



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

**CAMILA CRASTO LUTIF**

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES  
CITOTÓXICA E ALERGÊNICA DE UMA PROTEÍNA TRANSFERIDORA DE  
LIPÍDEOS ISOLADA DE SEMENTES DE *Morinda citrifolia* L. (RUBIACEAE)**

**FORTALEZA - CE**

**2015**

**CAMILA CRASTO LUTIF**

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES  
CITOTÓXICA E ALERGÊNICA DE UMA PROTEÍNA TRANSFERIDORA DE  
LIPÍDEOS ISOLADA DE SEMENTES DE *Morinda citrifolia* L. (RUBIACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira

**FORTALEZA - CE**

**2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

- 
- L991c Lutif, Camila Crasto.  
Caracterização bioquímica e avaliação das atividades citotóxica e alergênica de uma proteína transferidora de lipídeos isolada de sementes de *Morinda citrifolia* L. (Rubiaceae) / Camila Crasto Lutif. – 2015.  
120 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2015.  
Área de Concentração: Bioquímica Vegetal.  
Orientação: Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira.
1. Morinda. 2. Proteínas de transporte. 3. Bioquímica vegetal. I. Título.

---

CDD 574.192

CAMILA CRASTO LUTIF

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES  
CITOTÓXICA E ALERGÊNICA DE UMA PROTEÍNA TRANSFERIDORA DE  
LIPÍDEOS ISOLADA DE SEMENTES DE *Morinda citrifolia* L. (RUBIACEAE)**

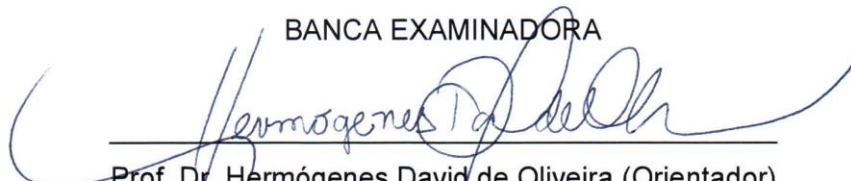
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

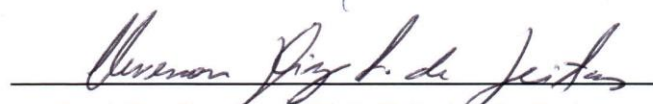
Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

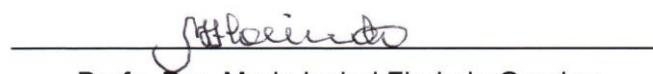
Orientador: Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira

Aprovada em: 06/07/2015.

BANCA EXAMINADORA

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Cleverton Diniz Teixeira de Freitas  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Maria Izabel Florindo Guedes  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Aos meus pais, Filomeno e Ruth e ao meu irmão Flávio, com todo o meu amor e carinho.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar e me acompanhar todos os dias da minha vida.

Aos meus pais, **Filomeno e Ruth**, pelo apoio, incentivo, motivação, conversas, carinhos e o amor incondicional ao longo da minha vida. Eu certamente não seria nada do que sou sem os meus pais e todo meu agradecimento ainda seria pouco, diante de tudo que os dois já fizeram por mim. Amores da minha vida, meu porto seguro.

Ao meu irmão querido, **Flávio**, que mesmo morando distante se fez e se faz presente na minha vida todos os dias. Agradeço todos os dias por ter um irmão com uma alma tão generosa, alguém capaz de fazer o bem, de apoiar, de ser um grande incentivador e arrancar sorrisos mesmo longe. Amo incondicionalmente.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira**, que soube conduzir de forma competente todo esse trabalho, mas além disso, soube orientar de verdade, com suas palavras, ensinamentos e motivações. Obrigada por toda sua atenção, carinho e ajuda, pois hoje sei que fui uma abençoada por ter sido sua orientanda.

Aos professores participantes da minha banca examinadora, **Prof. Dr. Cleverton Diniz Teixeira de Freitas e Profa. Dra. Maria Izabel Florindo Guedes** pelo tempo, pelas críticas e sugestões.

A todos que fizeram e fazem parte do BioAP (Laboratório de Aplicação Biotecnológica de Algas e Plantas) e que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho: **Dyély, Andréa, Amanda, Adrienne, Chris, Emanuel, Luis Otávio**. Meu obrigada especial para as queridas **Débora e Ana Luíza** que me acompanharam em diferentes momentos. Assim como agradeço especialmente, **Vilmara, Ana Márjory e Adson**, pela amizade, ajuda, apoio, incentivo, conversas e a alegria que me contagiava quando os encontrava.

À **Profa. Dra. Marjory Lima Holanda**, por toda sua contribuição no BioAP e toda sua equipe, **Roberta, Acrísio, Ludmilla, Áurea, Augusto**, e um agradecimento especial ao **George**, que soube ser um verdadeiro amigo em todas as horas que precisei.

À **Profa. Dra. Ilka Maria Vasconcelos**, por todo apoio que tive através do Laboratório de Toxinas Vegetais e de seus alunos, em especial à Helen Paula, por ter me ajudado pacientemente tantas vezes.

Ao **Prof. Dr. José Tadeu Oliveira** e seus alunos do Laboratório de Proteínas Vegetais de Defesa, em especial ao **Fredy e Thiago**, pela ajuda e apoio nos experimentos.

Ao **Prof. Dr. Márcio Viana Ramos** e seus alunos do Laboratório de Plantas Laticíferas, em especial à **Maria Zelândia**, pela parceria nos experimentos e amizade.

A todos os funcionários que fazem parte do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC.

Ao veterinário **Neto**, do Biotério - UFC, por toda ajuda ao longo dos meus experimentos e toda torcida.

À **Profa. Dra. Letícia Veras Costa Lotufo e Dr. José Delano Barreto Marinho Filho**, do Laboratório de Oncologia Experimental – UFC, pelas análises de citotoxicidade realizadas.

À **Profa. Dra. Leila Maria Beltramini, Dr. José Luiz de Souza Lopes** e demais membros do Laboratório de Biofísica – USP, pelas análises espectroscópicas realizadas.

À **Dra. Luciana Magalhães Rebêlo Alencar**, do Departamento de Física – UFC, pelas análises por microscopia de força atômica.

À **Dra. Maria Izabel Florindo Guedes** e todos que fazem parte do Laboratório de Bioquímica Humana – UECE, pelos experimentos de alergenidade realizados e por ter sido tão bem tratada por todos.

Ao amigo **Delvane Rodrigues**, por ter me ajudado em todos os momentos que precisei para a finalização deste trabalho e pela grande paciência que teve comigo.

À minha querida amiga **Glicia Maia**, por tudo que já fez e faz por mim, por estar e se fazer presente em todos os momentos da minha vida. Você é realmente o que podemos chamar de amiga, minha irmã de coração, obrigada por tudo, sempre.

À minha querida amiga **Ana Clece Soares**, que desde sempre torce por mim, por sua amizade linda e sincera. Nunca esquecerei que você esteve comigo em diferentes momentos.

A todos os familiares e amigos que torceram e torcem por mim.



## **AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS**

Os trabalhos experimentais que compõem esta dissertação foram realizados com o apoio dos seguintes Programas/Instituições:

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ** - através das atividades de capacitação no ensino e pesquisa em Bioquímica realizadas em parceria com o **Laboratório de Aplicação Biotecnológica de Algas e Plantas**, sob a coordenação do Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira e da Profa. Dra. Marjory Lima Holanda.

**COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR (CAPES)** – através de concessão de bolsa de mestrado e de fomento à pesquisa.

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO (SÃO CARLOS – SP)** – através de parceria experimental com o Laboratório de Biofísica, do Instituto de Física de São Carlos, sob coordenação e orientação da Profa. Dra. Leila Maria Beltramini.

**CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO (CNPq)** e **FUNDAÇÃO CEARENSE DE APOIO AO DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO (FUNCAP)** – pela contribuição para a melhoria nas condições experimentais e formação de recursos humanos dentro do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da UFC.

