

RUBENS DANIEL MISERANI MAGALHÃES

**PROSPECÇÃO EM FOLHAS DE PIMENTÃO 'SUNSHINE' DE
PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS COM AÇÃO CONTRA
FITOPATÓGENOS E ESTRUTURAÇÃO DO BANCO DE DADOS SOBRE
DEFENSINAS DefDB**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica Agrícola, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2010

RUBENS DANIEL MISERANI MAGALHÃES

**PROSPECÇÃO EM FOLHAS DE PIMENTÃO 'SUNSHINE' DE
PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS COM AÇÃO CONTRA
FITOPATÓGENOS E ESTRUTURAÇÃO DO BANCO DE DADOS SOBRE
DEFENSINAS DefDB**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica Agrícola, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

APROVADA: 27 de janeiro de 2010.

Prof. Marcelo Matos Santoro
(Coorientador)

Prof. Leandro Licursi de Oliveira
(Coorientador)

Dra. Meire de Oliveira Barbosa

Profa. Valéria Monteze Guimarães

Prof.^a Maria Cristina Baracat Pereira
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Deus alegre e feliz, que tem abençoado tanto a minha vida com conhecimento, pessoas, bens materiais, esperança, sonhos, fé e amor, “principalmente o amor”. Espero que nesse trabalho exista algo que Lhe trace um sorriso no rosto.

Às pessoas que são presentes de Deus na minha vida, Manoel A. Magalhães, Daisy M. M. Magalhães, T. Gladys M. Magalhães, Daisy M. Magalhães, Eliciane C. Mattos, obrigado pelo apoio e confiança, minha vida seria muito escura sem vocês.

À Professora M. Cristina Baracat Pereira pela confiança e amizade. Obrigado por me ensinar que podemos voar com carinho e respeito.

Aos meus Co-orientadores, Prof^ª. Flávia M. L. Passos, Prof. Leandro L. de Oliveira pelas colaborações valiosas, e principalmente ao Prof. Marcelo M. Santoro, também pelo seu apoio e amizade.

Aos meus queridos amigos Meire, Samuel, Natássia, Jacks, Pedro Henrique, Murilo, Pedro Augusto, Bruna, Saulo, Rogéria, Denise, Ana Ermelinda, Pastor Jonny, Jerusa, Ellen pelo apoio, pelos momentos felizes, pelo sorriso inspirador e pela colaboração no meu crescimento como pessoa durante essa fase da minha vida.

Aos meus demais colegas do Laboratório de Proteômica e Bioquímica de Proteínas, Marcos, Hebréia, Tânus, Nayara, Lanna, Patrícia, Fabiano, Mariana, Meire Sanny, pelos conselhos e ensinamentos.

Aos meus Mestres, que me ensinaram valiosas lições descritas em livros e fora deles.

Ao apoio do governo através dos órgãos financiadores e da própria Universidade Federal de Viçosa, tornando possível as atividades de ensino e pesquisa desenvolvidas durante esse período, agradeço às pessoas envolvidas em todo o processo, especialmente ao Eduardo, pela simpatia e prontidão em atender todas as necessidades dos estudantes da pós-graduação em Bioquímica Agrícola.

Cavaleiros de Deus...
Guardem suas armas...
Vivendo a vida pela fé(!!!)

SUMÁRIO

Página

LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
CAPÍTULO I –ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIFÚNGICA DE FRAÇÕES PEPTÍDICAS DE FOLHAS DE PIMENTÃO ‘SUNSHINE’	01
1. RESUMO.....	01
2. INTRODUÇÃO.....	03
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	05
3.1. Peptídeos Antimicrobianos (AMPs).....	05
3.2. Peptídeos Antimicrobianos em Plantas.....	06
3.3. Mecanismos de Ação dos Peptídeos Antimicrobianos.....	07
3.4. Fitopatógenos-teste.....	12
3.5. Espectrometria de Massa Aplicada ao Estudo de Peptídeos Antimicrobianos – Importância e Dificuldades.....	14
3.6. Estudo de Peptídeos Antimicrobianos para Aplicações Futuras.....	14
4. OBJETIVOS.....	15
4.1. Objetivo Geral.....	15
4.2. Objetivos Específicos.....	15
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
5.1. Plantio das Sementes de Pimentão e Armazenamento das Folhas..	16
5.2. Preparo de Extratos de Folhas de Pimentão.....	16
5.2.1. Obtenção de Extrato Solúvel (ES).....	16
5.2.2. Obtenção de Extrato de Parede Celular (EP).....	17
5.3. Purificação dos Peptídeos.....	17
5.3.1. Fracionamento com Sulfato de Amônio.....	17
5.3.2. Aquecimento Seletivo.....	17
5.3.3. Ultrafiltração.....	17
5.3.4. Liofilização.....	18

5.3.5. Cromatografia de Exclusão Molecular.....	18
5.3.6. Cromatografia Hidrofóbica.....	19
5.3.7. Cromatografia de Fase Reversa em Coluna C ₁₈	19
5.3.8. Cromatografia de Fase Reversa em Coluna C ₄	20
5.4. Espectrometria de Massa (MS).....	20
5.4.1. Seleção das Frações.....	20
5.4.2. Proteólise Limitada.....	20
5.4.3. Modelos e Ajustes dos Equipamentos.....	21
5.5. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida de Três Fases na Presença de Tricina.....	21
5.6. Teste de Atividade Antimicrobiana.....	22

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
6.1. Ajustes do Protocolo de Extração de Peptídeos.....	23
6.2. Teste de Atividade Antibacteriana.....	30
6.3. Protocolo de Extração Rápida.....	32
6.3.1. Purificação dos Peptídeos de Folhas de Pimentão.....	33
6.4. Novo Plantio e Extração de Material Vegetal.....	41
7. CONCLUSÃO.....	47
8. PERSPECTIVAS.....	49

**CAPÍTULO II – NOVA BASE DE DADOS SOBRE DEFENSINAS:
CONSTRUÇÃO DO BANCO DE DADOS DefDB.....**

	51
1. RESUMO.....	51
2. INTRODUÇÃO.....	52
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	54
3.1. Defensinas.....	54
3.1.1. Defensinas de Plantas.....	55
3.2. Mecanismos de Atuação.....	56
3.3. Banco de Dados (BD).....	57
3.3.1. Histórico.....	57
3.3.2. Definição de Bancos de Dados.....	59
3.3.3. Sistema Gerenciador de Bancos de Dados.....	59
3.3.4. Vantagens em se Construir Bancos de Dados.....	60
3.3.5. Modelo de Dados.....	62
3.4. Bancos de Dados já Disponíveis.....	65
3.4.1. UniProt.....	65
3.4.2. PhytAMP.....	67
3.4.3. Defensin Knowledgebase.....	67
3.4.4. Outros Bancos de Dados.....	69
3.4.4.1. Antimicrobial Peptide Database (APD).....	69
3.4.4.2. ANTIMIC Database.....	69
4. OBJETIVOS.....	71
4.1. Objetivo Geral.....	71
4.2. Objetivos Específicos.....	71

5. PROPOSTA PRELIMINAR E FUNCIONALIDADE.....	72
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	73
6.1. Construção e Conteúdo.....	73
6.2. Bancos de Dados-Fonte.....	73
6.3. Bases de Dados Criadas no DefDB.....	73
6.4. Programas.....	75
6.4.1. Programas Exploradores.....	76
6.4.1.1. Unibusca.....	76
6.4.1.2. KDBbusca.....	76
6.4.1.3. Phybusca.....	77
6.4.2. Programa Organizador.....	77
6.4.2.1. DefDB_Org.....	77
6.4.3. Programa Complementar.....	78
6.4.3.1. pl_resAA.....	78
6.5. Descrição da Página de Acesso na Web.....	79
7. POTENCIALIDADE E VALIDAÇÃO DO USO DO DefDB.....	84
8. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	88
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89

CAPÍTULO I

Figura 1-	Ilustração dos modelos de permeabilização e desestabilização das membranas celulares por AMPs.....	09
Figura 2-	Possíveis mecanismos de ação dos AMPs (Retirado de West <i>et al.</i> , 2006).....	10
Figura 3-	Ilustração dos possíveis mecanismos de ação dos AMPs no interior da célula.....	10
Figura 4-	Etapas de extração e de purificação de peptídeos de folhas totalmente expandidas de pimentão ('Sunshine').....	24
Figura 5-	Cromatografia de exclusão molecular do Extrato de Solúvel (ES) de folhas totalmente expandidas de pimentão 'Sunshine' em Sephadex G-10.....	25
Figura 6-	SDS-Tricina PAGE de frações recuperadas da cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-10 (Figura 5).....	25
Figura 7-	Cromatografia de exclusão molecular do Extrato Solúvel (ES) de folhas totalmente expandidas de pimentão 'Sunshine' em Sephadex G-50.....	26
Figura 8-	Análises espectrométricas (MS) do Extrato Solúvel (ES) de folhas totalmente expandidas de pimentão 'Sunshine' após Sephadex G-50.....	27
Figura 9-	Cromatografia de fase reversa da fração ESP7R3 (C18) e da fração Pico 10 (C4).....	28
Figura 10-	Análises espectrométricas (MS) de frações tripsinizadas obtidas após separação em C18-RP-HPLC e C4-RP-HPLC...	29
Figura 11-	Cromatografia hidrofóbica em Phenyl Sepharose do Extrato de Parede Celular (EP) de folhas totalmente expandidas de pimentão 'Sunshine'.....	30
Figura 12-	Inibição no crescimento de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> e de <i>Ralstonia solanacearum</i> por frações coletadas após cromatografia de exclusão molecular (ES, Figura 7) e hidrofóbica (EP, Figura 11).....	31
Figura 13-	Etapas de extração e de purificação otimizada de peptídeos presentes em folhas totalmente expandidas de pimentão 'Sunshine'.....	32

Figura 14-	Cromatografia de exclusão molecular em HPLC (coluna Protein Pak 60A) do ES após ultrafiltração (Figura 13).....	33
Figura 15-	Cromatografia de exclusão molecular em HPLC (coluna Protein Pak 60A) do EP após ultrafiltração (Figura 13).....	34
Figura 16-	Inibição no crescimento de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> e de <i>Ralstonia solanacearum</i> por frações eluídas da cromatografia de exclusão molecular (ES, Figura 14 e EP, Figura 15).....	34
Figura 17-	Cromatografias de exclusão molecular em HPLC (coluna Protein Pak 60A) do ES após ultrafiltração (Figura 13) e delimitação de ES-G1 e ES-G2.....	35
Figura 18-	Cromatografias de exclusão molecular em HPLC (coluna Protein Pak 60A) do EP após ultrafiltração (Figura 13) e delimitação dos grupos EP-GI a EP-GV.....	35
Figura 19-	Recromatografia de exclusão molecular em HPLC de ES-G1	36
Figura 20-	Recromatografias de exclusão molecular em HPLC de EP-GI (vermelho), EP-GII (azul), EP-GIII (verde) e EP-GIV (preto)...	36
Figura 21-	Cromatografias em C4-RP-HPLC, de ES-G1-A e ES-G1-B após recromatografia de exclusão molecular (Figura 19).....	37
Figura 22-	Cromatografias em C4-RP-HPLC, de EP-GI, EP-GII, EP-GIII e EP-GIV após cromatografia de exclusão molecular (Figura 18).....	38
Figura 23-	Inibição das bactérias <i>Ralstonia solanacearum</i> (A) e <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (B) pelas frações ES e EP, respectivamente, enriquecidas de peptídeos, providas de diversas etapas de fracionamento.....	40
Figura 24-	Cromatografia de fase reversa utilizando equipamento HPLC, coluna C4 de ES (A) e EP (B).....	42
Figura 25-	Inibição de <i>Alternaria solani</i> pelas frações de ES e EP enriquecidas de peptídeos após C4-RP-HPLC.....	43
Figura 26-	Frações que apresentaram maior capacidade de inibir o crescimento de <i>Alternaria solani</i> (ES-2 (84%), ES-5 (62%), EP-1 (88%), EP-5 (59%)).....	43
Figura 27-	Inibição de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> pelas frações de ES e EP enriquecidas de peptídeos após C4-RP-HPLC.....	44

Figura 28-	Frações que apresentaram maior capacidade de inibir o crescimento de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (ES-3 (33%), EP-1 (38%)).....	44
Figura 29-	Inibição de <i>Rastonia solanacearum</i> pelas frações de ES e EP enriquecidas de peptídeos após C4-RP-HPLC.....	45
Figura 30-	Frações que apresentaram maior capacidade de inibir o crescimento de <i>Ralstonia solanacearum</i> (ES-3 (27%), EP-3 (41%)).....	45

CAPÍTULO II

Figura 1-	Exemplo de relacionamento recursivo.....	64
Figura 2-	Fontes e fluxo de dados para os componentes das bases de dados do UniProt.....	66
Figura 3-	Esquema organizacional simplificado do <i>Defensin Knowledgebase</i> , com as entidades e os atributos contidos no banco de dados.....	68
Figura 4-	Diagrama do Banco de Dados DefDB.....	74
Figura 5-	Página inicial de acesso ao DefDB.....	79
Figura 6-	Opções de pesquisa à base de dados do DefDB: busca simples (A) e busca avançada (B);e representação da tabela de resultados resumida, apresentada após consulta (C).....	81
Figura 7-	Página de consulta contendo as informações disponíveis na base de dados sobre cada defensinas específica.....	81
Figura 8-	Exemplo de registros selecionados para <i>Download</i>	82
Figura 9-	Interface para inserção de sequências externas em formato FASTA ao servidor BLAST, incorporado ao banco de dados..	83
Figura 10-	Sequência de resíduos de aminoácidos da defensina J1-1 do organismo <i>Capsicum annuum</i>	84
Figura 11-	Resultados dos alinhamentos utilizando o programa BLAST, base de dados não reduntante de proteínas, dos fragmentos LCLSSRDC (A) e LCLSARDC (B) da sequência da defensina J1-1 expressa por <i>Capsicum annuum</i>	85
Figura 12-	Resultados dos alinhamentos utilizando o programa BLAST, base de dados 'Plant defensin' (DefDB), dos fragmentos LCLSSRDC (A) e LCLSARDC (B) da sequência da defensina J1-1 expressa por <i>Capsicum annuum</i>	85

CAPÍTULO II

Tabela 1 - Número e percentagem dos resíduos de aminoácidos das sequências peptídicas armazenadas nas bases de dados 'Defensin' e 'Plant defensin' (atributo 'seq').....	75
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPs: peptídeos antimicrobianos (*AntiMicrobial Peptides*)

CS $\alpha\beta$: motive *Cysteine-Stabilized $\alpha\beta$*

FPLC: *Fast Protein Liquid Chromatography*

HPLC: cromatografia líquida de alto desempenho (*High-Performance Liquid Chromatography*)

MS: espectrometria de massa (*Mass Spectrometry*)

OLAP: *On-Line Analytical Process*

OLTP: *On-Line Transaction Process*

PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida (*PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*)

PDB: Banco de dados *Protein Data Bank*

PMSF: fluoreto de fenilmetilsulfonila (*PhenylMethylSulphonyl Fluoride*)

SDS: dodecilsulfato de sódio (*Sodium Dodecyl Sulfate*)

SGBD: Sistema de Gerenciador de Banco de Dados

SQL: Linguagem Estruturada de Consulta (*Structured Query Language*)

subsp.: subespécie

TFA: ácido trifluoracético (*TriFluoroacetic Acid*)

TOF: tempo de voo (*Time-Of-Flight*)

TRIS: Tris (Hidroximetil) aminometano

U.A.: unidade de absorvância

RESUMO

MAGALHÃES, Rubens Daniel Miserani, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, janeiro de 2010. **Prospecção em Folhas de Pimentão `Sunshine´ de Peptídeos Antimicrobianos com Ação contra Fitopatógenos e Estruturação do Banco de Dados sobre Defensinas DefDB.** Orientadora: Maria Cristina Baracat-Pereira. Coorientadores: Flávia Maria Lopes Passos, Leandro Licursi, Marcelo Matos Santoro.

Peptídeos antimicrobianos (AMPs) são expressos por muitos organismos e apresentam uma função multifacetada. Estudos os têm revelado como potenciais agentes antibacterianos, defensivos agrícolas, medicamentos cicatrizantes, imuno-moduladores, agentes quimiotáticos, entre outros. Defensinas, a maior família dos peptídeos antimicrobianos, são moléculas com prevalência catiônica, ricas em cisteínas, apresentando em geral três ou quatro pontes dissulfídicas. São constituídas de 45 a 54 resíduos de aminoácidos, encontradas em organismos vertebrados e invertebrados, apresentam atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos e vírus encapsulados. Essas moléculas apresentam baixa toxicidade a animais e plantas, justificando assim seu uso como drogas ou defensivos agrícolas. As defensinas atuam por meio de atrações eletrostáticas com a face externa das membranas celulares alvo, gerando poros e ocasionando morte celular. Elas também atuam, segundo estudos recentes, como sinalizadores primários e secundários em vias apoptóticas e como agentes potencializadores das defesas imunológicas, sendo o mecanismo de atuação molecular ainda desconhecido. A busca por AMPs de plantas tem sido realizada no Laboratório de Proteômica e Bioquímica de Proteínas (DBB/UFV) visando à caracterização estrutural desses peptídeos. O isolamento de peptídeos antimicrobianos de extratos solúvel (ES) e de parede celular (EP) de folhas de pimentão da variedade Sunshine foi realizado por etapas pré-cromatográficas (centrifugações, fracionamento salino e por ultrafiltrações) e por cromatografia líquida multidimensional *offline*. As frações de interesse obtidas de ES e de EP foram testadas em relação à sua atividade antimicrobiana contra o fungo *Alternaria solani* e contra as bactérias *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, Gram positiva, e *Ralstonia solanacearum*, Gram negativa, pela técnica de microplacas, evidenciando a inibição do crescimento desses microrganismos. Os resultados sugerem a ocorrência de aglomerações dos

AMPs nos extratos, dadas as características de hidrofobicidade e cargas desses peptídeos, e que as etapas de separação por massas moleculares devem ser realizadas visando reduzir esses efeitos. O procedimento experimental proposto ao final do trabalho, que envolve o fracionamento por sal e por ultrafiltração, seguindo-se cromatografia de fase reversa em C4, permitiu a separação das amostras em frações com atividades antimicrobianas diferentes e potencialmente de interesse para a exploração comercial na defesa de plantas. A construção de um banco de dados que agrupe informações sobre defensinas, possibilitando evidenciar relações entre as moléculas já conhecidas e sequências não identificadas, apresenta-se de grande importância para a complementação dos estudos crescentes sobre esses peptídeos. As bases de dados do DefDB já estão disponíveis e podem ser utilizadas para identificação de sequências obtidas por métodos de sequenciamento, seja pelo alinhamento com a sequência obtida, ou pela identificação comparativa utilizando ferramentas computacionais específicas, como programas e *pipelines* utilizados para análises de dados de espectrometria de massa. Assim, as informações obtidas desse banco de dados, com a ajuda de ferramentas de análises já disponíveis na rede mundial de computadores, podem colaborar para a identificação de novas sequências, para a elucidação do mecanismo de atuação molecular, além de contribuir para direcionar estudos iniciais sobre esses peptídeos. Portanto, a obtenção de frações com alta atividade antimicrobiana, juntamente com o desenvolvimento de bases de dados específicas, que facilitem a identificação dos possíveis peptídeos antimicrobianos presentes nessas frações, pode ser o caminho para o estudo e o isolamento de novos compostos naturais, capazes de substituir defensivos agrícolas danosos ao ambiente, e/ou serem utilizados como base de medicamentos para combater infecções e doenças imunológicas.

ABSTRACT

MAGALHÃES, Rubens Daniel Miserani, M.Sc, Universidade Federal de Viçosa, January, 2010. **Prospection in Leaves of Bell Pepper ('Sunshine') of Antimicrobial Peptides with Action against Fitopathogens and Structuring of the Defensins Data Bank DefDB.** Adviser: Maria Cristina Baracat-Pereira. Co-advisers: Flávia Maria Lopes Passos, Leandro Licursi and Marcelo Matos Santoro.

Antimicrobial peptides (AMPs) are expressed by many organisms and have a multifaceted role. Studies have revealed the AMPs as potential antibacterial agents, pesticides, drugs, healing, immune modulators, chemotactic agents, among others. Defensins, the largest family of antimicrobial peptides, are cationic molecules, rich in cysteines, with four disulfide bridges. They consist of 45 to 54 amino acid residues, found in vertebrate and invertebrate organisms, presenting activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, fungi and encapsulated virus. These molecules have low animals and plants toxicity, thereby justifying their use as drugs or pesticides. The defensins act by means of electrostatic attractions with the external surface of the target cell membranes, creating pores and causing the cell death. They also operate, according to recent studies, such as primary and secondary signs in the apoptosis via and as enhancers of immune defenses, being the molecular mechanism of action still unknown. The search for AMPs in plants has been performed at the Laboratório de Proteômica e Bioquímica de Proteínas (DBB / UFV) aiming to characterize the structure of these peptides. The process of separation of peptides was performed by pre-chromatographic step (centrifuging, saline precipitation and ultrafiltration) and offline multidimensional liquid chromatography. The fractions of interest obtained from ES and EP were tested about their antimicrobial activity against the fungus *Alternaria solani* and against the bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, Gram positive, and *Ralstonia solanacearum*, Gram negative, the microplate technique, showing the inhibition of growth of these microorganisms. The results indicated the occurrence of possible agglomeration of AMPs in the extracts, given the characteristics of hydrophobicity and charges of these peptides, and that the separation steps by molecular weight should be carried out to reduce these effects. The experimental procedure proposed by the latter,

which involves the fractionation by salt and by ultrafiltration followed by reverse-phase chromatography on C4, allowed the separation of samples into fractions with different antimicrobial activities and potentially of interest to the commercial exploration to the plants defense. The construction of a data bank to collate information about defensins, allowing the construction of relations between the molecules that have been discovered and unidentified sequences, presented as a very important achievement for the complementation of studies about these peptides. The DefDB databases are available and can be used to identify the sequences obtained by sequencing methods, either by aligning the sequence obtained, or by the comparative identification using specific computational tools, such as programs and pipelines used for data analysis of MS. Thus, the information of this data bank, helped by analysis tools already available on the World Wide Web, may contribute to the identification of new sequences, to elucidate the molecular mechanism of action, and contributes to guide initial studies about these peptides. Therefore, the obtation of fractions with high antimicrobial activity, together with the development of specific databases, to facilitate the identification of potential antimicrobial peptides in these fractions, may be the way to the study and isolation of new natural compounds that can replace harmful pesticides to the environment, and/or be used as the basis for drugs to fight against infections and immune disorders.

CAPÍTULO I

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIFÚNGICA DE FRAÇÕES PEPTÍDICAS DE FOLHAS DE PIMENTÃO 'SUNSHINE'

1. RESUMO

Os peptídeos antimicrobianos (AMPs) catiônicos são uma forma de defesa natural e não tóxica, em geral, para diversas formas de vida, incluindo-se mamíferos e plantas. São ricos em cisteína, com carga líquida positiva, massas moleculares estimada entre 2-9 kDa e possuem ampla faixa de ação principalmente contra fungos e/ou bactérias. O mecanismo molecular de ação desses peptídeos não é ainda totalmente desvendado, mas já é conhecida a atuação dessas moléculas pela desestabilização da membrana celular e pela atuação sobre vias de sinalização e expressão gênica de células procarióticas. Bilhões de reais têm sido gastos anualmente devido ao ataque de fungos e bactérias a culturas comerciais, principalmente na compra de pesticidas, que causam poluição em solos e cursos d'água. Dessa forma, o estudo desses AMPs é essencial para a descoberta de moléculas naturais de defesa contra esses organismos, que apresentem baixo custo e baixo dano ambiental.

Para a bioprospecção desses AMPs em folhas totalmente expandidas de pimentão da variedade Sunshine de plantas em plena produção, os extratos protéicos solúvel (ES) e de parede celular (EP) obtidos foram fracionados por métodos como centrifugação, precipitação salina e ultrafiltração, e posteriormente por métodos cromatográficos, visando o clareamento e à obtenção de frações enriquecidas em peptídeos e com baixas quantidades de interferentes. Foi observada atividade antimicrobiana de frações obtidas contra as bactérias *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Gram-positiva), *Ralstonia solanacearum* (Gram-negativa) e contra o fungo *Alternaria solani*, todos de importância para culturas comerciais. As amostras com potencial inibitório foram preliminarmente avaliadas por espectrometria de massa (MS), e as dificuldades na obtenção das sequências aminoacídicas podem estar relacionadas às baixas concentrações dos peptídeos de interesse nas amostras frente à presença de interferentes. Assim, grande avanço foi conseguido pela melhoria do

protocolo de purificação, o que possibilitou a obtenção de frações de interesse comercial, potenciais fontes de AMPs que serão identificados futuramente por MS. Essas frações foram capazes de inibir o crescimento de microrganismos responsáveis por grandes perdas na agricultura mundial.

2. INTRODUÇÃO

As plantas são continuamente expostas a uma multiplicidade de patógenos, sendo passivas de ação mecânica e/ou química. Contudo, esses organismos possuem um sistema de defesa multifacetado contra os patógenos. Ao lado de diferentes mecanismos de ação como as paredes celulares vegetais que atuam como barreiras físicas, encontram-se as enzimas de defesa, as proteínas de resistência a patógenos (PR-proteínas) e os peptídeos antimicrobianos (AMPs), que pertencem ao grupo de moléculas de defesa que fazem parte desse sistema. Os PR-peptídeos incluem as defensinas, as tioninas, os LTPs e as proteases de baixas massas moleculares (Van Loon, *et al.*, 1999). Dez grupos de peptídeos de defesa foram identificados em plantas, sendo que muitos são catiônicos, ricos em cisteína, órgão-específicos e parcialmente hidrofóbicos, podendo ter uma expressão constitutiva ou estimulada por patógenos.

A membrana plasmática de bactérias apresenta-se carregada negativamente na sua porção externa, o que não ocorre nas células animais e vegetais. Assim, os AMPs catiônicos podem agir de forma específica pela interação com os fosfolípidos da monocamada externa de bactérias, formando canais, lisando as células ou penetrando na região intracelular para efetuar sua ação. Por essa razão, vários AMPs apresentam baixa toxicidade para animais e plantas, podendo ser potencialmente usados como defensivos agrícolas, minimizando a poluição ambiental devido ao uso de pesticidas químicos, ou como drogas farmacêuticas, semelhantes a antibióticos, ocasionando baixos efeitos colaterais e menor resistência microbiana seletiva.

A identificação, purificação e caracterização de AMPs vegetais, visando à busca de defensivos naturais contra fitopatógenos de interesse comercial, é dificultada pela complexidade molecular dos extratos de plantas. Como os AMPs vegetais naturais são expressos em baixas concentrações e os extratos vegetais são complexos, compostos interferentes, de baixas massas moleculares, podem dificultar a identificação desses PR-peptídeos por técnicas espectrométricas. Diferentes metodologias de clareamento e de purificação desses extratos vegetais complexos vêm sendo avaliadas visando ao enriquecimento desses AMPs nas amostras, por técnicas cromatográficas ou não, para permitir a redução do ruído e maior confiabilidade dos resultados

obtidos a partir das massas moleculares das frações peptídicas de interesse. Algumas solanáceas vêm sendo estudadas por nosso grupo como fonte de AMPs, como o pimentão (Teixeira *et al.*, 2006) e a berinjela (Almeida *et al.* 2008).

Esse trabalho visa avaliar metodologias para o clareamento e o enriquecimento de frações antimicrobianas de extratos vegetais complexos enriquecidos em peptídeos, com vistas à remoção de interferentes e ao seqüenciamento dos AMPs por meio de espectrometria de massa para realizar caracterizações estruturais para posteriores aplicações biotecnológicas dos peptídeos identificados.

Plantas de pimentão ('Sunshine') foram utilizadas para se obter material amostral por apresentarem resistência a fungos que atacam outras culturas importantes, como o *Alternaria solani* e o *Verticillium dahliae* que causam grandes perdas em culturas de tomate e batata respectivamente (Do *et al.*, 2003), sendo que os AMPs presentes nas folhas de pimentão podem estar envolvidos na resistência contra esses fitopatógenos (Teixeiras, *et al.*, 2006, Gao *et al.*, 2000). As separações das moléculas por peneiramento molecular, como a ultrafiltração e a cromatografia de exclusão molecular, se mostraram de grande valia para a remoção de compostos interferentes, de baixas massas moleculares e carregados, e também que são parcialmente hidrofóbicos. Por outro lado, pode ocorrer aglomeração entre os peptídeos, gerando compostos de altas massas moleculares, dificultando a separação.

Um maior conhecimento sobre o conjunto de peptídeos antimicrobianos presentes em extratos vegetais poderá permitir o posterior desenvolvimento de defensivos agrícolas e gerar informações quanto aos mecanismos de defesa de plantas que envolvam os AMPs, PR-peptídeos ou não.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Peptídeos Antimicrobianos (AMPs)

Organismos vivos secretam uma grande variedade de peptídeos antimicrobianos por vias ribossomais (defensinas e bacteriocinas) ou não ribossomais (peptaibols, ciclopeptídeos e pseudopeptídeos) (Montesinos, 2007). A ampla distribuição desses peptídeos entre os animais e as plantas sugere que esses peptídeos exerçam um papel fundamental para a evolução bem sucedida dos organismos multicelulares complexos (Zasloff, 2002). Os peptídeos antimicrobianos (AMPs), especialmente os catiônicos, são descritos como importantes compostos da defesa inata de insetos, anfíbios e plantas (Hancock e Lehrer, 1998; Oard *et al.*, 2004), e a produção dessas moléculas corresponde a uma rápida, eficiente, flexível, econômica e ampla estratégia de defesa (Broekaert *et al.*, 1997; Zasloff, 2002). Eles diferem estruturalmente dos antibióticos convencionais produzidos por microrganismos, e podem ser pesquisados como novas drogas farmacêuticas com eficácia contra o aumento da resistência microbiana (Ganz e Lehrer, 1999).

A estrutura fundamental pertencente à maioria das classes de peptídeos antimicrobianos é baseada na sua conformação espacial. Essas moléculas adotam formas com grupos de aminoácidos hidrofóbicos e catiônicos espacialmente organizados em setores discretos e específicos. A maioria dos peptídeos antimicrobianos são derivados de precursores de maiores massas moleculares, incluindo uma seqüência sinalizadora. Modificações pós-traducionais podem incluir o processamento proteolítico, e em alguns poucos casos, a glicosilação, a amidação e a isomerização de aminoácidos carboxi-terminais e a halogenação. Peptídeos naturais compostos de resíduos de D-aminoácidos tipicamente apresentam um potencial antimicrobiano de amplo espectro, com esperada resistência à proteólise enzimática. Pequenos peptídeos lineares ou anfífilos, compostos tanto de resíduos de L-aminoácidos quanto de D-aminoácidos, podem apresentar vários graus de seletividade e potencialidade antimicrobiana (Zasloff, 2002).

Esses peptídeos podem ser utilizados para desenvolver novos artifícios para ação na proteção de plantas (Powell *et al.*, 2000; Osusky *et al.*, 2000; Oard *et al.*, 2004), por apresentarem uma ampla gama de atividade contra bactérias, fungos, envelopes virais e, ou, protozoários, com destruição da

integridade da membrana em concentrações tão baixas quanto 0,25 a 4,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo muito promissores para aplicação no agronegócio (Thevissen *et al.*, 1996; Hancock e Lehrer, 1998; Niidome e Anzai, 1999). Vários componentes naturais vêm sendo amplamente empregados como fontes de agentes de defesa contra patógenos de plantas (Rao *et al.*, 1995; Shibata *et al.*, 1995; Fiori *et al.*, 2000; Berrocal Lobo *et al.*, 2002; Alan *et al.*, 2004; Ngai e Ng, 2004), por apresentarem geralmente baixa toxicidade a humanos e mamíferos, baixo impacto ambiental, baixo acúmulo residual em alimentos e compatibilidade com os sistemas de controle de pragas (Knight *et al.*, 1997; Fiori *et al.*, 2000). Muitos peptídeos antimicrobianos constituem a base para a síntese de novos análogos sintéticos que têm sido expressos em plantas transgênicas para conferir proteção a doenças ou são secretados por microrganismos se tornando os ingredientes principais de biopesticidas (Montesinos, 2007).

3.2. Peptídeos Antimicrobianos em Plantas

As plantas produzem um conjunto de peptídeos antimicrobianos voltado para a defesa contra diversos fitopatógenos (Thevissen *et al.*, 2004). A superexpressão de alguns peptídeos promove aumento na tolerância das plantas a microrganismos danosos. Patógenos mutantes, sensíveis aos peptídeos, apresentaram virulência significativamente menor nos tecidos em que os peptídeos foram expressos (Garcia-Omedo *et al.*, 2001).

Os AMPs são de grande importância na defesa de plantas, atuando como membro da barreira constitutiva pré-existente e também em resposta induzida por infecção (Garcia-Omedo *et al.*, 1998; 2001). Assim, os peptídeos antimicrobianos podem ter uma expressão constitutiva ou estimulada por patógenos, e podem interagir uns com os outros de forma aditiva, sinérgica ou antagonística (Garcia-Omedo *et al.*, 1998).

Dez grupos de peptídeos de defesa foram identificados em plantas (Garcia-Omedo *et al.*, 1998; 2001), e muitos são caracterizados como catiônicos, ricos em cisteína, órgão-específicos, contendo até 50 % de resíduos hidrofóbicos, os quais podem facilmente interagir com membranas (Hancock e Lehrer, 1998; Hancock, 2001). As diferentes classes de peptídeos antimicrobianos vegetais descritas apresentam especificidades variadas quanto ao efeito inibitório de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e/ou fungos

(Garcia-Omedo *et al.*, 2001). Alguns peptídeos são específicos para bactérias Gram-positivas porque não possuem a capacidade de criar um sistema de transporte próprio, necessário para transpor as barreiras encontradas para atividade bactericida contra bactérias Gram-negativas (Cristensen *et al.*, 1988; Tejada *et al.*, 1995). Muitas defensinas de plantas se ligam com alta afinidade a um lipídeo tipo II, um proteoglicano que está ancorado na membrana plasmática de células bacterianas. A partir dessa ligação esses peptídeos se difundiriam para o interior da membrana (Zasloff, 2002). Contudo, o número e a diversidade dos peptídeos ricos em cisteína é grande, e poucos membros dessa superfamília foram descritos (Silverstein *et al.*, 2007).

Progressos na utilização desses peptídeos na área de proteção vegetal já são relatados, como a produção de compostos protetores e a engenharia genética de plantas, que gera plantas expressando moléculas com total ou parcial resistência contra fitopatógenos (Mourgues *et al.*, 1998; Rao, 1995; Morassutti *et al.*, 2002).

3.3. Mecanismos de Ação dos Peptídeos Antimicrobianos

Sugere-se que a ação dos peptídeos antimicrobianos esteja relacionada a uma fatal despolarização da membrana bacteriana, à criação de poros que ocasionariam o extravasamento do conteúdo celular, à ativação de processos letais, como a indução de hidrolases que degradariam a parede celular, à distribuição desordenada de lipídeos entre as camadas da membrana plasmática, resultando na perturbação das funções da membrana, e ao dano de alvos intracelulares críticos após a internalização dos peptídeos (Zasloff, 2002).

