence. *FEBS. Lett.* 498(2): 219 – 222.
- Gautier, M. F., Aleman, M. E., Guirao, A., Marion, D., Joudrier, P. (1994). *Triticum aestivum* puroindolines, two basic cystein-rich seed proteins: cDNA sequence analysis and development gene expression. *Plant. Mol. Biol.* 25: 43-57.
- Gerlach, J. Q., Bhavanandan, V. P., Haynes, P. A., Joshi, L. (2009). Partial characterization of a vicilin-like glycoprotein from seeds of flowering tobacco (*Nicotiana sylvestris*). *J. Bot.* 1-12
- Gomes, V. M., Blanco-Labra, A., Sales, M. P., Fernandes, K. V. S., Cordeiro, R. A., Xavier-Filho, J. (1997). Vicilin storage proteins from cowpea (legume) seeds inhibit fungal development. *J. Agric. Food. Chem.* 45: 4110-4115.
- Gomes, V. M., Okorokov, L. A., Rose, T. L., Fernandes, K. V. S., Xavier-Filho, J. (1998). Legume vicilins (7S storage globulins) inhibit yeast growth and glucose stimulated acidification of the medium by yeast cells. *Biochim. Biophys. Act.* 1379: 207-216.
- Gomes, C. E., Barbosa, A. E., Macedo, L. L., Pitanga, J. C., Moura, F. T., Oliveira, A. S., Moura, R. M., Queiroz, A. F., Macedo, F. P., Andrade, L. B., Vidal, M. S., Sales, M. P. (2005). Effect of trypsin inhibitor from *Crotalaria pallida* seeds on *Callosobruchus*

- maculatus* cowpea weevil and *Ceratitis capitata* fruit fly. *Plant. Physiol. Biochem.* 4312: 1095-1102.
- Gonçalves, L. S. A. (2010). Herança de caracteres agronômicos e da resistência ao Pepper yellow mosaic vírus em *Capsicum baccatum* var. *pendulum*. (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas). Campos dos Goytacazes, RJ, - centro de Ciências e Tecnologias Agrárias – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF.
- Grossi-de-Sá, M. F., Chrispeels, M. J. (1997). Molecular cloning of bruchid (*Zabrotes subfasciatus*) α -amylase cDNA and interactions of the expressed enzyme with bean amylase inhibitors. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 27: 271-281.
- Gupta, M., Sharma, P., Nath, A. K. (2012). Purification of a novel α -amylase inhibitor from local Himalayan bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds with activity towards bruchid pests and human salivary amylase. *J Food Sci Technol.* 1-8.
- Gvozdeva, E. L., Valueva, T. A., Mosolov, V. V. (1993). Enzymatic oxidation of bifunctional wheat inhibitor of subtilisin and endogenous α -amylase. *FEBS. Lett.* 334: 72 -74.
- Gwadz, R. W., Kaslow, D., Lee, J. Y., Maloy, W. L., Zasloff, M., & Miller, L. H. (1989). Effects of magainins and cecropins on the sporogonic development of malaria parasites in mosquitoes. *Infect. and immunity*, 57:2628-2633.
- Heidari, R., Zareae, S., Heidarizadeh, M. (2005). Extraction, purification, and inhibitory effect of α -amylase inhibitor from wheat (*Triticum aestivum* Var. Zarrin). *Pakistan J. of Nutri.* 4: 101-105.
- Hong, J. K., Jung, H. W., Kim, Y. J., Hwang, B. K. (2000). Peper gene encoding a basic class II chitinase is inducible by pathogen and ethephon. *Plant Sci.* 159: 139-145.
- Howard, L. T., Talcott, S. T., Brenes, C. H., Villalan, B. (2000). Changes in phytochemical and antioxidant activity of selected pepper cultivars (*Capsicum* species) as influenced by maturity. *J. Agric. Food. Chem.* 48: 1713-1720.
- Jennings, C., West, J., Waive, C., Craik, D., Anderson, M. (2001). Biosynthesis and insecticidal properties of plant cyclotides: the cyclic knotted proteins from *Oldenlandia affinis*. *Proc. Natl. Acad. Sci: USA.* 98: 10614-10619.