## RESUMO

*Morinda citrifolia* L. é uma espécie nativa do Sudeste da Ásia intensamente investigada em função de suas propriedades terapêuticas reportadas há mais de 2.000 anos. Recentemente, uma proteína transferidora de lipídeos denominada *McLTP<sub>1</sub>* (*UniProt Accession Number*: C0HJH5) foi isolada de sementes de noni pelo nosso grupo de pesquisa. *McLTP<sub>1</sub>* é uma proteína termoestável de massa molecular 9,4 kDa, resistente à proteólise e dotada de atividades moduladoras da inflamação e da dor pela via oral, promissoras e inéditas para esse grupo de moléculas. Este trabalho objetivou caracterizar bioquimicamente *McLTP<sub>1</sub>*, bem como avaliar o seu potencial alergênico em camundongos, como etapas básicas para o seu uso racional e seguro do ponto de vista farmacológico. Em adição, as propriedades terapêuticas de *McLTP<sub>1</sub>* foram também ampliadas, através da investigação de seu efeito citotóxico em diferentes linhagens de células tumorais. A proteína em estudo foi isolada utilizando o protocolo já estabelecido, envolvendo as etapas de precipitação seletiva de proteínas do extrato total das sementes de noni com ácido tricloroacético 2,5% e cromatografia de exclusão molecular. O ensaio de alergenicidade *in vivo* foi conduzido após prévia aprovação pelo Comitê de Ética para Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará e utilizou fêmeas nulíparas com massa corporal entre 25 e 30 g. *McLTP<sub>1</sub>* apresentou *in vitro* atividades inibitórias de tripsina ( $767,10 \pm 8,36$  UIT/mgP), quimotripsina ( $25,36 \pm 0,86$  UI/mgP), papaína ( $65,419 \pm 0,152$  UI/mgP) e alfa-amilase (24,40%). A atividade inibitória de tripsina de *McLTP<sub>1</sub>* foi reduzida significativamente em temperaturas superiores a 37 °C, apresentando atividade residual de apenas 5,91% quando aquecida a 100 °C por 30 min. Essa atividade foi também influenciada pelo pH, sendo de apenas 30,13% e 39,05% quando a proteína foi incubada em tampões de pH 3,0 e 12,0. O padrão de oligomerização de *McLTP<sub>1</sub>* demonstrou a formação de agregados diméricos/tetraméricos delimitando um canal central de diâmetro de 4,4 nm. As análises espectroscópicas mostraram que *McLTP<sub>1</sub>* apresenta espectro de CD similar àquele apresentado por outras proteínas transferidoras de lipídeos e característico de proteínas ricas em alfa-hélice. Espectro de CD de *McLTP<sub>1</sub>* não mostrou alterações significativas em diferentes temperaturas e pHs, corroborando com os dados de estabilidade obtidos anteriormente. Diferentemente, em condições

reduzidas (DTT 1 mM) o espectro de CD mostrou alteração na estrutura secundária da proteína e os mínimos e máximos de elipticidade molar foram também alterados na presença de micelas iônicas de SDS (10 mM). *McLTP<sub>1</sub>* apresentou atividade citotóxica seletiva contra células de câncer de ovário (Ovcar-8;  $CI_{50}$ : 16,6  $\mu$ g/mL), não sendo citotóxica para as células tumorais de cólon humano (HCT-116), leucemia humano (HL-60) e glioblastoma humano (SF-295) testadas. *McLTP<sub>1</sub>* foi capaz de promover hemólise significativa em hemácias de coelho a partir da concentração de 0,005 mgP/mL. *McLTP<sub>1</sub>* apresentou potencial efeito alergênico *in silico* e em camundongos imunizados pela via oral, induzindo a síntese de anticorpos IgG e IgG1. Tal como descrito na literatura para outras LTPs, anticorpos anti-*McLTP<sub>1</sub>* produzidos em coelho foram também capazes de reconhecer proteínas presentes em extratos de Rosaceae, Cucurbitaceae e na polpa do fruto de noni. Os dados obtidos permitiram caracterizar parcialmente a proteína em estudo, bem como avaliar o seu potencial imunogênico após administração oral. Novos testes serão conduzidos objetivando avaliar a importância clínica dessas respostas, uma vez que testes de toxicidade demonstraram que *McLTP<sub>1</sub>* não foi capaz de promover reações adversas em camundongos, mesmo após administração da dose de 8 mg/kg por 28 dias.

**Palavras-chave:** *Morinda citrifolia* L.. Proteínas transferidoras de lipídeos. *McLTP<sub>1</sub>*. Caracterização bioquímica. Citotoxicidade. Alergenicidade.

## ABSTRACT

This work reports the biochemical characterization, cytotoxic and allergenic effects of a lipid transfer protein isolated from *M. citrifolia* seeds ( $McLTP_1$ ), with trypsin and alpha-amylase inhibition properties.  $McLTP_1$  was purified with a procedure involving trichloroacetic acid precipitation and gel filtration chromatography. This protein showed significant inhibitory activities against trypsin ( $767,10 \pm 8,36$  TIU/mgP), chymotrypsin ( $25,36 \pm 0,86$  IU/mgP), papain ( $65,419 \pm 0,152$  IU/mgP) and alpha-amylase (24,40%). Atomic force microscopy displayed that  $McLTP_1$  oligomerized in tetramers showing a central channel. Fluorescence and CD assays revealed that the  $McLTP_1$  structure is highly stable, regardless of pH and temperature levels. *In vitro*,  $McLTP_1$  presented a selective cytotoxic effect to human ovarian cancer cells (OVCAR-8;  $IC_{50}$  of 16,6  $\mu$ g/mL) and demonstrated hemolytic effect against fresh rabbit red blood cells. Similarly to other non-specific lipid transfer protein reported,  $McLTP_1$  showed allergenic properties in mice, being considered as a true food allergen since it was able to sensitize the animals via the gastrointestinal tract.

**Keywords:** *Morinda citrifolia* L.. Lipid transfer protein.  $McLTP_1$ . Biochemical characterization. Cytotoxicity. Allergenicity.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b>	<i>Morinda citrifolia</i> L.: visão geral de seus frutos, flores e sementes. (A) Aspectos gerais da planta <i>Morinda citrifolia</i> L. (B) Flores. (C) Frutos. (D) Aspecto geral das sementes.	19
<b>Figura 2-</b>	Estrutura e sequência de LTP <sub>1</sub> de arroz.	34
<b>Figura 3-</b>	Modelos esquemáticos de ciclos de transferência de lipídeos para Sfh3 e Sfh1.	36
<b>Figura 4-</b>	Perfil eletroforético (SDS-PAGE 15%) de McLTP <sub>1</sub> em condições não redutoras. Foram aplicados 20 µg de McLTP <sub>1</sub> por poço. A banda proteica foi corada com Coomassie blue R-250. Raia 1: marcadores de massa molecular (kDa). Raia 2: McLTP <sub>1</sub> .	58
<b>Figura 5-</b>	Atividade inibitória de tripsina de McLTP <sub>1</sub> em diferentes pHs e temperaturas.	60
<b>Figura 6-</b>	Análise de McLTP <sub>1</sub> por microscopia de força atômica (AFM).	61
<b>Figura 7-</b>	Espectros de dicroísmo circular de McLTP <sub>1</sub> no ensaio de estabilidade térmica.	62
<b>Figura 8-</b>	Estudos da estabilidade térmica de McLTP <sub>1</sub> monitorados por dicroísmo circular.	64
<b>Figura 9-</b>	Espectros de dicroísmo circular de McLTP <sub>1</sub> antes e depois do ensaio de desnaturação térmica.	65
<b>Figura 10-</b>	Espectros de dicroísmo circular de McLTP <sub>1</sub> no ensaio de estabilidade frente a variações de pH.	66
<b>Figura 11-</b>	Estudos espectroscópicos de McLTP <sub>1</sub> em presença de agente redutor – DTT.	67
<b>Figura 12-</b>	Estudos espectroscópicos de McLTP <sub>1</sub> em presença de micelas iônicas de CTAB, SDS e HPS.	68
<b>Figura 13-</b>	Espectros de fluorescência de McLTP <sub>1</sub> .	69
<b>Figura 14-</b>	Avaliação do efeito hemolítico de McLTP <sub>1</sub> em hemácias de coelho.	71
<b>Figura 15-</b>	Análise por ELISA da síntese de anticorpos IgG em camundongos imunizados pela via oral com McLTP <sub>1</sub> .	75

<b>Figura 16-</b>	Análise por ELISA da síntese de anticorpos IgG1 em camundongos imunizados pela via oral com <i>McLTP</i> <sub>1</sub> .	76
<b>Figura 17-</b>	<i>Dot Blotting</i> usando os anticorpos policlonais produzidos no coelho contra <i>McLTP</i> <sub>1</sub> (1,5 mg/mL) nas diluições de 1:100, 1:500, 1:1000 (v/v), partindo-se de uma solução de 1 mg/mL.	77
<b>Figura 18-</b>	Determinação do título dos anticorpos anti- <i>McLTP</i> <sub>1</sub> produzidos em coelho, pelo método de ELISA indireto.	78
<b>Figura 19-</b>	Determinação de reações cruzadas em extratos proteicos de maçã, pêsego, melão e polpa do noni, pela técnica do <i>Dot Blotting</i> usando os anticorpos policlonais produzidos no coelho contra <i>McLTP</i> <sub>1</sub> , na diluição de 1:500 (v/v), partindo-se de uma solução de 1 mg/mL dos anticorpos produzidos.	79
<b>Figura 20-</b>	Determinação de reações cruzadas em extratos proteicos das cascas de maçã, pêsego, melão e polpa do noni pelo método do ELISA indireto, com anticorpos anti- <i>McLTP</i> <sub>1</sub> produzidos em coelho (1:10000 v/v).	80