Os AMPs também apresentam uma especificidade relativa decisiva para sua atuação. A bicamada lipídica da membrana de células de mamíferos apresenta-se carregada negativamente na monocamada interna, e externamente não carregada, ao contrário da membrana plasmática de bactérias, que se apresenta carregada negativamente na porção externa da membrana. Assim, os AMPs catiônicos podem interagir mais facilmente com os fosfolipídeos da monocamada externa dos patógenos exercendo sua atuação. A presença de colesterol na membrana alvo em geral reduz a atividade dos peptídeos antimicrobianos em células de vertebrados por proporcionar uma estabilização da bicamada lipídica ou por estabilizar as interações entre o

colesterol e os peptídeos. Similarmente, acredita-se que o aumento da força iônica, que em geral reduz a atividade da maioria dos peptídeos antimicrobianos, o faz em parte pela diminuição das interações eletrostáticas carregadas, necessárias para a interação inicial (Zaslouff, 2002). Além disso, observa-se que as lipoproteínas e os fosfolipídeos aniônicos que compõem o lado externo da membrana celular dos patógenos estão em equilíbrio com os cátions divalentes cálcio e magnésio. Observa-se que AMPs catiônicos têm grande afinidade pelos fosfolipídeos ou por lipopolissacarídeos de membranas, substituindo o Ca^{2+} e o Mg^{2+} (Hancock e Lehrer, 1998).

A desestabilização das membranas celulares de microrganismos tem tradicionalmente sido considerada como o mecanismo pelo qual AMPs eliminam microrganismos (Hancock, 2001). Um dos passos-chave em sua atividade antimicrobiana é a geração do distúrbio das membranas celulares dos microrganismos, que pode se dar em dois passos durante a interação entre AMPs e bactérias. O primeiro passo envolve interações eletrostáticas que resultam em uma perda da diferença de potencial entre o interior e o exterior da membrana celular dos microrganismos, permitindo às substâncias polares, usualmente reguladas em condições normais, uma grande liberdade para atravessar a membrana e alcançar o ambiente celular. A referida perda da polaridade também possibilita ocorrer interações físicas entre outros peptídeos e os microrganismos. No segundo passo, AMPs formam estruturas anfifílicas na membrana dos patógenos que apresentam uma seção hidrofílica e uma seção hidrofóbica em terminais opostos. Estas mudanças conformacionais permitem ao peptídeo inserir-se na membrana, desestabilizando sua função de barreira física (West *et al.*, 2006).

Alguns modelos têm sido propostos para explicar a desestabilização das membranas celulares dos patógenos (Hancock, 2001) (**Figura 1**). O primeiro é o modelo 'tapete' ou 'carpete', no qual uma camada de AMPs se deposita sobre as membranas, resultando no colapso da membrana e, eventualmente, sua desintegração, que ocorre quando a concentração de AMPs é suficiente para ganharem acesso ao ambiente intracelular (Matsuzaki, 1999). O segundo modelo é o 'barril', que envolve a formação de canais iônicos através de seções hidrofóbicas dos AMPs junto à membrana. Os lipídeos de membrana separam-se, com a seção apolar do AMP revestindo a membrana e há formação de um barril com interior hidrofílico que perfura a membrana e expõe

a célula ao ambiente externo. O terceiro corresponde ao modelo 'agregado', no qual aglomerados de AMPs penetram na membrana causando a formação de poros transitentes, com o extravasamento de material celular. Contudo, há dúvidas sobre o mecanismo exato de desestabilização das membranas.

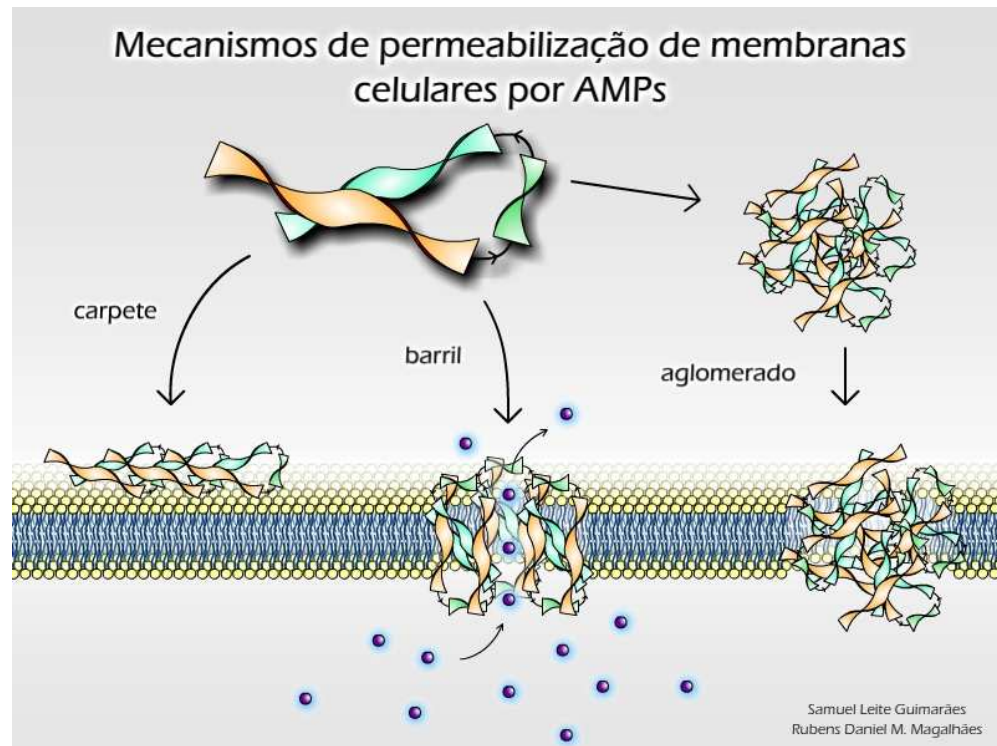


Figura 1 – Ilustração dos modelos de permeabilização e desestabilização das membranas celulares por AMPs.

Há suposições de que a permeabilização da membrana não seja o principal mecanismo pelo qual os AMPs eliminam microrganismos, mas seja apenas uma atividade que facilita o acesso do AMP ao interior da célula alvo.

Os mecanismos pelos quais os AMPs podem exercer sua atividade no interior da célula (West *et al.*, 2006) estão representados pelas **Figuras 2 e 3**. Além de causarem a desestabilização das membranas e inserção nas células-alvo, os AMPs atuam sobre o DNA/RNA (Kanyshkova *et al.* 2003), a síntese de proteínas (Helmerhorst *et al.*, 1999) e sobre enzimas autolíticas de parede celular (Ginsburg, 2004). Atualmente, já é conhecido que os AMPs possuem várias estratégias para desenvolver suas funções dentro da célula, no entanto, ainda não está claro se os AMPs são capazes de atacar múltiplos alvos simultaneamente ou se selecionam alvos específicos.

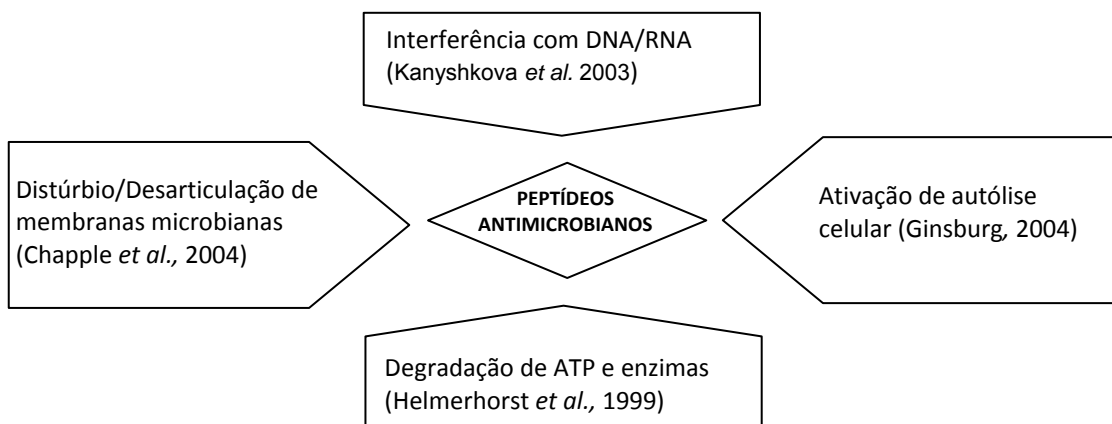


Figura 2 – Possíveis mecanismos de ação dos AMPs (Retirado de West *et al.*, 2006).

O ataque direto pode ser letal ou gerar um efeito inibitório sobre o crescimento e a atividade dos microrganismos, dependendo das concentrações de peptídeos. Para exercer a atividade antimicrobiana, AMPs devem estar presentes em uma concentração mínima específica, o que depende de cada patógeno.

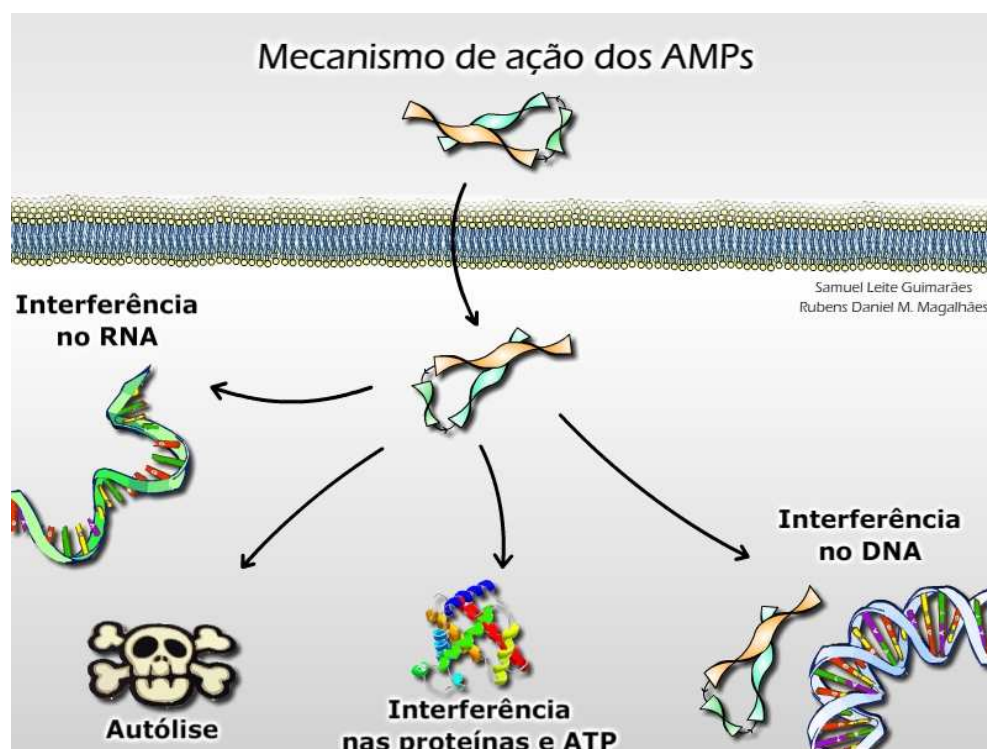


Figura 3 – Ilustração dos possíveis mecanismos de ação dos AMPs no interior da célula.

O mecanismo exato de ação utilizado por AMPs pode ser determinado por vários fatores, incluindo a linhagem do microrganismo-alvo, as características estruturais dos peptídeos e o modo como os AMPs interagem com outros fatores imunes, no caso de peptídeos de vertebrados, incluindo

outros peptídeos da mucosa (Matsuzaki, 1999). Contudo, a permeabilização das membranas é reconhecida como um fator central nessa ação.

AMPs também podem inibir de forma indireta o crescimento e a atividade do microrganismo. Um mecanismo pelo qual isso é feito consiste em tornar o ambiente da mucosa não propício para a colonização. Devido à multiplicidade e à alta colonização do epitélio, microrganismos necessitam da presença de nutrientes nas superfícies da mucosa. Um agente antimicrobiano bem caracterizado é a lactoferrina, que se liga a íons de ferro livres, um nutriente essencial para o crescimento e a multiplicação dos microrganismos, presentes nas superfícies da mucosa, restrito a bactérias (Legrand *et al.*, 2004). Fazendo a superfície da mucosa inóspita, os AMPs reduzem a habilidade de microrganismos em colonizar epitélios e diminui sua habilidade de multiplicação, permitindo ao tecido do hospedeiro o desenvolvimento de outras modalidades de defesa. Contudo, microrganismos têm desenvolvido mecanismos para contornar a capacidade dos AMPs em reduzir os nutrientes disponíveis. No caso do ferro, por exemplo, algumas bactérias são capazes de seqüestrar o metal da lactoferrina, o que determina um mecanismo que possibilita comunidades de micróbios comensais serem capazes de sobreviver em superfícies de mucosas (West *et al.*, 2006).

A atuação de AMPs contra microrganismos é aumentada por suas habilidades de agir sinergisticamente. Quando AMPs interagem com seus alvos, eles executam etapas combinadas e aditivas, que apresentam importantes efeitos. O primeiro efeito consiste na redução da concentração mínima de dado AMP, necessária para eliminar o microrganismo, quando uma grande diversidade de AMPs atuando em combinação sobre a mucosa diminui a concentração necessária para eliminar o microrganismo. O segundo efeito consiste no aumento do espectro de agentes infecciosos sobre os quais os AMPs podem agir de maneira eficaz. Investigações têm mostrado que a lactoferrina neutraliza os ácidos lipotécóis, tornando as membranas de bactérias Gram-positivas mais susceptíveis a atividade de lisozima (Leitch & Willcox, 1999). O terceiro efeito decorrido das interações sinérgicas e aditivas entre os AMPs é o aumento da velocidade desses peptídeos em eliminar infecções. Combinações entre lactoferrina, lisozima e inibidor de leucoprotease do soro resultam em uma taxa de eliminação mais rápida de *Escherichia coli* em relação a qualquer uma das proteínas empregadas individualmente (Singh

et al., 2000). Finalmente, interações sinérgicas e aditivas promovem um elemento a mais para a proteção da superfície das mucosas, diminuindo a suscetibilidade clínica a infecções.

Estudos recentes têm mostrado inconsistência nas propriedades dos AMPs em condições *in vitro* e *in vivo* (West *et al.*, 2006). Estudos *in vitro* determinam uma atuação padrão dos AMPs, muitas vezes não possibilitando uma interpretação de sua verdadeira participação *in vivo*, no qual fatores agonistas e antagonistas exercem considerável influência sobre a atividade desses AMPs. Por exemplo, alguns AMPs perdem sua atividade microbiana em presença de níveis fisiológicos de NaCl (Travis *et al.*, 1999). Além disso, existem discrepâncias entre a concentração de AMPs empregada em estudos *in vitro* comparada com as concentrações fisiológicas *in vivo* (Hancock, 2001). As concentrações nas quais os AMPs apresentam suas atividades antimicrobianas *in vitro* estão na ordem de micro- a miligrama por mililitro, muito mais alta do que a encontrada em muitas regiões do corpo, especialmente em condições não inflamatórias, onde a concentração de AMPs é ainda menor que a concentração inibitória mínima de ensaios *in vitro*. Isto sugere que as propriedades antimicrobianas apresentadas por AMPs podem não exercer um papel solitário nas defesas do hospedeiro *in vitro*. Por outro lado, eles podem atuar ativamente somente sob condições inflamatórias, em que a concentração substancialmente maior de AMPs sobrepõe o efeito inibitório das concentrações fisiológicas de sal (Hancock, 2001).

3.4. Fitopatógenos-teste

O gênero *Clavibacter* corresponde a um grupo de bactérias, patogênicas de plantas, Gram-positivas, actinomiceto (família *Microbacteriaceae*) (Stackebrandt *et al.*, 1997), representado por uma simples espécie: *C. michiganensis*. Esta espécie é subdividida em cinco subespécies, de acordo com seus diferentes hospedeiros (Jahr *et al.*, 1999). *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* é considerada a mais importante bactéria causadora de doença em tomateiros, causando grandes perdas econômicas em todo o mundo (Gartemann *et al.*, 2003). Ela é responsável pelo cancro bacteriano, descoloração do xilema e “doença do olho de pássaro” dos frutos em culturas de tomate (Strider, 1969; Davis *et al.*, 1984; Gartemann *et al.*, 2003). Essas

bactérias presentes no solo invadem o sistema vascular das plantas e colonizam os plasmodesmas (Gartermann *et al.*, 2003).

A bactéria fitopatogênica *Ralstonia solanacearum* tem sido um grande fator limitante da produção de diversas solanáceas em todo o mundo por causar a murcha bacteriana (Syed e Loke, 1995). Mais de 100 espécies vegetais já foram notificadas como susceptíveis a esta bactéria Gram-negativa, que está presente no solo, invade e coloniza as raízes das plantas hospedeiras, seguindo-se de uma rápida colonização nos tecidos vasculares (Hayward, 1991). Estudos comparativos entre plantas de pimenta da espécie *Capsicum annum* resistentes (cv.Kulai) e susceptíveis (LC4 55) a essa bactéria têm demonstrado que as células bacterianas, após colonizarem o protoxilema das plantas susceptíveis, degradam a sua parede celular e propagam-se para a célula vizinha, ao passo que, nas plantas resistentes, elas não conseguem atravessar a parede celular das suas células, não sendo possível sua propagação para as demais células adjacentes (Hayward, 1991; Rahman *et al.*, 1999).

O fungo *Alternaria solani* é o causador da “pinta preta”, que é uma das principais doenças que acomete o tomateiro e a batateira no Brasil. Essa doença caracteriza-se por causar intensa redução da área foliar, queda do vigor das plantas, depreciação de frutos e tubérculos, e conseqüente redução do potencial produtivo. Embora um programa de manejo da cultura possa minimizar o desenvolvimento da “pinta preta”, o uso de fungicidas é necessário para a proteção dessas culturas, sob condições ambientes favoráveis. Fungicidas protetores à base de cobre são amplamente empregados em ambas as culturas, resultando em danos ambientais consideráveis. O período de proteção na planta varia de 6 a 9 dias em média, sendo recomendados intervalos de aplicação de 7 dias. Várias alternativas aos fungicidas têm sido avaliadas nos últimos anos na busca de produtos que controlem satisfatoriamente as doenças, tenham pequeno impacto ambiental e baixa toxicidade aos seres vivos (Töfoli, 2004).

Esses microrganismos foram escolhidos para serem utilizados como fitopatógenos-teste nos ensaios antimicrobianos realizados nesse trabalho, por causarem danos irreversíveis em espécies de grande importância comercial.

3.5. Espectrometria de Massa Aplicada ao Estudo de Peptídeos Antimicrobianos – Importância e Dificuldades

MS vem sendo amplamente utilizada como importante ferramenta para a identificação e caracterização de peptídeos naturais em organismo diversos (Frewen, *et al.*, 2006). AMPs vegetais são expressos em muito baixa concentração, e os extratos vegetais são muito complexos, contendo um conjunto de compostos, especialmente com baixas massas moleculares (inferiores a 1000 Da), que são considerados interferentes nas análises espectrométricas. Esses compostos são de difícil remoção dos extratos vegetais, pois muitos apresentam carga líquida e/ou são parcialmente hidrofóbicos, que são características que dificultam sua remoção das amostras de interesse e facilita sua aglomeração (Barbosa, 2008). Esse aglomerado peptídico persiste em etapas de peneiramento molecular, dificultando o clareamento do material de interesse. Assim, estratégias de purificação como cromatografias de troca iônica e de fase reversa nem sempre garantem a remoção desses compostos em níveis suficientes à obtenção de resultados confiáveis na espectrometria, pois o ruído é alto e reduz a confiabilidade dos resultados obtidos de massas moleculares das frações peptídicas de interesse (Almeida *et al.*, 2008). Outras técnicas vêm sendo avaliadas para clareamento do material analisado como utilização de célula de agitação e uso de equipamento alta pressão (HPLC) para análises cromatográficas.

3.6. Estudo de Peptídeos Antimicrobianos para Aplicações Futuras

Os AMPs apresentam potencial considerável para uma variedade de aplicações terapêuticas para diferentes organismos (Aumelas *et al.*, 1996), pois apresentam estruturas e modos de ação diferentes dos descritos para os agentes de defesa conhecidos para uso em plantas e animais. Ainda, uma das principais vantagens na aplicação destes AMPs está na sua baixa indução de resistência microbiana, quando comparados à maioria dos medicamentos antibióticos existentes. Apesar de não se conhecer claramente os mecanismos de ação, os peptídeos têm mostrado expressiva atividade *in vitro* contra microrganismos resistentes a antibióticos convencionais, despontando como uma nova classe de agentes terapêuticos.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Identificar peptídeos antimicrobianos em extratos vegetais complexos, realizando a purificação de peptídeos antimicrobianos de plantas de pimentão da variedade Sunshine, por metodologias não refinadas e por técnicas cromatográficas, para obter as massas moleculares e as sequências aminoacídicas por técnicas espectrométricas.

4.2 Objetivos Específicos

i – Obter material vegetal-fonte de AMPs ,ajustar e avaliar a efetividade de metodologias de preparo de extratos vegetais;

ii – Refinar as metodologias de clareamento e purificação dos extratos;

iii - Avaliar o potencial antimicrobiano das frações enriquecidas em AMPs contra fitopatógenos;

iv – Analisar as frações enriquecidas em AMPs por espectrometria de massa e refinar procedimentos de purificação para localizar os peptídeos de interesse.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Plantio das Sementes de Pimentão e Armazenamento das Folhas

Sementes de pimentão 'Sunshine', foram obtidas do Banco de Germoplasma do Departamento de Fitotecnia (DFT/UFV), coordenado pelo Prof. Derly José Henriques da Silva (DFT/UFV). As sementes foram plantadas e as folhas totalmente expandidas foram colhidas de plantas com cerca de 60 dias e armazenadas a -80 °C, para uso como fonte de peptídeos. Copos descartáveis de 200 mL, com 5 furos na porção inferior, foram preenchidos com substrato BIOPLANT® (Prata), receberam uma ou duas sementes de pimentão, foram colocados sobre uma bandeja de isopor contendo o mesmo substrato e foram mantidos em estufa com temperatura controlada (BIOAGRO/UFV). As bandejas foram irrigadas duas vezes ao dia, inicialmente com água e, após germinação, com solução nutritiva Fertsubstrato®, conforme sistema hidropônico desenvolvido pelo Prof. Paulo Roberto Gomes Pereira (DFT/UFV). Plantas com 15-20 cm foram transferidas para vasos de 4 kg (duas plantas por vaso) e mantidas em casa-de-vegetação, sob temperatura controlada, até a coleta das folhas com cerca de 60 dias.

5.2. Preparo de Extratos de Folhas de Pimentão

5.2.1. Obtenção de Extrato Solúvel (ES)

Após pesagem, as folhas foram pulverizadas com nitrogênio líquido em almofariz e pistilo, e maceradas com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,0 contendo EDTA 10 mM, PMSF 1mM, benzamidina 1mM e tiouréia 2mM. Posteriormente, o homogenato foi centrifugado a 20.300 g, a 4°C por 30 minutos (BECKMAN). Para o primeiro protocolo utilizado, o sobrenadante foi reservado, o precipitado foi lavado por duas vezes em volume igual ao inicial da mesma solução tampão contendo os inibidores de proteases e centrifugado, e os dois sobrenadantes obtidos foram adicionados ao anteriormente reservado, e a fração resultante foi nomeada Extrato Solúvel (ES). Para o segundo protocolo avaliado, o primeiro sobrenadante recuperado correspondeu a ES, o precipitado foi lavado à semelhança, e os dois sobrenadantes obtidos foram descartados.

5.2.2. Obtenção do Extrato de Parede Celular (EP)

O precipitado obtido na etapa anterior foi ressuspenso em LiCl (1,5 M) contendo PMSF 1mM, benzamidina 1mM e tiouréia 2mM, e foi deixado sob agitação por duas horas a 4°C. Após centrifugação sob as mesmas condições descritas, o precipitado foi descartado e o sobrenadante foi nomeado **Extrato de Parede Celular (EP)**.

5.3. Purificação dos Peptídeos

Trabalhos prévios realizados no Laboratório de Proteômica e Bioquímica de Proteínas indicaram a ocorrência de aglomerações e degradação proteolítica, ocasionando diminuição da concentração peptídica de interesse nas frações provenientes dos extratos solúvel e de parede celular. Novas propostas de protocolo, priorizando técnicas com menor tempo de execução e maior efetividade durante o fracionamento das amostras foram avaliadas.

5.3.1. Fracionamento com Sulfato de Amônio

ES e EP foram separadamente submetidos à precipitação com sulfato de amônio sólido a 35% de saturação, em banho de gelo e sob agitação lenta por duas horas e centrifugados. Apenas para o segundo protocolo usado, os sobrenadantes foram submetidos novamente à precipitação por sulfato de amônio sólido a 75% de saturação em banho de gelo sob agitação *overnight*. Os precipitados foram recuperados.

5.3.2. Aquecimento Seletivo

O aquecimento seletivo foi usado apenas no protocolo antigo. Os sobrenadantes recuperados do fracionamento por sulfato de amônio a 35% de saturação foram separadamente submetidos ao aquecimento seletivo em banho-maria a 80 °C por 15 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas e os sobrenadantes, Extrato Solúvel (ES) e Extrato de Parede Celular (EP), foram recuperados, dializados e liofilizados.

5.3.3. Ultrafiltração

Uma célula de agitação (“Amicon”) de 400 mL foi utilizada para ultrafiltração.

Após precipitação por sulfato de amônio, ES e EP foram ressuspensos em Tris-HCl 50mM, pH 7,0 e ultrafiltrados (Amicon/Millipore, 8400, 400 mL) em uma membrana de tamanho de poro de 10.000 Da, com 3 lavagens com a mesma solução. A seguir, o filtrado foi ultrafiltrado novamente em uma membrana de tamanho de poro de 1.000 Da. O retido foi lavado por mais três vezes usando a mesma solução de lavagem e concentrado a 20 mL. O procedimento foi desenvolvido em banho de gelo. As membranas foram escolhidas e usadas sequencialmente para priorizar a recuperação de AMPs, tendo em vista seu tamanho de 2 a 9 kDa (Hancock e Lehrer, 1998)

5.3.4. Liofilização

As amostras ultrafiltradas foram congeladas em ultrafreezer a -80 °C ou em nitrogênio líquido e liofilizadas (Edwards).

5.3.5. Cromatografia de Exclusão Molecular

Para a primeira extração, as cromatografias de exclusão molecular foram realizadas com colunas montadas manualmente utilizando resinas Sephadex G10 ou G50, sob pressão ambiente, com fluxo controlado por bomba peristáltica BIO-RAD, Ep1 Econo Pump, para Sephadex G-10, ou sob baixa pressão em equipamento FPLC (BIO-RAD) para Sephadex G-50. Após a separação de ES em Sephadex G-10 (1,3 cm de diâmetro, 26 cm de altura, volume de resina de 52 mL), duas regiões do perfil cromatográfico foram misturadas, liofilizadas e submetidas à cromatografia em resina Sephadex G-50, em coluna com 1,6 cm de diâmetro, 90 cm de altura e volume de resina de 181 mL, em FPLC. Utilizou-se como solução de equilíbrio e de eluição Tris-HCl 50 mM, pH 7,0, ao fluxo de 0,5 mL.min⁻¹. Foram coletadas frações de 1,3 mL em microtubos, que foram avaliadas por Absorbância a 280 e 214 nm.

Nas extrações posteriores (protocolo de extração rápida, **item 6.3**), o uso do equipamento HPLC foi incorporado ao protocolo e as separações foram feitas no laboratório de Proteômica e Bioquímica de Proteínas (DBB/UFV). Após o fracionamento com sulfato de amônio, ES e EP individualmente foram separados por cromatografia de exclusão molecular em coluna Protein Pak 60A (Waters, 14,34 mL de volume total). O fluxo utilizado foi inicialmente de 0,5 mL.min⁻¹ para a cromatografia e 0,2 mL.min⁻¹ para as recromatografias realizadas, com o tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,0. O volume aplicado das

amostras foi de 100 μL (aproximadamente 0,7% do volume da coluna) para todas as separações. As frações obtidas foram coletadas em microtubos de 1,5 mL em volumes variados de acordo com o pico eluído e foram avaliadas a 280 e 214 nm para confirmar a presença de peptídeos.

5.3.6. Cromatografia Hidrofóbica

A cromatografia hidrofóbica em coluna com resina Phenyl Sepharose (Amersham/GE) (110 mL de volume, 2 cm de diâmetro, 50 cm de altura, fluxo 1,5 mL.min⁻¹) foi usada para separação de EP. A coluna foi equilibrada com tampão Tris HCl 25 mM, pH 7,0, com 20% de sulfato de amônio. A amostra consistiu de 10 mL de EP aplicados em sistema manual com auxílio de uma bomba peristáltica (BIO-RAD, Ep1 Econo Pump), em gradiente decrescente descontínuo de sulfato de amônio (20%, 15%, 10% e 5% de saturação), com passos com cerca de 200 mL de solução eluída, avaliando-se a leitura em espectrofotômetro para prolongar a troca de solução de modo que não houvesse a perda de picos. Foram coletadas 824 frações de 1,3 mL cada.

5.3.7. Cromatografia de Fase Reversa em Coluna C₁₈

Após o desenvolvimento da cromatografia de exclusão molecular, para ES, ou hidrofóbica, para EP, algumas frações ricas em peptídeos foram separadas em coluna de fase reversa C18 em equipamento HPLC (C18-RP-HPLC), capilar, associado ao espectrômetro de massa, no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS-Campinas/SP). As proteínas foram separadas em um gradiente contínuo de acetonitrila (0 a 40 % de acetonitrila), sendo a solução A formada por TFA 0,1% (v/v) e a solução B por TFA 0,1% (v/v) e acetonitrila 80% (v/v). Os picos eluídos da C18-RP-HPLC foram automaticamente analisados pelo espectrômetro de massas.

Em outro momento, frações ricas em peptídeos, recuperadas após o desenvolvimento de cromatografia de exclusão molecular (ES) ou hidrofóbica (EP) foram separadas em coluna de fase reversa C18 (Shimadzu) em equipamento HPLC semi-preparativo, no Laboratório de Proteômica, no BIOAGRO/UFV. As proteínas foram separadas em um gradiente contínuo de acetonitrila (8 a 80 % de acetonitrila), sendo a solução A formada por TFA 0,1% (v/v) e a solução B por TFA 0,1% e acetonitrila 80% (v/v). Alguns picos eluídos da C18-RP-HPLC foram coletados e submetidos a uma recromatografia em

coluna C4-RP-HPLC no mesmo equipamento, visando avaliar o grau de pureza para, a seguir, serem submetidos a análises em espectrômetro de massa.

5.3.8. Cromatografia de Fase Reversa em Coluna C₄

Após o desenvolvimento de cromatografia de exclusão molecular (ou, no caso da primeira extração de material vegetal, após C18-RP-HPLC), frações enriquecidas de peptídeos de ES e EP foram separadas em coluna analítica de fase reversa C₄ em equipamento HPLC (C₄-RP-HPLC). As proteínas foram inicialmente separadas em gradiente contínuo de acetonitrila (8 a 80%), sendo a solução A formada por TFA 0,1% (v/v) e a solução B por TFA 0,1% (v/v) e acetonitrila 80% (v/v). Os picos eluídos da C₄-RP-HPLC foram submetidos a teste de inibição microbiana, visando selecionar os picos de interesse para análise em espectrômetro de massa.

A C₄-RP-HPLC também foi utilizada nos protocolos de extração rápida, sendo a única etapa da cromatografia de fase reversa utilizada. O fluxo utilizado foi de 1 mL.min⁻¹, coluna analítica, gradiente de acetonitrila (8 a 32%, variando 4,8%/min.; 32 a 48%, variando 0,8%/min.; 48 a 80%, variando 6,4%/min.), a solução A foi constituída de TFA 0,1% (v/v) e a solução B de TFA 0,1% (v/v) e acetonitrila 80% (v/v).

5.4. Espectrometria de Massa (MS)

5.4.1. Seleção das Frações

Foram submetidas à espectrometria de massa todas as frações coletadas que promoveram inibição no crescimento dos microrganismos testados (**item 3.4**) e as frações que se apresentaram bem separada após as etapas cromatográficas, com picos bem resolvidos e com alta intensidade.

5.4.2. Proteólise limitada

Alíquotas das frações separadas por etapas cromatográficas e selecionadas para análises por MS foram proteolizadas. A proteólise limitada das amostras proporciona a fragmentação de sequências protéicas em pequenos fragmentos de peptídeos, que serão usados para posterior análise e identificação protéica por meios computacionais. Para a proteólise limitada, foi utilizada tripsina (SIGMA, código T 6567). A digestão ocorreu à temperatura de

37°C (temperaturas de atuação máxima da enzima proteolítica) por 3 a 4 h, em presença de tampão bicarbonato de amônio. Posteriormente também foi realizada a redução por DTT (10mM) e alquilação por iodoacetamida (55mM).

5.4.3. Modelos e Ajustes dos Equipamentos

As análises de espectrometria de massa (MS) foram realizadas no Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS-Campinas/SP) sob supervisão do Dr. Fábio Gozzo. Foram analisadas cinco frações em espectrômetro de massa acoplado a um HPLC com coluna capilar RP-C18 (Q-TOF “Ultima” acoplado ao sistema nanoAcquity Ultra Performance LC, Waters). O equipamento foi ajustado com parâmetros de restrição para a separação de peptídeos na região até 12 kDa. Foram obtidos perfis de MS para cada fração e os peptídeos selecionados automaticamente pelos parâmetros pré-definidos foram analisados por MS-MS, após fragmentação automática.

5.5. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida de Três Fases na Presença de Tricina

A eletroforese em gel de poliacrilamida de três fases foi realizada segundo Judd (1994). Foi utilizado o equipamento para mini-gel (Bio-Rad, Mini-Protean III). Para o gel de separação (16,5% T), foram utilizadas: solução de acrilamida/bis-acrilamida (49,5% T, 3,0% C), tampão do gel (Tris-HCl 3M, SDS, pH 8,9), glicerol 10% (v/v), persulfato de amônio 10% (p/v), água e TEMED. O gel intermediário (9,9% T) foi preparado com os mesmos componentes do gel de separação nas mesmas concentrações, à exceção do glicerol, que não foi adicionado. Para o gel de concentração (5,1% T), foram utilizados: solução de acrilamida/bis-acrilamida (30,8% T, 2,6% C), tampão do gel (Tris-HCl 3M, pH 6,8), EDTA 0,2M, água, persulfato de amônio 10% (p/v) e TEMED. A eletroforese desenvolveu-se a 100V por cerca de 15 min, até atingir o gel intermediário, a 80V por cerca de 20 min, até atingir o gel de concentração, e então a 60 V até o final da corrida, perfazendo cerca de 6,5 h. O tampão do catodo foi Tris-base 0,1M e tricina 0,1M, SDS 0,1%, pH 8,31, e o tampão do anodo foi Tris-HCl 0,2M, pH 8,9. O tampão de amostra para os dois tipos de gel consistiu de Tris-HCl, 50mM, pH 6,8, SDS 4% (p/v), azul de bromofenol 0,025% (p/v), glicerol 12% (p/v) e β -mercaptoetanol 10% (v/v). A amostra foi

fervida por 10 minutos em banho-maria. Os gel foi revelado pelo método da prata (Pharmacia-Biotech (2000)).