- Jenssen, H., Hamill, P., Hancock, R. E. W. (2006). Peptide antimicrobial agents. *Clin Microbiol Ver.* 19: 491-511.
- Jha, S., Chattoo, B. B. (2010). Expression of a plant defensin in rice confers resistance to fungal phytopathogens. *Transgenic. Res.* 19: 373-384.
- Jiménez, A. V. (2009). As enzimas presentes no trato digestivo dos insetos: um alvo susceptível de inibição. Tese (doutorado em Biologia Molecular) – Brasília, DF, - Instituto de Ciências Biológicas – Universidade de Brasília-UnB.
- Kadziola, A., Sogaard, M., Svensson, B., Haser, R. (1998). Molecular structure of a barley α -amylase inhibitor complex: implications for starch binding and catalysis. *J. Mol. Bio.* 278: 205-217.
- Kalve, N. D., Lomate, P. R., Hivrale, V. K. (2012). A proteinaceous thermo labile α -amylase inhibitor from *Albizia lebbek* with inhibitory potential toward insect amylases. *Arthro. Plant Interactions.* 6:213–220.
- Kamimori, H., Halla, K., Craik, D. J., Aguilar, M-I. (2005). Studies on the membrane interactions of the cyclotides kalata B1 and kalata B6 on model membrane systems by surface plasmon resonance. *Anal. Biochem.* 337: 149-153.
- Kappel, V. D. (2007). Avaliação das propriedades antioxidante e antimicrobiana de extratos de *C. baccatum* L. var. *pendulum*. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Bioquímica) Porto Alegre, RS, - Instituto de Ciências Básicas da Saúde – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS.
- Karshikov, A., Berendes, R., Burger, A., Cavalié, A., Lux, H-D., Huber, R. (1992). Annexin V membrane interaction: an electrostatic potential study. *Eur Biophys J.* 20:337-44.
- Krishna, S. S., Saxena, K. (1962). Digestion and absorption of food in *Tribolium castaneum* (Herbst). *Physiol. Zool.* 53: 66-78.
- Kluh, I., et al. (2005). Inhibitory specificity and insecticidal selectivity of alpha-amylase inhibitor from *Phaseolus vulgaris*. *Phytochem.* 66(1): 31-9.
- Lee, S. C., Hong, J. K., Kim, Y. J., Hwang, B. K. (2000). Peper gene encoding thionin is differentially induced by pathogens, ethylene and methyl jasmonate. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 56: 207-216.

- Leitner, M., Boland, W., Mithofer, A. (2005). Direct and indirect defences induced by piercing-sucking and chewing herbivores in *Medicago truncatula*. *New Phytol.* 167: 597-606.
- Lemos, F. J. A., Campos, F. A. P., Silva, C. P., Xavier-Filho., J. (1990). Proteinases and amylases of larval midgut of *Zabrotes subfasciatus* reared on cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds. *Entomologia Experimentalis et Applicata*.56: 219-227.
- Lipkin, A., Anisimova, V., Babakov, A., Krause, E., Bienert, M., Grishin, E., Egorov, T. (2005). An antimicrobial peptide Ar-AMP from Amaranth (*Amaranthus retrofractus* L.) seeds. *Phytochem.* 66: 2426-2431.
- Ma, D. Z., Wang, H. X., Ng, T. B. (2009). A peptide with potent antifungal and antiproliferative activities from Nepalese large red beans. *Peptides.* 30: 2089-2094.
- Macedo, M. L. R. et al. (1995). Purification and properties of storage proteins (vicilins) from cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds which are susceptible or resistant to be bruchid beetle. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 28: 183-190.
- Marcos, J. F., Munoz, A., Pérez-Payá, E., Misra, S., López-García, B. (2008). Identification and rational design of novel antimicrobial peptides for Plant Protection. *Annu. Rev. Phytopathol.* 46: 273-301.
- Marcus, J. P., Goulter, K. C., Green, J. L., Harrison, S. J., Manners, J. M. (1997). Purification, characterization and cDNA cloning of an antimicrobial peptide from *Macadamia integrifolia*. *Eur. J. Biochem.* 244: 743-739.
- Marcus, J. P., Green, J. L., Goulter, K. C., Manners, J. M. (1999). A family of antimicrobial peptides is produced by processing of a 7S globulin protein in *Macadamia integrifolia* kernels. *The Plant J*, 19: 699-710.
- Markwick, N. P., Laing, W. A., Christeller, J. T., Reid, S. T., Newton, M. R. (1996). Amylase activities in larval midgut extracts from four species of leptopectera (75 Tortricidae and Gelechiidae): response to pH and to inhibitors from wheat, barley, kidney bean, and *Streptomyces*. *J. Econ. Entomol.* 89: 39-45.
- McManus, A. M., Nielsen, K. J., Marcus, J. P., Harrison, S. J., Green, J. L., Manners, J. M., Craik, D. J. (1999). MiAMP1, a novel protein from *Macadamia integrifolia* adopts a Greek key beta-barrel fold unique amongst plant antimicrobial proteins. *J. Mol. Biol.* 293: 629-638.