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b>	Detecção e quantificação da atividade inibitória de tripsina, quimotripsina e papaína de <i>McLTP<sub>1</sub></i> .	59
<b>Tabela 2-</b>	Padrões de distribuição da estrutura secundária presentes em <i>McLTP<sub>1</sub></i> , determinados a partir do espectro de dicroísmo circular.	63
<b>Tabela 3-</b>	Atividade citotóxica de <i>McLTP<sub>1</sub></i> em células tumorais após 72h de incubação.	70
<b>Tabela 4-</b>	Sequência N-terminal de <i>McLTP<sub>1</sub></i> em comparação com outras proteínas transferidoras de lipídeos consideradas alérgenos, presentes em diferentes espécies de plantas.	73

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADFS	<i>Allergen Database for Food Safety</i>
AFM	Microscopia de Força Atômica
AMP	<i>Antimicrobial Peptides</i> (Peptídeos antimicrobianos)
BANA	<i>N</i> - $\alpha$ -benzoil-DL-arginina- <i>p</i> -naftilamida
BAPNA	<i>N</i> - $\alpha$ -benzoil-DL-arginina- <i>p</i> -nitroanilida
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	Albumina Sérica Bovina
CDD	<i>Conserved Domain Database</i>
CD	<i>Circular Dichroism</i>
CTAB	Brometo de Cetiltrimetilamônio
DMACA	4-dimetilaminocinamaldeído
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
HCT-116	Células Tumerais de Cólon Humano
HL-60	Células Tumerais de Leucemia Humana
HPS	N-hexadecil-N, N-dimetil-3-amônio-1-propanosulfonato
LTP	Proteína Transferidora de Lipídeos
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium
OPD	Ortofenilenodiamina
OVCAR-8	Células Tumerais de Ovário Humano
SDAP	<i>Structural Database of Allergenic Proteins</i>
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SF-295	Células Tumerais de Glioblastoma Humano
TNJ	<i>Tahitian Noni Juice</i>



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>1.1 <i>Morinda citrifolia</i> L.</b> .....	18
<b>1.1.1 Caracterização botânica e distribuição geográfica</b> .....	18
<b>1.1.2 Propriedades nutracêuticas e farmacológicas do noni</b> .....	21
<b>1.2 Proteínas de sementes: visão geral e aplicações</b> .....	29
<b>1.2.1 Proteínas Transferidoras de Lipídeos</b> .....	32
<b>2 HIPÓTESE</b> .....	40
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	41
<b>3.1 Objetivo Geral</b> .....	41
<b>3.2 Objetivos Específicos</b> .....	41
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	42
<b>Parte I – Caracterização bioquímica e análises estruturais da proteína transferidora de lipídeos isolada das sementes de <i>Morinda citrifolia</i> L. (<i>McLTP<sub>1</sub></i>)</b> .....	42
<b>4.1 Material Biológico</b> .....	42
<b>4.2 Reagentes</b> .....	42
<b>4.3 Purificação de <i>McLTP<sub>1</sub></i> a partir das sementes de Noni</b> .....	43
<b>4.4 Determinação da atividade inibitória de tripsina de <i>McLTP<sub>1</sub></i></b> .....	43
<b>4.4.1 Avaliação do efeito inibitório de tripsina de <i>McLTP<sub>1</sub></i> em diferentes pHs e temperaturas</b> .....	44
<b>4.5 Avaliação da atividade inibitória de quimotripsina de <i>McLTP<sub>1</sub></i></b> .....	45
<b>4.6 Avaliação da atividade inibitória de papaína (E.C. 3.4.22.2)</b> .....	45
<b>4.7 Avaliação da atividade inibitória de <math>\alpha</math>-amilase (E.C. 3.2.1.1)</b> .....	46
<b>4.8 Análise por microscopia de força atômica (AFM)</b> .....	46
<b>4.9 Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD) de <i>McLTP<sub>1</sub></i> nativa e em diferentes condições experimentais</b> .....	47
<b>4.10 Espectroscopia de Fluorescência de <i>McLTP<sub>1</sub></i></b> .....	48
<b>Parte II – Atividades Biológicas de <i>McLTP<sub>1</sub></i></b> .....	49
<b>4.11 Ensaio com animais</b> .....	49

4.12 Reagentes e soluções.....	49
4.13 Análise da Citotoxicidade em Diferentes Linhagens Tumorais .....	50
4.13.1 Atividade Hemolítica .....	51
4.14 Predição da alergenicidade <i>in silico</i> de <i>McLTP<sub>1</sub></i> .....	51
4.15 Avaliação da Alergenicidade <i>in vivo</i> de <i>McLTP<sub>1</sub></i> .....	52
4.16 Produção de anticorpos policlonais anti- <i>McLTP<sub>1</sub></i> .....	53
4.16.1 Determinação do Título dos Anticorpos Policlonais anti- <i>McLTP<sub>1</sub></i> .....	53
4.17 Determinação de Reações Cruzadas em Extratos Proteicos de Cascas de Maçã, Pêssego, Melão e Polpa do Noni.....	54
4.18 Análise Estatística.....	56
5 RESULTADOS.....	58
5.1 Caracterização Bioquímica e Análises estruturais da proteína transferidora de lipídeos isolada das sementes de <i>Morinda citrifolia</i> L. ( <i>McLTP<sub>1</sub></i> ) .....	58
5.1.1 Obtenção da proteína transferidora de lipídeos isolada das sementes de <i>Morinda citrifolia</i> L. ( <i>McLTP<sub>1</sub></i> ).....	58
5.1.2 Atividade inibitória de tripsina, quimotripsina, papaína e $\alpha$ -amilase de <i>McLTP<sub>1</sub></i> .....	59
5.1.3 Atividade inibitória de tripsina de <i>McLTP<sub>1</sub></i> em diferentes pHs e temperaturas.....	60
5.1.4 Análise por microscopia de força atômica (AFM) .....	61
5.1.5 Análises por espectroscopia de dicroísmo circular.....	62
5.1.6 Análise por espectroscopia de fluorescência .....	69
5.2 Atividades Biológicas de <i>McLTP<sub>1</sub></i> .....	70
5.2.1 Análise da Citotoxicidade em Diferentes Linhagens de Células Tumorais ...	70
5.2.2 Atividade hemolítica.....	71
5.2.3 Predição da alergenicidade <i>in silico</i> de <i>McLTP<sub>1</sub></i> .....	72
5.2.4 Avaliação da Resposta Humoral em Camundongos – Ensaio Imunoenzimático (ELISA) .....	75
5.2.5 Determinação do Título dos Anticorpos Policlonais anti- <i>McLTP<sub>1</sub></i> .....	77
5.2.6 Determinação de Reações Cruzadas em Extratos Proteicos de Maçã, Pêssego, Melão e Polpa do Noni .....	79
5.2.6.1 <i>Dot Blotting</i> .....	79
5.2.6.2 Ensaio Imunoenzimático (ELISA).....	80

<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>81</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>98</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>99</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 *Morinda citrifolia* L.

#### 1.1.1 Caracterização botânica e distribuição geográfica

Espécie originária do sudeste asiático, *Morinda citrifolia* L. (noni) vem sendo utilizada pelos habitantes da Polinésia há mais de 2000 anos (LEÓN; POVEDA, 2000). O noni é conhecido, dentre outros nomes vulgares, como *Ba Ji Tian*, *Nonu*, *Indian Mulberry*, *Canary Wood* e *Cheese fruit* e os cultivos comerciais dessa espécie podem ser encontrados no Taiti, Havaí e outros países da Polinésia, onde se fabricam a maioria dos sucos comercializados no mundo. Como não existem cultivares selecionados, a exploração comercial de noni é feita a partir de plantas originadas de sementes (TOMBOLATO *et al.*, 2005).