5.6. Testes de Atividade Antimicrobiana

Para os testes, as bactérias foram repicadas em meio LB líquido e cultivadas até valores de $A_{560} = 0,9 - 1$. O fungo *Alternaria solani* (Isolado 422, obtido da coleção de patógenos do Laboratório de Biologia de Populações de Fitopatógenos do Departamento de Fitopatologia da UFV) foi crescido em meio sólido BDA/Ágar e repicado para placas contendo meio apropriado para esporulação (175ml de V8(suco comercial), 3g de CaCO_3 , 20g de ágar-ágar e 0,1g de cloranfenicol), posteriormente sendo incubado por cinco dias em fotoperíodo de 12h claro e 12h escuro. Após o crescimento foi causado estresse ao fungo por meio do desprendimento de suas colônias, e a cultura foi novamente incubada por 16 horas no escuro e 8 horas sob luz negra. Foram obtidos esporos em alta concentração por inundação da placa de cultura com água estéril e posterior filtração (Simmons, 2007).

Testes de inibição das bactérias e do fungo fitopatogênicos foram realizados de acordo com Teixeira *et al.* (2006), modificado, em microplacas de 96 poços, de fundo plano, estéreis e tampadas. Para os ensaios, em cada poço foram adicionados 50 μL de meio LB 2x líquido, 10 μL de cultura de bactéria ($A_{560} = 0,9 - 1$) ou de fungo (2000 esporos) e 40 μL da fração peptídica (teste) ou de água (controle da cultura). O controle do meio consistiu de 50 μL de meio LB 2x adicionados de 50 μL de água. Nos últimos ensaios realizados, cloranfenicol 25 mg.L^{-1} , contra as bactérias, e Cicloeximida 150 mg.L^{-1} , contra o fungo, foram utilizados como controles negativos para o crescimento dos microrganismos. A inibição foi medida pela comparação entre as curvas de crescimento na presença e na ausência das frações peptídicas. Os testes foram desenvolvidos em triplicata. O crescimento microbiano foi avaliado em leitor de microplacas a 560nm, periodicamente, para o preparo das curvas de crescimento dos microrganismos.

A média aritmética dos valores obtidos pela leitura em microplacas de cada uma das três repetições correspondentes a cada fração foi usada para cálculo da percentagem de crescimento do microrganismo em relação ao meio de cultura, a qual foi usada para a obtenção da percentagem de inibição.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Ajuste do Protocolo de Extração de Peptídeos

ES e EP foram inicialmente clarificados por fracionamento salino, por sulfato de amônio, e aquecimento seletivo seguindo-se etapas cromatográficas de purificação (**Figura 4**). Apesar de rudimentares as técnicas não cromatográficas auxiliaram na eliminação de um conjunto de proteínas e outros contaminantes não protéicos que não são de interesse. Para a purificação de peptídeos, várias estratégias têm sido aplicadas: fracionamento salino (sulfato de amônio, por *salting out*), aquecimento seletivo, filtração em célula de agitação, cromatografias de exclusão molecular, de troca iônica, hidrofóbica e de fase reversa, além da purificação em géis preparativos (Barbosa, 2008).

Considerando a baixa concentração de peptídeos antimicrobianos em plantas e a complexidade molecular das amostras, existe a necessidade de uma purificação exaustiva a partir de grande volume de extratos pré-purificados de plantas, obtendo frações enriquecidas, que permitam o seqüenciamento desses peptídeos via espectrometria de massa, e também a realização de testes de atividade antimicrobiana, além das caracterizações estruturais, bioquímicas e toxicológicas posteriores.

Há grande dificuldade na compatibilização da purificação para atender às atividades do trabalho, pois, enquanto ensaios biológicos, como os antimicrobianos, necessitam de grandes quantidades de frações com baixo grau de pureza, as análises espectrométricas para identificação dos AMPs necessitam de baixas quantidades de amostra com alto grau de pureza.

A cromatografia em resina Sephadex G-10, com faixa de separação menor que 700 Da, dessalinizou e gerou dois grupos peptídicos (**Figura 5**), que foram agrupados para compor a amostra para a nova cromatografia. A resina Sephadex G-50, com faixa de separação de 1500-30000 Da, além de dessalinizar, promoveu melhor separação das frações peptídicas.



Figura 4 – Etapas de extração e de purificação de peptídeos de folhas totalmente expandidas de pimentão ('Sunshine'). As folhas foram pulverizadas com nitrogênio líquido e maceradas com tampão de extração, obtendo-se ESB e EPB, que foram fracionados por sulfato de amônio (SA) e aquecidos seletivamente, produzindo ES e EP, respectivamente. ES foi separado em duas colunas de exclusão molecular, Sephadex G-10 e Sephadex G-50, e as frações recuperadas foram submetidas à espectrometria de massa acoplada à C18-RP-HPLC capilar ou foram purificadas em coluna C18-RP-HPLC (Laboratório de Proteômica e Bioquímica de Proteínas - BIOAGRO/UFV). As frações obtidas em coluna Sephadex G-10 foram primeiramente submetidas a espectrometria de massa, a nova separação por Sephadex G-50 e proteólise, ainda não sendo suficiente para alcançar os objetivos. EP foi separado em coluna hidrofóbica com resina Phenyl Sepharose e submetida à C18-RP-HPLC capilar ou semi-preparativo, à semelhança de ES. As frações recuperadas foram submetidas a C4-RP-HPLC e posteriormente a espectrometria de massa. No fluxograma, as caixas verdes correspondem às etapas desenvolvidas para ES, e as caixas azuis referem-se às etapas desenvolvidas para EP.

Duas regiões ricas em peptídeos foram identificadas após a separação em Sephadex G-10 (Regiões 1 e 2, **Figura 5 e 6**). A presença de bandas com baixas massas moleculares logo após o volume vazio da coluna sugere a ocorrência de aglomeração peptídica na Região 1. Já a segunda região apresentou frações eluídas em uma faixa correspondente à dos peptídeos de interesse.

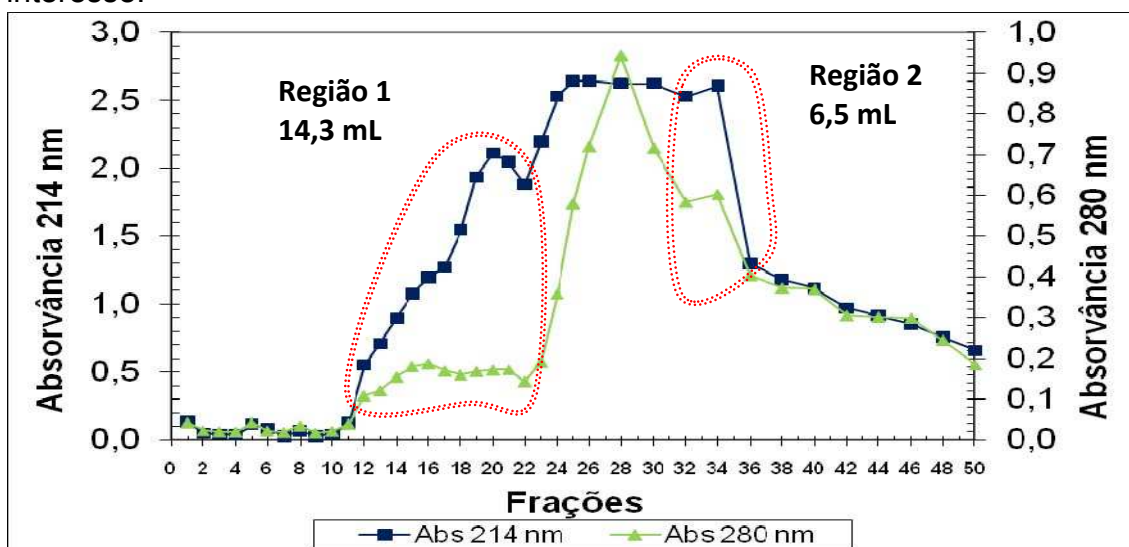


Figura 5 – Cromatografia de exclusão molecular do Extrato de Solúvel (ES) de folhas totalmente expandidas de pimentão ‘Sunshine’ em Sephadex G-10. A partir de SDS-Tricina-PAGE, foram selecionadas duas regiões de interesse, que foram recuperadas visando posterior separação em Sephadex G-50. A separação foi desenvolvida usando Tris-HCl 5 mM, pH 7,0, ao fluxo de $1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. A amostra correspondeu a 10 mL de ES (**Figura 4**) e frações de 1,3 mL foram recuperadas.

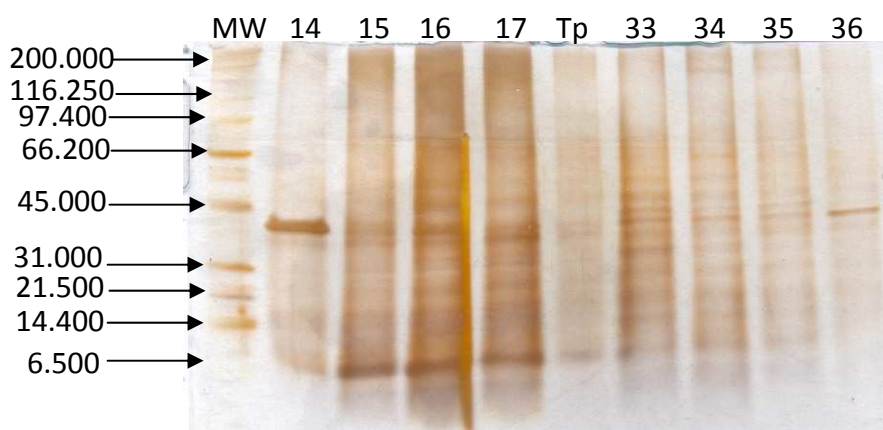


Figura 6 – SDS-Tricina PAGE de frações recuperadas da cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-10 (**Figura 5**). As canaletas contêm 25 μL das amostras: **MW** - Padrão de Peso Molecular (Da); **14**) Fração 14; **15**) Fração 15; **16**) Fração 16; **17**) Fração 17; **Tp**) Canaleta Vazia (Tampão de Amostra); **33**) Fração 33; **34**) Fração 34; **35**) Fração 35; **36**) Fração 36. O gel foi revelado por coloração de prata.

Doze corridas cromatográficas semelhantes foram desenvolvidas em Sephadex G-10, aplicando-se 10mL de ES em cada corrida. Observou-se excelente repetibilidade no desenvolvimento das mesmas e as Regiões 1 e 2

de todas as corridas foram agrupadas em um único *pool*, que foi liofilizado, ressuspenso para 10mL. Análises espectrométricas dessa amostra indicaram alto grau de contaminantes e a necessidade de continuidade das purificações (dados não apresentados). Assim, essa amostra foi separada em Sephadex G-50, obtendo-se oito regiões de interesse (**Figura 7**). Para a espectrometria de massa, foram avaliadas quatro dos oito *pools* obtidos, que foram P-II, P-V, P-VII, P-VIII, por serem mais promissores, dada a melhor separação no perfil cromatográfico. Esses *pools* foram digeridos com Tripsina conforme o **item 5.4.2**, dada a complexidade das amostras. Os espectros de MS do Pool-V (**Figura 8A**) e do Pool-VII (**Figura 8B**) ilustram os resultados obtidos após análise dessas amostras por espectrometria de massa acoplada em RP-HPLC capilar (LC-ESI-TOF), realizados no LNLS. Podem ser observados fragmentos peptídeos duplamente carregados em uma faixa de 1.200 a 1.400 Da.

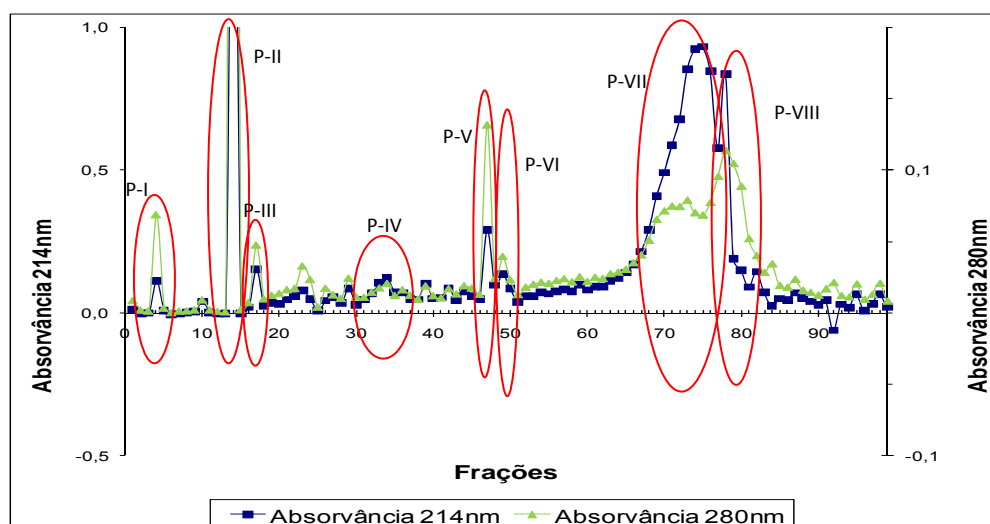


Figura 7 – Cromatografia de exclusão molecular do Extrato Solúvel (ES) de folhas totalmente expandidas de pimentão ‘Sunshine’ em Sephadex -G-50. Oito pools foram destacados (P-I a P-VIII) e recuperados, e quatro deles foram submetidos à espectrometria de massas. A separação foi desenvolvida na presença de Tris-HCl 5mM, pH 7,0, ao fluxo de 0,5 mL.min⁻¹. A amostra correspondeu a 10 mL do *pool* obtido das Regiões 1 e 2 da separação em Sephadex G-10 (**Figura 6**) e frações de 1,3 mL foram recuperadas.

No entanto, não se obteve nenhuma identificação computacional por homologia das seqüências previstas desses peptídeos utilizando o banco de dados não redundante do UniProt (The UniProt, 2009). A partir das análises dos espectros de MS, três possíveis causas para a não obtenção de homologia podem ser sugeridas a princípio: o banco de dados utilizado pode ter sido muito amplo, também contendo proteínas de alta massa, o que dificulta a identificação de peptídeos; a separação em apenas oito *pools*, após a

Sephadex G-50, pode não ter sido suficiente para se obter um alto grau de pureza e concentração da amostra, por se tratar de uma mistura complexa de proteínas; o tratamento enzimático com tripsina pode não ter sido eficaz. Observou-se a ocorrência de peptídeos duplamente carregados (**Figura 8**) em apenas uma pequena faixa do gradiente de acetonitrila. Em uma digestão eficaz era esperado que ocorresse a presença de peptídeos duplamente carregados na maior parte do gradiente.

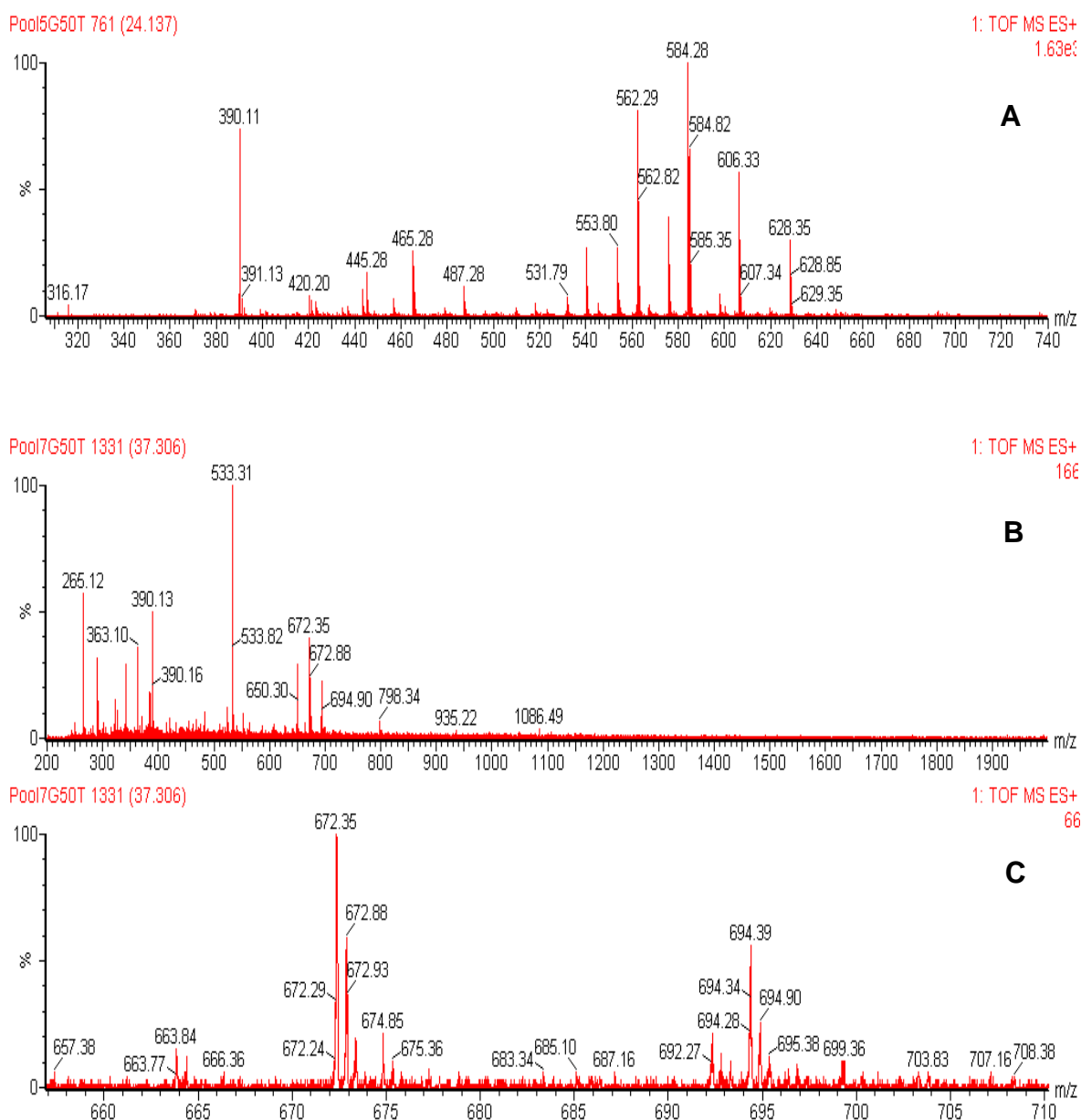


Figura 8 – Análises espectrométricas (MS) do Extrato Solúvel (ES) de folhas totalmente expandidas de pimentão ‘Sunshine’ após Sephadex G-50. Separação do Pool V (**A**) e Pool VII (**B**). Estas amostras foram submetidas à espectrometria de massa acoplada à C18-RP-HPLC. Em **B**, a região de interesse foi expandida, mostrando peptídeos duplamente carregados. Em **C**, a região de m/z entre 660 e 710 foi ampliada para melhor visualização do espectro encontrado, observando-se peptídeos duplamente carregados.

Embora um grande número de picos tenha sido obtido, as frações não apresentaram um grau de purificação que permitisse desenvolver a identificação e o sequenciamento via espectrometria de massa.

As frações correspondentes a ESP6 (P-VI) e a ESP7 (P-VII) foram selecionadas pela quantidade de material disponível, pela qualidade da separação observada a partir do perfil cromatográfico (**Figura 7**), e pelo grau de inibição microbiana (**Figura 12**), e separadas em C18-RP-HPLC, buscando melhor purificação para nova análise por espectrometria de massa (LNLS) (**Figura 10**). Foram coletados 18 picos a partir da separação de ESP7 por C18-RP-HPLC. O pico 10 (**Figura 9A**) foi separado por C4-RP-HPLC, seis picos foram coletados e o pico 2 (**Figura 9B**) analisado por MS (figura 10C), buscando avaliar o grau de pureza e identificar os componentes de cada fração. ESP6 também foi submetido à separação por C18-RP-HPLC e posterior MS (**Figura 10B**).

No entanto, não foi possível a identificação das seqüências peptídicas, possivelmente devido a uma separação restrita das frações submetidas a MS, a possíveis agentes interferentes ou a uma alta degradação protéica.

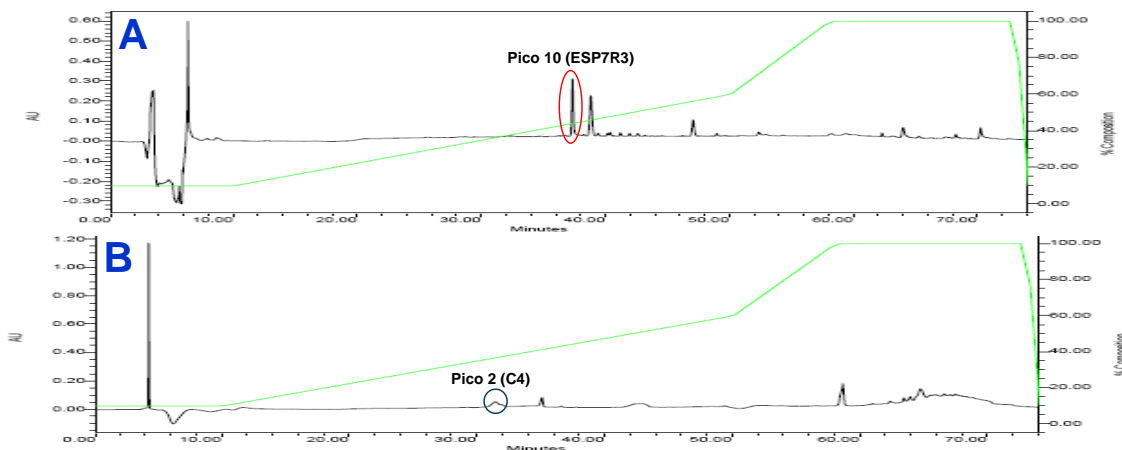


Figura 9 – Cromatografias de fase reversa da fração ESP7R3 (C18) e da fração Pico 10 (C4). **(A)** Perfil cromatográfico decorrente de separação em coluna C18-RP-HPLC de Extrato Solúvel (ES) pool VII (**Figura 7**) de folhas totalmente expandidas de pimentão da variedade Sunshine após Sephadex G-50. A terceira repetição (R3) foi analisada usando detector de absorvância em 214nm. **(B)** Perfil cromatográfico decorrente de separação em coluna C4-RP-HPLC do pico 10, destacado (vermelho) em (A). A linha verde corresponde à concentração da solução de eluição (solução B: 0,1% TFA e 80% acetonitrila). Em azul também se encontra o pico 2, provido da separação de ESP7R3, submetido posteriormente a MS (**Figuras 10C**).

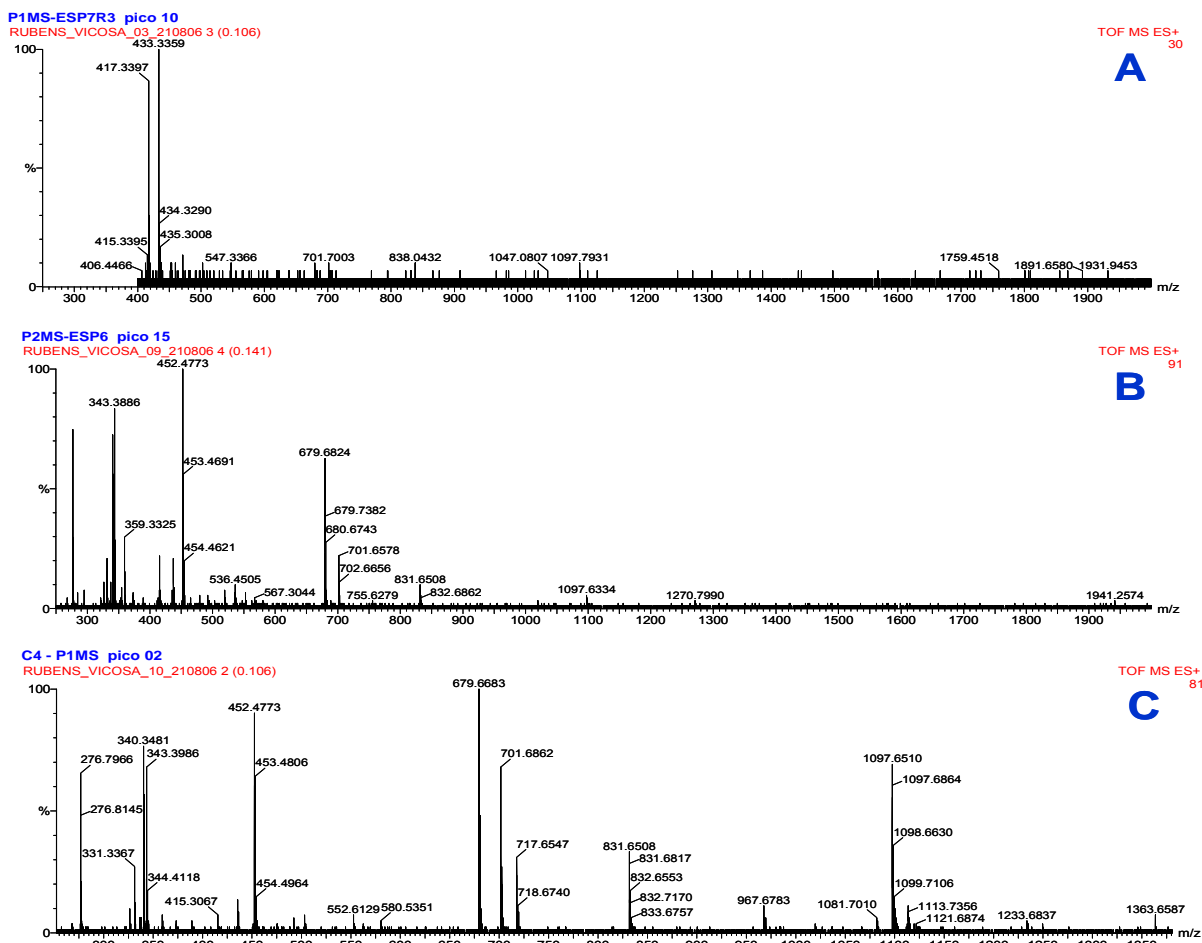


Figura 10 – Análises espectrométricas (MS) de frações tripsinizadas obtidas após separação em C18-RP-HPLC e C4-RP-HPLC. Os espectros referentes ao pico 10 (A) provido de ES-P7 após separação em colunas Sephadex G-50 e C18-RP-HPLC e ao pico 15 (B) provido de ES-P6 estão apresentados. O pico 10 foi submetido a nova separação por C4-RP-HPLC e nova análise por MS foi realizada com o pico 2 coletado (C) (Figura 9B). Os espectros não mostram compostos com massas superiores a 2 kDa e apresentam grande interferência impossibilitando análises precisas dos dados obtidos, já o espectro referente à C4-RP-HPLC (C), apresentou-se com menos interferência, embora com compostos ainda abaixo da massa molecular esperada.

Não foram encontrados compostos com mais de 2 kDa nos espectros obtidos a partir de ES-P6 e ES-P7, separados em C18-RP-HPLC, possivelmente pela ocorrência de degradação proteolítica e/ou pela alta concentração de interferentes, dificultando a análise dos dados obtidos (Figura 10A e 10B). Já os espectros obtidos a partir de C4-RP-HPLC (Figura 10C) se mostraram mais definidos, possivelmente pela menor concentração de interferentes nas frações analisadas, apesar de não serem identificados peptídeos com massa esperada. Somente foram encontrados peptídeos com massas inferiores a 2 kDa.

A utilização da cromatografia de interação hidrofóbica para separar EP (Phenyl Sepharose, **Figura 11**) foi realizada com o objetivo de reduzir a concentração salina da amostra e de avaliar a separação protéica, dada a característica hidrofóbica dos peptídeos de interesse relatada pela literatura (Matsuzaki *et al.*, 1999; Hancock, 2001; Zasloff, 2002).

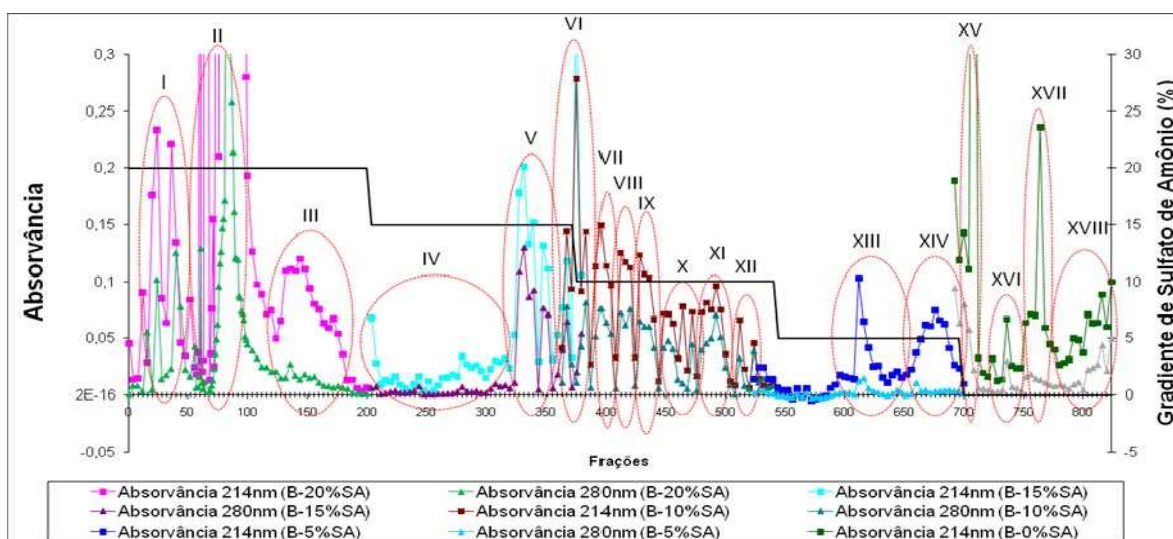


Figura 11 – Cromatografia hidrofóbica em Phenyl Sepharose do Extrato de Parede Celular (EP) de folhas totalmente expandidas de pimentão ‘Sunshine’. Foram aplicados 10 mL, obtendo-se dezoito pools destacados (I a XVIII), que foram utilizados para ensaio de inibição microbiana. A coluna foi equilibrada com Tris HCl 25 mM, pH 7,0, com 20% de sulfato de amônio. A cromatografia desenvolveu-se com gradiente decrescente descontínuo de sulfato de amônio, com passos a cada 200 mL (Representado em Preto).

Por EP apresentar menor concentração de proteínas, os extratos foram utilizados para ensaios antimicrobianos, e não foram analisados por MS.

Dessa forma, houve a necessidade de se fazer novas extrações a fim de se obter material necessário para repetição das etapas realizadas, inserindo-se modificações, realizando testes de novos métodos de purificação e eliminando-se o aquecimento seletivo, o qual pode ser responsável pela aglomeração peptídica.

6.2. Teste de Atividade Antibacteriana

Testes de inibição antimicrobiana utilizando as frações eluídas da cromatografia de exclusão molecular (Sephadex G-50, **Figura 7**), contra as bactérias *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* e *Ralstonia solanacearum* (**Figura 12**), evidenciaram o potencial inibitório de um grupo de frações, sendo importante para indicar os picos a serem priorizados em análises posteriores.

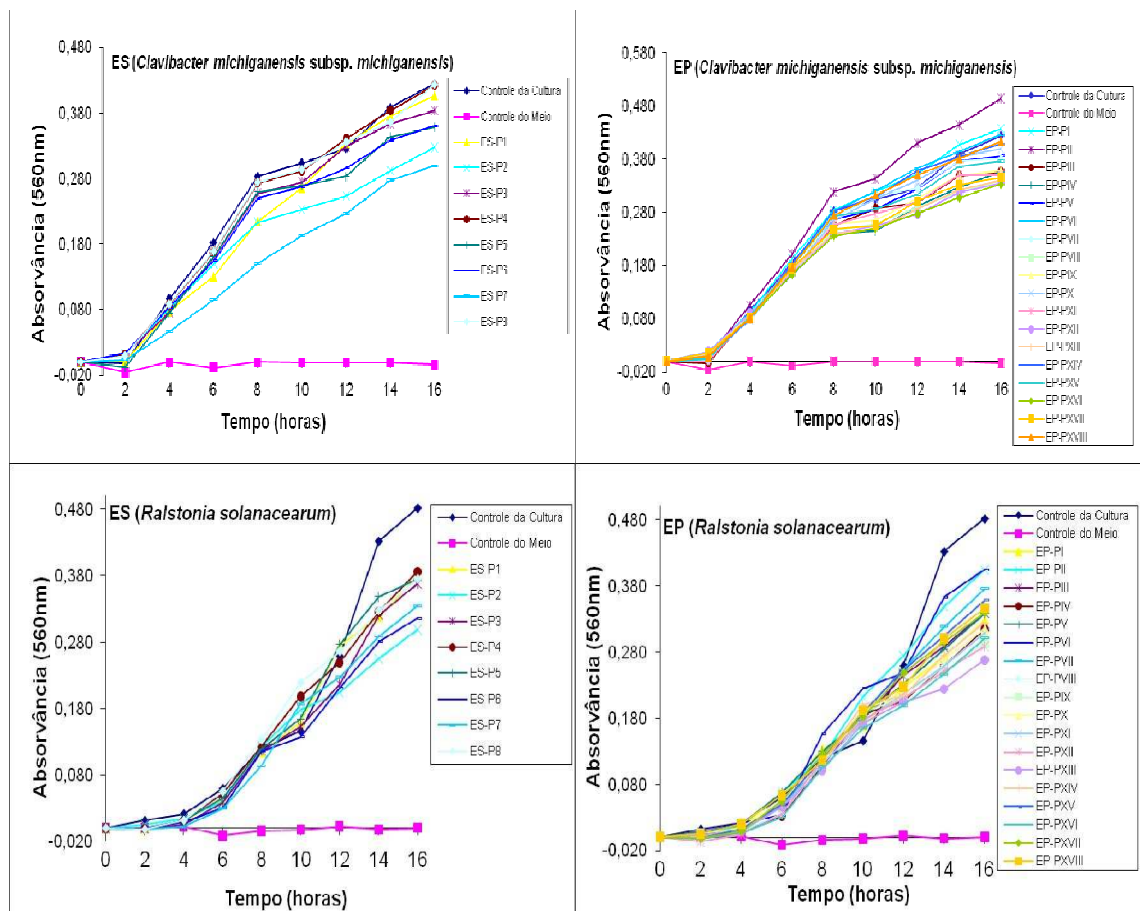


Figura 12 – Inibição no crescimento de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* e de *Ralstonia solanacearum* por frações coletadas após cromatografia de exclusão molecular (ES, **Figura 7**) e hidrofóbica (EP, **Figura 11**). O crescimento bacteriano foi monitorado em leitor de microplacas (absorvâncias a 560 nm) por 16 horas. As amostras foram ensaiadas em triplicata sendo o valor do desvio padrão inferior a 10 %. O controle da cultura correspondeu ao cultivo da bactéria em ausência dos extratos peptídicos. O controle do meio correspondeu ao meio de cultivo na ausência da bactéria e dos extratos.