- Mehrabadi, M., Bandani, A. R., Mehrabadi, R., Alizadeh, H. (2012). Inhibitory activity of proteinaceous α -amylase inhibitors from Triticale seeds against *Eurygaster integriceps* salivary α -amylases: Interaction of the inhibitors and the insect digestive enzymes. *Pest. Biochem. and Physiol.* 102:220–228.
- Mello, E. O., Ribeiro, S. F. F., Carvalho, A. O., Santos, I. S., Da Cunha, M., Santa-Catarina, C., Gomes, V. M. (2011). Antifungal activity of *PvD1* defensin involves plasma membrane permeabilization, inhibition of médium acidification, and induction of ROS in fungi cells. *Curr. Microbiol.* 62: 1209-1217.
- Melo, F. R., Sales, M. P., Silva, L. S., Franco, O. L., Bloch, C., Ary, M. B. (1999). α -Amylase inhibitors from cowpea seeds. *Protein Pept. Lett.* 6:387–392.
- Mendiola-Olava, E., Valencia-Jiménez, A., Valdés-Rodríguez, S., Délano-Frier, J., Blanco-Labra, A. (2000). Digestive amylase from the larger grain borer, *Prostephanus truncatus* horn. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochem Mol Biochem.* 126: 425-433.
- Miteva, M., Andersson, M., Karshikoff, A., Otting, G. (1999). Molecular electroporation: a unifying concept for the description of membrane pore formation by antibacterial peptides, exemplified with NK-lysin. *FEBS Lett.* 462:155-15.
- Mithöfer, A., Boland, W. (2012). Plant defense against herbivores: chemical aspects. *Annu. Rev. Plant Biol.* 63: 431-450.
- Moreira, G. R., Calimam, F. R. B., Silva, D. J. H., Ribeiro, C. S. C. (2006). Espécies e variedades de pimenta. *Informe Agropecuário.* 27: 16-29.
- Moscone, E. A., Scaldaferrro, M. A., Grabiele, M., Cechinni, M. N., García, Y. S., Jarret, R., Daviña, J. R., Ducasse, D. A., Barboza, G. E., Ehrendorfer, F. (2007). The evolution of chilli pepers (*Capsicum* – Solanaceae): a cytogenetic perspective. *Acta Horticul.* 745: 137-169.
- Murao, S., Goto, A., Matsui, Y., Ohyama, K. (1980). New proteinous inhibitor (Haim) of animal α -amylase from *Streptomyces griseosporus* YM-25. *Agric. Biol. Chem.* 44: 1679-1681.
- Nascimento, V. V. (2002). Caracterização de polipeptídeo inibidor de α -amilase isolado das sementes de *Ricinus communis*. Monografia para obtenção de graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Norte Fluminense.