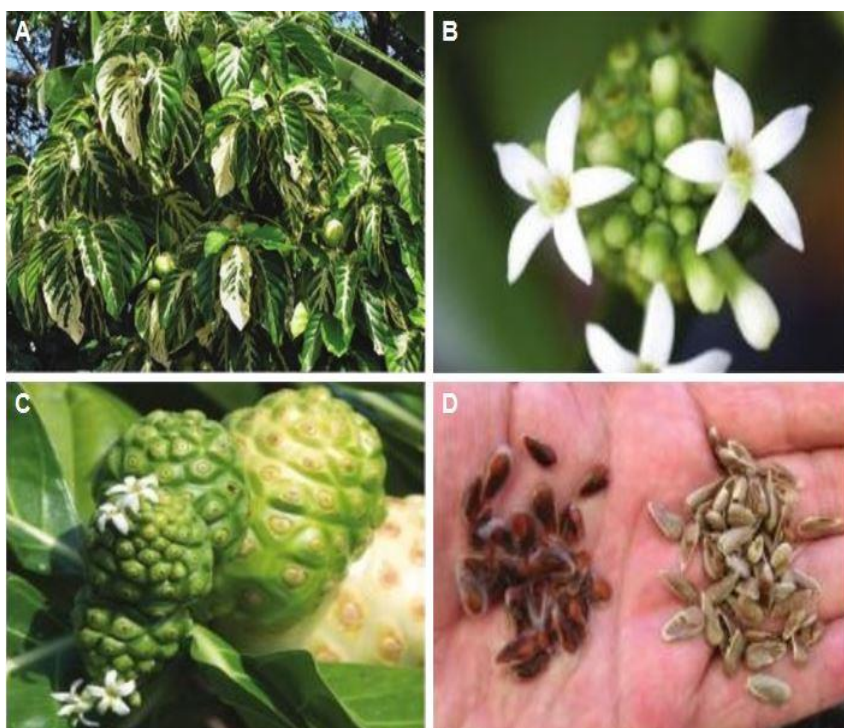
A denominação botânica do gênero é devida à união das palavras latinas *morus* (amora) e *indicus* (Índia), justificada pela semelhança com fruto de *Morus alba* L. O nome da espécie indica que a folhagem da planta é similar a alguns tipos de citros. Pertence à família Rubiaceae, mesma do cafeeiro, essa frutífera possui arquitetura de copa similar à do sistema radicular, sendo que a planta adulta atinge de 3 a 10 m de altura e permanece enfolhada o ano todo. Dependendo da origem do material ou do local de cultivo, as plantas podem não desenvolver uma copa típica e permanecem com aspecto arbustivo (TOMBOLATO *et al.*, 2005).

O período de florescência da planta compreende de novembro a fevereiro, sendo todas as suas partes (frutos, folhas, cascas, tronco e raízes) destinadas para fins terapêuticos (**Figura 1**). *Morinda citrifolia* L. é uma planta perene, sendo comum encontrar frutas em diferentes estágios de maturação na mesma planta.

No primeiro ano, a fruta apresenta tamanho pequeno, mas já pode ser colhida. No Hawaii o noni é colhido de duas a três vezes por ano. No entanto, durante o inverno, a produção é reduzida (CHAN-BLANCO *et al.*, 2006). É considerada uma espécie muito resistente e de boa longevidade. Quando é cultivada exposta ao sol e sem a presença de ventos frios, dificilmente é infectada por doenças ou atacada por insetos. Após ter iniciado a fase de produção de frutos, a

produção se torna constante, produzindo frutos o ano inteiro (CHAN-BLANCO *et al.*, 2006).

**Figura 1 - *Morinda citrifolia* L.: visão geral de seus frutos, flores e sementes.** (A) Aspectos gerais da planta *Morinda citrifolia* L. (B) Flores. (C) Frutos. (D) Aspecto geral das sementes.



Fonte: Nelson e Elevitch (2006).

Existem três variedades de noni já descritas. A mais conhecida e distribuída pelo mundo é a *Morinda citrifolia* var. *citrifolia*, contendo os maiores frutos e folhas mais elípticas. As outras duas variedades, *Morinda citrifolia* var. *bracteata* e *Morinda citrifolia* var. *potteri*, consistem de plantas com os menores frutos e são encontradas em sua maioria na Indonésia (NELSON; ELEVITCH, 2006).

Atualmente, *Morinda citrifolia* L. é também encontrada em várias partes do mundo, como nas regiões tropicais da África (Centro e Sul), no Caribe e em países como Austrália, China e Índia. É uma espécie que se adapta muito bem às regiões costeiras, desde o nível do mar até 400 m de altitude (LÜBECK; HANNES, 2001). É cultivada em diversas regiões mundiais, principalmente em função do alto

valor da polpa de seus frutos, os quais são tidos como portadores de várias propriedades nutracêuticas (NELSON; ELEVITCH, 2006; WANG *et al.*, 2002).

O fruto é de formato ovalado, suculento e apresenta várias sementes. A casca do fruto é uma película fina, facilmente retirada, quando o fruto está maduro. Na polpa, ocorre mudança de coloração, passando da cor branca para a amarela, à medida que o fruto amadurece (TOMBOLATO *et al.*, 2005). O fruto é considerado fonte de antioxidante natural e o seu consumo diário, na forma de suco, auxilia o sistema imunológico e aumenta a capacidade das células na absorção de nutrientes. Um dos principais componentes encontrados no fruto é a proxeronina, precursora do alcalóide xeronina (TOMBOLATO *et al.*, 2005). Os caracteres físicos e físico-químicos dos frutos referentes à aparência externa, tamanho, forma, cor da casca, sabor, odor e valor nutritivo, constituem atributos de qualidade à comercialização e utilização da polpa na elaboração de produtos industrializados (OLIVEIRA *et al.*, 1999).

As sementes, mais de 100 por fruto grande, são triangulares a alongadas, marrons e medem entre 3 e 10 mm de comprimento (TOMBOLATO *et al.*, 2005). Costa *et al.* (2013) demonstraram que o noni possui quantidades significativas de carboidratos (27,21%; 9,70% e 8,37%) e de proteínas (2,64%; 2,23%; e 2,24%) nas sementes, cascas e polpa, respectivamente. E que os extratos aquosos, etanólicos e acetônicos das sementes, cascas e polpa apresentaram atividade antioxidante *in vitro*.

A tentativa de se estabelecer cultivos de noni no Brasil é recente. Atualmente, encontram-se plantios do noni no Nordeste do país, especialmente nos estados de Sergipe e Ceará, embora também se possam encontrar plantios no Acre, São Paulo e Minas Gerais (CORREIA *et al.*, 2011). Neves *et al.* (2013) demonstraram que *Morinda citrifolia* L. apresenta um período de reprodução e crescimento vegetativo distribuídos em todos os meses do ano o que facilita a coleta de material vegetal.

Estudo realizado por Oliveira *et al.* (2014) mostrou que a área relacionada à pesquisa tecnológica com *Morinda citrifolia* L. é promissora, e que desde os anos 2000 há um aumento do número de patentes, particularmente nos anos de 2005 e 2007. Os Estados Unidos e o Japão lideram o ranking de países depositantes. A

maior tecnologia está envolvida na produção de cosméticos para cuidados da pele e preparações medicinais.

### 1.1.2 Propriedades nutracêuticas e farmacológicas do noni

*Morinda citrifolia* L. tem sido largamente utilizada na medicina popular polinesiana e a essa espécie tem sido atribuídas atividades farmacológicas tais como: antioxidante, antitumoral, anti-inflamatória, analgésica, antimicrobiana e imunomoduladora, dentre outras (ATKINSON, 1956; YOUNOS *et al.*, 1990; DITTMAR, 1993; MCKOY; THOMAS; SIMON, 2002; PAWLUS; KINGHORN, 2007).

A atividade anti-inflamatória atribuída não apenas ao suco, mas às outras partes do noni, tem sido associada à presença de compostos secundários, já isolados e identificados, não apenas no noni, mas também em outras plantas medicinais. Dentre os compostos já descobertos podem ser citados: quercetina, presente nas sementes e no suco dos frutos; escopoletina, presente no suco dos frutos e o ácido ursólico, presente em sementes e folhas (YU *et al.*, 2008; MASUDA *et al.*, 2009; YANG *et al.*, 2009).

Estudos detalhados sobre o isolamento de compostos da planta já estão bastante avançados. Cerca de 200 substâncias já foram isoladas, sendo predominante a presença de antraquinonas, triterpenos, iridóides e lignanas (SINGH, 2012). Compostos como a escopoletina, rutina, ácido ursólico,  $\beta$ -sitosterol, damnacanthal são considerados os principais componentes dos frutos do noni (WANG *et al.*, 2002; PAWLUS; KELLER; KINGHORN, 2005; POTTERAT; HAMBURGER 2007).

A cada parte da planta de noni é atribuída uma diferente propriedade medicinal. A casca tem propriedade adstringente e é utilizada no tratamento contra malária; as folhas são usadas como analgésico e no tratamento de inflamações externas; as flores são empregadas no tratamento de inflamações oculares; o extrato das raízes reduz a pressão sanguínea; as sementes são utilizadas como laxante; e os frutos, que possuem a mais ampla utilização, são usados como antibacteriano, analgésico, anticongestivo, antioxidante, expectorante, anti-inflamatório, adstringente, emoliente, emenagogo, laxativo, analgésico, hipotensor, purificador do sangue, imunoestimulante e tônico (ELKINS, 1997; PAWLUS;

KINGHORN, 2007; SALUDES *et al.*, 2002; WANG; SU, 2001; SU *et al.*, 2001; MASUDA *et al.*, 2009; YU *et al.*, 2008). Também é atribuída ao fruto e às raízes, ação anticancerígena (RODRÍGUEZ; PINEDO, 2004; LV *et al.*, 2011; NUALSANIT *et al.*, 2012 ).