Portanto, ES e EP apresentaram potencial antimicrobiano a ser explorado e as cromatografias de exclusão molecular de ES permitiram o enriquecimento das frações peptídicas. A comparação com experimentos já realizados, inclusive com a separação em Sephadex G-10 (**Figura 5**), sugere que a fração ES-PVII contenha peptídeos antimicrobianos em menor grau de aglomeração, enquanto as frações anteriormente obtidas (ES-P11, ESPV, ESPVI) podem ter peptídeos em diferentes graus de aglomeração. As atividades antimicrobianas observadas por ação das frações provenientes de EP podem ter sido influenciadas pela concentração salina (sulfato de amônio) decorrente da separação hidrofóbica. No entanto, são observadas atividades superiores a 20% (EP-PXVI) e a 18% (EP-PXVII) contra ambas as bactérias testadas, ocasionadas por frações eluídas na cromatografia hidrofóbica na ausência de sal.

6.3. Protocolo de Extração Rápida

Durante o decorrer do protocolo anterior observou-se degradação dos peptídeos de interesse, possivelmente devido a uma demorada etapa de purificação e à ocorrência de aglomeração peptídica, agravada pela etapa de aquecimento. Diante desse fato, uma nova extração foi realizada alterando-se as etapas de purificação, esperando-se obter uma menor degradação e a obtenção de maiores quantidades de peptídeos para futuras análises.

Folhas de pimentão da variedade Sunshine (78,29 gramas) foram colhidas e usadas como fonte de peptídeos, e os protocolos de extração e purificação foram desenvolvidos conforme fluxograma a seguir (**Figura 13**).

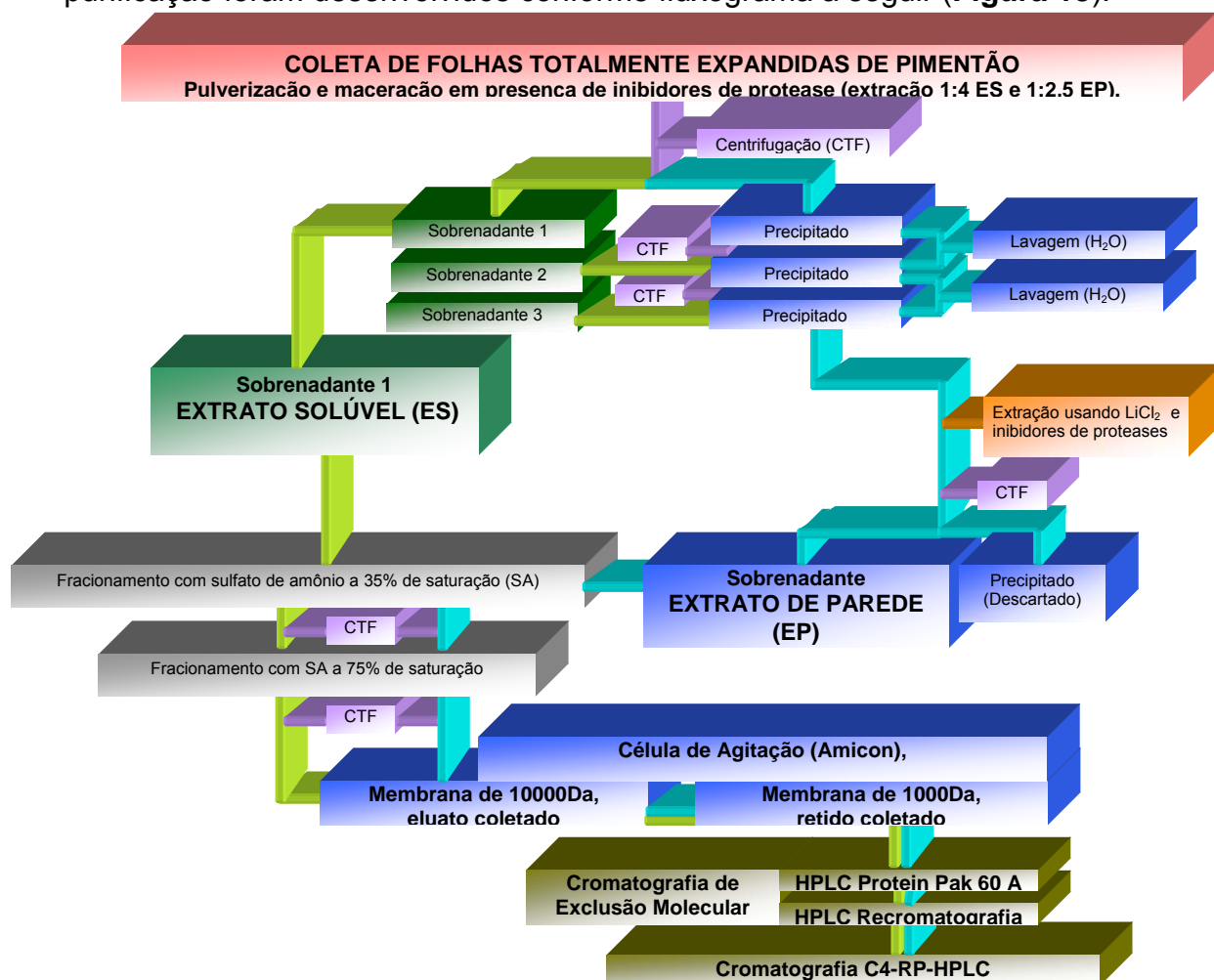


Figura 13 – Etapas de extração e de purificação otimizada de peptídeos de folhas totalmente expandidas de pimentão ‘Sunshine’. As folhas foram pulverizadas com nitrogênio líquido e maceradas com tampão de extração. O extrato obtido foi centrifugado e o sobrenadante coletado, nomeado ES. O precipitado foi lavado mais duas vezes e a ele foi adicionado LiCl₂ por duas horas. Nova centrifugação foi feita obtendo-se EP. Tanto ES quanto EP foram fracionados por sulfato de amônio (SA) a 35% e posteriormente a 75% de saturação. Os extratos obtidos foram ultrafiltrados em duas etapas. Na primeira foi utilizada membrana de 10000Da para separar os contaminantes de tamanho superior ao poro da membrana, coletando-se o material eluído. Na segunda etapa foi utilizada membrana de 1000Da para separar os contaminantes com tamanho menor que o poro da membrana e também para concentração da amostra de interesse. ES e EP coletados foram separados por cromatografia de exclusão molecular (HPLC, Protein Pak 60A) em dois grupos (ES) e cinco grupos (EP), resubmetidos a mesma separação individualmente (Recromatografia). As frações obtidas na recromatografia foram agrupadas e posteriormente resubmetidas a cromatografia C4-RP-HPLC.

Duas etapas de ultrafiltração por célula de agitação (Amicon, **Item 5.3.3**) (Membrana de 10.000 e 1.000 Da) foram acrescentadas com o objetivo de obter frações enriquecidas em peptídeos (1 a 10 kDa) antes dos procedimentos cromatográficos. SDS-Tricina-PAGE foi utilizado para acompanhar o enriquecimento dos peptídeos nas frações (dados não apresentados). Bandas com massas estimadas abaixo de 6.500 Da foram encontradas nas amostras recuperadas, comprovando assim a eficácia do procedimento.

6.3.1. Purificação dos Peptídeos de Folhas de Pimentão

As etapas para purificação parcial dos peptídeos de interesse se desenvolveram, principalmente, por cromatografias em HPLC, das amostras já fracionadas por sulfato de amônio (SA 35% e 75% saturação) e ultrafiltração (membranas de 10.000 Da e 1.000 Da, sequencialmente), que proporcionaram uma importante eliminação dos contaminantes segundo sua solubilidade e tamanho.

ES e EP após ultrafiltração (**Figura 13**) foram separados por cromatografias de exclusão molecular em coluna “Protein Pak 60A” em HPLC (fluxo de 0,5 mL.min⁻¹, fase móvel Tris-HCl 50mM, pH 7,0, temperatura controlada de 30°C). Três separações de ES e de EP, para obtenção de quantidade suficiente de material eluído, foram realizadas (**Figuras 14 e 15**). *Pools* foram formados e liofilizados para um novo ensaio de inibição microbiana contra *Ralstonia solanacearum* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, para seleção de novas frações de interesse. O teste foi feito segundo protocolo apresentado no **item 5.6** e os resultados estão apresentados na **Figura 16**.

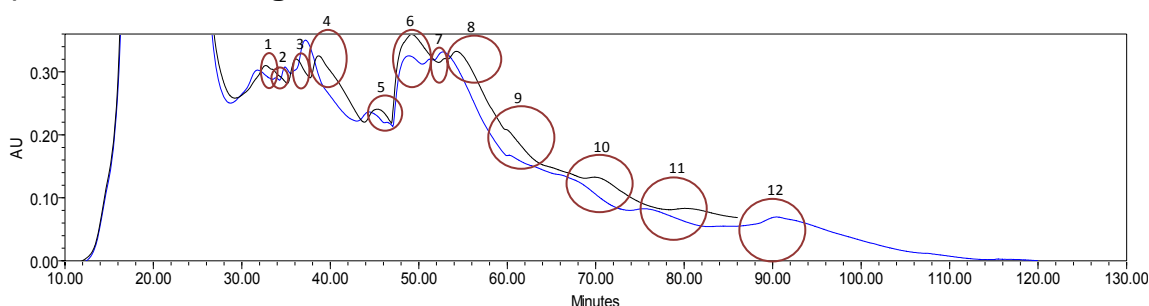


Figura 14 – Cromatografia de exclusão molecular em HPLC (coluna Protein Pak 60A) do ES após ultrafiltração (**Figura 13**). O fluxo utilizado foi de 0,5 mL/min, fase móvel Tris-HCl 50mM, pH 7,0, 30°C, Abs. a 214 nm. Das três separações realizadas, apenas duas são sobrepostas acima. Em destaque se encontram as regiões agrupadas em *pools* usadas para realização de teste de inibição microbiana (**Figura 16**).

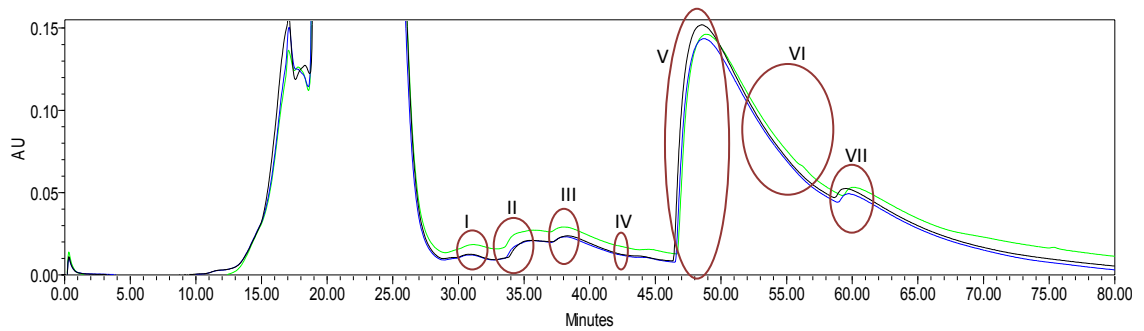


Figura 15 – Cromatografia de exclusão molecular em HPLC (coluna Protein Pak 60A) do EP após ultrafiltração (**Figura 13**). O fluxo utilizado foi de 0,5mL/min, fase móvel Tris-HCl 50mM pH 7,0, 30°C, Abs. a 214 nm. Três separações realizadas foram sobrepostas. Em destaque se encontram as regiões agrupadas em *pools* usados para realização de teste de inibição microbiana (**Figura 16**).

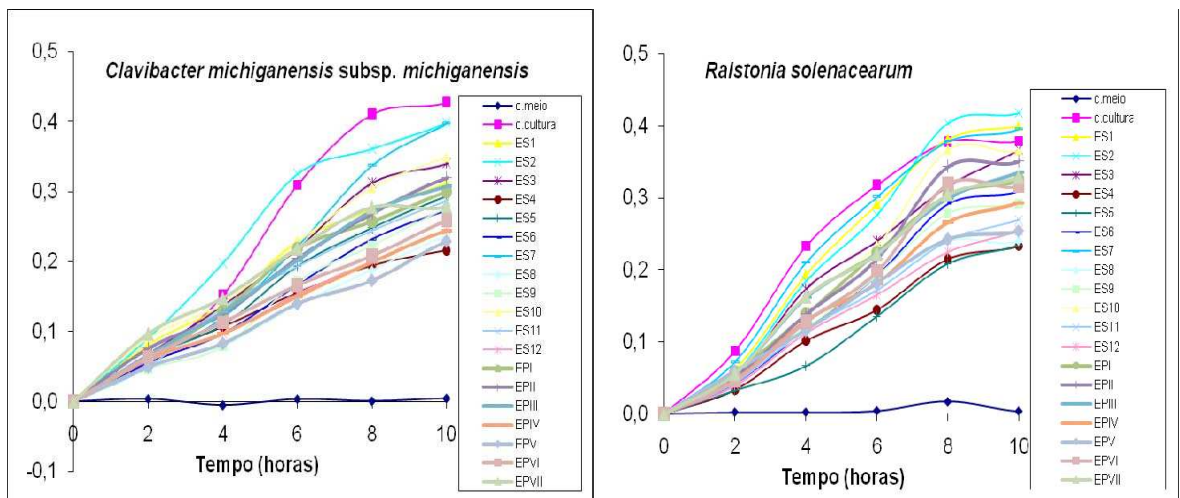


Figura 16 – Inibição no crescimento de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* e de *Ralstonia solanacearum* por frações eluídas da cromatografia de exclusão molecular (ES, **Figura 14** e EP, **Figura 15**). O crescimento das bactérias foi avaliando em leitor de microplacas (absorvâncias a 560 nm) por 10 horas. O controle da cultura correspondeu ao cultivo da bactéria em ausência dos extratos peptídicos. O controle do meio correspondeu ao meio de cultivo na ausência da bactéria e dos extratos.

Valores de inibição superiores a 20% foram observados para *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, pelas frações ES4 (30%), ES8 (27%), ES9 (20%), ES12 (21%), EPIV (27%), EPV (31%) e EPVI (25%), e para *Ralstonia solanacearum*, pelas frações ES4 (31%), ES5 (34%), ES8 (28%), ES11 (24%), ES12 (27%) e EPV (27%), com 10 horas de ensaio, e denotam a eficiência do protocolo de extração rápida. A quantidade de material utilizado para o teste foi correspondente à extração de 1,5g de folhas de pimentão da variedade Sunshine. A alta inibição de EPV pode ter sido causada pela presença de sal em alta concentração na fração eluída. Todo o material submetido à cromatografia e usado para o teste de inibição veio de fracionamento por SA 35 e 75% de saturação, onde o precipitado foi eluído em célula de agitação com membrana com tamanho de poro de 10 kDa, e retido por membrana com tamanho de poro de 1 kDa, não tendo sido realizadas

lavagens durante a passagem do material. Logo, ES e EP foram recuperados após ultrafiltração contendo moléculas com tamanho esperado de 1 a 10 kDa, condizente com o tamanho relatado dos AMPs pela literatura (2 a 9 kDa, Hancock e Lehrer, 1998).

Novas cromatografias de exclusão molecular foram feitas e novas regiões foram delimitadas, abrangendo toda a extensão dos perfis. Assim, ES e EP retidos em célula de agitação com membrana 1kDa foram novamente separados por cromatografias de exclusão molecular. As **Figuras 17 e 18** correspondem aos perfis obtidos que foram divididos em grupos de frações de ES (grupo 1 (G1) e grupo 2 (G2)) e de EP, (grupo I (GI), grupo II (GII), grupo III (GIII), grupo IV (GIV) e grupo V (GV)).

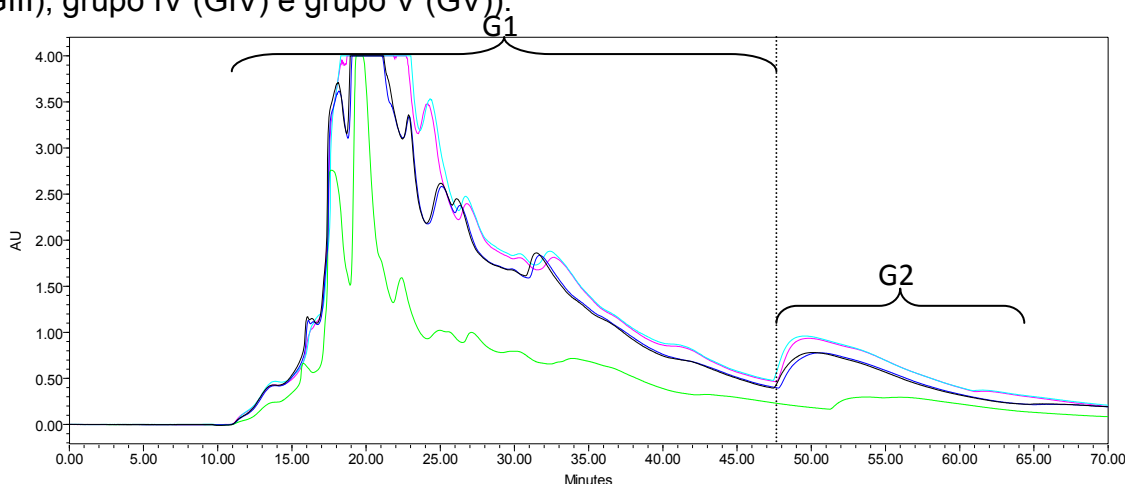


Figura 17 – Cromatografias de exclusão molecular em HPLC (coluna Protein Pak 60A) do ES após ultrafiltração (**Figura 13**) e delimitação de ES-G1 e ES-G2. O fluxo utilizado foi 0,5mL/min, fase móvel Tris-HCl 50mM, pH 7,0, 30°C, abs. à 214 nm. Cinco separações realizadas foram sobrepostas. A diferença dos perfis pode ser devido a concentração diferencial das amostras aplicadas. Os grupos formados para recromatografia estão indicados na figura. O grupo dois (G2) não foi submetido a recromatografia.

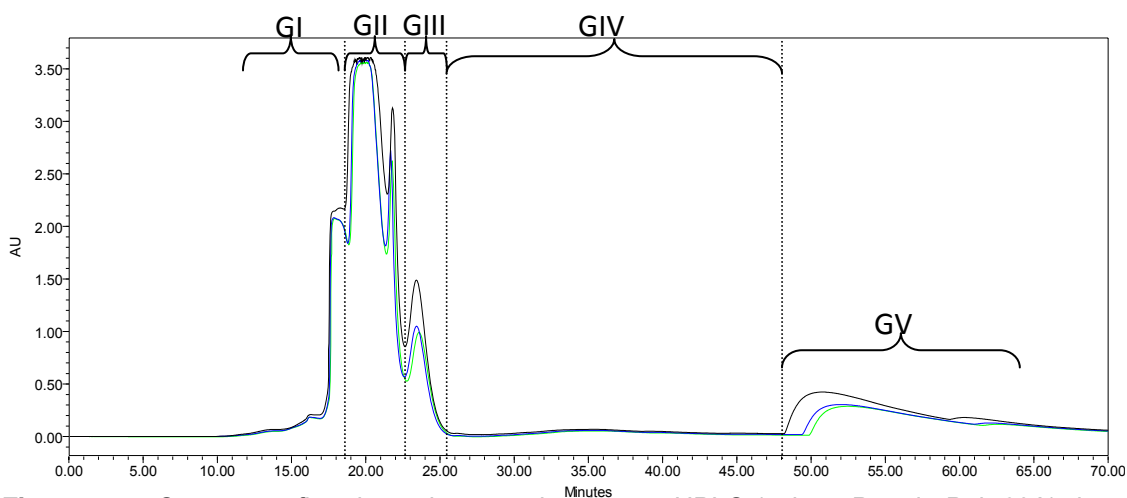


Figura 18 – Cromatografias de exclusão molecular em HPLC (coluna Protein Pak 60A) do EP após ultrafiltração (**Figura 13**) e delimitação dos grupos EP-GI a EP-GV. Três separações realizadas foram sobrepostas. O fluxo utilizado foi 0,5mL/min, fase móvel Tris-HCl 50mM, pH 7,0, 30°C, abs. à 214 nm. A diferença dos perfis é devida a concentração diferencial das amostras aplicadas. Os grupos formados para recromatografia estão indicados na figura (GI, GII, GIII e GIV). O grupo cinco (GV) não foi submetido a recromatografia.

As frações ES-G2 e EP-GV foram estocadas em freezer a -80°C e os demais grupos individualmente foram submetidos à recromatografia de exclusão molecular, na tentativa de melhorar a resolução dos perfis. O fluxo foi diminuído para $0,2\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. As separações recromatográficas de ES e a sobreposição das separações realizadas, correspondente a cada um dos grupos obtidos a partir da recromatografia de EP, estão apresentadas nas **Figuras 19 e 20**.

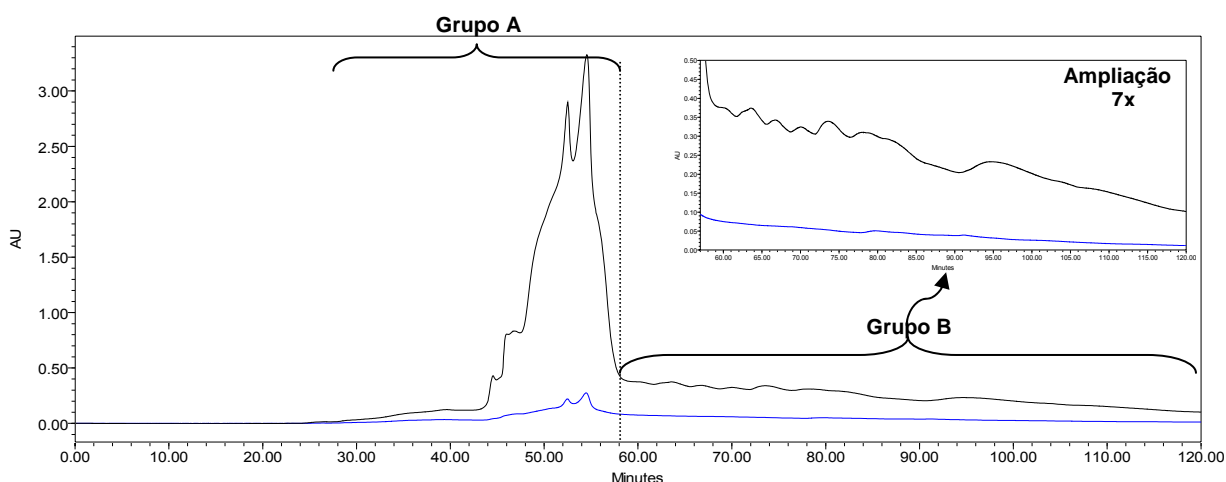


Figura 19 – Recromatografia de exclusão molecular em HPLC de ES-G1. O perfil foi obtido utilizando equipamento HPLC com coluna Protein Pak 60A, fluxo $0,2\text{ mL}/\text{min}$, fase móvel Tris-HCl 50 mM , pH 7,0, 30°C , abs. a 214 nm e a 280 nm . As frações aplicadas estão apresentadas na **Figura 17**. Dois grupos foram separados para cromatografia de fase reversa: ES-G1-A e ES-G1-B. À direita, ampliação da região referente ao grupo B.

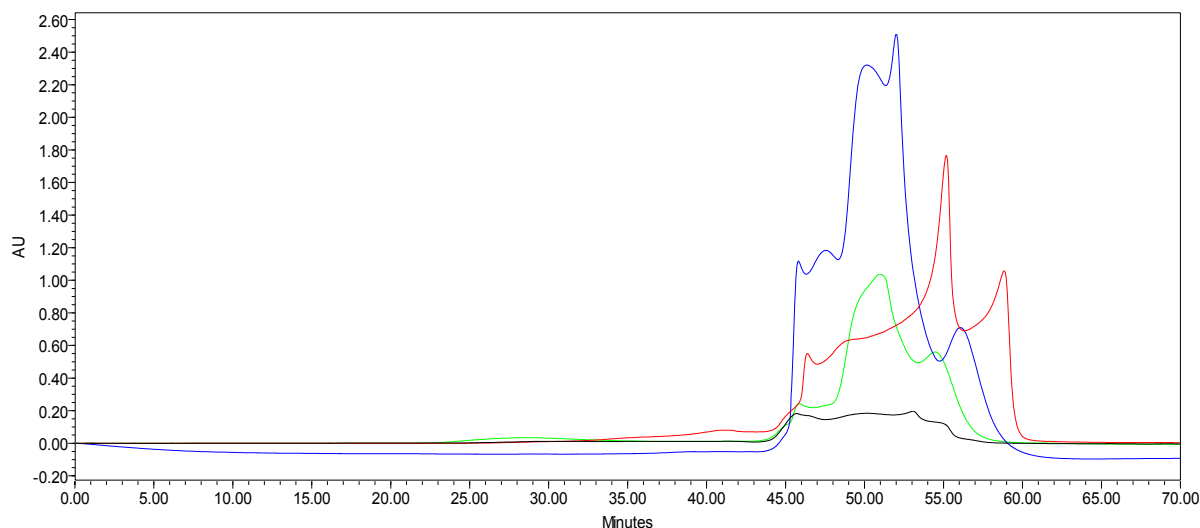


Figura 20 – Recromatografias de exclusão molecular em HPLC de EP-GI (vermelho), EP-GII (azul), EP-GIII (verde) e EP-GIV (preto). Os perfis sobrepostos foram obtidos utilizando equipamento HPLC com coluna Protein Pak 60A, fluxo $0,2\text{ mL}/\text{min}$, fase móvel Tris-HCl 50 mM , pH 7,0, 30°C , abs. a 214 nm . As frações aplicadas estão apresentadas na **Figura 17**.

Analisando os resultados obtidos pela recromatografia de exclusão molecular de EP, observa-se que o aumento da resolução dos picos não foi satisfatório, mesmo com fluxo 2,5 vezes menor do que o fluxo da cromatografia anterior. Por isso essa etapa foi considerada desnecessária para o protocolo de purificação de EP e os picos eluídos de cada grupo foram recuperados e reagrupados, para serem aplicados à cromatografia de fase reversa. Para ES, a etapa foi mantida.

As separações utilizando cromatografia de fase reversa foram realizadas em HPLC com coluna C4. Devido ao menor tamanho dos peptídeos de interesse e a sua alta hidrofobicidade, as interações realizadas com a fase estacionária são relativamente mais significativas para o seu progresso durante a separação do que interações realizadas por proteínas com alto peso molecular. Assim, espera-se que uma fase estacionária constituída por uma menor cadeia carbônica possa proporcionar menor área para interações das moléculas com a fase estacionária favorecendo os peptídeos de interesse. Dessa forma, todas as frações obtidas na recromatografia de exclusão molecular referentes a cada grupo analisado foram agrupadas e submetidas a cromatografias de fase reversa. Os perfis obtidos são apresentados nas **Figuras 21 e 22**.

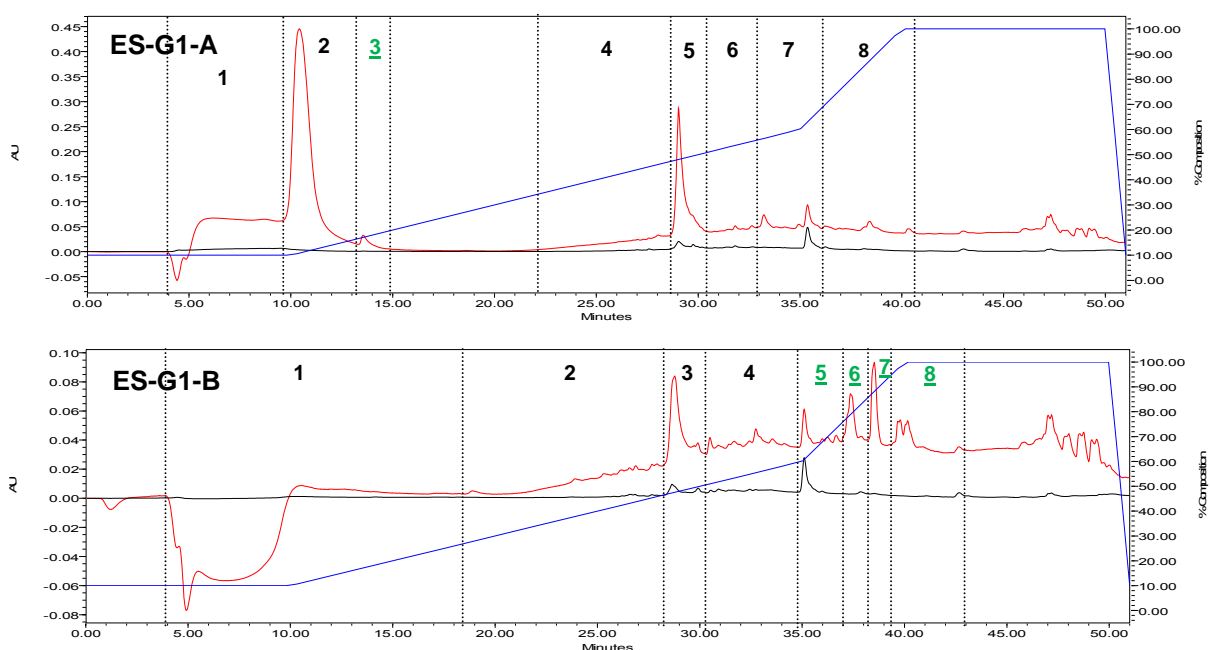


Figura 21 – Cromatografias em C4-RP-HPLC, de ES-G1-A e ES-G1-B após recromatografia de exclusão molecular (**Figura 19**). O fluxo foi de 1,0 mL/min, temperatura 30°C, abs. a 214 nm (vermelho) e 280 nm (preto). Um gradiente descontínuo de acetonitrila de 8 a 80% (10 a 100% de B contendo acetonitrila 80%+TFA 0,1%, eixo secundário) foi feito (azul). Em destaque regiões que apresentaram mais de 60% de inibição (verde).

Observa-se, na separação de ES, a existência de picos coincidentes com tempos de eluição de aproximadamente 28 e 31 minutos. Uma corrida controle realizada com H₂O e TFA 0,1% como amostra e como o solvente, mantendo-se as mesmas condições das separações realizadas, não evidenciou a presença de picos no controle, indicando que picos coincidentes são de ambas as amostras.

Houve uma separação satisfatória de ES e EP por cromatografia de fase reversa. O material eluído foi coletado e submetido a novo teste de inibição microbiana.

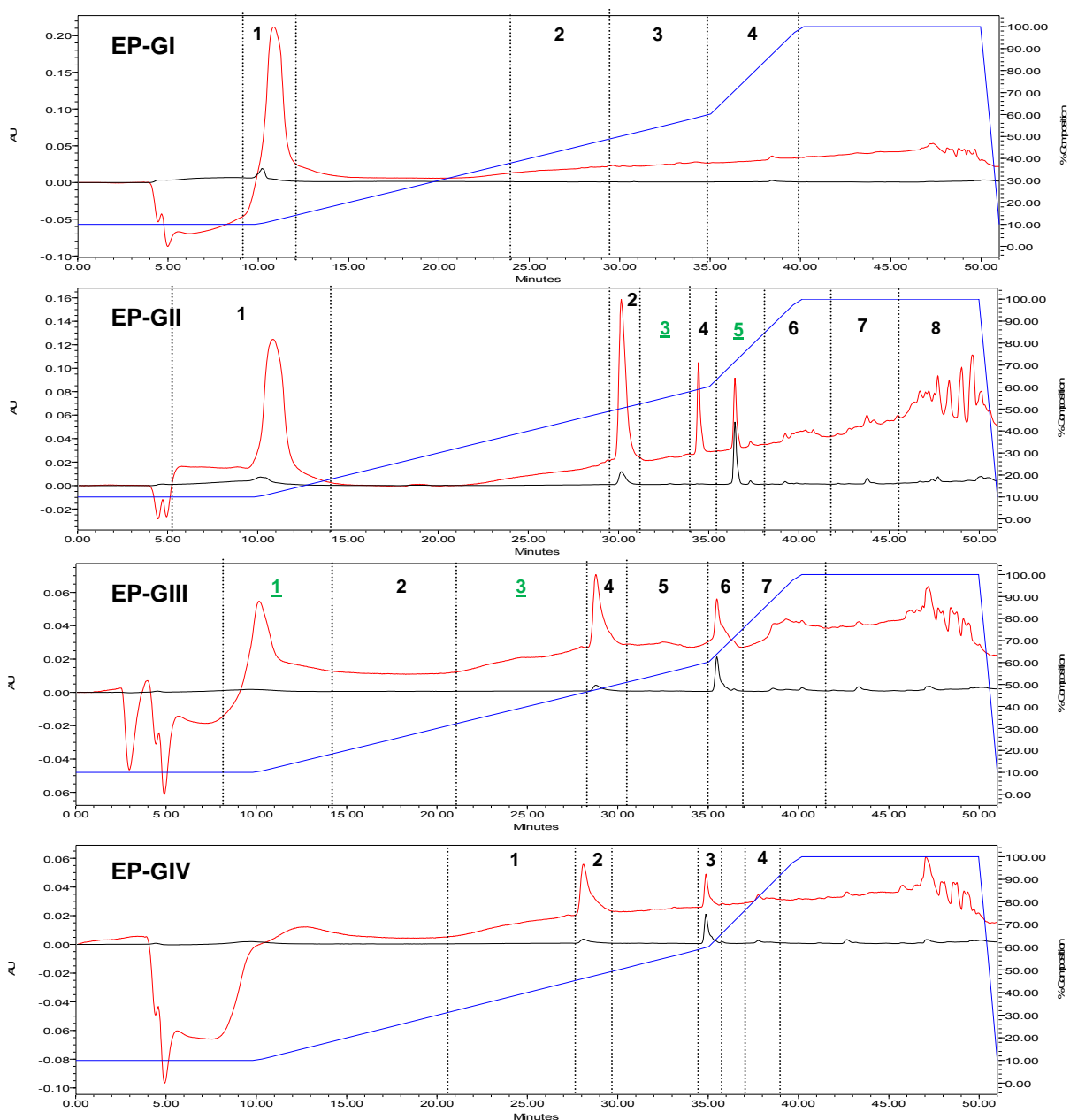


Figura 22 – Cromatografias em C4-RP-HPLC, de EP-GI, EP-GII, EP-GIII e EP-GIV após cromatografia de exclusão molecular (**Figura 18**). O fluxo foi de 1,0 mL/min, 30°C, Abs. à 214 nm (vermelho) e 280 nm (preto). Um gradiente descontínuo de acetonitrila de 8 a 80% (10 a 100% de B contendo acetonitrila 80%+TFA 0,1%, eixo secundário) foi feito (azul). Em destaque regiões que apresentaram mais de 60 % de inibição (verde).