- Nascimento, V. V. (2009). Caracterização de albuminas 2S de *Ricinus communis* L como inibidores de α -amilase e relação estrutura-atividade de suas principais isoformas, Ric c 1 e Ric c 3. Tese (doutorado em Biociências e Biotecnologia) Campos dos Goytacazes, RJ, - centro de Biociências e Biotecnologia – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF.
- Nascimento, V. V., Castro, H. C., Abreu, P. A., Oliveira, A. E. A., Fernandez, J. H., Araújo, J. S., Machado, O. L. T. (2011). In silico structural characteristics and α -amylase inhibitory properties of Ric c 1 and Ric c 3, Allergenic 2S Albumins from *Ricinus communis* seeds. *J. Agric. Food Chem.* 59:4814–4821
- Nijnik, A., Hancock, R. E. W. (2009). Host defence peptides: antimicrobial and immunomodulatory activity and potential applications for tackling antibiotic resistant infections. *Emerging Health Threats Journal.* 2:1-7.
- Nolde, S. B., Vassilevski, A. A., Rogozhin, E. A., Barinov, N. A., Balashova, T. A., Samsonova, O. V., Baranov, V. V., Feofanov, A. V., Egorov, T. A., Arseniev, A. S., Grishin, E. V. (2011). *J. Biol. Chem* 286:25145–25153.
- Ohtani, S., Okada, T., Yoshizumi, H e Kagamiyama, H. (1977). Complete primary structures of two subunits of purothionin A, a lethal protein for brewer's yeast from wheat flour. *J. Bio. Chem.* 250: 4007-4020.
- Ohtsubo, K., Richardson, M. (1992). The amino acid sequence of a 20 kDa bifunctional subtilisin/ α -amylase inhibitor from grain of rice (*Oryza sativa* L.) seeds. *FEBS. Lett.* 309: 68-72.
- Oppert, B., Morgan, T. D., Hartzler, K., Lenaric, B., Galesa, K., Brzin, J., Turk, V., Yoza, K., Ohtsub, K., Kramer, K. J. (2003). Effects of proteinase inhibitors on digestive proteinases and growth of the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Biochem. Physiol.* 134: 481-490.
- Osborn, R. W., De Samblanx, G. W., Thevissen, K., Goderis, I., Torrenkes, S., Van Leuven, F. V. (1995). Isolation and characterization of plant defensins from seeds of Asteraceae, Hippocastanaceae and Saxifragaceae. *FEBS Lett.* 368: 257-262.
- Papo, N., Shai, Y. (2002). Exploring peptide membrane interaction using surface plasmon resonance: differentiation between pore formation versus membrane disruption by lytic peptides. *Biochemistry.* 42: 458–66.

- Patel, S. U., Osborn, R., Rees, S., Thornton, J. M. (1998). Structural studies of *Impatiens balsamina* antimicrobial protein (Ib-AMP1). *Biochemistry*. 37: 983-990.
- Payan, F. (2004). Structural basis for the inhibition of mammalian and insect α -amylases by plant protein inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta*. 1996: 171-180.
- Pelegri, P. B., Lay, F. T., Murad, A. M., Anderson, M. A., Franco, O. L. (2008). Novel insights on the mechanism of action of α -amylase inhibitors from the plant defensin family. *Proteins*. 73: 719-729.
- Pelegri, P. B., Farias, L. R., Saude, A. C., Costa, F. T., Bloch, C., Silva, L. P., Oliveira, A. S., Gomes, C. E. M., Sales, M. P., Franco, O. L. (2009). A novel antimicrobial peptide from *Crotalaria pallida* seeds with activity against human and phytopathogens. *Curr. Microbiol.* 59: 400-404.
- Peters, B. M., Shirliff, M. E., Jabra-Rizk, M. A. (2010). Antimicrobial peptides: primeval molecules or future drugs? *PLoS. Pathog.* 6 (10).
- Pichersky, E., Lewinsohn, E. (2011). Convergent evolution in plant specialized metabolism. *Annu. Rev. Plant Biol.* 62: 549-66.
- Pokorny, A., Birkbeck, T. H., Almeida, P. F. F. (2002). Mechanism and kinetics of d-lysin interaction with phospholipid vesicles. *Biochemistry*. 41: 11044-56.
- Pokorny, A., Almeida, P. F. F. (2004). Kinetics of dye efflux and lipid flip-flop induced by d-lysin in phosphatidylcholine vesicles and the mechanism of graded release by amphipathic, α -helical peptides. *Biochemistry*. 43:8846-57.
- Porto, W. F., Silva, O. N., Franco, O. L. (2012). Prediction and rational design of Antimicrobial Peptides. *Protein Structure*, Dr. Eshel Faraggi. 377-396.
- Reifshneider, F. J. B. (2000). *Capsicum*. Pimentas e pimentões no Brasil. Brasília, DF: Embrapa. 113p.
- Ribeiro, S. F. F., Carvalho, A. O., Da Cunha, M., Rodrigues, R., Melo, V. M. M., Vasconcelos, I. M., Melo, E. J. T., Cruz, L. P., Gomes, V. M. (2007). Isolation and characterization of novel peptides from chilli pepper seeds: antimicrobial activities against pathogenic yeasts. *Toxicon*. 50: 600-611.
- Ribeiro, S. F. F. (2011) Caracterização e atividade antifúngica das proteínas *CaTi* e *Ca-Alb* de sementes de pimenta (*Capsicum annum* L): potencial antimicrobiano sobre leveduras patogênicas. Tese apresentada para obtenção do grau de Doutor.