Existem diversas pesquisas *in vitro* ou *in vivo* relacionadas às atividades biológicas com *Morinda citrifolia* L. (noni), nas quais foram analisados extratos ou substâncias isoladas da planta. Esses estudos têm revelado e confirmado algumas das atividades biológicas do noni, descritas pelos povos polinésios, como: atividade antioxidante, antimicrobiana, cardiovascular, anti-inflamatória, analgésica, imunomoduladora, antitumoral e anti-tubercular, entre outros (PAWLUS; KINGHORN, 2007; FURUSAWA *et al.*, 2003; HIRAZUMI; FURUSAWA, 1999; KAMIYA *et al.*, 2004; SALUDES *et al.*, 2002; WANG; SU, 2001; WANG *et al.*, 2002).

Wang e Su (2001) avaliaram a atividade antioxidante do TNJ (*Tahitian Noni Juice*) *in vitro*, demonstrando que o suco dos frutos possui a capacidade de remover radicais superóxido com eficiência 2,8 vezes maior do que àquela observada para a vitamina C. Quando testado *in vivo*, o suco foi capaz de reduzir significativamente os níveis de superóxido e de peroxidação lipídica em ratas administradas com tetracloreto de carbono, um agente reconhecidamente hepatotóxico.

Foram isolados 19 compostos da *M. citrifolia* e avaliados quanto sua atividade antioxidante. Deste total, oito compostos demonstraram possuir potente atividade antioxidante: narcissoside, borreriagenin, cytidine, deacetylasperuloside, dehydromethoxygaertneroside, epi-dihydrocornin, methyl  $\alpha$ -D-fructofuranoside e methyl  $\beta$ -D-fructofuranoside (SU *et al.*, 2005).

Foi relatado que o noni inibe o crescimento de certas bactérias, como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus morgaii*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Salmonella* e *Shigella* (ATKINSON, 1956). O mesmo autor afirma que o efeito antimicrobiano observado pode ser devido à presença de compostos fenólicos, tais como acubina, L-asperulosídeo alizarina, escopoletina e outras antraquinonas. Outro estudo mostrou que o extrato com acetoneitrila do fruto do noni inibiu o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Streptococcus pyrogenes* (LOCHER *et al.*, 1995). Jayaraman, Manoharan e Illanchezian (2008) avaliaram a atividade antimicrobiana *in*



*vitro* dos extratos do fruto de *Morinda citrifolia*, com metanol, acetato de etila e hexano contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Vibrio harveyi*, *Klebsiella Pneumonia*, *Shigella flexneri*, *Salmonella paratyphi*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio cholera*, *Chromobacterium violaceum*, *Enterococcus faecalis*. Entre os três extratos testados, o extrato metanólico foi o mais efetivo, o extrato com acetato de etila foi efetivo contra quase todos os microorganismos testados, exceto contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella Pneumonia* e o extrato com hexano não foi efetivo contra todos os microorganismos testados.

A atividade antituberculose do noni foi descrita por Saludes *et al.* (2002), que mostraram que a fração hexano do extrato de noni foi capaz de inibir o crescimento da *Mycobacterium tuberculosis* em 89-95%. Muitos desses estudos demonstraram que o efeito antimicrobiano é dependente do estágio de maturação e de tratamento, sendo maior quando a fruta está madura, sem secagem (MACPHERSON *et al.*, 2007).

Estudos comprovaram os efeitos do noni na prevenção da arteriosclerose, uma doença relacionada com a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL). Metanol e extratos de acetato de etila mostraram 88 e 96% de inibição, respectivamente, de cobre, induzindo a oxidação do LDL (usando o ácido tiobarbitúrico método reativa). Esse efeito benéfico pode ser devido à presença de ligninas e dímeros fenilpropanóide (KAMIYA *et al.*, 2004).

Li *et al.* (2003) investigaram *in vitro* a atividade anti-inflamatória de 24 espécies de plantas australianas e chinesas, e observaram que a *M. citrifolia* em pó possui atividade inibitória da enzima cicloxigenase COX-1.

Outro estudo mostrou que o suco de noni comercial tem um efeito de inibição seletiva em algumas enzimas cicloxigenase (COX-1 e COX-2) envolvidas em atividade anti-inflamatórias na mama, cólon e pulmão (SU *et al.*, 2001). A inibição da atividade destas enzimas pelo suco de noni foi comparada com outros anti-inflamatórios tradicionais não esteroidais, como aspirina, indometacina e um inibidor seletivo da COX-2, o celecoxibe. Os resultados mostraram que a seletividade para a inibição da COX-2 do suco comercial é comparável com a do celecoxibe e sem efeitos colaterais (SU *et al.*, 2001).

McKoy, Thomas e Simon (2002) mostraram que os extratos, aquoso e etanólico, do suco de noni possuem atividade antiedematogênica quando administrados tanto por via oral quanto por via intraperitoneal, utilizando o modelo de edema de pata induzido por carragenina.

Estudos demonstraram as propriedades analgésicas de um suco comercial em ratos. Os resultados mostraram que ratos alimentados com 10% e 20% de suco de noni tiveram maior tolerância a dor (162% e 212%, respectivamente) comparado com o grupo placebo (WANG *et al.*, 2002). Uma equipe de pesquisadores franceses também estudou os efeitos analgésicos e sedativos do noni em ratos. O extrato da raiz do noni (1,600 mg/kg) apresentou atividade analgésica significativa nos animais, semelhante ao efeito de morfina (75% e 81% de proteção através do noni e morfina, respectivamente), e também mostrou não ser tóxico (YOUNOS *et al.*, 1990).

As propriedades imunomoduladoras (capacidade para melhorar o sistema imune do hospedeiro) de suco de noni foram estudadas por uma equipe de pesquisadores japoneses. Na fração de etanol precipitável (ppt) de suco de noni, correspondendo a uma substância rica em polissacarídeo composto de ácido glucurônico, galactose, arabinose, rhamnose, tem-se verificado efeitos imunomoduladores e anti-tumorais contra o carcinoma de pulmão de Lewis (LLC). Em modelos celulares, noni-ppt parece estimular a produção de células-T, tímócitos e macrófagos que produzem citocinas, que são importantes mediadores da citotoxicidade (HIRAZUMI *et al.*, 1996; HIRAZUMI; FURUSAWA, 1999).

Hirazumi e Furusawa (1999) investigaram, em camundongos, a atividade imunomodulatória do suco de noni em modelos de carcinoma pulmonar-peritoneal de Lewis. Foi observado que, a administração terapêutica de suco de noni pode ativar as células do exsudato peritoneal, aumentando o tempo de sobrevivência dos camundongos sugerindo que este efeito foi mediado pela ativação do sistema imune do hospedeiro. O TNJ (*Tahitian Noni Juice*) também foi capaz de estimular a liberação de inúmeros mediadores de células efectoras murinas, incluindo fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina 1-beta (IL-1 $\beta$ ), interferon gama (IFN- $\gamma$ ), óxido nítrico (NO) entre outros.

Palu *et al.* (2008) analisaram os mecanismos envolvidos nas propriedades imunológicas do *Tahitian Noni Juice* (TNJ) e concentrados do suco do fruto do noni

(NFJC) em camundongos. Os resultados mostraram que TNJ e NFJC potencializaram a ativação dos receptores canabinóides CB<sub>2</sub>, e inibiram os receptores canabinóides CB<sub>1</sub>. O TNJ (*Tahitian Noni Juice*) suprimiu interleucina 4 (IL-4), porém aumentou a produção de IFN- $\gamma$ .

O suco do noni é comumente usado como um “milagre” de cura em muitos países tropicais, incluindo Taiti, Havaí e as ilhas do Caribe (MCKOY; THOMAS; SIMON, 2002). O suco tornou-se um suplemento alimentar bastante consumido nos Estados Unidos, Japão e parte da Europa. O crescimento em popularidade pode ser em parte atribuído ao seu poder “cura-tudo”. Este suco vem sendo utilizado na medicina popular no tratamento de doenças e/ou distúrbios tais como: diabetes, diarreia, dores, hipertensão, artrite, estresse e câncer (SU *et al.*, 2005).

Brown (2012) realizou uma revisão de literatura de publicações entre 1964 e 2011, na fonte de dados MEDLINE, relacionando *Morinda citrifolia* e câncer, encontrando 19 estudos, dos quais, 7 foram estudos *in vitro*, 9 foram *in vivo* com animais e 3 *in vivo* com humanos, sendo utilizado o precipitado, extrato ou suco do fruto e extrato de folhas.