Para eliminar a acetonitrila, agente inibitório presente em todo material eluído da fase reversa em concentrações variadas, o material foi fervido por duas horas em banho-maria, em capela de exaustão. A escolha desse procedimento se deve ao fato do ponto de ebulição da acetonitrila ser 82°C e de alguns peptídeos antimicrobianos serem termorresistentes (Lindorff-Larsen e Winther, 2001). Em ensaios inibitórios realizados previamente no laboratório de Proteômica e Bioquímica de Proteínas observou-se que o tempo de duas horas de fervura foi suficiente para a retirada da acetonitrila presente no meio em diferentes concentrações, ocasionando inibição microbiana desconsiderável nas bactérias *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* e *Ralstonia solanacearum* (Barbosa, 2008).

O teste de inibição foi feito conforme protocolo apresentado no **item 5.6**. Devido a falta de material, foram feitos testes apenas com extratos em diversas etapas da purificação contra as bactérias *Ralstonia solanacearum* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* a fim de avaliar a efetividade do método antes de realizar nova extração. A curva de crescimento das bactérias testadas com as frações obtidas estão apresentadas na **Figura 23**.

Divergências foram observadas pela comparação dos resultados obtidos após teste de inibição microbiana. As frações correspondentes aos extratos obtidos após cromatografia de exclusão molecular apresentaram baixa inibição, enquanto frações do mesmo material, em etapa mais adiantada do protocolo de separação (após etapa de cromatografia de fase reversa) apresentaram alta inibição. Isso possivelmente se deve a baixa concentração dos compostos inibidores no extrato, assim como a atuação de outros compostos que poderiam exercer um papel estimulador em relação ao crescimento microbiano. As frações EP-GII e EP-GIII, por exemplo, apresentaram inibição pouco considerável, enquanto RP-GII-3 e 5, RP-GIII-1 e 2 (*pools* 3 e 5, 1 e 2 de EP-GII e EP-GIII, respectivamente, após fase reversa) apresentaram alta inibição, provavelmente devido a um enriquecimento do composto inibitório durante o processo cromatográfico. O mesmo foi observado para as frações de ES (RP-G1-A-3 e RP-G1-B-5, 6, 7 e 8).

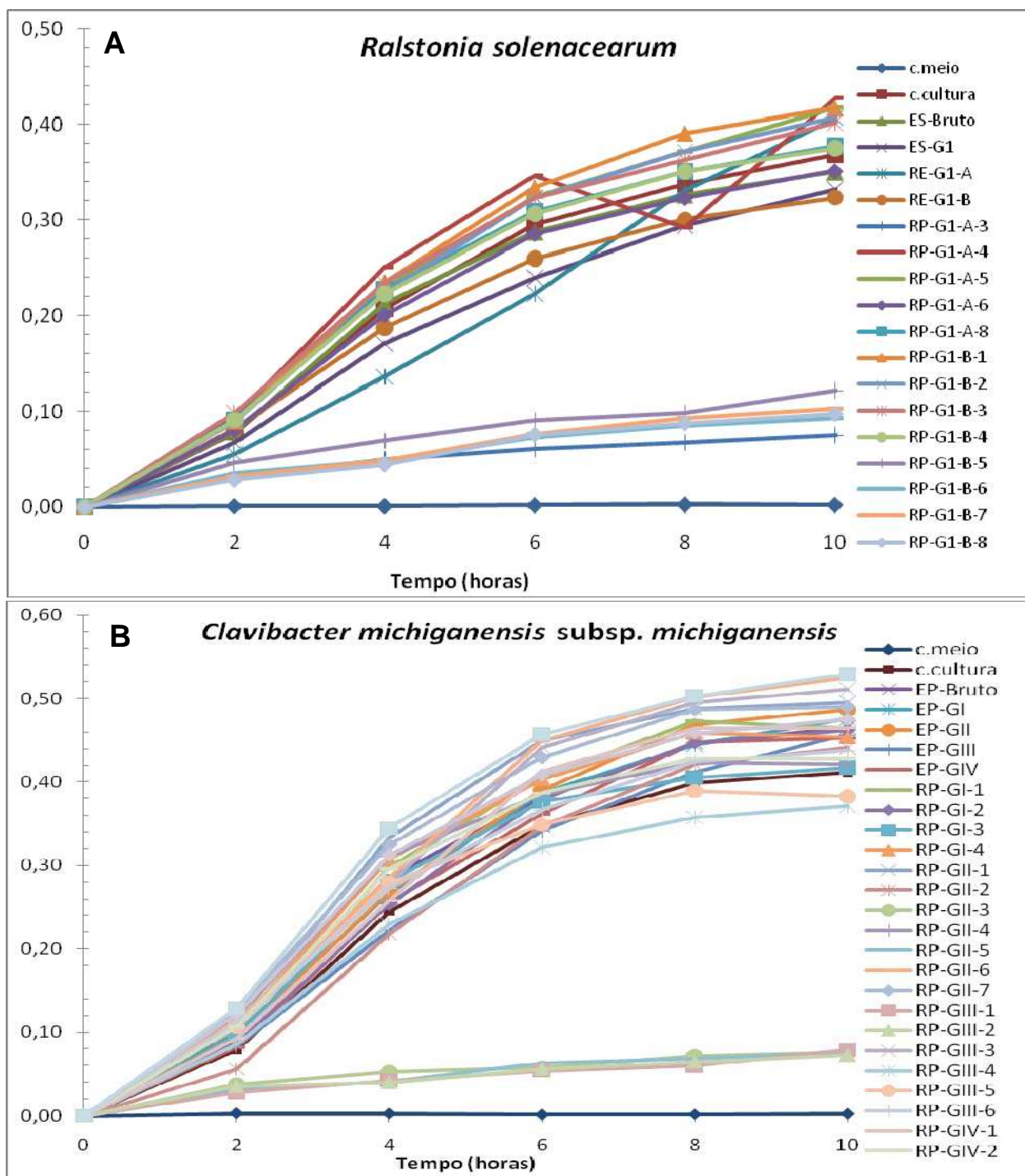


Figura 23 – Inibição das bactérias *Ralstonia solanacearum* (A) e *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* (B) pelas frações ES e EP, respectivamente, enriquecidas de peptídeos, providas de diversas etapas de fracionamento. Crescimento bacteriano mediante a adição de frações obtidas de folhas totalmente expandidas de pimentão da variedade Sunshine após separações pré-cromatográficas (ES e EP-Bruto), exclusão molecular (RE e EP-GI a GIV) e C4-RP-HPLC (RP), avaliando-se as absorvâncias a 560 nm em leitor de microplacas por 10 horas. O controle da cultura correspondeu ao cultivo da bactéria em ausência dos extratos peptídicos. O controle do meio correspondeu ao meio de cultivo na ausência da bactéria e dos extratos.

Observando ainda os resultados obtidos pelo teste de atividade antimicrobiana é possível encontrar valores de inibição negativos (maior crescimento do microrganismo com a fração peptídica do que o controle da

cultura). Isso indica que certas frações podem estar estimulando o crescimento bacteriano pela presença de fontes de carbono adicionais ou pela presença de moléculas que podem estimular o crescimento das bactérias por atuação nas vias metabólicas e na expressão gênica. No entanto, observam-se frações com alta capacidade inibitória (mais de 80 %), o que pode ser justificado pela eliminação dos interferentes presentes no extrato bruto e pela alta concentração dos peptídeos de interesse, já que essas frações se encontram em estágio avançado de purificação (obtidas por cromatografia de fase reversa).

Esse resultado também mostra que, conforme esperado, os compostos responsáveis pela inibição microbiana não perderam sua capacidade inibitória quando fervidos por duas horas (para remoção de toda a acetonitrila e TFA do meio), podendo ser considerados termoestáveis em temperatura de 98 °C e resistentes a ação de solventes orgânicos (acetonitrila). Lindorff-Larsen e Winther (2001) descreve a LTP1 de cevada, AMP com cerca de 90 resíduos de aminoácidos altamente estável à ação de agentes desnaturantes, proteases e temperaturas até 100 °C. Barbosa (2008) também obteve frações contendo peptídeos de folhas de semente de soja que se apresentaram estáveis em alta temperatura e na presença de solventes orgânicos. Por essas características, esses compostos são muito promissores para a utilização como componentes para a proteção de plantas contra os referidos microrganismos testados.

6.4. Novo Plantio e Extração de Material Vegetal

Para obtenção de maior quantidade de material para sequenciamento via espectrometria de massa e realização de novos ensaios antimicrobianos, foi realizado um novo plantio de sementes de pimentão da variedade Sunshine e, após cerca de 60 dias, 20 gramas de folhas foram colhidas e usadas como fonte de peptídeos. Os procedimentos para extração e purificação das amostras foram realizados à semelhança do apresentado na **Figura 13**, diferindo pelo maior número de lavagens durante a etapa de ultrafiltração (3 em cada etapa) e pela eliminação da etapa cromatográfica de exclusão molecular.

Devido à pouca quantidade de material disponível, e buscando testar a separação usando C4-RP-HPLC do material obtido após etapa de ultrafiltração otimizada pela adição das lavagens, optou-se pela aplicação direta das amostras ultrafiltradas em coluna de fase reversa C4 (fluxo de 1 mL.min⁻¹, **item**

5.3.8). A boa separação permitiu a delimitação de frações para ensaios antimicrobianos e para tentativa de sequenciamento via espectrometria de massa. Os perfis estão apresentados na **Figura 24**.

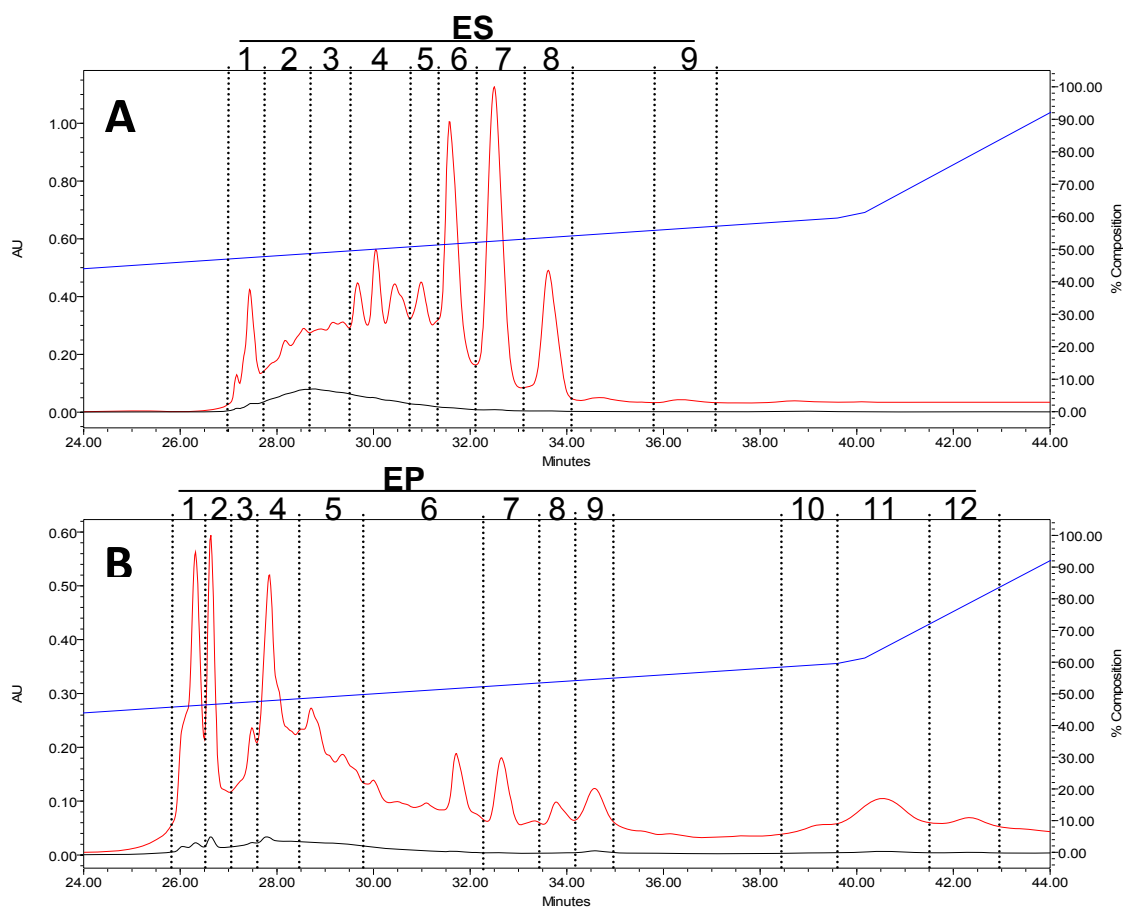


Figura 24 – Cromatografia de fase reversa utilizando equipamento HPLC, coluna C4 de ES (A) e EP (B). O fluxo utilizado foi de 1 mL/min, Bomba A – TFA 0,1%, Bomba B – TFA 0,1% e Acetonitrila 80% e monitorada em 214 nm (vermelho) e 280nm (preto contínuo). A variação do gradiente (%B) está representada pela linha azul. As frações coletadas estão delimitadas pelas linhas pontilhadas.

Ensaio de inibição foram feitos utilizando material equivalente a 5 das 20 gramas de folhas extraídas contra o fungo *Alternaria solani* (**Figuras 25 e 26**) e outros ensaios foram feitos utilizando o equivalente a 2,5 gramas de folhas extraídas contra cada uma das duas bactérias, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Gram positiva) (**Figuras 27 e 28**) e *Ralstonia solanacearum* (Gram negativa) (**Figura 29 e 30**).

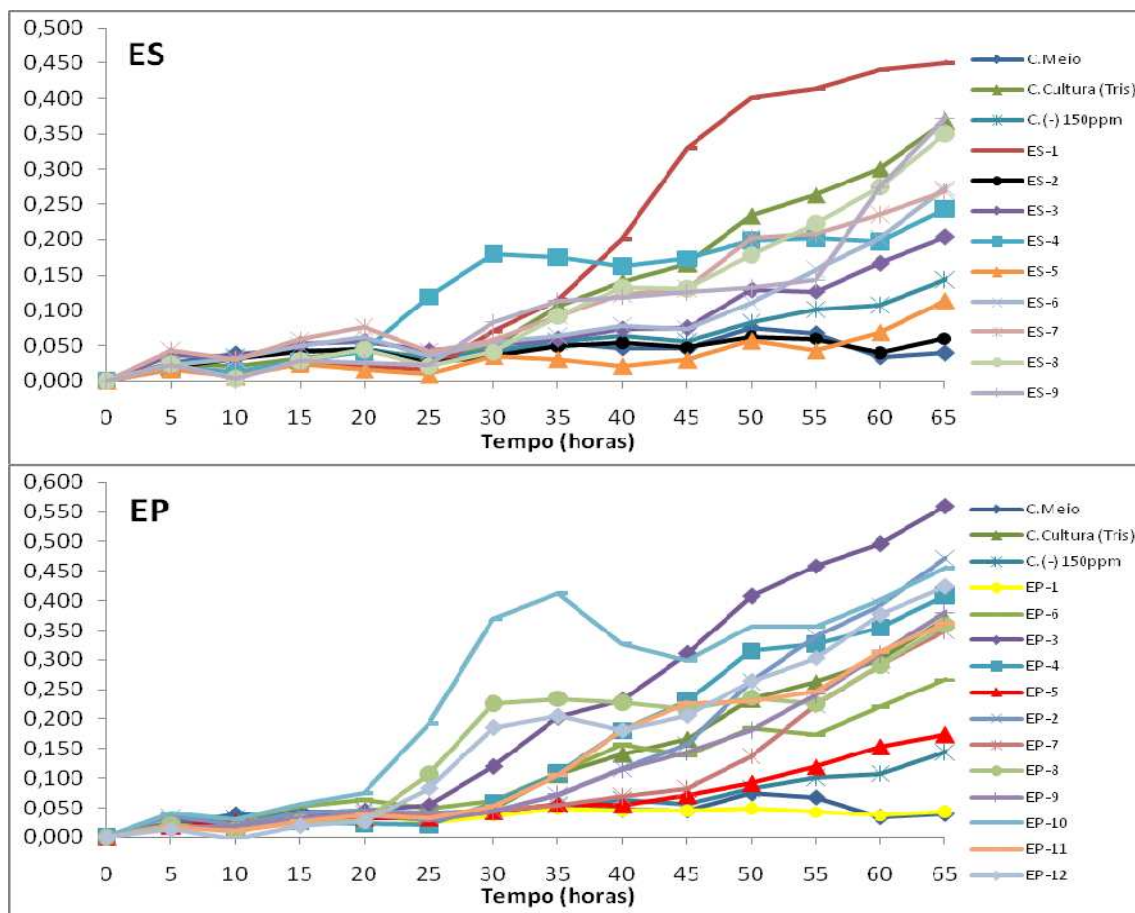


Figura 25 – Inibição de *Alternaria solani* pelas frações de ES e EP enriquecidas de peptídeos após C4-RP-HPLC. Crescimento do fungo mediante a adição de frações obtidas de folhas totalmente expandidas de pimentão da variedade Sunshine após separação em C4-RP-HPLC, avaliando-se as absorvâncias a 560 nm em leitor de microplacas por 65 horas. O controle da cultura (**C.Cultura(Tris)**) correspondeu ao cultivo do fungo na ausência dos extratos peptídicos. O controle do meio (**C.Meio**) correspondeu ao meio de cultivo na ausência dos esporos do fungo. Cicloheximida 150 mg.L⁻¹ (**C.(-) 150ppm**) foi adicionado como controle negativo do crescimento.

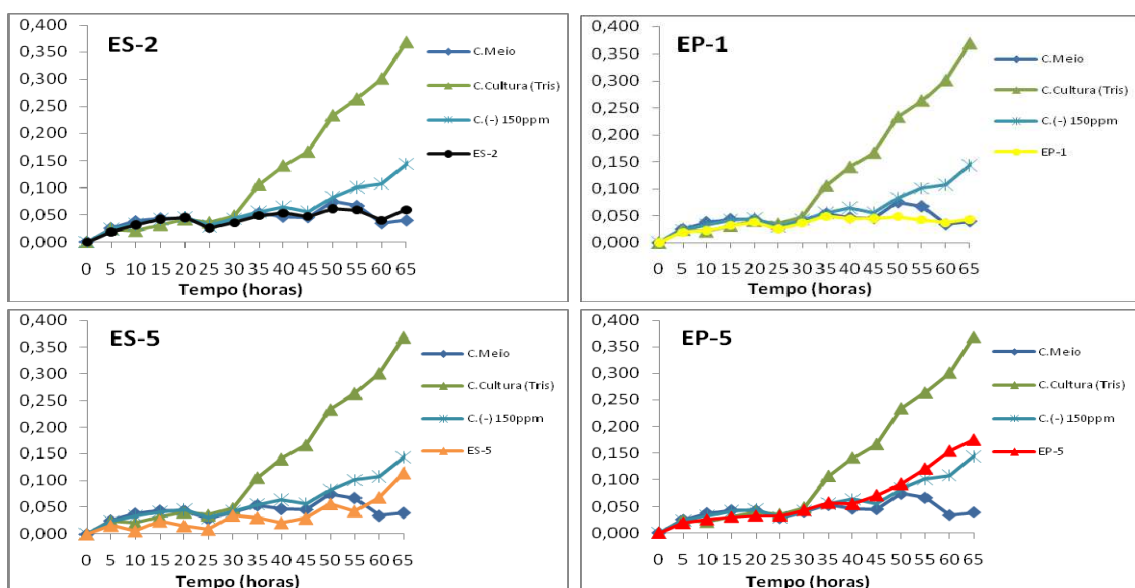


Figura 26 – Frações que apresentaram maior capacidade de inibir o crescimento de *Alternaria solani* (**ES-2**(84%), **ES-5** (62%), **EP-1**(88%), **EP-5**(59%). O teste foi realizado com frações após C4-RP-HPLC, avaliando-se as absorvâncias a 560 nm em leitor de microplacas por 65 horas. O controle da cultura (**C.Cultura(Tris)**) correspondeu ao cultivo do fungo na ausência dos extratos peptídicos. O controle do meio (**C.Meio**) correspondeu ao meio de cultivo na ausência dos esporos do fungo. Cicloheximida 150ppm (**C.(-) 150ppm**) foi adicionado como controle negativo do crescimento.

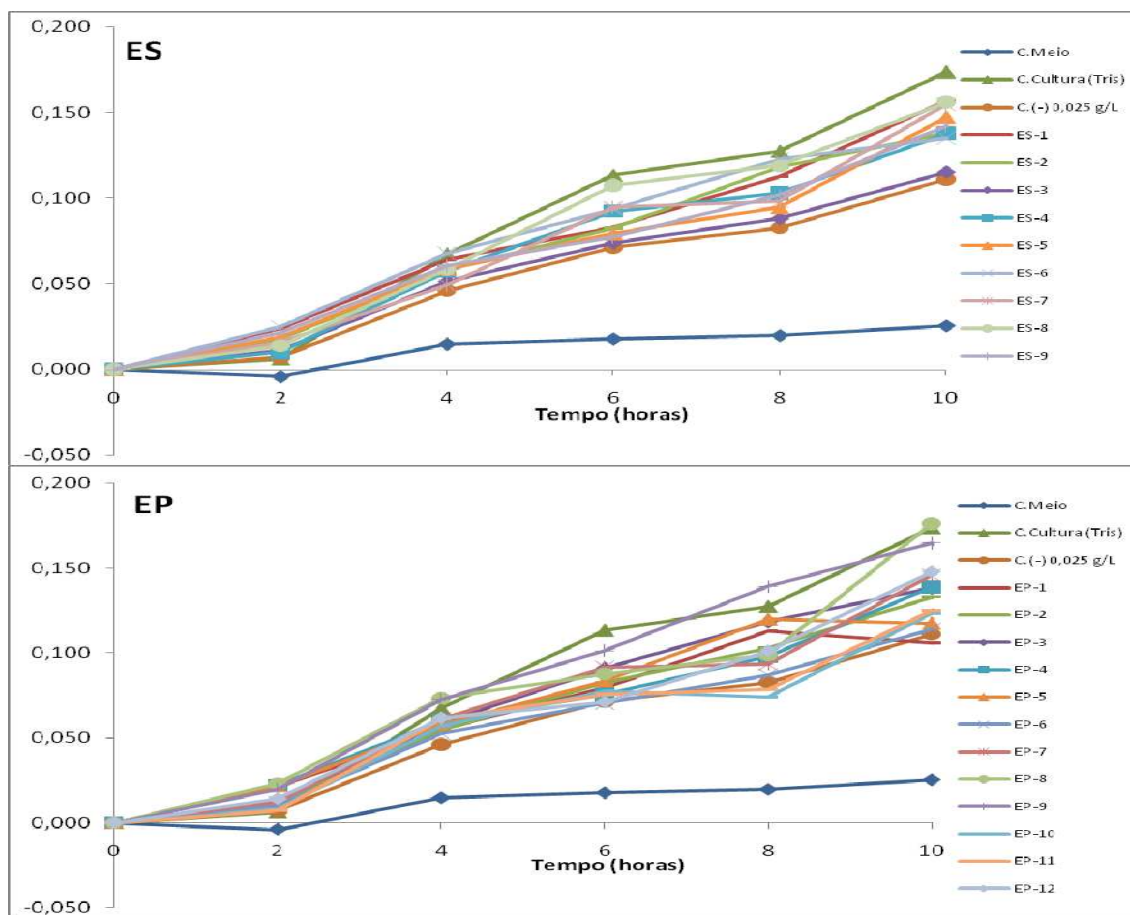


Figura 27 – Inibição de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* pelas frações de **ES** e **EP** enriquecidas de peptídeos após C4-RP-HPLC. Crescimento bacteriano mediante a adição de frações obtidas de folhas totalmente expandidas de pimentão da variedade Sunshine após separação em C4-RP-HPLC, avaliando-se as absorvâncias a 560 nm em leitor de microplacas por 10 horas. O controle da cultura (**C.Cultura(Tris)**) correspondeu ao cultivo da bactéria na ausência dos extratos peptídicos. O controle do meio (**C.Meio**) correspondeu ao meio de cultivo na ausência da bactéria. Cloranfenicol 25 mg.L⁻¹ (**C.(-) 0,025 g/L**) foi adicionado como controle negativo do crescimento.

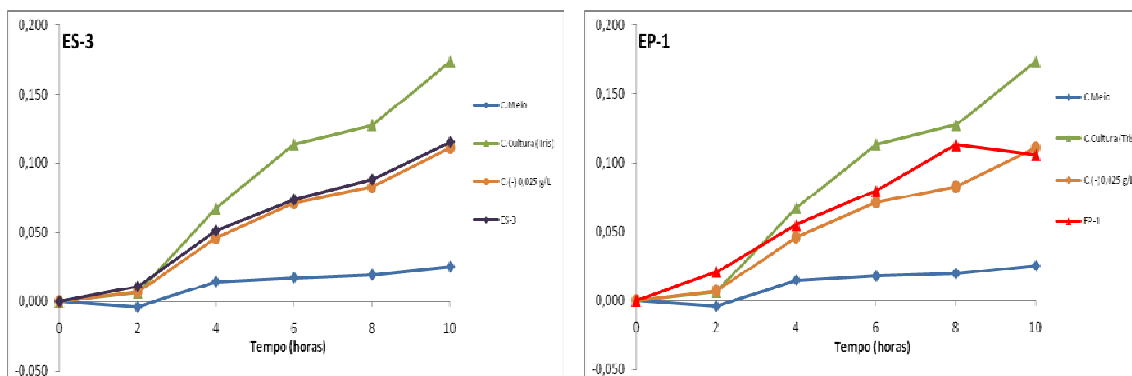


Figura 28 – Frações que apresentaram maior capacidade de inibir o crescimento de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (**ES-3** (33%), **EP-1** (38%)). O teste foi realizado com frações após C4-RP-HPLC, avaliando-se as absorvâncias a 560 nm em leitor de microplacas por 10 horas. O controle da cultura (**C.Cultura(Tris)**) correspondeu ao cultivo da bactéria na ausência dos extratos peptídicos. O controle do meio (**C.Meio**) correspondeu ao meio de cultivo na ausência da bactéria. Cloramfenicol 25 mg.L⁻¹ (**C.(-) 0,025 g/L**) foi adicionado como controle negativo do crescimento.

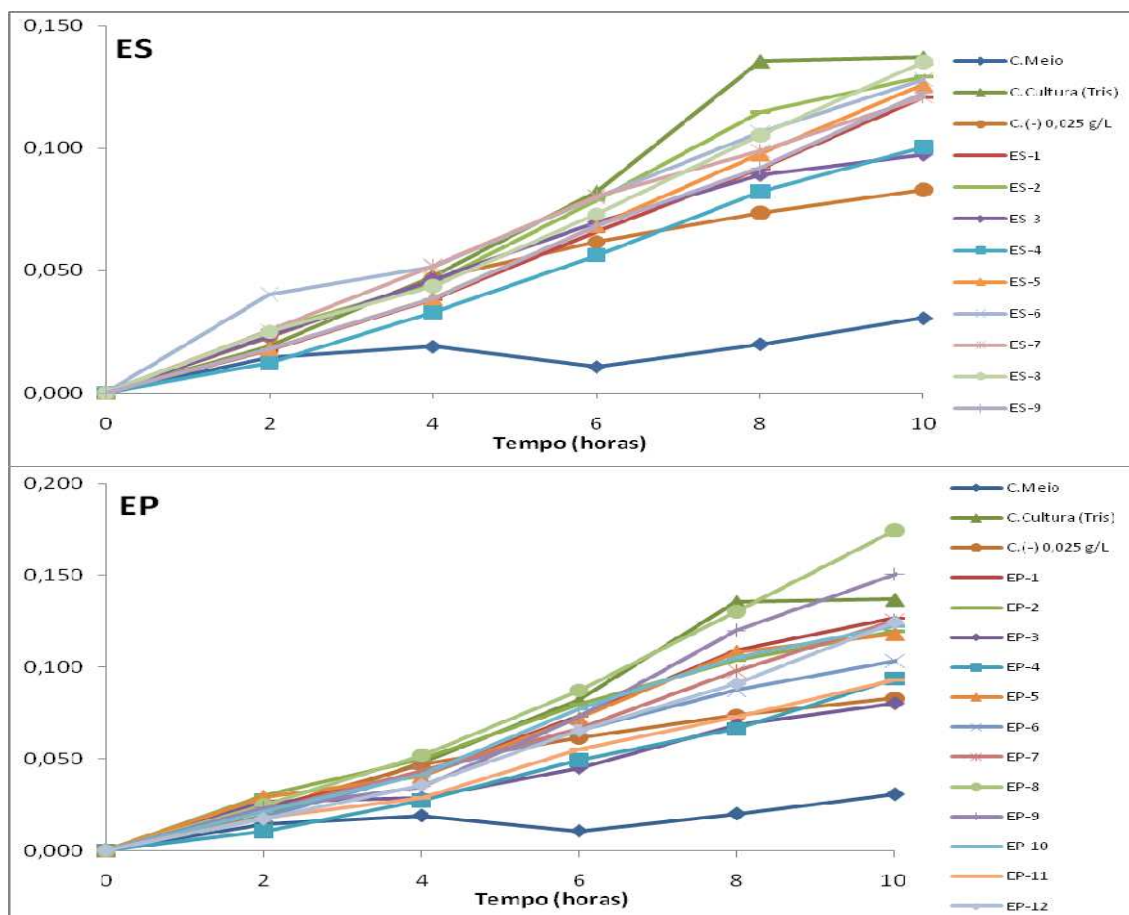


Figura 29 – Inibição de *Ralstonia solanacearum* pelas frações de **ES** e **EP** enriquecidas de peptídeos após C4-RP-HPLC. Crescimento bacteriano mediante a adição de frações obtidas de folhas totalmente expandidas de pimentão da variedade Sunshine após separação em C4-RP-HPLC, avaliando-se as absorvâncias a 560 nm em leitor de microplacas por 10 horas. O controle da cultura (**C.Cultura(Tris)**) correspondeu ao cultivo da bactéria na ausência dos extratos peptídicos. O controle do meio (**C.Meio**) correspondeu ao meio de cultivo na ausência da bactéria. Cloranfenicol 25 mg.L⁻¹ (**C.(-) 0,025 g/L**) foi adicionado como controle negativo do crescimento.

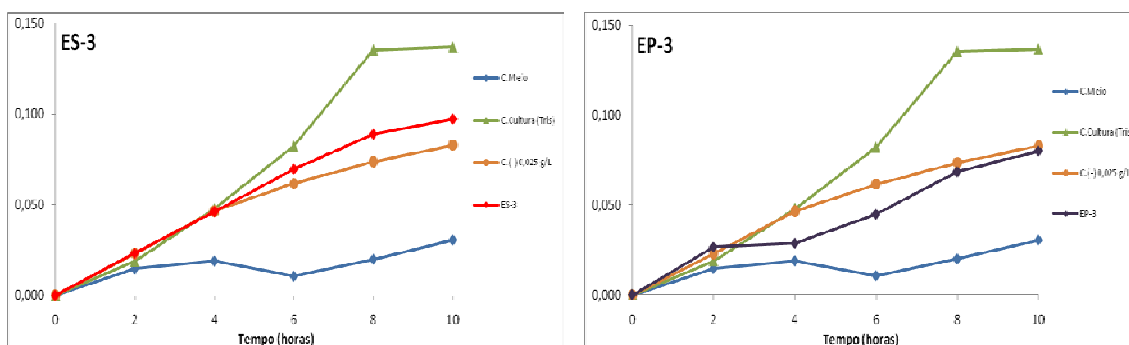


Figura 30 – Frações que apresentaram maior capacidade de inibir o crescimento de *Ralstonia solanacearum* (**ES-3** (27%), **EP-3** (41%)). O teste foi realizado com frações após C4-RP-HPLC, avaliando-se as absorvâncias a 560 nm em leitor de microplacas por 10 horas. O controle da cultura (**C.Cultura(Tris)**) correspondeu ao cultivo da bactéria na ausência dos extratos peptídicos. O controle do meio (**C.Meio**) correspondeu ao meio de cultivo na ausência da bactéria. Cloranfenicol 25 mg.L⁻¹ (**C.(-) 0,025 g/L**) foi adicionado como controle negativo crescimento.

Cicloheximida foi utilizado na concentração de 150 mg.L⁻¹ como controle negativo do crescimento microbiano, ocasionando 55% de inibição no crescimento de *Alternaria solani*, após 65 horas de cultivo. Esse composto atua

bloqueando a peptidil transferase na unidade 60S do ribossomo eucarioto, impossibilitando o alongamento do peptídeo nascente. As frações nomeadas ES-2, ES-5, EP-1 e EP-5 (**Figura 24**) causaram maiores inibições no crescimento do fungo do que o controle negativo (84%, 62%, 88%, 59%, respectivamente, **Figura 26**) após 65 horas de cultivo, as quais se destacaram como amostras de grande interesse.

Cloranfenicol, na concentração de 25 mg.L⁻¹ (25 ppm), foi utilizado como controle negativo do crescimento das bactérias. Esse antibiótico, na concentração utilizada, bloqueia a atividade dos ribossomos bacterianos, dificultando a síntese protéica. EP-1 também se destacou por causar maior inibição no crescimento da bactéria Gram-positiva *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (38%) em relação ao antibiótico (36%), sendo ES-3 (33%), a fração proveniente do extrato solúvel que mais se aproximou da inibição causada por cloranfenicol (**Figura 28**). Para a bactéria Gram-negativa *Ralstonia solanacearum*, EP-3 causou maior inibição do crescimento (41%) do que o controle negativo (39%) e ES-3 (27%) também foi a fração do extrato solúvel que mais se aproximou da inibição causada pelo antibiótico (**Figura 30**). Para ambas as bactérias testadas, as frações do extrato de parede celular apresentaram maiores inibições em comparação com aquelas provenientes do extrato solúvel.

A composição da parede celular da bactéria Gram-negativa (*Ralstonia solanacearum*) possivelmente dificultou a ação do agente antimicrobiano presente na fração EP-1 (1% de inibição). É conhecido pela literatura (Cristensen *et al.*, 1988; Tejada *et al.*, 1995) que bactérias Gram-negativas possuem barreiras que dificultam a ação de peptídeos antimicrobianos, por dificultar sua interação com a membrana celular e/ou sua entrada na célula.

Outras frações também causaram inibição próxima ao controle negativo para os microrganismos testados, como a ES-3 (50%) para *Alternaria solani*; EP-5 (31%) e EP-6 (34%), para *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*; e EP-11 (32%), para *R. solanacearum*. Todas as percentagens de inibição foram calculadas com tempo de cultivo bacteriano de 10 horas.

Todas as frações destacadas serão submetidas à MS para obtenção de informações sobre sua sequência primária, que poderá ser identificada pela utilização de programas de alinhamento e pela comparação de espectros (valores m/z) com o auxílio das bases de dados do DefDB (**Capítulo II**).

7. CONCLUSÃO

A purificação de peptídeos antimicrobianos tem sido um grande desafio para vários grupos de pesquisa no mundo. Nesse trabalho, considerável progresso foi conseguido para a purificação desses peptídeos a partir de folhas de pimentão ('Sunshine'), utilizando métodos de fracionamento adaptáveis a uma purificação em larga escala, necessários para ensaios funcionais, e de modo refinado, necessário para as caracterizações estruturais das moléculas.