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campos dos Goytacazes-RJ.

- Ribeiro, S. F. F., Silva, M. S., Da Cunha, M., Carvalho, A. O., Dias, G. B., Rabelo, G., Mello, E. O., Santa-Catarina, C., Rodrigues, R., Gomes, V. M. (2012). *Capsicum annuum* L. trypsin inhibitor as a template scaffold for new drug development against pathogenic yeast. *Antonie van Leeuwenhoek (Gedruckt)*, 101:657-670.
- Ristori, C. A., Pereira, M. A. S., Gelli, D. S. (2002). O efeito da pimenta do reino moída frente a contaminação in vitro com *Salmonella rubislaw*. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*. 62(2): 131-133.
- Rodenburg, A. J. C., West, C. E., Hovenier, R., Beynen, A. C. (1995). Evaluation of a two-generation rat model for vitamin A deficiency and the inter-relationship with iron metabolism. *Br. J. Nutr.* 74: 689-700.
- Rose, T. L., Conceição, A. S., Xavier-Filho, J., Okorokov, L. A., Fernandes, K. V. S., Marty, F., Marty-Mazars, D., Carvalho, A. O., Gomes, V. M. (2003). Defense proteins from *Vigna unguiculata* seed exudates: characterization and inhibitory activity against *Fusarium oxysporum*. *Plant Soil*. 286: 181-191.
- Sales, P. M., Souza, P. M., Simeoni, L. A., Magalhães, P. O., Silveira, D. (2012). - Amylase inhibitors: a review of raw material and isolated compounds from plant source. *J Pharm Pharmaceut Sci*. 15: 41-183.
- Santos, I. S., Carvalho, A. O., Filho, G. A. S., Nascimento, V. V., Machado, O. L. T., Gomes, V. M. (2010). 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*. 71: 8-15.
- Schagger, H., Von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166: 368-379.
- Schimoler-O'Rourke, R., Richardson, M., Selitrennikoff, C. P. (2001). Zeamatin inhibits trypsin and α -amylase activities. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2365- 2366.
- Schitteck, B., Hipfel, R., Sauer, B., Bauer, J., Kalbacher, H., Stevanovic, S., et al. (2001). Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. *Nat. Immunol.* 2:1133-113.

- Schrader-Fischer, G e Apel, K. (1994). Organ-specific expression of highly divergent thionin variants that are distinct from the seed-specific crambin in the crucifer *crambe abyssinica*. *Mol. Gen. Genet.* 245: 380-389.
- Segura, A., Moreno, M., Madueño, F., Molina, A e García-Olmedo, F. (1999). Snakin-1, a peptide from potato that is active against plant pathogens. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12: 16-23.
- Sevensson, B., Kenji, F., Nielsen, P. K., Bonsager, B. C. (2004). Proteinaceous α -amylase inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta.* 1696: 145-156.
- Shai, Y. (1999). Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by α -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim Biophys Acta.* 1462:55–70.
- Shin, R., Lee, G. J., Park, C. J., Kim, T. Y., You, J. S., Nam, Y. W., Paek, K. H. (2001). Isolation of pepper mRNAs differentially expressed during the hypersensitive response to tobacco mosaic virus and characterization of a proteinase inhibitor gene. *Plant Sci.* 161: 727-737.
- Silano, V., Furia, M., Gianfreda, L., Macri, A., Palescandolo, R., Rab, A., Scard, V., Stella, E., Valfre, F. (1975). Inhibition of amylases from different origins by albumins from the wheat kernel. *Biochim. et Biophys. Acta – Enzymol.* 391: 170-178.
- Silva, O. N., Mulder, K. C., Barbosa, A. A., Otero-Gonzalez, A. J., López-Abarategui, C., Dias, S. C., Rezende, T. M., Franco, O. L. (2011). Exploring the pharmacological potential of promiscuous host-defense peptides: from natural screenings to biotechnological applications. *Front Microbiol.* Vol.2.
- Silva, F. P., Machado, M. C. C. (2012). Antimicrobial peptides: Clinical relevance and therapeutic implications. *Peptides.* 36: 308–314.
- Silverstein, K. A., Moskal, W. A., Jr., Wu, H. C., Under wood, B. A., Graham, M. A., Town, C. D., Vanden., Bosch, K. A. (2007). Small cysteine-rich peptides resembling antimicrobial peptides have been underpredicted in plants. *Plant J.* 51:262–280.
- Smith, R., P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Maallia, A. K., Garther, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Oslon, B. J., Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150:76-85.