Wang e Su (2001) investigaram o mecanismo do efeito preventivo do suco de *Morinda citrifolia* L. (noni) no estágio inicial da carcinogênese. Os resultados sugeriram que a prevenção de formação de adutos de DNA- carcinogênicos e a atividade antioxidante do suco da fruta podem contribuir para o efeito quimiopreventivo.

O potencial profilático e terapêutico contra Sarcoma 180 foi investigado por Furusawa *et al.* (2003) utilizando uma substância rica em polissacarídeos chamada Noni-ppt extraída de *Morinda citrifolia*. Os resultados mostraram que a atividade antitumoral de Noni-ppt produziu a cura em 25% a 45% dos camundongos alogênicos e que esta atividade foi completamente abolida através da administração concomitante de inibidores específicos de macrófagos (2-cloroadenosine), células T (ciclosporina) ou células *natural killer*.

Kamiya *et al.* (2010) estudaram o potencial anticarcinogênico de diversas antraquinonas isoladas da raiz de *Morinda citrifolia* L. (noni) para confirmar a utilidade dessa parte da planta para fins terapêuticos. Foram encontradas 10 antraquinonas: rubiadina, 1-éter metílico rubiadina, lucidina, damnacantol, 1,3-

diidroxí-2-etoximetilantraquinona, 3-hidroxí-1-metoxi-2- metoximetilantraquinona, nordamnacantal, damnacantal, sorandiol e morindona. Os compostos 1,3-diidroxí-2-etoximetilantraquinona, 3-hidroxí-1-metoxi-2- metoximetilantraquinona, nordamnacantal, damnacantal e morindona exibiram notável inibição contra o câncer, e o composto morindona foi o mais forte inibidor de todas as antraquinonas investigadas. Segundo os autores, estes resultados sugerem que as raízes de noni podem ser utilizadas como um alimento funcional com potencial anticancerígeno.

Mesmo reconhecendo o elevado potencial terapêutico do noni, até então, estudos direcionados para as sementes de *Morinda citrifolia* L. e a identificação de compostos de natureza proteica nas sementes dessa espécie apresentam-se escassos. As sementes de *M. citrifolia* L. têm sido consumidas há vários anos em função de suas propriedades de “melhoria da saúde humana” e, a partir delas, é possível extrair um óleo rico em ácido linoléico, o qual apresenta propriedades hidratantes utilizadas para evitar o ressecamento da pele. No fruto, as sementes secas representam cerca de 2,5% do seu peso total (NELSON, 2005) e têm sido descartadas, sem nenhuma utilização. Na Polinésia Francesa, somente no ano de 2007, o rejeito das sementes do noni foi superior a 150 toneladas (WEST; JENSEN; WESTENDORF, 2008).

Masuda *et al.* (2009) realizaram ensaios *in vitro* da ação inibidora da tirosinase e a atividade antioxidante pelo método DPPH utilizando os extratos etanólicos das sementes, folhas e frutos da *Morinda citrifolia* L. (noni). Os resultados apontaram o extrato das sementes da planta com um maior potencial para essas duas variáveis, quando comparados aos da folha e frutos.

A partir dessa potente ação do extrato etanólico das sementes de noni, os autores realizaram um fracionamento bioguiado do mesmo, utilizando os ensaios *in vitro*. Com isso, levou ao isolamento do ácido ursólico, que se apresentou como um componente ativo da capacidade inibitória das células de leucócitos humanas. Já os compostos 3,30-bisdimetilpinoresinol, americanina A e quercetina também foram isolados e se apresentaram como elementos ativos no extrato, pois apresentaram ação inibitória da tirosinase e do radical livre DPPH. Quando comparado os valores das substâncias com a enzima superóxido dismutase (SOD), a americanina A e a quercetina mostraram atividade semelhante. Estes compostos ativos foram isolados das sementes de noni pela primeira vez (MASUDA *et al.*, 2009).

Yang *et al.* (2009) também trabalharam com as sementes de *Morinda citrifolia* L. (noni) e isolaram vinte compostos: daucosterol, ácido ursólico, ácido 19-hidroxi-ursólico, 1, 5,15-trimetilmorindol, 5,15-dimetil-morindol, escopoletina, 3, 3'-bisdimetilpinoresinol, 3, 4, 3 '4'-tetra-9, 7' $\alpha$ -epoxilignano-7 $\alpha$  9'-lactona, americanina D, americanina A, americanina, isoprincepina, ácido diacetil asperulosídico, ácido logânico, ácido asperulosídico, rodolatosídeo, quercetina-3-O- $\alpha$  - L-ramnopiranosil-(1-6)- $\beta$ -D-glicopiranosídeo, 4-etil-2-hidroxisuccinato, 5-hidroximetil-2-furancarboxaldeído, 3-metilbut-3-enil-6-O- $\beta$ -Dglucopiranosil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo. Segundo os autores, os compostos americanina D, americanina, ácido logânico, rodolatosídeo e 4-etil-2-hidroxisuccinato são relatados pela primeira vez nas sementes dessa planta.

West *et al.* (2006) realizaram um estudo com o extrato etanólico das sementes de noni objetivando avaliar sua toxicidade e potencial antioxidante e verificaram que esses extratos não causaram nenhum efeito citotóxico contra a espécie *Artemia salina*, nenhum efeito genotóxico e, ainda, apresentaram atividade antioxidante *in vitro*.

No Brasil, ainda são poucos os trabalhos de pesquisa desenvolvidos com o noni, apesar do grande sucesso e demanda internacional pelos produtos dessa espécie, principalmente o suco dos frutos, sendo escassas as informações referentes às características agrônômicas, tais como: o meio mais adequado de propagação, as características fisiológicas da germinação e as condições de armazenamento das sementes (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

O cultivo do noni tem grande potencial para a geração de novas oportunidades comerciais para o Ceará, devido ao seu elevado valor de mercado e por ser oriundo de um ecossistema semelhante ao encontrado em várias regiões do estado, o que facilita sua adaptação às condições locais. Portanto, a maximização do potencial dessa espécie exótica através do aproveitamento biotecnológico de suas sementes poderá abrir um leque ainda maior de potencialidades comerciais dessa espécie no nosso estado (CAMPOS *et al.*, 2015).

*Morinda citrifolia* L. é uma espécie de amplo potencial terapêutico, sendo que muitas das suas propriedades terapêuticas até então relatadas têm sido associadas a diferentes metabólitos secundários. Em um trabalho pioneiro, realizado pelo nosso grupo de pesquisa, França (2013) mostrou que as sementes do noni

apresentam um teor proteico de 9%, sendo essas moléculas concentradas essencialmente em albuminas e globulinas.

Dados também obtidos pelo nosso grupo de pesquisa mostraram que extratos aquosos de sementes de noni, foram capazes de inibir a eclosão de ovos parasitas de pequenos ruminantes (LIMA, 2013) e Campos *et al.* (2015) isolaram uma proteína de sementes de *Morinda citrifolia* L., caracterizada como uma proteína transferidora de lipídeos ( $McLTP_1$ ), com massa molecular de 9,4 kDa, por espectrometria de massas, promotora de atividade antinociceptiva e anti-inflamatória, fato inédito em se tratando dessa classe de proteínas, efeito este também observado pela via oral, indicando que a proteína pode passar pelo trato gastrointestinal sem perder sua atividade. Tal como observado para outras LTPs,  $McLTP_1$  se mostrou como uma proteína termoestável, visto que ao ser aquecida a 80 °C por 30 minutos não apresentou perda significativa da atividade antinociceptiva quando comparada à proteína não aquecida (25 °C).

A atividade anti-edematogênica evidenciada com a redução do edema de pata induzido pela carragenina, representou outra evidência das propriedades anti-inflamatórias da proteína isolada, além da inibição da migração leucocitária produzida pela  $McLTP_1$  no teste da peritonite por carragenina, reforçando nesse modelo a atividade anti-inflamatória da proteína isolada (CAMPOS *et al.*, 2015).

A literatura mostra que, em detrimento do grande potencial terapêutico de *Morinda citrifolia* L. há também diversos relatos de hepatotoxicidade associados ao consumo de produtos derivados do noni (MILLONIG; STADLMANN; WOLFGANG, 2005; STADLBAUER *et al.*, 2005). Dessa forma, também foram realizados estudos de toxicidade de  $McLTP_1$ , em nosso grupo de pesquisa, por Costa (2013), no qual a administração intragástrica de  $McLTP_1$  nas doses de 8 e 80 mg/kg não promoveram alterações em parâmetros comportamentais ou mesmo mortalidade, não sendo observados sinais de toxicidade, incluindo-se alteração da locomoção, frequência respiratória, piloereção, diarreia, sialorréia, alteração do tônus muscular, hipnose, convulsões e hiperexcitabilidade. E no teste de toxicidade em doses repetidas, após 28 dias de administração diária de  $McLTP_1$  (8mg/kg), pela via oral, não houve mortalidade ou qualquer alteração comportamental dos animais tratados, assim como não promoveu alterações nos parâmetros hematológicos e bioquímicos avaliados. E estudos de estabilidade de  $McLTP_1$ , também realizados por Costa

(2013), demonstraram que  $McLTP_1$  mantém suas propriedades terapêuticas (atividades anti-inflamatória e antinociceptiva) inalteradas sob refrigeração, mesmo após 3 meses de armazenamento.