Entre o protocolo de purificação inicialmente sugerido e o protocolo otimizado de extração rápida, observa-se a eliminação do aquecimento seletivo, a implantação da utilização de célula de agitação nas etapas iniciais de fracionamento, e o uso de HPLC na etapa cromatográfica inicial (gel filtração). O aquecimento seletivo parece ter colaborado para a aglomeração peptídica observada.

A otimização das etapas de clareamento dos extratos, especialmente com o uso da ultrafiltração, minimizou degradações e perdas de material peptídico. Assim, a cromatografia de exclusão molecular foi substituída, reduzindo o tempo de isolamento protéico. Foram implementadas etapas de lavagens entre as ultrafiltrações e foi abolida a etapa de aquecimento seletivo.

Observou-se que a duração das etapas de extração e purificação influencia diretamente na qualidade do material fracionado, devido à ocorrência de possíveis processos de aglomeração, precipitação e/ou degradação proteolítica. Essa perda de material possivelmente é favorecida pelas características estruturais dos peptídeos antimicrobianos (regiões discretas com alto grau de hidrofobicidade e outras positivamente carregadas) e poderia ser causada pela presença de compostos salinos ou carregados, capazes de neutralizar a carga entre os peptídeos, a qual favorece a repulsão e solubilidade dessas moléculas, pelos procedimentos que aumentariam a energia cinética do meio (como aquecimento), pelo aumento exagerado da concentração desses peptídeos em cada fração e pela retirada, por meio dos métodos de fracionamento, de moléculas importantes para a manutenção dos peptídeos em solução e/ou desaglomerados. A degradação pode ser causada principalmente por proteases residuais, atuantes a partir da maceração do material vegetal. Por outro lado, frações peptídicas misturadas a solventes orgânicos e submetidas a aquecimento (98 °C) após etapa cromatográfica de

fase reversa, ainda apresentaram alta inibição no crescimento das bactérias Gram positiva e Gram negativa e do fungo testados, a semelhança do que foi encontrado em outros trabalhos (Lindorff-Larsen e Winther, 2001; Barbosa, 2008), o que permite constatar a resistência térmica e química dos peptídeos antimicrobianos presentes nas frações testadas e a eficiência do protocolo de fracionamento estabelecido.

A inibição fúngica foi mais acentuada em relação à inibição bacteriana no último protocolo testado possivelmente por existir defensinas de plantas nas frações inibitórias. Defensinas de plantas apresentam inibição preferencial contra fungos, como descrito por Broekaert e colaboradores (1997). Algumas frações peptídicas (ES-2, ES-5, EP-1, EP-5) apresentaram inibição fúngica superior ao controle utilizado (cicloeximida, 150 ppm). Outras frações também apresentaram maior inibição no crescimento de bactérias Gram positiva (ES-3, ES-6) e Gram negativa (ES-4, EP-11) do que o antibiótico controle utilizado (cloranfenicol, 25 ppm), e outras ainda apresentaram alta inibição, tanto no crescimento do fungo quanto no crescimento da bactéria Gram positiva (EP-1, EP-5). Não foram encontradas frações capazes de inibir o fungo e a bactéria Gram negativa.

A partir das informações apresentadas, é notável o grande avanço obtido nos métodos de extração e purificação de peptídeos antimicrobianos, devido à utilização de equipamentos mais modernos e, principalmente, devido aos ajustes realizados entre as etapas, minimizando o tempo de extração e purificação, e melhorando a qualidade do fracionamento peptídico em cada procedimento. O material fracionado pelo último protocolo será analisado por espectrometria de massa, buscando a identificação dos peptídeos responsáveis pela alta inibição microbiana.

8. PERSPECTIVAS

1. O seqüenciamento por espectrometria de massa das frações com elevado grau de pureza e alta percentagem inibitória, obtidas após os ajustes do protocolo de purificação, será realizado.
2. As bases de dados do DefDB (Capítulo II) e outras bases de dados disponíveis na internet serão utilizadas, juntamente com plataformas de análise de dados de espectrometria de massa, para identificar as sequências peptídicas conseguidas.
3. Os genes responsáveis pela expressão das sequências peptídicas obtidas serão identificados ou sintetizados e posteriormente clonados. Dessa forma peptídeos com alta inibição microbiana serão expressos em modelos heterólogos, buscando obter grande quantidade de material para novas análises. Se esses peptídeos forem produtos de proteínas maiores, essas proteínas poderão ser identificadas pela construção de bibliotecas e sondas de cDNA, por exemplo.
4. A concentração inibitória mínima do peptídeo recombinantes *in vitro* (teste de microplacas) e *in vivo* (possivelmente em plantas tomateiros), utilizando pares específicos peptídeos-fitopatógenos, em casa-de-vegetação, poderá ser medida tão logo se consiga quantidade de material suficiente. Buscado, dessa maneira, avaliar, via indução de enzimas de resistência, a resposta da planta aos agentes antimicrobianos em estudo, para aplicações comerciais futuras dos peptídeos.
5. Outras caracterizações estruturais como dicroísmo circular e elucidação da estrutura tridimensional por ressonância magnética nuclear (RMN), ou por difração de raios X, se possível a obtenção do cristal peptídico, serão realizadas para tentativa de elucidação do mecanismo de atuação dos peptídeos antimicrobianos. Tão logo se consiga material peptídico em quantidade suficiente, também serão realizadas caracterizações toxicológicas, bioquímicas, termodinâmicas.

Após a purificação e caracterização dos peptídeos antimicrobianos da variedade Sunshine, os mesmos procedimentos poderão ser realizados para extratos solúveis e de parede celular obtidos de folhas totalmente expandidas de pimentão da variedade Samara, que também apresentou frações parcialmente purificadas com alta atividade de inibição de fitopatógenos de interesse comercial.

CAPÍTULO II

NOVA BASE DE DADOS SOBRE DEFENSINAS: CONSTRUÇÃO DO BANCO DE DADOS DefDB

1. RESUMO

Defensinas são moléculas com prevalência catiônica, ricas em cisteínas, apresentando normalmente três ou quatro pontes dissulfídicas, constituídas de 45 a 54 resíduos de aminoácidos. Elas são encontradas em organismos vertebrados e invertebrados, apresentando atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos e/ou vírus encapsulados. Essas moléculas apresentam, em geral, baixa toxicidade a animais e plantas, e atuam sob baixas concentrações, justificando assim seu uso potencial como drogas ou defensivos agrícolas. A construção de um banco de dados capaz de agrupar informações selecionadas sobre defensinas mostra-se de grande importância para a complementação dos estudos funcionais e estruturais desses peptídeos.

O banco de dados DefDB foi construído para auxiliar em estudos iniciais e na identificação de defensinas. Esse banco contém duas bases de dados não redundantes, sendo uma relacionada a defensinas de vários organismos, e outra exclusivamente relativa a defensinas de plantas. Os dados armazenados são obtidos a partir de três bancos de dados (UniProt, Defensins Knowledgebase e PhytAMP), analisados e agrupados remotamente. Os programas construídos verificam a integridade dos dados antes de inseri-los nas bases de dados. Várias informações importantes, priorizando as sequências aminoacídicas, estão disponíveis no banco de dados, com possibilidade de filtragem de campos específicos, como, por exemplo, a seleção de defensinas expressas por um organismo determinado. Assim, o DefDB é um banco de dados público (www.defdb.ufv.br), no qual as informações sobre as sequências das defensinas podem ser selecionadas e recuperadas no formato fasta, capaz de disponibilizar informações confiáveis, armazenadas em duas bases de dados concisas e específicas.

2. INTRODUÇÃO

Defensinas são compostos naturais com atividade antimicrobiana, sendo encontradas desde organismos inferiores até humanos. Seu modo de ação permite que sejam menos capazes de desencadear resistência microbiana, quando comparadas aos antibióticos convencionais. O conhecimento sobre a ação desses peptídeos pode fornecer informações para o desenvolvimento de agentes de defesa melhorados (Seebah *et al.*, 2007) e seguros. Esses peptídeos estão também envolvidos na defesa imunológica, no tratamento de doenças, atuando como agentes cicatrizantes e antiinflamatórios (Ganz *et al.* 2002).

O mecanismo de atuação das defensinas não é totalmente entendido. No entanto, já se sabe que essas moléculas atuam interagindo, por atrações eletrostáticas, com a face externa das membranas celulares-alvo, gerando poros e ocasionando efluxo do conteúdo celular (Lichtenstein, 1991). A atuação desses peptídeos como sinalizadores primários e secundários em vias apoptóticas e como agentes potencializadores das defesas imunológicas inata e adaptativa também tem sido demonstrada em estudos recentes (Lay *et al.*, 2005; Aerts *et al.*, 2009; Carvalho *et al.*, 2009).

Plantas não apresentam um sistema multifacetado de defesa tão sofisticado como o de animais, sendo também expostas a uma multiplicidade de patógenos que realizam ataques mecânicos e químicos. Para esses organismos, as defensinas produzidas constitutivamente atuam como uma barreira de suma importância contra a atuação de microrganismos e alguns fitovírus. A identificação e a possibilidade de aplicação biotecnológica de peptídeos de defesa vegetais constitutivos ou induzidos têm atraído a atenção de pequenas e grandes empresas mundialmente.

A espectrometria de massa (MS) aplicada ao estudo da estrutura de moléculas biológicas, incluindo-se proteínas, permite a determinação das massas moleculares e também das seqüências aminoacídicas de proteínas, e tem despertado a atenção de pesquisadores mundialmente. Esses resultados, juntamente com uma base de dados concisa, referente ao grupo de proteínas ou peptídeos de interesse, possibilitam a identificação de novas moléculas e auxiliam na determinação do arranjo tridimensional (estruturas secundárias e terciárias), o que justifica o interesse por esta técnica experimental. Entretanto,

embora apresente grande potencialidade, trata-se de uma técnica que requer amostras quase isentas de contaminantes interferentes. Sabe-se que extratos vegetais são amostras complexas, e que o clareamento e a purificação adequados são primordiais à obtenção de resultados.

A bioinformática é uma ferramenta de grande potencialidade para estudos de peptídeos antimicrobianos. Com o grande avanço na área de desenvolvimento de softwares, hardwares e nos métodos de sequenciamento, ferramentas voltadas para a identificação *in silico* de regiões codificadoras de peptídeos antimicrobianos, como as defensinas, em genomas já seqüenciados podem ser construídas. Bancos de dados estruturalmente compatíveis e específicos oferecem grande suporte à utilização produtiva dessas ferramentas.

O banco de dados DefDB, com foco em defensinas, foi construído voltado à busca, agrupamento, e adequação dos dados providos de outras fontes de dados já estabelecidas. Defensina, a classe dos AMPs mais bem estudada, foi escolhida por apresentar maior quantidade de dados disponíveis. O agrupamento remoto de dados de interesse por meio de um programa bem implementado não somente otimiza o tempo de trabalho para construção do banco e a quantidade de informações disponíveis, mas também proporciona uma atualização remota e a obtenção de dados mais apurados, minimizando erros de anotação e nomenclatura. Para isso, duas linguagens de programação de alto nível (PHP e SQL) foram usadas para a construção dos programas '*parsers*'. Dessa forma, o banco de dados DefDB (www.defdb.ufv.br) está sendo implementado para fornecer ao usuário uma base de dados que possibilite identificar inter-relações entre defensinas a fim de produzir informações de interesse biológico e que auxilie na identificação de seqüências aminoacídicas das defensinas.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Defensinas

Defensinas pertencem a uma ampla família dos peptídeos antimicrobianos que contém moléculas com uma surpreendente conservação funcional. Elas já foram descritas em cinco classes de dois reinos (Carvalho *et al.*, 2009). As defensinas α , β e θ foram encontradas em mamíferos e pássaros (Ganz *et al.*, 2004; von Djik *et al.*, 2008), e a quarta e quinta classes de defensinas foram encontradas em insetos (Bulet *et al.*, 1999) e plantas (Broekaert *et al.*, 1997). Representantes dessas moléculas também foram encontradas em moluscos (Charlet *et al.*, 1996) e fungos (Mygind *et al.*, 2005).

Análises filogenéticas indicam que defensinas podem compartilhar um ancestral comum, como já demonstrado entre defensinas de pássaros e mamíferos (Sugiarto *et al.*, 2004) e entre defensinas de artrópodes e moluscos (Charlet *et al.*, 1996). Essa similaridade estrutural entre espécies e a assinatura dos resíduos de cisteína sugerem que esses peptídeos têm um parentesco evolutivo, dificilmente apresentando uma origem polifilética (Carvalho *et al.*, 2009). Estudos têm demonstrado a existência de peptídeos semelhantes às defensinas presentes em mixobactérias (Zhu *et al.*, 2007). Esses resultados sugerem que esses peptídeos representam uma antiga estratégia de defesa das formas de vida procarióticas, que foi transferida para a linhagem eucariótica em algum momento durante a evolução, dando origem às defensinas eucarióticas (Carvalho *et al.*, 2009).

Defensinas de vertebrados são pequenos peptídeos catiônicos (18-45 resíduos de aminoácidos), com três pontes dissulfídicas intra-moleculares, mediadas por seis cisteínas conservadas (Bowdish *et al.*, 2006). Existem duas subfamílias principais em vertebrados: as α -defensinas e as β -defensinas. Esses peptídeos são separados pelo pareamento de suas cisteínas e pelo número de resíduos de aminoácidos entre as cisteínas. Todos os membros dessas duas subfamílias, cujas estruturas foram analisadas, mostram um mesmo padrão de enovelamento da defensina, composto predominantemente por três folhas β (Hill *et al.*, 1991; Zimmermann *et al.*, 1995; Szyk *et al.*, 2006). Um terceiro grupo de defensinas, as θ -defensinas, são somente encontradas em primatas, sendo diferentes das encontradas em humanos, e não são relacionadas estruturalmente com as subfamílias α e β (Tang *et al.*, 1999;

Selsted *et al.*, 2004). Em adição à sua capacidade de atuar como agentes efetores contra microrganismos, defensinas desenvolvem outras funções relacionadas a ambas as respostas imunes, inata e adaptativa, como a indução ou modulação da produção de citocinas e quimiocinas, alteração da expressão gênica de células do hospedeiro, inibição de repostas pró-inflamatórias das células do hospedeiro em relação aos componentes bacterianos como lipopolissacarídeos (Bowdish *et al.*, 2006). Recentes avanços no conhecimento da bioquímica das defensinas, principalmente defensinas humanas, são descritos no contexto de infecções bacterianas.

Com exceção dos resíduos de cisteína, os resíduos de aminoácidos variam muito entre os domínios dos peptídeos maduros. Isso pode ser explicado pela pressão submetida à evolução dos peptídeos antimicrobianos, mediante a sua ação competitiva contra patógenos dentro de um curso co-evolucionário (Silverstein *et al.*, 2005; Dessanayake *et al.*, 2007).

3.1.1. Defensinas de Plantas

Os primeiros membros da família das defensinas de plantas foram isolados de grãos de trigo e cevada por Mendez e colaboradores (Mendez *et al.*, 1990) e chamados originalmente de γ -Tioninas, por apresentarem semelhanças no tamanho (5 kDa) e no número de pontes dissulfídicas (quatro) com as α - e β -Tioninas, já caracterizadas (Terras *et al.*, 1992, Pelegri, *et al.*, 2005). Trabalhos subsequentes constataram que Tioninas e γ -Tioninas apresentavam estruturas diferentes, principalmente pelas propriedades das pontes dissulfídicas (Bruix *et al.*, 1995), e por possuírem uma estrutura tridimensional muito semelhante às defensinas de insetos e de vertebrados, geralmente com um motivo CS $\alpha\beta$ (*Cysteine-Stabilized* $\alpha\beta$). Esse motivo é formado por uma α -hélice e três folhas- β antiparalelas unidas por duas pontes dissulfídicas. A α -hélice também é ligada à primeira folha- β por uma ou duas pontes dissulfídicas (Zhang, *et al.*, 2002; Shunyi, 2007).

Embora a maioria das defensinas de animais e insetos apresente melhor atividade antimicrobiana contra bactérias, defensinas de plantas em geral apresentam maior atividade antifúngica, refletindo uma maior necessidade de defesa dos vegetais contra fungos em relação a bactérias patogênicas. A exemplo, sabe-se que esses peptídeos são expressos em folhas de rabanete após contato com um fungo patogênico (Broekaert *et al.*, 1997). As defensinas

de plantas com atividade antifúngica podem ser divididas em dois grupos, sendo o primeiro formado por defensinas que inibem o crescimento dos fungos por distorções morfológicas das hifas, enquanto que o segundo grupo corresponde a peptídeos que inibem o crescimento dos fungos sem a distorção morfológica (Broekaert *et al.*, 1997).

As defensinas de plantas são peptídeos básicos, com pI próximo a 9. Os domínios processados das defensinas maduras compreendem de 45 a 55 resíduos de aminoácidos, resultando em uma pequena molécula com massa entre 5 e 7 kDa. Existem outros resíduos de cisteína conservados que formam quatro pontes dissulfídicas intracadeia. Essas interações formam o motivo CS α β que já é bem documentado em peptídeos antimicrobianos (Carvalho, 2009).

Significantes progressos vêm sendo obtidos na utilização desses peptídeos na área de proteção vegetal (Rao, 1995), incluindo a produção de componentes protetores e a engenharia genética de plantas, que gera plantas expressando moléculas com total ou parcial resistência contra fitopatógenos (Mourgues *et al.*, 1998; Morassutti *et al.*, 2002). Um pré-requisito importante para controlar os patógenos em plantas transgênicas não é somente a expressão constitutiva do peptídeo antimicrobiano, mas também da sua presença no local de interação com o patógeno (Jha *et al.*, 2009). Por isso, dados agrupados sobre a estrutura de peptídeos antimicrobianos têm ajudado na descoberta de novas sequências sinalizadoras, por meio da comparação das regiões possivelmente responsáveis por esse direcionamento, presentes na macromolécula peptídica.

3.2. Mecanismos de Atuação

As defensinas podem realizar os mesmos mecanismos de atuação dos outros peptídeos antimicrobianos já apresentados no **capítulo 1, item 3.3**. Por exemplo, Rs-AFP2 (5,1 kDa), uma defensina extraída de sementes de *Raphanus sativus* (rabanete), interage com uma glicopiranosilceramida presente na membrana plasmática das hifas dos fungos, ocasionando um aumento do efluxo de potássio e um influxo de cálcio, alterando o potencial de membrana, e exercendo uma atividade antifúngica contra um amplo espectro de fungos filamentosos patogênicos a plantas, por causar hiper-ramificação e redução do crescimento das hifas (Thevissen *et al.*, 2004).

3.3. Banco de Dados (BD)

3.3.1. Histórico

Década de 60:

- Computadores se tornam parte efetiva das empresas com o crescimento da capacidade de armazenamento;
- Os primeiros modelos de dados são desenvolvidos:
 - Modelo em rede (*Committee for Data Systems Language*);
 - Modelo em hierárquico (*Information Management System*).

Década de 70:

- Sistema de Gerenciamento de Banco de Dados (SGBD) é apresentado como disciplina acadêmica;
- Edgar Frank Codd propõe o modelo de dados relacional (1970 – 1972);
- Peter Chen propõe o modelo Entidade-Relacionamento (ER) para projetos de banco de dados (1976), ocorrendo a implementação dos conceitos de modelos de dados;
- Dois principais protótipos de sistema relacional (1974 e 1977) são propostos:
 - Ingres: Serviu como base para Ingres Corp., Sybase, MS SQL Server, Britton-Lee, Wang PACE. Utilizava QUEL como linguagem de consulta. Esse sistema relacional foi desenvolvido pela Universidade da Califórnia, Berkeley, USA;
 - System R: Serviu de base para o IBM SQL/DS, IBM IB2, Oracle, todos os bancos de dados da HP, Tandem's Non-Stop SQL. O System R utilizava SEQUEL como linguagem de consulta e foi desenvolvido pela IBM San Jose.

O termo Sistema de Gerenciamento de Banco de Dados Relacional (SGBDR) foi definido nesse período.

Década de 80:

- Sistemas relacionais são comercializados;
- Por volta de 1985, a Linguagem Estruturada de Consulta (SQL) se torna um padrão mundial;
- Desenvolvimento do IBM PC desperta muitas empresas e produtos de BD (RIM, RBASE 5000, PARADOX, OS/2 Database Manager, Dbase III e IV, e outros).

Década de 90:

- Crise econômica em empresas voltadas à computação ocorre – produtos vendidos a preços muito elevados para garantir a sobrevivência de poucas empresas;
- Softwares voltados para o *Desktop (client tolls)* são desenvolvidos: Power-Builder (Sybase), Oracle Developer, Visual Basic (Microsoft), dentre outros;
- Modelo cliente-servidor prevalece – consiste em um modelo que separa clientes de servidores, sendo esses interligados via rede; cada instância de clientes pode enviar requisições de dados para algum servidor, que, se requisitado, enviará uma resposta;
- Ferramentas de produtividade são desenvolvidas: Ex: Excel/Access (Microsoft) e ODBC, início dos protótipos de *Object Database Management Systems* (ODBMS).
- Explosão da internet em meados da década de 90 ocorre com corrida para prover acesso remoto a sistemas de computadores com dados legados;
- Crescimento exponencial na tecnologia Web/BD se concretiza;
- O uso de soluções de código aberto por meio das linguagens gcc, CGI, Apache, MySQL, e outros é aumentado;
- Surgem os processos de transação em tempo real (OLTP – *On-Line Transaction Process*) e processos analíticos em tempo real (OLAP – *On-Line Analytical Process*), ocasionando maior simplicidade e eficiência, e aumentando a rapidez das análises de grande volume de dados;
- Final da década de 90, grandes investimentos em empresas impulsiona as vendas de ferramentas para conexão Web/Internet/BD.

Novo Milênio:

- Desenvolvimento de áreas de aplicação é estabelecido:
 - BD multimídia;
 - BD geográficos;
 - BD genoma e biotecnologia;
 - BD móveis;
 - Outras;
- Tecnologias emergentes se instalam:
 - Data warehouse;

- Data mining;
- XML.

3.3.2. Definição de Bancos de Dados

Bancos de dados correspondem a conjuntos de dados integrados com uma estrutura definida para organização das informações obtidas em relação a um tema. Um banco de dados é, geralmente, mantido e acessado por meio de um software conhecido como Sistema Gerenciador de Bancos de Dados (SGBD). De acordo com Elmasri (2005), um banco de dados possui alguma fonte, da qual os dados são derivados, algum grau de interação com eventos do mundo real e um público que está ativamente interessado no conteúdo do banco.

Existem três maneiras de se visualizar um banco de dados. A primeira consiste em uma **visão interna**, empregada pelo responsável pela manutenção e desenvolvimento do SGBD, quando a preocupação com a forma de recuperação e manipulação dos dados dentro do banco é priorizada. A segunda maneira é por meio de uma **visão conceitual**, empregada pelo analista de desenvolvimento e pelo administrador das bases de dados, cuja preocupação primordial é a definição de normas e procedimentos para a manipulação dos dados, com a finalidade de garantir a segurança e confiabilidade das informações contidas. A terceira maneira é por meio de uma **visão externa**, a visão do usuário que opera os sistemas de aplicativos por meio de interfaces desenvolvidas pelo analista, buscando atender às suas necessidades específicas.

3.3.3. Sistema Gerenciador de Bancos de Dados

O Sistema Gerenciador de Bancos de Dados ou Sistema Gestor de Bancos de Dados (SGBD) surgiu no final da década de 60 e constitui um sistema extremamente complexo, responsável pela persistência, organização e recuperação dos dados armazenados. Consiste em uma coleção de programas para prover a criação, o acesso e a manutenção de dados. O objetivo principal de um SGBD é possibilitar um ambiente que seja adequado e eficiente para uso na recuperação, no armazenamento e na manipulação de informações para várias aplicações.

3.3.4. Vantagens em se Construir Bancos de Dados

Existem vários aspectos que contribuem para a construção de um sistema de banco de dados para AMPs, ao invés do uso do sistema tradicional (Elmasri *et al.*, 2005). No sistema tradicional, os dados estão armazenados separados fisicamente uns dos outros. O acesso é feito pelos programas de aplicação, associando o nome externo dos arquivos e definindo todo o registro independente da utilização dos campos.

A utilização de um sistema de banco de dados e, conseqüentemente, um SGBD, apresenta as seguintes vantagens:

1 - Redução ou Eliminação de Redundâncias - Possibilita a eliminação de dados privativos de cada sistema. Os dados, que eventualmente são comuns a mais de um sistema, são compartilhados por eles, permitindo o acesso a uma única informação consultada por vários sistemas.

2 - Eliminação de Inconsistências - Em função do armazenamento da informação em um único local com acesso descentralizado e, sendo compartilhada a vários sistemas, os usuários estarão utilizando uma informação confiável. A inconsistência ocorre quando um mesmo campo tem valores diferentes em sistemas diferentes. A exemplo: o estado civil de uma pessoa é solteiro em um sistema e casado em outro, o que ocorre porque esta pessoa atualizou o campo em um sistema e não o atualizou em outro. Quando o dado é armazenado em um único local e compartilhado pelos sistemas, esta inconsistência não ocorre.

3 - Compartilhamento dos Dados - Permite a utilização simultânea e segura de um dado por mais de uma aplicação ou usuário, independente da operação que esteja sendo realizada. O processo de atualização concorrente deve ser observado para não gerar erros de processamento (atualizar simultaneamente o mesmo campo do mesmo registro). Os aplicativos são, por natureza, multi-usuários.

4 - Restrições de Segurança – Define, para cada usuário, o nível de acesso a ele concedido (leitura, leitura e gravação ou sem acesso) ao arquivo

e/ou campo. Este recurso impede que pessoas não autorizadas utilizem ou atualizem um determinado arquivo ou campo.

5 - Fornecimento de Múltiplas Interfaces - Devido aos vários tipos de usuários, com variados níveis de conhecimento técnico, um SGBD deve fornecer uma variedade de interfaces para atendê-los. Os tipos de interfaces incluem linguagens de consulta para usuários ocasionais, interfaces de linguagem de programação para programadores de aplicações, formulários e interfaces dirigidas por menus para usuários comuns.

6 - Padronização dos Dados - Permite que os campos armazenados na base de dados sejam padronizados segundo um determinado formato de armazenamento (padronização de tabela, padronização de conteúdo, etc) e o nome de variáveis seguindo critérios-padrão pré-estabelecidos pela empresa. Ex. Para o campo "Sexo" somente será permitido armazenamento dos conteúdos "M" ou "F".

7 - Independência dos Dados - Representa a forma física de armazenamento dos dados no BD e a recuperação das informações pelos programas de aplicação. Esta recuperação deverá ser totalmente independente da maneira pela qual os dados estão fisicamente armazenados. Quando um programa retira ou inclui dados, o SGBD compacta-os para que haja um menor consumo de espaço no disco. Este conhecimento do formato de armazenamento do campo é totalmente transparente para o usuário. Dessa forma, a independência dos dados permite os seguintes recursos:

a - Os programas de aplicação definem apenas os campos que serão utilizados independente da estrutura interna dos arquivos;

b - Quando há inclusão de novos campos no arquivo, será feita manutenção apenas nos programas que utilizam esses campos, não sendo necessário acessar os demais programas. Nos sistemas tradicionais, este tipo de operação requer a alteração no *lay-out* de todos os programas do sistema que utilizam o arquivo.

8 - Manutenção da Integridade - Consiste em impedir que um determinado código ou chave em uma tabela não tenha correspondência em

outra tabela. Ex. Um código de uma determinada defensina na tabela “Sequencia” sem a sua descrição na tabela “Defensina”.

9 - Fornecer Backup e Restauração - Um SGBD deve fornecer recursos para restauração caso ocorram falhas de hardware ou software. O subsistema de *backup* e restauração do SGBD é o responsável pela restauração. Por exemplo, se o sistema de computador falhar no meio da execução de um programa que esteja realizando uma alteração complexa na base de dados, o subsistema de restauração é responsável por assegurar que a base de dados seja restaurada ao estado anterior ao início da execução do programa. Alternativamente, o subsistema de restauração poderia assegurar que o programa fosse re-executado a partir do ponto em que havia sido interrompido.

No entanto, não é recomendado o uso do SGBD nas seguintes situações:

- O banco de dados é simples, bem definido e não se espera que mude;
- O acesso multi-usuário não é necessário;
- O custo de configuração do SGBD não é compatível com as necessidades imediatas de utilização de determinadas aplicações;
- Não é possível modelar um determinado problema;
- O usuário necessita de operações não suportadas pelo SGBD;
- Manipulação de áudio e imagem;
- Análise de vastos conjuntos de dados resultantes de experiências científicas.

3.3.5. Modelo de Dados

O modelo de dados é uma imagem gráfica contendo as informações primordiais para o desenvolvimento de um banco de dados, segundo uma determinada visão. Um modelo de dados é uma coletânea de conceitos que podem ser utilizados para descrever a estrutura de um banco de dados, como os tipos de dados, relacionamentos e restrições desses dados (Elmasri *et al.*, 2005).

Existem praticamente duas categorias de modelos de dados, que são os **modelos de alto nível**, ou modelos conceituais, e os **modelos de baixo nível** ou modelos físicos de dados.

Os modelos de alto nível ou conceituais, como o modelo de Entidade-Relacionamento proposto por Peter Chain em 1976, oferecem conceitos que estão muito próximos da realidade, facilitando a percepção dos dados pelos usuários. Esses modelos omitem detalhes de como os dados são armazenados. Utilizam conceitos como entidades, atributos e relacionamentos.

Uma entidade representa um objeto do mundo real que possui existência própria e cujas características ou propriedades desejamos armazenar. O objeto representado pode ser concreto (uma defensiva, uma pessoa, um carro, um organismo, outros) ou abstrato (um departamento, um projeto, um curso). Às características do objeto que desejamos armazenar, dá-se o nome de atributos. Atributos são propriedades descritivas de uma entidade. Cada atributo de uma entidade possui um nome e um valor específico.

Existem vários tipos de atributos:

- Atributos Simples (atômicos) – são atributos indivisíveis (representados graficamente por elipses).
- Atributos Compostos – são atributos que podem ser divididos em vários sub-atributos com significados independentes. O atributo 'Endereço' de um funcionário, por exemplo, pode ser dividido em Rua, Número e Bairro.
- Atributos Monovalorados – são atributos que possuem apenas um valor para a entidade relacionada.
- Atributos Multivalorados – são aqueles que podem assumir diversos valores para uma entidade relacionada. O número de telefone de um funcionário, por exemplo, pode apresentar diversos valores (representados graficamente por uma elipse de bordas duplas).
- Atributos Derivados – são atributos relacionados. Por exemplo, é possível determinar a idade de uma pessoa através de sua data de nascimento ou vice-versa; logo, os atributos idade e data de nascimento estão relacionados (representado graficamente por uma elipse pontilhada).
- Atributos-Chave – são aqueles que apresentam valores distintos para cada entidade em um conjunto de entidades. A seqüência

aminoacídica de cada defensina é um exemplo de atributo chave (identificado graficamente pelo atributo sub-grifado).

- Atributos de Valor Nulo: Um valor nulo é usado quando uma entidade não possui valor para determinado atributo.

Chave é um conjunto de um ou mais atributos, que tomados coletivamente, permitem identificar um determinado elemento no conjunto-entidade. São nomeadas como chaves primárias quando pertencem à própria tabela, ou chaves estrangeiras, quando uma tabela se relaciona com chave primária de outra tabela.

Um relacionamento, por sua vez, corresponde a uma associação entre uma ou mais entidades. Já um conjunto de relacionamentos inclui um número qualquer de relacionamentos similares, ou que associam os mesmos tipos de entidades. O grau de um relacionamento corresponde ao número de entidades que dele participam. Os relacionamentos mais comuns são os de grau dois (relacionamentos binários), podendo ocorrer também relacionamentos ternários ou até de maiores proporções. Relacionamentos também podem possuir atributos e se associar às entidades do mesmo tipo, comportando-se recursivamente (auto-relacionamento, **Figura 1**). Nesse caso é necessário o conceito de papel da entidade no relacionamento.

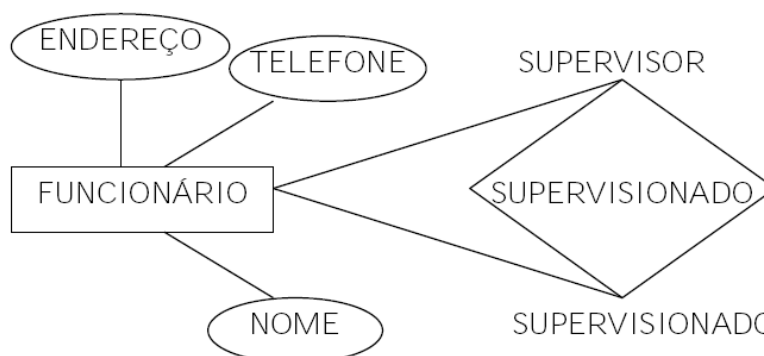


Figura 1 – Exemplo de relacionamento recursivo. No caso, funcionários supervisionam funcionários, sendo atribuído o papel de cada funcionário (supervisor ou supervisionado). Entidades são representadas graficamente por quadrados, atributos por círculos e relacionamentos por retângulos.

Já os modelos de baixo nível ou físicos oferecem conceitos que descrevem como os dados estão armazenados em um computador, no qual são representadas as informações dos formatos de registros, ordenamento desses registros, dentre outros.

3.4. Bancos de Dados já Disponíveis

Alguns Bancos de Dados voltados para peptídeos já estão acessíveis na rede mundial de computadores. Por isso, buscou-se construir programas para agrupar os dados de alguns desses bancos, filtrar e complementar essas informações, construindo uma base de dados concisa, empregada na descoberta de novas defensinas, a partir de sequências obtidas via sequenciamento aminoacídico.

3.4.1. UniProt

O UniProt (www.uniprot.org) é produzido por um consórcio UniProt (Figura 2), que consiste em uma colaboração entre o Instituto Europeu de Bioinformática (EBI), o Instituto Suíço de Bioinformática (SIB) e o Protein Information Resource (PIR).

A parte central do consórcio UniProt é formada pelo UniProt Knowledgebase, uma rica base de dados habilmente curada, dividida em duas seções. O UniProtKB/Swiss-Prot contém armazenadas sequências de proteínas manualmente anotadas e não redundantes. A anotação manual consiste de análise, comparação e fusão de todas as sequências disponíveis para uma dada proteína, assim como uma revisão crítica dos experimentos associados e dos dados preditos.

Os curadores do UniProt extraem as informações biológicas da literatura e realizam numerosas análises computacionais. O UniProtKB/TrEMBL contém entradas analisadas computacionalmente, enriquecidas com anotações automáticas e classificações. Os registros são selecionados para a anotação manual e integração ao UniProtKB/Swiss-Prot de acordo com os pré-requisitos definidos para anotações. As origens dos dados para o UniProtKB/TrEMBL são:

- Tradução das sequências de codificação (CDS) do DDBJ/EMBL Bank/GenBank ;
- As sequências das estruturas do PDB;
- Sequências do Ensembl, The Arabidopsis Information Resource (TAIR) e do *Saccharomyces* Genome Database (SGD);
- Dados derivados das sequências de aminoácidos que são diretamente submetidas ao UniProt ou que são escaneadas da literatura.