- Soko evi, A., Han, Sigeng., Engels, J. W. (2011). Biophysical characterization of α -amylase inhibitor Parvulostat (Z-2685) and comparison with Tendamistat (HOE-467). *Biochimica et Biophysica Acta*. 1814:1383–1393.
- Steffen, H., Reig, S., Wiedemann, I., Kalbacher, H., Deeg, M., Sahl, H. G., Peschel, A., Götz, F., Garbe, C., Schitteck, B. (2006). Naturally processed dermicidin-derived peptides do not permeabilize bacterial membranes and kill microorganisms irrespective of their charge. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 2608-2620.
- Taylor, R. H., Acland, D. P., Attenborough, S., Cammue, B. P., Evans, I. J., Osborn, R. W., Ray, J. A., Rees, S. B e Broekaert, W. F. (1997). A novel family of small cysteine-rich antimicrobial peptides from seed of *Impatiens balsamina* is derived from a single precursor protein. *J. Biol. Chem.* 272: 24480-24487.
- Tavares, L. S., Santos, M. O., Viccini, L. F., Moreira, J. S., Miller, R. N. G e Franco, O. L. (2008). Biotechnological potential of antimicrobial peptides from flowers. *Peptides*. 29: 1842-1851.
- Teixeira, V., Feio, M. J., Bastos, M. (2012). Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Prog in Lipid Research*. 51:149-177.
- Terras, F. R. G., Torrekens, S., Van Leuven, F., Osborn, R. W., Vandeleyden, J., Cammue, B. P. A. e Broekaert, W. F. (1992). A new family of basic cysteine-rich plant antifungal proteins from Brassicaceae species. *FEBS. Lett.* 316(3): 233-240.
- Thevissen, K., Terras, F. R. G. e Broekaert, W. F. (1999). Permeabilization of fungal membranes by plant defensins inhibits fungal growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 5451-5458.
- Thevissen, K., Cammue, B. P. A, Lemaire, K., Winderickx, J., Dickson, R. C., Lester, R. L., Ferket, K. K. A., Even, F. V., Parret, A. H. A., Broekaert, W. F. (2000). A gene encoding a sphingolipid biosynthesis enzyme determines the sensitivity of *Sacharomyces cerevisiae* to na antifungal plant defensin from dahlia (*Dahlia merckii*). *P. Natl. Acad. Sci.* 97:9535-9536.
- Thevissen, K., Ferket, K. K. A., François, I. E. J. A. e Cammue, B. P. A. (2003a) Interactions of antifungal plant defensins with fungal membrane components, *Peptides*. 24:1705-1712.