Dados recentes obtidos pelo nosso grupo mostraram que em relação à sensibilidade de fungos de interesse clínico à  $McLTP_1$ , as espécies *Candida parapsilosis*, *Criptococcus gatti* e *Criptococcus neoformans* se mostraram sensíveis ao tratamento. Na maior concentração testada (400 µg/ml) as inibições do crescimento das 3 espécies foram de 64,66 %, 85,02 % e 91,42 %, respectivamente. Quando foi testada em sinergismo com anfotericina B, uma droga antifúngica de mercado,  $McLTP_1$  na concentração de 100 µg/ml, diminuiu os valores de  $IC_{100\%}$  pela metade, de 1,0 para 0,5 µg/ml em *C. parapsilosis*; de 0,5 para 0,25 µg/ml em *C. gatii*; e de 0,25 para 0,125 µg/ml para *C. neoformans*.

Dessa forma, obter dados acerca da estrutura de  $McLTP_1$ , contribuirá para os estudos de mecanismos de ação de inflamação e dor dessa proteína, assim como para as demais pesquisas envolvendo diversas atividades biológicas, como atividade anti-helmíntica e anti-fúngica, sendo base para o desenvolvimento de um futuro fármaco, agregando valor às sementes do noni, as quais representam resíduos da obtenção da polpa dos frutos.

## 1.2 Proteínas de sementes: visão geral e aplicações

As proteínas das sementes têm como função armazenar principalmente carbono, nitrogênio e enxofre, essenciais para a síntese de proteínas, ácidos nucléicos e compostos secundários na plântula em crescimento (BUCKERIDGE *et al.*, 2004).

A classificação das proteínas pode ser feita segundo sua solubilidade em diferentes solventes – albuminas (água e solução salina), globulinas (solução salina), prolaminas (etanol 70%) e glutelinas (soluções ácidas e alcalinas) (OSBORNE, 1924) ou de acordo com sua função – de reserva, estrutural-metabólica e de proteção (BEWLEY, 2001). Em leguminosas, as globulinas representam a maior parcela das proteínas de reserva e são solúveis em soluções salinas (DERBYSHIRE; WRIGHT; BOULTER, 1976).

Dentre as proteínas de proteção encontramos um grupo de proteínas acumuladas tardiamente durante o desenvolvimento das sementes - são as LEAs (*Late Embriogenesis Abundant*). A expressão destas proteínas está relacionada à aquisição da tolerância à dessecação em sementes, porém muitas proteínas LEA são também induzidas pelo frio, pelo estresse osmótico ou por aplicações de ácido abscísico (WELIN *et al.*, 1994). Essas proteínas são capazes de inibir a desnaturação de macromoléculas e estabilizar estruturas intracelulares sob condições de estresse, incluindo estresse hídrico severo (BLACKMAN; OBENDORF; LEOPOLD, 1995; CLOSE, 1997).

Outro grupo de proteínas, conhecidas como *heat-shock* (HSPs), atuam na proteção das plantas contra estresses, na re-estabilização da conformação das proteínas e na homeostase celular (WANG *et al.*, 2004). O aumento na síntese de HSPs pode levar à aquisição de termotolerância quando da exposição à temperatura subletal e, também, a outras condições de estresse, como pH, metais pesados e salinidade (FEDER; HOFMANN, 1999).

Estudos demonstram a importância e aplicações das proteínas isoladas de sementes. Alguns trabalhos, já considerados clássicos, pela literatura, destacam o papel quimiopreventivo de inibidores de proteases em modelos de carcinogênese experimental, particularmente de moléculas capazes de inibir a quimotripsina e enzimas *quimotripsina-like*, tal como tem sido descrito para o inibidor de Bowman-Birk isolado a partir de sementes de soja (KENNEDY, 1998).

Pereira *et al.* (2011) mostraram que as sementes de *Moringa oleifera* apresentam uma proteína ligante à quitina (*Mo-CBP<sub>4</sub>*) capaz de inibir de forma significativa na dose de 10 mg/kg (via i.p. e também via oral) as contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos, um modelo experimental de dor inflamatória tradicionalmente utilizado como ferramenta de triagem para descoberta de novos agentes analgésicos.

Estudos com *Mo-CBP<sub>3</sub>*, uma proteína ligante à quitina isolada de sementes de *Moringa oleifera* mostraram que essa proteína possui amplo espectro de ação contra fungos fitopatogênicos, sendo altamente estável, mantendo sua estrutura secundária e atividade antifúngica em extremos de temperatura e diferentes valores de pH (GIFONI, 2009; GIFONI *et al.*, 2012; BATISTA, 2013; FREIRE, 2013). E o estudo de avaliação da biossegurança alimentar da proteína



*Mo*-CBP<sub>3</sub> permitiu considerar o uso seguro dessa proteína no contexto da biotecnologia agrícola, tendo em vista seu grande potencial para o desenvolvimento de plantas transgênicas resistentes ao ataque de fungos (PINTO, 2014).

Costa *et al.* (2014) isolou um inibidor de tripsina da torta das sementes de pinhão-manso (*Jatropha curcas*) que revelou ser uma proteína antimicrobiana, com atividade frente a vários fungos fitopatogênicos de importância agrícola, incluindo *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani*, bem como para bactérias patogênicas ao homem, representadas por *Bacillus subtilis*, *Salmonella choleraesuis* e *Staphylococcus aureus*.

Nos vegetais, as lectinas foram detectadas em centenas de espécies, sendo que a maioria das lectinas vegetais estudadas foram obtidas de sementes, principalmente em leguminosas, onde são acumuladas no período de maturação e desaparecem após a germinação. Algumas lectinas de leguminosas se tornaram ferramentas indispensáveis na pesquisa biológica e biomédica além de serem amplamente utilizadas como proteínas bioativas tanto na pesquisa quanto na medicina (VAN DAMME *et al.*, 1998). Algumas atividades biológicas também foram evidenciadas em uma lectina extraída de sementes de *Lonchocarpus sericeus*, com alta atividade anti-inflamatória em modelo de edema de pata (ALENCAR *et al.*, 1999), efeito anti-inflamatório e antibacteriano em um modelo de peritonite infecciosa (ALENCAR *et al.*, 2005), diminuição da migração leucocitária e hipernocicepção mecânica pela inibição da produção de citocinas e quimiocinas (NAPIMOGA *et al.*, 2007). Simões (2013) isolou uma nova lectina de sementes da espécie *Swartzia laevicarpa*, denominada de SLA, que possui atividade pró-inflamatória e hipernociceptiva, sendo a dor de origem inflamatória e quando administrada em doses superiores a 50 µg/mL apresenta toxicidade para *Artemia sp.*

Estudos com Ca-LTP<sub>1</sub>, uma proteína transferidora de lipídeos isolada das sementes da pimenta (*Capsicum annuum*) demonstraram a atividade inibitória de α-amilase e atividade antifúngica contra *C. lindemuthianum*, e especialmente contra *C. tropicalis*, causando várias alterações morfológicas às células, incluindo a formação de pseudo-hifas (DIZ *et al.*, 2011). Zottich *et al.* (2011) isolaram uma proteína transferidora de lipídeos das sementes de café (*Coffea canephora*) denominada Cc-LTP<sub>1</sub>, demonstrando a atividade inibitória de α-amilase e uma alta

atividade antifúngica contra *Candida albicans* e promoveu mudanças morfológicas, incluindo a formação de pseudo-hifas em *Candida tropicalis*.

Esses trabalhos mostram a relevância atribuída à diversas proteínas isoladas de sementes de diferentes espécies envolvidas em atividades biológicas importante, com potencial para aplicação biotecnológica, ampliando-se o campo de investigação em química medicinal.

### 1.2.1 Proteínas Transferidoras de Lipídeos

Nas plantas, os lipídeos realizam diversas funções importantes, incluindo armazenamento de energia, compartimentalização celular, proteção e transdução de sinal em diferentes processos. A transferência de lipídeos como os ácidos graxos livres, esteróis, fosfolipídeos e seus derivados, em um ambiente aquoso do sistema biológico é facilitada por proteínas ligadas à lipídeos (GIZATULLINA *et al.*, 2013). Estas proteínas pertencem a diferentes famílias tais como proteínas transferidoras de lipídeos (LTPs), proteínas transportadoras de esteróis, puroindolinas, e homólogos Bet v 1 (CARVALHO; GOMES, 2007).