A base de dados em cluster UniRef usa conjuntos de sequências do UniProtKB e registros selecionados do UniParc para prover uma cobertura completa do espaço das sequências em várias resoluções. UniRef100 é produzido pelo agrupamento de todas essas sequências baseado em sua identidade. Sequências idênticas e seus sub-fragmentos são adicionados em uma mesma entrada UniRef100 com número de ascensão de todas as entradas fusionadas, sequências de proteínas, links para os registros UniProtKB e para os arquivos correspondentes. UniRef90 e UniRef50 apresentam uma redução do tamanho da base de dados de aproximadamente 40% e 65%, respectivamente, promovendo pesquisas significativamente mais rápidas envolvendo essas sequências.

UniParc é a base de dados de sequência de proteínas não redundante mais acessível ao público, fornecendo links para todas as fontes subjacentes e versões dessas sequências. Uma sequência pode ser instantaneamente encontrada se já estiver em domínio público, caso contrário, serão identificadas as sequências mais próximas.

UniMES é um repositório específico para metagenômica e para dados ambientais (UniProt, 2009).

Em 18/12/2009 o UniProt se encontra em sua versão 15.12, atualizada em 15/12/2009.

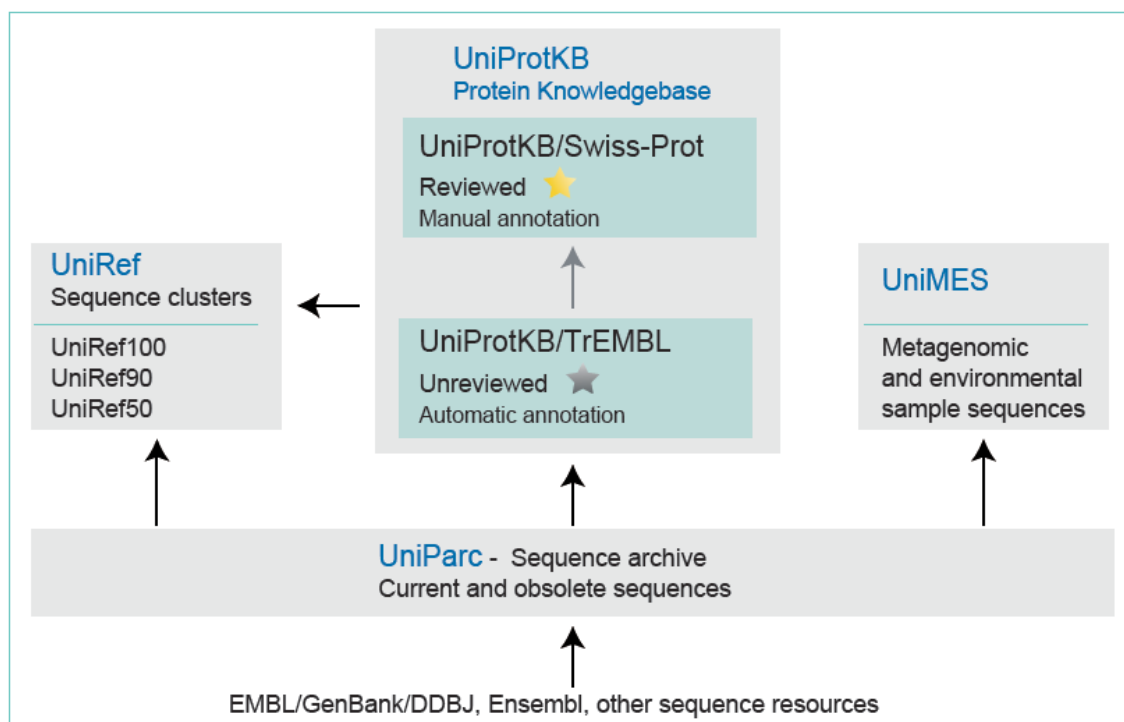


Figura 2 – Fontes e fluxo de dados para os componentes das bases de dados do UniProt .

3.4.2. PhytAMP

O banco de dados PhytAMP é executado a partir de uma plataforma Windows NT (Microsoft Windows 2000) com servidor Apache Web Server, servidor MySQL e PHP, e hospedado no Centro de Calcul El Khawarizmi (CCK), Tunísia. As sequências são coletadas e curadas manualmente a partir da base de Dados do UniProt (UniProt, 2009) e da literatura científica usando o PubMed. Programas para análise das sequencias armazenadas foram incorporados, como os programas FASTA (Pearson *et al.*, 1988), BLAST (Altschul *et al.* 1990), Smith-Waterman search (Pearson *et al.*, 1988), ClustalW (Thompson *et al.*, 1994), MUSCLE (Edgar, 2004) e T-Coffee (Notredame *et al.*, 2000). O programa HMMER também é utilizado para implementar modelos ocultos de Markov (Durbin *et al.*, 1998). Cada entrada contém dados gerais como nome do peptídeo, sequência, classe, taxonomia da planta, dados de atividade e referências relevantes do UniProt. Dados físico-químicos (Fórmula empírica, massa, tamanho, ponto isoelétrico, rede de cargas, entre outras) são também adicionados, desde que essas informações estejam disponíveis.

A versão corrente do PhytAMP armazena 271 AMPs de plantas, secretados por várias famílias, tais como Amaranthaceae, Andropogoneae, Brassicaceae, dentre outras. A classificação tem sido proposta com base na estrutura primária. *Viola* (família Violaceae) e *Arabidopsis* (família Brassicaceae) apresentam predominância entre os organismos que expressam AMPs, possivelmente, devido a estudos mais predominantes sobre essas espécies. Os AMPs de plantas são classificados dentro dessa base de dados como Ciclotídeos, defensinas, *Hevein-like*, *Impatiens*, *Knottins*, LTPs, *Shepherdins* ('Pastoras'), Snakinas, tioninas ou Vicilin-like ('Vicilina-like'), MBP-1 e beta-barellin (Hammami *et al.*, 2008). Apenas 69% dos peptídeos armazenados foram sequenciados diretamente. Os demais foram obtidos por predição de sequências genômicas e 83,4% das sequências de aminoácidos variam entre 20 a 67 resíduos (Hammami *et al.*, 2008).

3.4.3. Defensins Knowledgebase

Os dados armazenados no *Defensins Knowledgebase* são provenientes de duas fontes, nomeadas primárias e secundárias, de acordo com o tipo de banco de dados relacionado: banco de dados bibliográficos, ou banco de dados de sequências, respectivamente. Como fonte primária foi utilizada a versão

acadêmica do SciFinder Scholar 2006
 (<http://www.cas.org/SCIFINDER/SCHOLAR>) e, como fonte secundária, foram utilizados o *UniProt Knowledgebase* e o *GenBank* (Seebah *et al.*, 2007).

Esse banco de dados foi organizado por meio de uma tabela contendo informações básicas sobre as defensinas (*BasicInformation*) (**Figura 3**). Essa tabela se relaciona com as demais tabelas contendo informações específicas sobre as seqüências das defensinas (*ProteinSequence*) e sobre as variações dessas seqüências (*SequenceVariation*). A tabela *ProteinSequence*, por sua vez, relaciona-se com as tabelas *Cytotoxicity*, *Antimicrobes* e *ProteinStructure*. Essa, por último, relaciona-se com a tabela *ExperimentForm*. As sete entidades ainda apresentam diversos atributos. Como pode ser observado, o objetivo principal da construção do *Defensin Knowledgebase* é fornecer informações gerais sobre as defensinas.

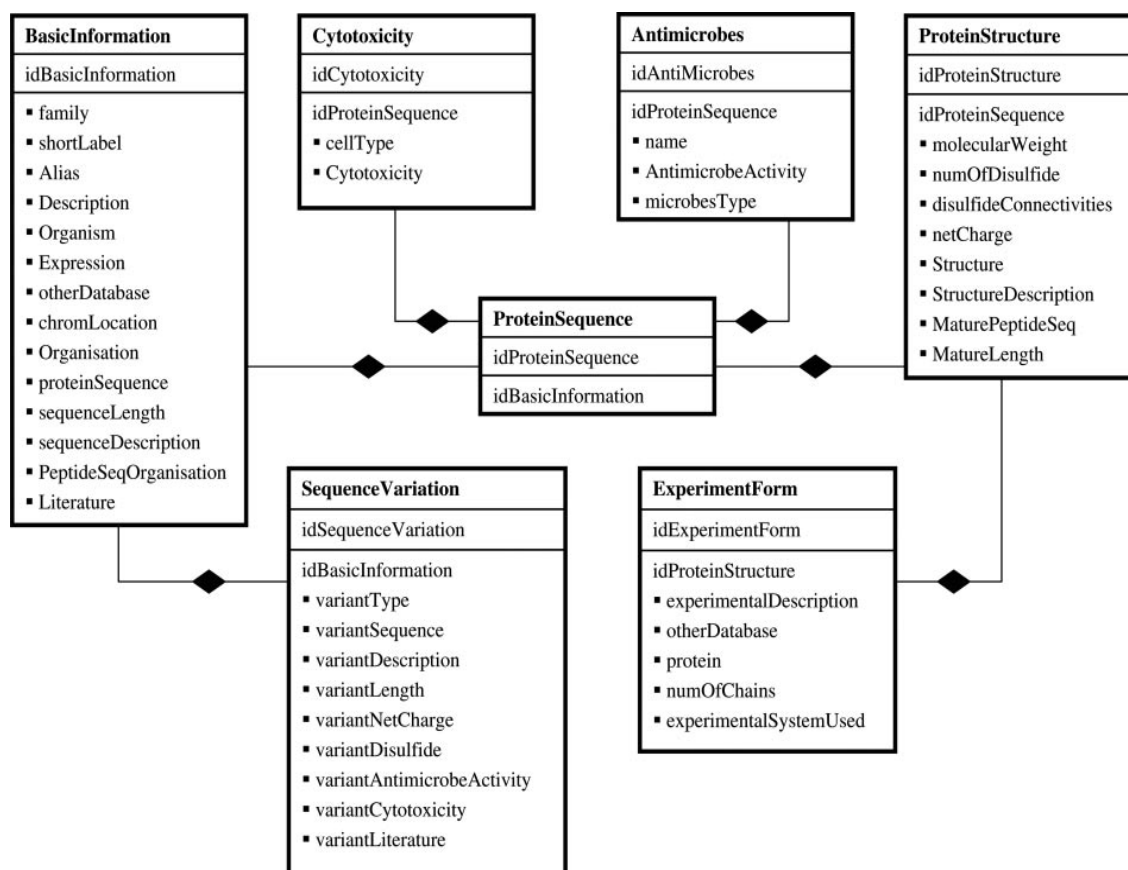


Figura 3 – Esquema organizacional simplificado do *Defensin Knowledgebase*, com as entidades e os atributos contidos no banco de dados.

3.4.4. Outros Bancos de Dados:

3.4.4.1. *Antimicrobial Peptide Database (APD)*

APD foi construído no sistema operacional *Red Hat Linux* usando o servidor *freeware Apache*, linguagem de *script PHP* e sistema de banco de dados relacional *MySQL*. Nesse banco, os peptídeos antimicrobianos foram coletados da literatura por pesquisa ao *PubMed* usando palavras-chave como *antimicrobial peptide*, *antibacterial peptide*, *antifungal peptide*, *anticancer peptide* ou *anti-tumor peptide*. Os peptídeos coletados nessa versão do APD são principalmente de fontes naturais. Um único identificador numérico de cinco dígitos, iniciado com AP foi correlacionado para a identificação de cada peptídeo. Cada entrada foi conferida no *PDB* ou no *UniProt*. Se o peptídeo existir nos bancos de dados estabelecidos, um *web link* será criado para essa entrada para facilitar a consulta do banco de dados original. Além disso, cada entrada também contém o nome do peptídeo, a seqüência, o tamanho, o grau de hidrofobicidade, a carga parcial, a estrutura, os métodos físicos para determinação de estrutura tridimensional, a atividade biológica, os resíduos críticos para a atividade e as referências (Wang *et al.*, 2004).

3.4.4.2. *ANTIMIC Database*

O banco de dados *Antimic* contém uma coleção extensiva de seqüências antimicrobianas de muitas famílias. O banco de dados foi criado sobre um desenvolvedor doméstico em uma plataforma de armazenamento de dados (*BioWare*, sdmc.i2r.a-star.edu.sg/Templar) que permite rápida construção de bancos de dados de pesquisa biologicamente especializados. *BioWare* é composto de três programas modulares: *BioWare Retrieve Module*, que recupera os dados não trabalhados de diversas fontes na rede mundial de computadores; *BioWare-Prep Module* para processar os dados recuperados; e *Templar Module* para a integração das informações até um repositório central. O processamento inclui a geração de um sumário reportado para a remoção de entradas redundantes e re-enumeração das entradas, e outros sub-módulos, como um módulo para geração de múltiplos alinhamentos e um módulo para visualização das propriedades das pontes dissulfeto para ajudar o criador do banco de dados a gerenciar as informações mais eficientemente (Brahmachary *et al.*, 2004).

Os dados foram extraídos de bancos de dados públicos. Palavras-chave específicas como *alpha defensin* e palavras-chave genéricas como *antibacterial*, *antifungal*, e outras, foram usadas com *BioWare Retrieve Module* para pesquisa nos bancos de dados do NCBI, GenBank e Swiss-Prot (Brahmachary *et al.*, 2004).

Diante do anteriormente apresentado, observa-se e reforça-se a importância da caracterização das defensinas como compostos, direta e indiretamente associados à saúde humana e ao agronegócio, apresentando uma gama de aplicações biotecnológicas e farmacêuticas em potencial.

Assim, existe a real necessidade de associar informações já disponíveis, de forma específica frente aos trabalhos em desenvolvimento, por meio da criação de um banco de dados relacional que agrupe e seja capaz de estabelecer relações entre os dados armazenados, fornecendo uma base de dados ampla para auxiliar a identificação de novas defensinas, de forma simples, fácil e com confiabilidade.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Desenvolver uma base de dados ampla e concisa contendo registros de defensinas, que será usada para a identificação e caracterização desses peptídeos por meio de análises computacionais.

4.2. Objetivos Específicos

i – Identificação e análise de novas fontes de dados e elaboração da estrutura do banco;

ii – Construção dos programas voltados à atualização (*parser*) e à adequação dos dados obtidos;

iii – Preenchimento e atualização remota da base de dados;

iv – Publicação do banco de dados na internet;

v – Incorporação de ferramentas ligadas à base de dados (ex. BLAST);

vi – Teste e avaliação do DefDB;

5. PROPOSTA PRELIMINAR E FUNCIONALIDADE

A construção do banco de dados DefDB foi iniciada em 2007 (Magalhães, 2007). A proposta era desenvolver um banco de dados relacional, voltado à identificação de padrões relacionados à defensinas, organismos e classes taxonômicas, possibilitando o estabelecimento de inter e intra-relações entre as moléculas já descobertas. Essa proposta foi então desenvolvida utilizando-se o Microsoft Access (MSAccess), e a população inicial dos registros foi importada manualmente dos bancos de dados UniProt (registros sobre sequências aminoacídicas e outras informações de literatura) e do NCBI (Entrez - registros sobre sequências nucleotídicas codificadoras). Em função da necessidade imediata de identificação e análise das sequências aminoacídicas demandada pelo Laboratório de Proteômica e Bioquímica de Proteínas (LPBP/UFV), e pela dificuldade encontrada na correlação das sequências aminoacídicas e nucleotídicas, a proposta inicial do DefDB foi abandonada. A estrutura do banco de dados e as bases de dados foram reconstruídas, havendo uma priorização sobre a obtenção, agrupamento e análises das sequências aminoacídicas remotamente.

Assim, o banco de dados DefDB foi idealizado para servir como suporte para identificação dos peptídeos antimicrobianos da classe das defensinas, em especial de plantas, por meio das seqüências peptídicas, obtidas pelos diversos métodos analíticos. Por esse motivo, a obtenção e a análise das sequências aminoacídicas foram priorizadas. Isso se deve à maior confiabilidade desse tipo de dado para realizar alinhamentos e análises para identificação e caracterização de novas defensinas, quando comparadas a ESTs e sequências nucleotídicas. Mediante a existência de diversas fontes de dados já publicadas na rede mundial de computadores, optou-se pela criação de ferramentas computacionais que agrupem essas informações de maneira automatizada, eliminando redundâncias e organizando uma base de dados ampla, que favoreça a identificação de novas sequências.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Construção e Conteúdo

O banco de dados DefDB foi construído sobre uma plataforma Linux (Ubuntu 9.04), utilizando servidor web Apache (versão 2.0), MySQL (versão 5.0) e PHP (versão 5.2.6). O banco de dados foi hospedado na Central de Processamento de Dados (CPD), na Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais, Brasil. O DefDB está na sua versão 1.07, sendo sua última atualização realizada no dia 10/12/2009.

6.2. Bancos de Dados-Fonte

Os dados presentes no DefDB foram obtidos pela mineração remota em três bancos de dados já publicados na rede mundial de computadores, UniProt (The UniProt, 2009; **item 3.4.1**), Defensin Knowledgebase (Seebah *et al.*, 2007; **item 3.4.2**) e PhytAMP (Hammami *et al.*, 2008; **Item 3.4.3**).

6.3. Bases de Dados Criadas no DefDB

Foram criadas duas bases de dados pré-selecionáveis no domínio do DefDB. A base de dados intitulada 'Defensin' contém todas as defensinas resgatadas pelos programas exploradores (defensinas de mamíferos, plantas, artrópodes, outras). Já a base de dados intitulada 'Plant Defensin', contém somente defensinas de plantas. As defensinas apresentam grande similaridade estrutural, como já conhecido (Carvalho, 2009). Por isso, pode ser importante para o usuário, interessado em analisar uma possível defensina de planta, a comparação desses peptídeos com todas as demais defensinas, mesmo com aquelas expressas por organismos muito diferentes.

O banco de dados DefDB foi construído a partir de sete tabelas temporárias ("Temporary Databases", **Figura 4**), sendo cinco tabelas pré-processadas e duas processadas, que serviram de base para a construção das duas tabelas principais ("DefDB Databases", **Figura 4**). As tabelas pré-processadas contêm dados brutos provenientes dos três bancos de dados-fonte, selecionados segundo a necessidade e a finalidade do DefDB apresentadas no **item 4**. As duas tabelas processadas foram criadas a partir das tabelas pré-processadas, por meio de uma ferramenta construída a partir das linguagens de programação SQL e PHP. Já as tabelas principais, foram

criadas apenas uma vez a partir das tabelas processadas, sendo apenas atualizadas durante as atualizações do banco, mediante as alterações necessárias dos dados contidos e acréscimo de novas sequências. Por não haver a deleção das tabelas principais, cada defensina armazenada apresenta uma identificação única e imutável, dentro de uma base de dados bem estruturada e não redundante.

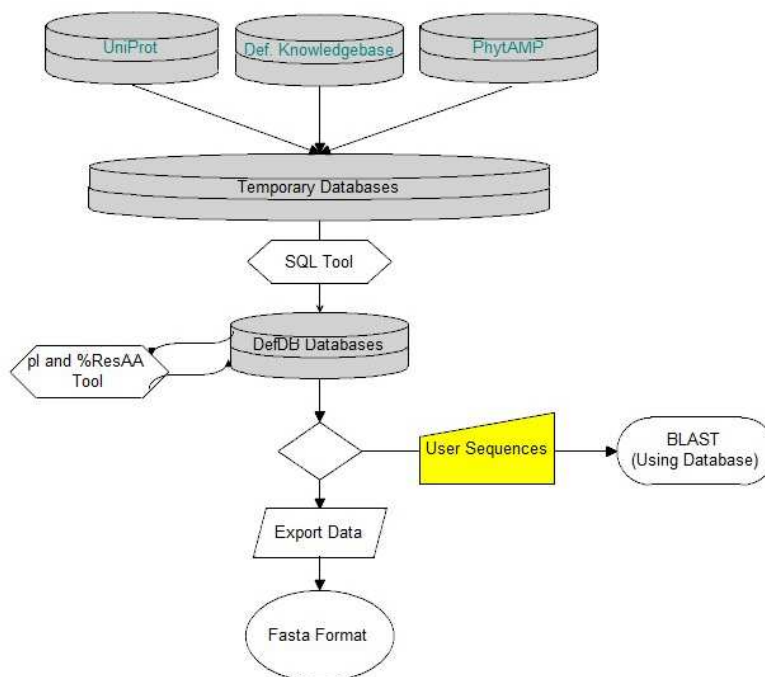


Figura 4 - Diagrama do Banco de Dados DefDB.

Nem todos os dados obtidos foram inseridos nas bases de dados do DefDB. As redundâncias observadas entre os bancos de dados-fonte, os dados repetidos dentro desses bancos, e outros erros internos encontrados foram eliminados. Esses erros internos são basicamente nomeações erradas das entradas (tuplas), gerando repetições internas. Desse modo, a base de dados 'Defensin' é constituída de 1582 entradas, das quais 1552 vieram dos 1594 registros recuperados do UniProt, 24 dos 489 registros recuperados do Defensin Knowledgebase e 6 dos 55 registros obtidos do PhytAMP. Já a base de dados 'Plant Defensin' é constituída de 422 entradas, sendo que 415 vieram dos 418 registros recuperados do UniProt, 0 dos 61 registros recuperados do Defensin Knowledgebase e 7 dos 55 registros armazenados no PhytAMP. A prioridade foi dada ao UniProt por ser o banco de dados-fonte que recebe maior atenção da comunidade acadêmica, apresentando dados confiáveis.

O número e a porcentagem de resíduos das sequências armazenadas em cada base de dados ('Defensin' e 'Plant defensin') estão apresentados na **Tabela 1**. Os valores médios do pl teórico para as sequências presentes em 'Defensin' e 'Plant Defensin' foram, respectivamente, **8,08** e **7,83**.

Tabela 1 – Número e porcentagem dos resíduos de aminoácidos das sequências peptídicas armazenadas nas bases de dados 'Defensin' e 'Plant defensin' (atributo 'seq')

Resíduos Aminoacídicos	Bases de Dados			
	'Defensin'		'Plant Defesin'	
	Nº Resíduos	% Resíduos	Nº Resíduos	% Resíduos
ALA(A)	8709	6,94	1924	5,70
ARG(R)	8046	6,41	1546	4,58
ASP(D)	4550	3,62	1305	3,87
ASN(N)	4660	3,71	1460	4,33
CYS(C)	11201	8,92	3597	10,66
GLU(E)	5953	4,74	1473	4,37
GLN(Q)	4334	3,45	897	2,66
GLY(G)	9097	7,25	2365	7,01
HIS(H)	2892	2,30	712	2,11
ILE(I)	5511	4,39	1806	5,35
LEU(L)	11778	9,38	2575	7,63
LYS(K)	7603	6,06	2352	6,97
MET(M)	3303	2,63	1044	3,09
PHE(F)	5688	4,53	1742	5,16
PRO(P)	5556	4,43	1380	4,09
SER(S)	8188	6,52	2528	7,49
THR(T)	6908	5,50	1842	5,46
TRP(W)	1038	0,83	246	0,73
TYR(Y)	3300	2,63	957	2,84
VAL(V)	7222	5,75	1988	5,89

6.4. Programas

Programas exploradores, utilizando a linguagem PHP, foram especificamente construídos para recuperar os dados provenientes de cada um dos três bancos de dados (**Item 6.2**). Todas as informações recuperadas foram agrupadas e curadas utilizando as linguagens de programação SQL/PHP, por meio da implementação de ferramentas computacionais usadas para criar e atualizar as tabelas do banco de dados DefDB. Esses programas estão em processo de registro junto ao Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI).

Uma função foi implementada e acrescentada aos programas exploradores para estimar a massa molecular de cada defensina em Daltons. Para tal estimativa foi considerado o valor de pH 7,0 como a referência para o estado de ionização de cada resíduo e as massas utilizadas foram obtidas na Biblioteca Jena (www.imb-jena.de/IMAGE_AA.html) do Instituto de Biotecnologia Molecular (IMB) de Jena, Alemanha. Outra ferramenta computacional foi criada para aprimorar a base de dados utilizando linguagem PHP, fornecendo o número, a percentagem de resíduos e estimando o valor do pI de cada sequência. O programa 'BLAST' (Altschul *et al.*, 1990) foi vinculado à base de dados utilizando o *Blast Web Server* versão 2.2.20 (www.blast para Linux-ia32, [FTP://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/executables/LATEST/wwwblast-2.2.20-ia32-linux.tar.gz](ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/executables/LATEST/wwwblast-2.2.20-ia32-linux.tar.gz)).

6.4.1. Programas Exploradores

6.4.1.1. Unibusca

O programa usa as palavras-chave “defensin” e “plant defensin” para coletar dados no UniProt e iniciar o preenchimento de duas das cinco tabelas temporárias do DefDB. Posteriormente, esses dados são refinados e comparados com os dados coletados nos outros bancos por outra ferramenta computacional (**item 6.4.2**), sendo que, em caso de qualquer redundância, a preferência será sempre dos dados do UniProt. Esse banco possui um grande volume de informações e apresenta uma equipe de anotadores responsáveis por atualizar e revisar os dados continuamente, sendo amplamente utilizado pela comunidade científica. Uma das tabelas será preenchida com as informações selecionadas referentes a todas as defensinas registradas e a outra tabela será preenchida apenas com as defensinas de plantas.

6.4.1.2. KDBbusca

O programa KDBbusca acessa o banco de dados Defensin Knowledgebase e recupera as informações sobre defensinas armazenadas nesse banco, por meio de sua identificação, preenchendo mais duas das 5 tabelas temporárias do DefDB. Uma das tabelas será preenchida com as informações selecionadas referentes às defensinas presentes no banco de dados fonte e a outra tabela será preenchida apenas com as defensinas de plantas.

6.4.1.3. Phybusca

O Phybusca é um programa criado para recuperar os dados do banco de dados PhytAMP, que seleciona e recupera remotamente todos os dados de interesse referentes à defensinas armazenados no banco de dados fonte, preenchendo apenas uma das tabelas temporárias do DefDB, já que o banco de dados fonte armazena apenas informações relacionadas a peptídeos antimicrobianos de plantas.

6.4.2. Programa Organizador

6.4.2.1. DefDB_Org

O DefDB_Org é uma ferramenta computacional criada a partir de rotinas SQL implementadas para agrupar os dados providos das tabelas temporárias pré-processadas e atualizar as tabelas principais do DefDB. Essa ferramenta cria duas tabelas temporárias processadas, uma para cada base de dados ('Defensin', 'Plant Defensin'), e posteriormente usa essas duas tabelas para atualizar as tabelas permanentes do banco. O agrupamento de dados é feito comparando-se as tabelas pré-processadas de cada base de dados, levando-se em conta os atributos referentes às sequências ('Seq') e aos organismos ('Org'). Desse modo, duas defensinas serão consideradas idênticas, somente quando suas sequências forem idênticas e os organismos que as expressem forem idênticos, partindo do princípio que não pode haver dentro da base de dados duas defensinas com a mesma sequência sendo expressas por um mesmo organismo. Posteriormente, os demais atributos são completados e a atualização das tabelas principais é realizada, pela comparação direta do atributo "número de identificação no banco de dados fonte" (ID). As defensinas que não tiverem seus IDs registrados no banco de dados DefDB são inseridas, sendo numeradas com um novo código interno. Dessa maneira, um atributo constituído de um número natural diferente de zero, nomeado "número de identificação interno" (ID_Int), é criado para a identificação interna de cada registro, sendo mantido imutável para cada entrada. Após atualizações do DefDB, alguns IDs podem ser eliminados. Esses registros correspondem a entradas retiradas ou remanejadas nos bancos de dados-fonte, podendo ser causada por mudança na classificação do peptídeo, ou correção e atualização dos registros internos desses bancos. Outras delimitações específicas para as

entradas providas de cada banco de dados também são realizadas por essa ferramenta.

6.4.3. Programa Complementar

6.4.3.1. pl_resAA

O programa pl_resAA foi implementado para atuar como ferramenta complementar para fornecer o número e a percentagem dos resíduos aminoacídicos, e estimar o pl de cada defensina.

Para fornecer o número de resíduos o programa conta o número de cada tipo de resíduo presente em cada uma das entradas do banco (atributo 'seq'). Com essa informação, o programa divide a quantidade de cada tipo de resíduo pelo número total de resíduo e o valor percentual obtido é apresentado para o usuário em número centesimal, com duas casas decimais aproximativas.

Para estimar o pl de cada defensina, o programa considera apenas os resíduos carregados que influenciam na variação do pl quando há alteração no valor de pH (Arginina, Apartato, Cisteína, Glutamato, Histidina, Lisina e Tirosina) e os grupos amino (N-t) e carboxílico (C-t). O cálculo da carga total de cada peptídeo mediante a variação do pH em 0.01 unidade, a partir de zero, foi feito pelo rearranjo da equação de Handerson-Hasselbach, permitindo a determinação aproximada do valor de pH que corresponde ao de mudança do sinal da carga líquida total do peptídeo. Por meio desse rearranjo foi feito um somatório das cargas dos grupos ionizáveis da molécula:

Para cada resíduo negativo como: $\sum_{i=1}^n \frac{-1}{1 + 10^{pK_n - pH}}$, sendo pK_n o valor negativo do log da constante de dissociação do grupo lateral negativo do resíduo aminoacídico ou do grupo carboxílico (C-t).

E para cada resíduo positivo como: $\sum_{i=1}^n \frac{1}{1 + 10^{pH - pK_p}}$, sendo pK_p o valor do negativo do log da constante de dissociação do grupo lateral positivo do resíduo aminoacídico ou do grupo amino (N-t). Os valores de pK_p e pK_n usados foram obtidos por Dawson *et al.*, (1986).

Dessa forma, o valor do pH em que a carga líquida total do peptídeo, obtida pela combinação dos somatórios descritos, passa de um valor positivo para zero ou para um valor negativo é tomado como o pl estimado do peptídeo.

6.5. Descrição da Página de Acesso na Web

O banco de dados DefDB pode ser acessado no endereço eletrônico www.defdb.ufv.br. O *layout* da página foi desenvolvido para proporcionar ao usuário uma fácil navegação, com parâmetros intuitivos. Após o acesso pelo usuário, esse é direcionado à página intitulada “about”, que contém uma breve descrição do DefDB, juntamente com algumas informações sobre o conteúdo do banco (**Figura 5**). Botões situados na região superior direita da tela direcionam o usuário a outras páginas: “defensins”, na qual está postada uma breve descrição sobre defensinas; “search”, na qual é possível realizar buscas de sequências e de outras informações presentes na base de dados, além de realizar o *download* das sequências desejadas; “tools”, na qual é possível usar o programa Blast para realizar alinhamentos de uma sequência desejada contra cada uma das bases de dados do DefDB; e “contact”, onde o usuário pode enviar suas dúvidas, sugestões e críticas ao administrador do banco.



Figura 5 – Página inicial de acesso ao DefDB. Apresenta uma breve descrição do banco de dados e de seu conteúdo. Em destaque, no canto superior direito, estão os botões de direcionamento.

Na página destinada à busca, o usuário tem a opção de selecionar o número de resultados por página, a base de dados que se deseja realizar a consulta, a ordenação dos resultados da pesquisa, além de escolher o tipo de

pesquisa desejável. Em relação a essa última opção, o usuário pode optar por uma busca simples (**Figura 6-A**) ou por uma busca avançada (**Figura 6-B**), especificando nessa última possibilidade, o tipo do termo de pesquisa segundo a seleção do campo de preenchimento. No campo tamanho da sequência ('Lenght'), a busca pode ser feita pela inserção da massa estimada em Daltons ('Da') ou do número de resíduos ('AA') da sequência de interesse. O usuário também pode buscar as entradas cujas sequências estejam dentro de uma faixa de massa-específica, utilizando a notação de uma barra (/) após o valor de massa informado, seguido pelo valor positivo correspondente à faixa considerada. O mesmo se aplica ao número de resíduos a serem considerados. Por exemplo, se o usuário desejar visualizar todas as defensinas com massas estimadas entre 6800 a 7200 Da, deve-se digitar "7000/200" no campo referente ao tamanho, em Da, na opção busca avançada. Se o usuário digitar simplesmente 7000, são disponibilizadas somente as defensinas que apresentarem exatamente esse tamanho estimado. Os valores de massa, em Da, foram estimados usando as massas dos resíduos disponíveis no Repositório de Aminoácidos do Jena Library of Biological Macromolecules (Institute of Molecular Biotechnology (IMB), Jena / Germany; Leibniz Institute for Age Research - Fritz Lipmann Institute (FLI) - http://www.imb-jena.de/IMAGE_AA.html), acrescentado do valor correspondente a uma molécula de água, com precisão de duas casas decimais. Após a consulta, os resultados são apresentados em uma tabela resumida (**Figura 6-C**), em que será mostrada a identificação no DefDB, o nome da defensina, o tipo de processamento da sequência, o organismo, o gene codificante e o tamanho da sequência, com o número de resíduos de aminoácidos e a massa molecular (em Da).

A visualização das demais informações armazenadas no banco de dados poderá ser feita quando o usuário clicar sobre o ID da defensina de interesse. Após esse procedimento, uma nova janela se abrirá, apresentando as informações sobre o registro selecionado (**Figura 7**).

A Search

Results per page: All

Search in: Plant defensins

Query:

Order by:

ID Ascendent

Search Clear

Advanced Search

B Search

Results per page: 25

Search in: Plant defensins

Id

Name

Description

Organism

Sequence

Length Da AA Res

Gene

Search Clear

Single Search

C

Select all	ID	Name	Process	Organism	Gene	Length
<input type="checkbox"/>	1	Putative defensin-like protein 15 : Putative plant defensin 1.2b	Precursor	Arabidopsis thaliana	PDF1.2B	80 (8642.41)
<input type="checkbox"/>	2	Defensin-like protein 17 : Plant defensin 1.2c	Precursor	Arabidopsis thaliana	PDF1.2C	80 (8552.29)
<input type="checkbox"/>	3	Defensin-like protein 14 : Plant defensin 1.3	Precursor	Arabidopsis thaliana	PDF1.3	80 (8582.36)
<input type="checkbox"/>	4	Defensin-like protein 6 : Plant defensin 2.5	Precursor	Arabidopsis thaliana	PDF2.5	73 (8392.94)
<input type="checkbox"/>	5	Defensin-like protein 18 : Plant defensin 1.5	Precursor	Arabidopsis thaliana	PDF1.5	80 (9138.61)
<input type="checkbox"/>	6	Defensin-like protein 13 : Plant defensin 1.1	Precursor	Arabidopsis thaliana	PDF1.1	80 (8712.5)
<input type="checkbox"/>	7	Defensin-like protein	Mature	Ipomoea trifida	S10AB3 EMBL BAF52546.1	74 (8242.1)

Figura 6 – Opções de pesquisa na base de dados do DefDB: busca simples (A) e busca avançada (B); e representação da tabela de resultados resumida, apresentada após consulta (C).