- Thevissen, K., François, I. E. J. A., Takemoto, J. Y., Ferket, K. K. A., Meert, E. M. K. e Cammue, B. P. A. (2003b) DmAPM1, an antifungal plant defensin from dahlia (*Dahlia merckii*), interacts with sphingolipids from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Let.*, 226:169-173.
- Thevissen, K., Warnecke, D. C., François, I. E. J. A., Leipelt, M., Heinz, E., Ott C, Zähringer, U., Thomma, B. P. H. J., Ferket, K. K. A., Cammue, B. P. A., (2004). Defensins from insects and plants interact with fungal glucosylceramides. *J. Biol. Chem.*, 279: 3900-3905.
- Thevissen, K., François, I. E. J. A., Sijtsma, L., Van Amerongen, A., Schaaper, W. M. M., Meloen, R., Posthuma-trumpie, T., Broekaert, W. F., Cammue, B. P.A. (2005). Antifungal activity of synthetic peptides derived from *Impatiens balsamina* antimicrobial peptides Ib-AMP1 e Ib-AMP4. *Peptides*. 26: 1113-1119.
- Titarenko, E., Chrispeels, M. J. (2000). cDNA cloning, biochemical characterization and inhibition by plant inhibitors of the alpha-amylases of the Western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30: 979–990.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76:4350-4354.
- Tsybina, T. A., Dunaevskii, Ya .E., Musolyamov, A. Kh., Egorov, Ts. A., Belozerskii, M. A. (2001). *Biochem.* 66:1157–1164.
- Vieira. G. C. (2011). Peptídeos antimicrobianos de sementes de pimenta do gênero *Capsicum*: atividade antimicrobiana e inibidora de -amilase. Monografia para obtenção de graduação em Ciências Biológicas. Campos dos Goytacazes, RJ, - centro de Biociências e Biotecnologia – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF.
- Vigers, A., Roberts, W., Sellitrennikoff, C. P. (1991). A new family of plant antifungal proteins. *Mol. Plant. Microb.* 4: 315-323.

- Vijayan, S., Imani, J., Tanneru, K., Guruprasad, L., Kogel, K. H., Kirti, P. B. (2012). 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*. 33:220-229.
- Yadav, S., Tomar, A. K., Jithesh, O., Khan, M. A., Yadav, R. N., Srinivasan, A., Singh, T., Yadav, S. (2011). Purification and Partial characterization of low molecular weight vicilin-Like glycoprotein from the Seeds of *Citrullus lanatus*. *Protein J*. 30:575–580.
- Yamagata, H., Kunimatsu, K., Kamasaka, H., Kuramoto, T., Iwasaki, T. (1998). Rice bifunctional α -amylase/subtilisin inhibitor: characterization, localization, and changes in developing and germinating seeds. *Biosc. Biotechnol. Biochem*. 62:978–985.
- Yamaguchi, S., Huster, D., Waring, A., Lehrer, R. I., Kearney, W., Tack, B. F., et al. (2001). Orientation and dynamics of an antimicrobial peptide in the lipid bilayer by solid-state NMR spectroscopy. *Biophys J*. 81:2203–14.
- Yeaman, M. R., Yount, N. Y. (2003). Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol Ther*. 55:27–55.
- Yetter, M. A., Saunders, R. M., Boles, H. P. (1969). α -Amylase inhibitor from wheat kernels as factor in resistance to postharvest insects. *Cereal. Chem*. 53: 243-244.
- Wagner, C. M. (2003). Variabilidade e base genética da pungência e caracteres do fruto. Implicações no melhoramento genético de uma população de *Capsicum annum* L. Tese (Doutorado em Agronomia), Escola superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ-USP) – Piracicaba – SP, 104p.
- Wang, P., Bang, J-K., Kim, H. J., Kim, J-K., Kim, Y., Shin, S. Y. (2009). Antimicrobial specificity and mechanism of action of disulfite-removed linear analogs of the plant-derived Cys-rich antimicrobial peptide IB-AMP1. *Peptides*. 30: 2144-2149.
- Wisessing, A., Engkagul, A., Wongpiyasatid, A., Choowongkomon, K. (2010). Biochemical characterization of the α -Amylase inhibitor in mungbeans and Its application in inhibiting the growth of *Callosobruchus maculatus*. *J. Agric. Food. Chem*. 58: 2131-2137.

- Zeitler, B., Bernhard, A., Meye, H., Sattler, M., Koop, H., Lindermayr, C. (2013). Production of a de-novo designed antimicrobial peptide in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Mol Biol*.81: 259–272.
- Zottich, U., Da Cunha, M., Carvalho, A. O., Dias, G. B., Silva, N. C. M., Santos, I. S., Nascimento, V. V., Miguel, E. C., Machado, O. L. T., Gomes, V. M. (2011). Purification, biochemical characterization and antifungal activity of a new lipid transfer protein (LTP) from *Coffea canephora* seeds with α -amylase inhibitor properties. *Biochim.t Biophys. Acta*. 1810(4): 375-383.