[about](#) [defensins](#) [search](#) [tools](#) [contact](#)

|||Exit|||
<< Back

ID:	40
Data Source:	UNIPROT - Q43413
Defensin Name:	Defensin J1-1
Organism	Capsicum annuum
Taxonomic identifier (NCBI):	4072
Gene name:	No stored
Sequence:	MAGFSKVVATIFLMMLLVFATDMMAEAKICEALSGNFKGLCLSSRDGCVCRREGFTDGSICGFRLQCFCTKPCA
Sequence length (Aminoacid residues/Daltons):	75 / 8119.96
Sequence Processing:	Precursor
Evidence level:	Evidence at protein level
Estimated pI:	7.89

Ident:	ALA(A)	ARG(R)	ASN(N)	ASP(D)	CYS(C)	GLN(Q)	GLU(E)	GLY(G)	HIS(H)	ILE(I)	LEU(L)	LYS(K)	MET(M)	PHE(F)	PRO(P)	SER(S)	THR(T)	TRP(W)	TYR(Y)	VAL(V)
Res. Number:	7	4	2	3	8	1	3	7	0	3	7	4	5	7	1	5	4	0	0	4
Res. Percent:	9.33	5.33	2.67	4	10.67	1.33	4	9.33	0	4	9.33	5.33	6.67	9.33	1.33	6.67	5.33	0	0	5.33

Mature Sequence:	KICEALSGNFKGLCLSSRDGCVCRREGFTDGSICGFRLQCFCTKPCA
Signal Peptide:	MAGFSKVVATIFLMMLLVFATDMMAEA

Figura 7 – Página de consulta contendo as informações disponíveis na base de dados sobre cada defensinas específica.

As informações disponíveis atualmente no DefDB correspondem a informações sobre a fonte de dados (“Data Source”), o nome da defensina (“Defensin Name”), o organismo que a expressa (“Organism”), o identificador taxonômico segundo codificação do NCBI (“Taxonomic identifier (NCBI)”), o nome do gene (“Gene name”), a sequência primária da defensina (“Sequence”), o comprimento da sequência em resíduos de aminoácidos e a massa estimada em Daltons (“Sequence length”), a condição de exibição da sequência quanto ao seu processamento (“Sequence Processing”), o nível de evidência experimental que suporta a existência da proteína (“Evidence Level”), o valor de *pI* estimado da sequência primária (“Estimated *pI*”), a quantidade e a percentagem de resíduos aminoacídicos apresentados em forma de uma tabela e informações sobre a sequência madura, no caso da sequência apresentada no campo “Sequence” corresponder a um precursor, juntamente com a apresentação do peptídeo sinal, quando existir. Algumas informações sobre o nome do gene codificante ou sobre a sequência madura de algumas defensinas podem não estar registradas nos bancos de dados-fonte, sendo apresentadas como “No stored”.

O usuário também pode realizar o *download* das sequências desejadas marcando as caixas de seleção, localizadas à esquerda do resultado, e clicando na opção “Download” (**Figura 8**). As sequências são enviadas no formato FASTA.

Select all	ID	Name	Process	Organism	Gene	Length
<input checked="" type="checkbox"/>	1	Putative defensin-like protein 15 : Putative plant defensin 1.2b	Precursor	Arabidopsis thaliana	PDF1.2B	80 (8642.41)
<input type="checkbox"/>	2	Defensin-like protein 17 : Plant defensin 1.2c	Precursor	Arabidopsis thaliana	PDF1.2C	80 (8552.29)
<input checked="" type="checkbox"/>	3	Defensin-like protein 14 : Plant defensin 1.3	Precursor	Arabidopsis thaliana	PDF1.3	80 (8582.36)
<input checked="" type="checkbox"/>	4	Defensin-like protein 6 : Plant defensin 2.5	Precursor	Arabidopsis thaliana	PDF2.5	73 (8392.94)
<input type="checkbox"/>	5	Defensin-like protein 18 : Plant defensin 1.5	Precursor	Arabidopsis thaliana	PDF1.5	80 (9138.61)
<input type="checkbox"/>	6	Defensin-like protein 13 : Plant defensin 1.1	Precursor	Arabidopsis thaliana	PDF1.1	80 (8712.5)

3 selected: Download... like protein Mature Ipomoea triloba S1cAB3 EMBL BAF52546.1 74 (8242.1)

Figura 8 – Exemplo de registros selecionados para *Download*. Para realizar a extração, basta ao usuário marcar os registros das defensinas de interesse e clicar no botão “Download”. A quantidade de itens marcados será apresentada na barra laranja.

Além disso, o usuário pode realizar alinhamentos imediatos de suas sequências de interesse contra a base de dados criada dentro do próprio site do DefDB (**Figura 9**). O programa BLAST (BLAST Web Server) se encontra vinculado ao banco de dados, podendo ser acessado pelo botão “Tools”.

Futuramente, novas ferramentas de análise de sequência serão incorporadas ao DefDB.

DefDB
Defensins
DATABASE

about defensins search tools contact

|||Exit||| << Back

BLAST

NCBI BLAST BLAST Entrez ?

Choose program to use and database to search:

Program: blastp

Database: Defensins

Enter sequence below in FASTA format

Or load it from disk: [input] Enviar arquivo...

Set subsequence: From [input] To [input]

Clear sequence Search

The query sequence is filtered for low complexity regions by default.

Filter Low complexity Mask for lookup table only

Expect: 10 Matrix: BLOSUM62

Perform ungapped alignment

Query Genetic Codes (blastx only)
Standard (1)

Clear sequence Search

Figura 9 – Interface para inserção de sequências externas em formato FASTA ao servidor BLAST, incorporado ao banco de dados. Os alinhamentos serão efetuados com uma das duas bases de dados do DefDB, selecionadas em **Database**. As sequências também podem ser carregadas em forma de arquivo (“load it from disk”) e serem delimitadas em relação ao seu número de resíduos (“Set subsequence”).

A base de dados do DefDB, ou um sub-conjunto de suas sequências, selecionado pelo próprio método de busca do DefDB, já podem ser utilizados por programas, ou plataformas (Pipelines) de análise de dados para identificar novas defensinas. A exemplo, X Tandem (<http://www.thegpm.org/tandem/index.html>), LabKey Web Server (<https://www.labkey.org/project/home/begin.view>).

7- POTENCIALIDADE E VALIDAÇÃO DO USO DO DefDB

O Banco de dados DefDB foi elaborado para auxiliar na identificação de novas defensinas a partir de dados obtidos por métodos de seqüenciamento: seqüências de fragmentos peptídicos ou espectros de massa. Desse modo, os atributos referentes às seqüências aminoacídicas foram priorizados (**item 5**). A grande vantagem de utilizar bases de dados menores e específicas está na otimização das análises realizadas pelos algoritmos de alinhamento ou pelos algoritmos de comparação de espectros de massa (algoritmos de localização, seleção e comparação dos valores de massa/carga), favorecendo uma identificação mais precisa e coerente de possíveis defensinas. Um fragmento constituído de oito resíduos da seqüência da defensina J1-1, expressa por *Capsicum annuum* (**Figura 10**), pode ser utilizado para exemplificar a utilização e potencialidade de uso do DefDB, por meio da realização de alinhamentos simples utilizando o programa Protein BLAST.

Seq Ref: Defensin J1-1
Numero DefDB: 40 ('Plant defensin')
ID_Uniprot: Q43413
Seq: KICEALSGNFKGLCLSSRD ^{CGNVCRREGFTDGSCIGFRLQCFCTKPCA}
Fragmento Seq: LCLSSRDC
Frag. modificado: LCLSARDC

Figura 10 – Seqüência de resíduos de aminoácidos da defensina J1-1 do organismo *Capsicum annuum*. Abaixo, estão mostrados os fragmento (normal e modificado – contando uma troca do resíduo Ser5 para Ala5) utilizados para as análises de alinhamento através da ferramenta BLAST. Em vermelho, é apresentada a posição do fragmento utilizado na seqüência da defensina J1-1.

As **Figuras 11** e **12** mostram os resultados dos alinhamentos do fragmento LCLSSRDC e do fragmento LCLSARDC, um variante contendo uma troca do resíduo de Ser5 para Ala5, utilizando a base de dados de proteínas não redundantes do BLAST (**Figura 11**) e a base de dados 'Plant defensin' do DefDB (**Figura 12**).

A – LCLSSRDC

Sequences producing significant alignments:

	Score (Bits)	E Value	
gb ABW99097.1 defensin [Capsicum chinense]	<u>29.5</u>	37	> sp Q43413.1 DEF1_CAPAN RecName: Full=Defensin J1-1; Flags: Precursor
sp Q43413.1 DEF1_CAPAN RecName: Full=Defensin J1-1; Flags: Pr...	<u>29.5</u>	37	gb AAW09502.1 AF488780.1 gamma thionin [Capsicum annuum]
emb CAA65045.1 defensin [Capsicum annuum]	<u>29.5</u>	37	emb CAA64853.1 gamma-thionin [Capsicum annuum]
gb ACM50808.1 defensin [Capsicum frutescens]	<u>26.9</u>	216	gb ACB30365.1 defensin [Capsicum annuum]
ref XP_001993900.1 GH18530 [Drosophila grimshawi] > gb EDV946...	<u>26.9</u>	216	Length=75
gb ACT74449.1 predicted protein [Malo kingi]	<u>25.2</u>	699	Score = 29.5 bits (62), Expect = 37
gb EEE21658.1 hypothetical protein TGGT1_069280 [Toxoplasma ...]	<u>25.2</u>	699	Identities = 8/8 (100%), Positives = 8/8 (100%), Gaps = 0/8 (0%)

B – LCLSARDC

Sequences producing significant alignments:

	Score (Bits)	E Value	
ref XP_001993900.1 GH18530 [Drosophila grimshawi] > gb EDV946...	<u>29.5</u>	37	> ref XP_001993900.1 G GH18530 [Drosophila grimshawi]
gb ABW99097.1 defensin [Capsicum chinense]	<u>26.9</u>	216	gb EDV94636.1 G GH18530 [Drosophila grimshawi]
sp Q43413.1 DEF1_CAPAN RecName: Full=Defensin J1-1; Flags: Pr...	<u>26.9</u>	216	Length=476
emb CAA65045.1 defensin [Capsicum annuum]	<u>26.9</u>	216	GENE ID: 6567580 Dgri GH18530 GH18530 gene product from transcript GH18530-RA
gb EEU37480.1 hypothetical protein NECHADRAFT_86344 [Nectria...]	<u>25.7</u>	521	[Drosophila grimshawi] [10 or fewer PubMed links]
ref ZP_05728890.1 tetraacyldisaccharide 4'-kinase [Pantoea s...]	<u>25.2</u>	699	Score = 29.5 bits (62), Expect = 37
ref ZP_03765108.1 DNA topoisomerase I ['Nostoc azollae' 0708...]	<u>25.2</u>	699	Identities = 8/8 (100%), Positives = 8/8 (100%), Gaps = 0/8 (0%)

Figura 11 – Resultados dos alinhamentos utilizando o programa BLAST, base de dados não redundante de proteínas, dos fragmentos LCLSSRDC (A) e LCLSARDC (B) da sequência da defensina J1-1 expressa por *Capsicum annuum*. À esquerda estão representadas as sete sequências mais bem pontuadas (maior score e menor e-value) e à direita os alinhamentos da sequência mais bem pontuada. Para A, foi representado o alinhamento da própria defensinas J1-1 que recebeu a mesma pontuação e apresenta o mesmo alinhamento da defensina apresentada na primeira posição.

A – LCLSSRDC

Sequences producing significant alignments:

	Score (bits)	E Value	
> 40 Defensin J1-1 ORG_Capsicum annuum_Precursor	<u>22</u>	0.070	Length = 75
 106 Defensin Tk-AMP-D4 ORG_Triticum kiharae_Mature	<u>18</u>	0.77	Score = 21.9 bits (45), Expect = 0.070
 20 Putative defensin ORG_Zea mays_Mature	<u>17</u>	1.7	Identities = 8/8 (100%), Positives = 8/8 (100%)
 349 Defensin-like protein 289 ORG_Arabidopsis thaliana_Precursor	<u>15</u>	6.5	Query: 1 LCLSSRDC 8
 338 Putative defensin-like protein 277 ORG_Arabidopsis thaliana...	<u>15</u>	6.5	LCLSSRDC
 55 Defensin-like protein 1 : Gamma-l-purothionin ORG_Triticum a...	<u>15</u>	6.5	Sbjct: 40 LCLSSRDC 47
 29 Putative defensin-like protein 9 : Putative low-molecular-we...	<u>15</u>	6.5	

B – LCLSARDC

Sequences producing significant alignments:

	Score (bits)	E Value	
> 40 Defensin J1-1 ORG_Capsicum annuum_Precursor	<u>21</u>	0.15	Length = 75
 106 Defensin Tk-AMP-D4 ORG_Triticum kiharae_Mature	<u>18</u>	1.3	Score = 20.8 bits (42), Expect = 0.15
 20 Putative defensin ORG_Zea mays_Mature	<u>16</u>	3.8	Identities = 7/8 (87%), Positives = 8/8 (100%)
 29 Putative defensin-like protein 9 : Putative low-molecular-we...	<u>15</u>	6.5	Query: 1 LCLSARDC 8
 423 LCR75 ORG_Arabidopsis thaliana_Precursor	<u>15</u>	8.5	LCLSARDC
 349 Defensin-like protein 289 ORG_Arabidopsis thaliana_Precursor	<u>15</u>	8.5	Sbjct: 40 LCLSSRDC 47
 206 Putative defensin-like protein 137 : Putative low-molecular...	<u>15</u>	8.5	

Figura 12 – Resultados dos alinhamentos utilizando o programa BLAST, base de dados 'Plant defensin' (DefDB), dos fragmentos LCLSSRDC (A) e LCLSARDC (B) da sequência da defensina J1-1 expressa por *Capsicum annuum*. À esquerda estão representadas as sete sequências mais bem pontuadas (maior score e menor e-value) e à direita os alinhamentos da sequência mais bem pontuada.

Pela **Figura 11A** observa-se que a identificação da defensina foi bem sucedida quando o fragmento íntegro é analisado. Porém quando o fragmento variante é analisado (**Figura 11B**), a confiabilidade de análise é altamente afetada. O alinhamento perfeito entre o fragmento íntegro e as sequências mais bem pontuadas gerou um valor de *e-value* alto devido ao alinhamento ser realizado entre sequências curtas. No caso da análise realizada com o

fragmento variante, a melhor pontuação é dada a uma sequência que não tem qualquer relação com defensinas. Defensinas são apresentadas somente na segunda, terceira e quarta posição, com pontuações menos relevantes, o que causaria grande incerteza no caso de uma análise buscando a identificação do fragmento. Por outro lado, ao se utilizar uma base de dados restrita para fazer os alinhamentos, como exemplificado na **Figura 12A** para o fragmento íntegro e na **Figura 12B** para o fragmento variante, as pontuações são otimizadas (menores valores de *e-value* para sequências correspondentes, maior diferença entre valores de scores e de *e-values* das sequências), proporcionando um maior grau de confiabilidade para a seleção dos melhores alinhamentos via pontuação. Sequências com alinhamentos e pontuações relativas não satisfatórias também são excluídas com maior confiabilidade. Além disso, as sequências diferentes do objetivo, que poderiam dificultar a análise do resultado por meio de alinhamentos randômicos, como na **Figura 11B**, não estarão presentes.

Como observado nas **Figuras 11 e 12**, a utilização de uma base de dados mais restrita como as descritas no DefDB, além de fornecer valores mais ponderados de *e-value*, também promove uma maior certeza na identificação dos fragmentos obtidos de novas defensinas putativas (divergentes em pelo menos um dos resíduos aminoacídicos) pela ausência de sequências que podem atuar como interferentes. Utilizando-se programas de análises comparativas de espectros de massa, tal influência é ainda maior, visto que esses programas transformam as sequências primárias, armazenadas na base de dados em espectros de massa (valores de massa/carga), que serão comparados com os espectros reais, obtidos na análise. A comparação de espectros está sujeita a um maior número de interferentes estatísticos, relacionados à qualidade do espectro real obtido e aos parâmetros de ajuste da análise *in silico* (tolerância de massa, modificações permanentes ou variáveis, outros).

Ainda, bases de dados apuradas e específicas, como as bases de dados do DefDB, podem ser de grande ajuda para estudos preliminares, para direcionamento de trabalhos específicos no assunto e até mesmo para a obtenção de instrumentos iniciais para a realização de novos experimentos. Em outro trabalho em andamento no Laboratório de Proteômica e Bioquímica de Proteínas do DBB/UFV, sequências consenso foram construídas utilizando as

bases de dados do DefDB por meio da teoria dos Modelos Ocultos de Markov. A partir da tradução reversa *in silico* dessas sequências, e das sequências das defensas mais similares às consensos, foram construídos oligonucleotídeos para identificar possíveis genes relacionados à expressão de defensas putativas. Os oligonucleotídeos construídos estão sendo atualmente testados.

A partir da base de dados 'Defensin' do DefDB, grupos contendo defensas semelhantes estruturalmente foram separados com eficácia satisfatória utilizando dados providos apenas pela sequência primária das defensas. Esse agrupamento foi feito a partir do alinhamento da base de dados contra ela mesma, e por uma ferramenta computacional implementada para comparar os resultados e agrupar as sequências mais bem alinhadas, considerando um e-value menor ou igual a e^{-3} para cada alinhamento. Dessa forma foram conseguidos nove grupos. Desses, dois são constituídos somente por defensas de plantas (36, 106 defensas em cada grupo), cinco são constituídos somente por defensas de mamíferos (13, 18, 19, 49, 101 defensas em cada grupo), um grupo é constituído prevalentemente por defensas de artrópodes (173 defensas, 167 de artrópodes, 3 de fungos e 2 de cefalocordado (anfioxo)), e um grupo é constituído, com menor prevalência, também por defensas de artrópodes, mas apresentando número considerável de defensas expressas por moluscos (74 defensas, 43 de artrópodes, 29 de moluscos, 2 de fungos). A existência de grupos heterólogos pode ser justificada por convergência evolutiva ou por ancestralidade comum, visto que as sequências primárias das defensas pertencentes a esses grupos ainda se apresentam similares, mesmo sendo expressas por organismos evolutivamente distantes. Charles e colaboradores realizaram análises filogenéticas demonstrando que defensas de moluscos e artrópodes compartilham de um ancestral comum, o que justificaria a heterogeneidade do último grupo (Charles *et al.*, 1996). Logo, a partir de uma base de dados específica e agrupamentos racionais, estudos filogenéticos podem ser traçados e efetuados para verificar a proximidade evolutiva e a relevância de cada grupo.

Dessa forma, o banco de dados DefDB vem sendo testado com sucesso no LPBP/UFV, representando uma ferramenta útil para a identificação e para a delimitação e direcionamento de estudos iniciais sobre defensas, incluindo-se aquelas que futuramente serão obtidas por esse e por outros grupos de pesquisa.

8. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Grande avanço foi conseguido para facilitar a análise e identificação das sequências de defensinas obtidas por meio dos métodos de sequenciamento, a partir da idealização e da construção de um banco de dados específico para defensinas, destacando-se defensinas vegetais. O banco de dados DefDB já se encontra hospedado em domínio na rede mundial de computadores no endereço www.defdb.ufv.br, contendo duas bases de dados concisas relacionadas às defensinas, preparadas para serem utilizadas junto a ferramentas computacionais para a identificação de novas defensinas. Sua página na rede mundial de computadores permite ao usuário consultar os dados e obter as sequências de interesse no formato fasta. Além disso, o usuário pode utilizar a ferramenta BLAST para realizar alinhamento de uma sequência de interesse, contra a base de dados contendo todas as defensinas disponíveis, ou somente as defensinas de plantas, utilizando o serviço encontrado na própria página do DefDB.

Algumas perspectivas são ainda passíveis de consideração:

1. Novos programas encarregados da recuperação de dados e formação de novas bases de dados podem ser criados. A partir desses programas pretende-se a ampliação da base de dados do DefDB para abranger outros grupos de peptídeos antimicrobianos, com ênfase aos peptídeos vegetais.
2. Tanto os programas a serem criados como os já existentes poderão ser melhorados para obter dados de outras fontes diferentes das convencionais como, por exemplo, banco de dados relacionados à via de sinalização, referências bibliográficas, dados sobre as plantas capazes de expressar os peptídeos, entre outras.
3. Novas ferramentas de análise poderão ser incorporadas ao DefDB, como por exemplo, outras ferramentas para alinhamento múltiplo (FASTA e Clustal W), ferramentas para análises estatísticas e para visualização de estruturas secundárias e terciárias, além da incorporação das plataformas de análise de dados espectrométricos (Trans-Proteomic Pipeline - TPP e LabKey).

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aerts, A.M., Carmona-Gutierrez, D., Lefevre, S., Govaert, G., François, I.E.J.A., Madeo, F., Santos, R., Cammue, B.P.A., Thevissen, K. (2009) The antifungal plant defensin RsAFP2 from radish induces apoptosis in a metacaspase independent way in *Candida albicans*. *FEBS Letters*, 583, 2513-2516.
- Alan, A.R., Blowers, A. and Earle, E.D. (2004) Expression of a magainin-type antimicrobial peptide gene (MSI-99) in tomato enhances resistance to bacterial speck disease. *Plant Cell Reports* 22, 388-396.
- Almeida, H.O., Teixeira, F.R., Romeiro, R.S., Silva, D.J.H., Pereira, P.R.G., Fontes, E.P.B., Baracat-Pereira, M.C. (2008) Atividade antimicrobiana de extratos peptídicos de folhas de berinjela na inibição do crescimento de *Ralstonia solanacearum* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Summa Phytopathologica*, 34, 1, 62-64.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215, 403-410.
- Barbosa, M.O. (2008) Prospecção de peptídeos antimicrobianos de soja (*Glycine max*) utilizando ferramentas proteômicas. *Tese, Universidade Federal de Viçosa*.
- Berrocal Lobo, M., Segura, A., Moreno, M., Lopez, G., Garcia Olmedo, F. and Molina, A. (2002) Snakin-2, an antimicrobial peptide from potato whose gene is locally induced by wounding and responds to pathogen infection. *Plant Physiology* 128, 951-961.
- Bowdish, D.M.E., Davidson, D.J., Hancock, R.E.W. (2006) Immunomodulatory properties of defensins and cathelicidins. *Current Topics in Microbiology Immunology*, 306, 27-66.
- Brahmachary, M., Krishnan, S.P.T., Koh, J.L.Y., Khan, A.M., Seah, S.H., Tan, T.W., Brusica, V., Bajic, V.B. (2004) ANTIMIC: a database of antimicrobial sequences. *Nucleic Acids Research* 32, D586-D589.
- Broekaert, W.F., Terras, F.R.G., Cammue, B.P. A and Osborn, R.W. (1997) Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant Physiology*, 108, 1353-1358.
- Bruix, M., Gonzalez, C., Santoro, J., Soriano, F., Rocher, A., Mendez, E. (1995) ¹H-NMR studies on the structure of a new thionin from barley endosperm. *Biopolymers*, 36, 751-63.
- Bulet, P., Hetru, C., Dimarcq, J.-L., Hofmann, D. (1999) Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Developmental & Comparative Immunology*, 23, 329-44.
- Carvalho, A. O., Gomes, V. M. (2009) Plant defensin – Prospects for the biological function and biotechnological properties. *Peptides*, 30, 1007-1020.

- Charlet, M., Chernysh, S., Philippe, H., Hetru, C., Hoffmann, J.A., Bulet, P. (1996) Isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusc, *Mytilus edulis*. *Journal of Biological Chemistry*. 271(36), 21808–21813.
- Davis, M.J., Gillaspie Jr., A.G., Vidaver, A.K., Harris, R.W. (1984) *Clavibacter*: A new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp. Nov., subsp., nov. and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* subsp. Nov., pathogens that cause ratoo stunting disease of sugarcane and bermudagrass stunting disease. *Journal of Systematic Bacteriology*, 34, 107-117.
- Dawson, R.M.C., Elliott, D.C., Elliott W., H., e Jones K., M. (1986) Data for Biochemical Research. *Oxford Science Publications*, (3ed.), 1-31.
- Do, M.H., Lee, S.C., Jung, H.W., Sohn, K.H., Hwang, B.K. (2004) Differential expression and in situ localization of a pepper defensin (*CADEF1*) gene in response to pathogen infection, abiotic elicitors and environmental stresses in *Capsicum annum*. *Plant Science*, 166, 5, 1297-1305.
- Durbin, R., Eddy, S., Krogh, A., Mitchison, G. (1998) Biological Sequence Analysis: Probabilistic Models of Proteins and Nucleic Acids. *Cambridge University Press*, Cambridge, UK.
- Edgar, R.C. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32, 1792–1797.
- Elmasri, R., Navathe, S.B. (2005) Sistemas de Banco de Dados. *Person*, 4^a ed. São Paulo.
- Fiori, A.C.G., Schwan-Estrada, K.R.F., Stangarlin, J.R., Vida, J.B., Scapim, C.A., Cruz, M.E.S., Pascholati, S.F. (2000) Antifungal activity of leaf extracts and essential oils of some medicinal plants against *Didymella bryoniae*, *Journal of Phytopathology*, 148, 483-487.
- Frewen, B.E., Merrihew, G.E., Wu, C.C., Noble, W.S., MacCoss, M.J. (2006) Analysis of peptide MS/MS spectra from large-scale proteomics experiments using spectrum libraries. *Anal Chemistry*, Aug. 15, 78(16), 5678-5684.
- Ganz, T. (2002) Immunology: Versatile defensins. *Science*, v.298, n.5595, Nov 1, 977-979.
- Ganz T. (2004) Defensins: antimicrobial peptides of vertebrates. *CR Biology*, 327, 539–549.
- Ganz, T., Lehrer, R.I. (1999) Antibiotic peptides from higher eukariotes: biology and applications. *Molecular Medicine Today*, 5, 292-297.
- Gao, A.G., Hakimi, S. M., Mittanck, C.A., Wu, Y., Woerner, B.M., Stark, D.M., Shah, D.M., Liang, J., Rommens, C.M.T. (2000) Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide. *Nature Biotechnology*, 18, 1307-1310.

- Garcia-Omedo, F., Molina, A., Alamillo, J.M., Rodríguez-Palenzuela, P. (1998) Plant defense peptide. *Biopolymers*, 47, 479-491.
- Garcia-Omedo, 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 peroxynitrite in plant defence. *FEBS Letters*, 498, 219-222.
- Gartemann, K.H., Kirchner, O., Engemann, J., Grafen, I., Eichenlaub, R., Burger, A. (2003) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: first steps in the understanding of virulence of Gram-positive phytopathogenic bacterium. *Journal of Biotechnology*, 106, 179-191.
- Hammami, R., Hamida, J.B., Vergoten, G., Fliss, I. (2008) PhytAMP: a database dedicated to antimicrobial plant peptides. *Nucleic Acids Research*, 37, D963-D968.
- Hancock, R.E.W., Lehrer, R.I. (1998) Cationic peptide: a new source of antibiotics. *Trends in Biotechnology*, 16, 82-88.
- Hancock, R.E.W. (2001) Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Infectious Diseases*, 1, 156-165.
- Hayward, A.C. (1991) Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology*, 29, 65-87.
- Jahr, H., Bahro, R., Burger, A., Ahlemeyer, J. and Eichenlaub, R. (1999) Interaction between *Clavibacter michiganensis* and its host plants. *Environmental Microbiology*, 1(2), 113-118.
- Jha, S., Chattoo, B.B. (2009) Expression of a plant defensin in rice confers resistance to fungal phytopathogens. *Transgenic Research*, 009, 9315-9317.
- Judd, R.C. (1994) Electroforesis of peptides. (In: Walker J.M. (ed), *Methods in Molecular Biology, Basic Protein and Peptide Protocols*, 32, 49-57.
- Knight, S.C., Anthony, V.M., Brady, A. M., Greenland, J., Heaney, S.P., Murray, D.C., Powell, K.^a, Schulz, M.A., Worthington, P.A., Youle, D. (1997) Rationale and perspectives on the development of fungicides, *Annual Review of Phytopathology*, 35, 349-372.
- Lay, F.T., Anderson, M.A. (2005) Defensins – Components of the Innate Immune System in Plants. *Current Protein and Peptide Science*, 6, 85-101.
- Lichtenstein, A. (1991) Mechanism of mammalian cell lysis mediated by peptide defensins. Evidence for an initial alteration of the plasma membrane. *Journal of Clinical Investigation*, 88, 1, Jul, 93-100.
- Lindorff-Larsen, L., Winther, J.R. (2001) Surprisingly high stability of barley lipid transfer protein, LTP1, towards denaturant, heat and proteases. *FEBS Letters*, 488, 145-148

- Magalhães, R.D.M. (2007) Desenvolvimento de um banco de dados relacional sobre defensinas: DefDB. *Monografia, Universidade Federal de Viçosa*.
- Montesinos, E. (2007), Antimicrobial peptides and plant disease control, minireview, plant biology. *FEMS Microbiology Letters*, 270, 1, 1-11.
- Morassutti, C., De Amicis, F., Skerlavaj, B., Zanetti, M., Marchetti, S. (2002) Production of a recombinant antimicrobial peptide in transgenic plants using a modified VMA intein expression system. *FEBS Letters* 519, 141-146.
- Mourgues, F., Brisset, M.-N., Chevreau, E. (1998) Strategies to improve plant resistance to bacterial diseases through genetic engineering. *Trends Biotechnology*, 16, 203-210.
- Mygind, P.H., Fischer, R.L., Schnorr, K.M., Hansen, M.T., Sönksen, C.P., Ludvigsen, S. (2005) Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus. *Nature*, 437, 975–80.
- Ngai, P. H. K., Ng, T. B. (2004) A napin-like polypeptide from dwarf Chinese white cabbage seeds with translation-inhibitory, trypsin-inhibitory, and antibacterial activities. *Peptides*, 25, 171-176.
- Niidome, T., Anzai, S. (1999) Effect of amino acid substitution in amphiphilic α -helical peptides on peptide-phospholipid membrane interaction. *Journal of Peptide*, 5, 298-305.
- Notredame, C., Higgins, D.G., Heringa, J. (2000) T-Coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *Journal of Molecular Biology*, 302, 205–217.
- Oard, S., Rush, M.C., Oard, J.H. (2004) Characterization of antimicrobial peptides against a US strain of the rice pathogen *Rhizoctonia solani*, *Journal of Applied Microbiology*, 97, 169-179.
- Osusky, M., Zhou, G., Osuska, L., Hancock, R.E., Kay, W.W., Misra, S. (2000) Transgenic plants expressing cationic peptide chimeras exhibit broad-spectrum resistance to phytopathogens. *Nature*, 18, 1162-1166.
- Pearson, W.R., Lipman, D.J. (1988) Improved tools for biological sequence comparison. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85, 2444–2448.
- Pelegrini, P.B., Franco, O.L. (2005) Plant g-thionins: novel sites on the mechanisms of actions of a multi-functional class of defense proteins. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37, 2239–2253.
- Powell, W.A., Catranis, C.M., Maynard, C.A. (2000) Design self-processing antimicrobial peptides for plant protection, *Letters in Microbiology*, 31, 163-168.

- Rahman, M.A., Abdullah, H., Vanhaecke, M. (1999) Histopathology of susceptible and resistant *Capsicum annum* cultivars infected with *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Phytopatology*, 147, 129-140.
- Rao, A.G. (1995) Antimicrobial peptides. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 8, 6-13.
- Seebah, S., Suresh, A., Zhuo, S., Choong, Y.H., Chua, H., Chuon, D., Beuerman, R., Verma, C. (2007) Defensins knowledgebase: a manually curated database and information source focused on the defensins family of antimicrobial peptides. *Nucleic Acids Research*, 35, D265–D268.
- Shibata, Y., Matsui, K., Kajiwara, T., Hatanaka, A. (1995) Purification and properties of fatty acid hydroperoxide lyase from green bell pepper fruits. *Plant and Cell Physiology*, 36, 147-156.
- Silverstein, K.A.T., Graham, M.A., Paape, TD, VandenBosch, K.A. (2005) Genome organization of more than 300 defensin-like genes in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 138, 600–610.
- Silverstein, K.A.T. (2007) Small cysteine-rich peptides resembling antimicrobial peptides have been under-predicted in plants, *The Plant Journal*, 51,262-280.
- Simmons, E. G. (2007) *Alternaria: An identification Manual*. BBS Biodiversity Series, n. 6, Utrecht, Netherlands.
- Stackebrandt, E., Rainey, F.A., Wardrainey, N.L. (1997) Proposal for a new hierarchic classification system. *International Journal Systematic Bacteriology*, 47, 479-491.
- Strider, D.L. (1969) Bacterial canker of tomato caused by *Corynebacterium michiganensis*: a literature review and bibliography. *North Carolina Agricultural Experiment Station Technical Bulletin*, n. 193.
- Sugiarto, H., Yu, P.-L. (2004) Avian antimicrobial peptides: the defense role of bdefensins. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 323, 721–727.
- Syed, A.R., Loke, W.H. (1995) Development and challenges in pest management of vegetables. *Malasia Plant Protetion Society*, 43-56.
- Teixeira, F. R., Lima, M. C. O. P., Almeida, H. O., Romeiro, R. S., Silva, D. J. H., Pereira, P. R. G., Fontes, E. P. B., Baracat-Pereira, M. C. (2006) Bioprospection of Cationic and Anionic Antimicrobial Peptides from Bell Pepper Leaves for Inhibition of *Ralstonia solanacearum* and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* Growth. *Journal of Phytopathology*, 154, 418-421.
- The UniProt (2009) The Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Research*, 37, D169-D174.

- Thevissen, K., Warnecke, D.C., Francois, I.E.J.A., Takemoto, J.Y., Ferket, K.K.A., Meert, E.M.K., Cammue, B.P.A. (2004) Defensins from insects and plants interact with fungal glucosylceramides. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 3900–3905.
- Thevissen, K., Ghazi, A., De Samblanx, G.W., Brownlee, C., Osborn, R.W., Broekaert, W.F. (1996) Fungal membrane responses induced by plant defensins and thionins., *Journal of Biological Chemistry*, 271, 12018-12025.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22, 4673–4680.
- Töfoli, J.G. (2004) Pinta preta - uma ameaça constante aos cultivos da batata e do tomate. *Cultivar*, fev/mar.
- Van Loon, L.C., Rep, M., Pieterse, C.M.J. (1999) The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiology and Molecular Plant Pathology*, 55: 85-97.
- von Djik, A., Veldhuizen, E.J.A., Haagsman, H.P. (2008) Avian defensins. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 124, 1–18.
- Wang, Z, Wang, G. (2004) APD: the Antimicrobial Peptide Database. *Nucleic Acids Research*, 32, D590-D592.
- West, N.P., Pyne, D.B. Renshaw, G., Cripps, A.W. (2006) Antimicrobial peptides and proteins, exercise and innate mucosal immunity, *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 48, 3, 293 -304.
- Zasloff, M. (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415, 389-395.
- Zhu, S. (2007) Evidence for myxobacterial origin of eukaryotic defensins, *Immunogenetics*, 59, 949-954.