As LTPs de plantas constituem uma família de proteínas solúveis em água, principalmente básicas, capazes de se ligar e transferir uma grande variedade de ligantes hidrofóbicos *in vitro* (CARVALHO; GOMES, 2007). LTPs se caracterizam por um elevado ponto isoelétrico teórico (IEP) de cerca de 9,0 (GASTEIGER *et al.*, 2005; SAFI *et al.*, 2015). São divididas em 2 subfamílias, com massa molecular relativa de 9 kDa (LTP<sub>1</sub>) e 7 kDa (LTP<sub>2</sub>) (CASTRO *et al.*, 2003). LTPs de plantas têm uma localização extracelular, geralmente na periferia de plantas (ARONDEL *et al.*, 2000).

Diferentes isoformas de LTPs são expressas em vários órgãos e tecidos em certas fases da ontogenia (CARVALHO; GOMES, 2007). As LTPs estão envolvidas em reações de estresse bióticos e abióticos (KADER, 1996), formação de cutina e suberina (RENAN *et al.*, 2003), embriogênese somática (STERK *et al.*, 1991) e podem desempenhar o papel de moléculas de sinalização sistêmicas (BLEIN *et al.*, 2002).

As duas subfamílias de LTPs (LTP<sub>1</sub> e LTP<sub>2</sub>) compartilham uma arquitetura estrutural comum de uma cavidade hidrofóbica composta por quatro  $\alpha$ -hélices,

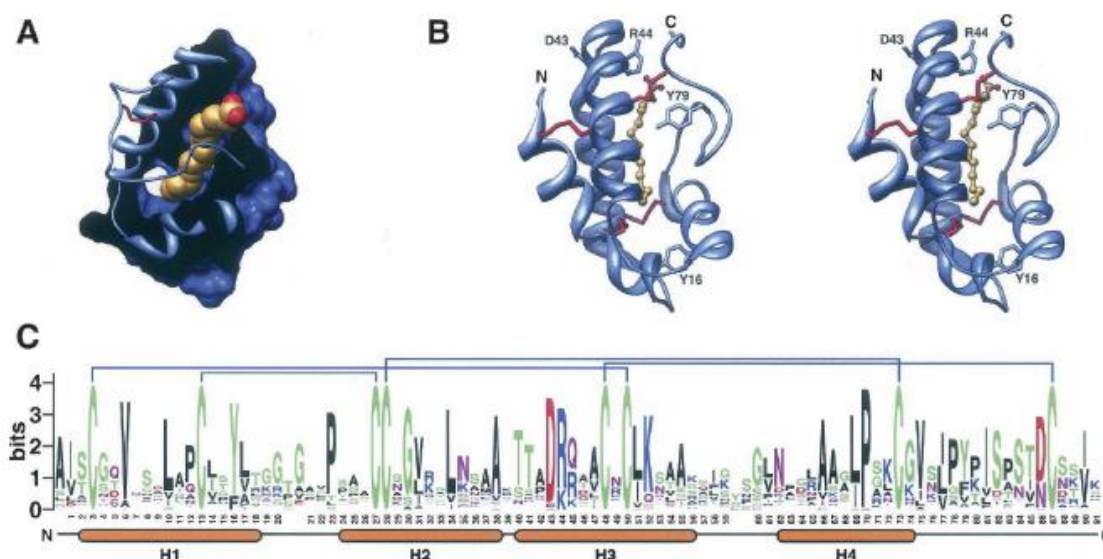
formando uma dobra compacta com quatro pontes dissulfeto, formadas por um motivo contendo oito cisteínas com a forma geral  $C-X_n-C-X_n-CC-X_n-CXC-X_n-C-X_n-C$ , o que resulta numa estrutura muito compacta e estável (HEINEMANN *et al.*, 1996; CHARVOLIN *et al.*, 1999; HAN *et al.*, 2001; CHENG *et al.*, 2004b; PASQUATO *et al.*, 2006; GUERBETTE *et al.*, 1999; SALCEDO *et al.*, 2004; SAFI *et al.*, 2015). As duas subfamílias apresentam um peptídeo sinal na região amino terminal, que em geral varia entre 21 e 27 aminoácidos para as LTP<sub>1</sub>s e de 27 a 35 aminoácidos para as LTP<sub>2</sub>s (SAFI *et al.*, 2015).

Estruturas tridimensionais de LTP<sub>1</sub>s de plantas, determinadas por cristalografia de raios-X ou espectroscopia de RMN (Ressonância Magnética Nuclear), são compostas de quatro  $\alpha$ -hélices e uma região C-terminal (GIZATULLINA *et al.*, 2013). A estrutura geral das LTP<sub>1</sub>s é estabilizada por quatro pontes dissulfeto e caracterizada pela presença de uma cavidade hidrofóbica com espaço suficiente para a ligação de uma ou duas moléculas de lipídeos (**Figura 2**) (KADER, 1996). Interações hidrofóbicas desempenham um papel importante na ligação de lipídeos. LTP<sub>1</sub>s de plantas ligam uma grande variedade de moléculas hidrofóbicas, incluindo ácidos graxos, desde C10 a C18, fosfolipídeos, liso-derivados, prostaglandina B2 e acil-coenzima A (GOMAR *et al.*, 1996; SODANO *et al.*, 1997; LERCHE *et al.*, 1997; CHARVOLIN *et al.*, 1999; TASSIN-MOINDROT *et al.*, 2000; HAN *et al.*, 2001). Embora as LTP<sub>1</sub>s exibam dobras semelhantes, a sua capacidade de ligação a lipídeos depende da forma e do volume da cavidade interna, da localização dos aminoácidos no interior da cavidade interna, e variações na organização dos elementos da estrutura secundária. A capacidade das LTP<sub>1</sub>s de retirar lipídeos de micelas ou bicamadas também varia de uma proteína para outra (GIZATULLINA *et al.*, 2013).

A outra subfamília das LTPs, as LTP<sub>2</sub>s também possuem quatro  $\alpha$ -hélices ligadas por quatro pontes dissulfeto, com uma cavidade hidrofóbica para ligação de lipídeos. No entanto, o emparelhamento padrão de cisteínas 5 e 6 (CXC) são trocados: nas LTP<sub>1</sub>s, C5 forma uma ponte dissulfeto com C8 e C6 com C1, enquanto nas LTP<sub>2</sub>s, C5 forma uma ponte dissulfeto com C1 e C6 com C8 (CHENG *et al.* 2004b). Embora menor do que a cavidade hidrofóbica das LTP<sub>1</sub>s, a cavidade das LTP<sub>2</sub>s é mais flexível, permitindo o alojamento de uma ampla variedade de lipídeos, incluindo esteróis (YEATS; ROSE, 2008).

As LTP<sub>1</sub>s de plantas podem estar envolvidas em diversos processos da fisiologia celular e desenvolvimento: formação da cera e cutina, adesão do pólen, mobilização dos lipídeos de sementes e extensão da parede celular e defesa antimicrobiana através da inibição do crescimento de fungos e bactérias (DIZ *et al.*, 2011).

**Figura 2 – Estrutura e sequência de LTP<sub>1</sub> de arroz.** (A) Corte mostrando a ligação à lipídeos da LTP<sub>1</sub> de arroz. (B) Estrutura de LTP<sub>1</sub> de arroz com as quatro  $\alpha$ -hélices e as pontes de dissulfeto em vermelho. (C) Sequência mostrando as características conservadas de LTP<sub>1</sub>s de *Arabidopsis thaliana*, arroz, e álamo. Pares dissulfeto são indicados acima do logotipo. Números de resíduos e hélices de acordo com a estrutura da LTP<sub>1</sub> de arroz são mostrados abaixo da sequência.



Fonte: Yeats e Rose (2008).

Apesar das várias moléculas envolvidas na linha de frente da defesa contra patógenos, as proteínas têm recebido atenção especial em virtude do seu potencial para aplicação na agricultura. As proteínas transferidoras de lipídeos pertencem a um grupo de compostos envolvidos na defesa de plantas denominadas de peptídeos antimicrobianos ou AMP, compreendendo também as tioninas, defensinas, peptídeos tipo heveína e tipo *knottin* (VAN DEN BERGH *et al.*, 2002).

As LTPs podem ser componentes importantes da defesa direta contra bactérias e fungos patogênicos, e as primeiras evidências dessa função foram observadas *in vitro* com os extratos proteicos de rabanete (*Raphanus sativus*), cevada (*Hordeum vulgare*), *Arabidopsis thaliana*, espinafre (*Spinacia oleracea*) e sementes de cebola (*Allium cepa*) (TERRAS *et al.*, 1992; MOLINA; SEGURA; GARCIA-OLMEDO, 1993; SEGURA; MORENO; GARCIA-OLMEDO, 1993; CAMMUE *et al.*, 1995). O papel das LTPs nos mecanismos de defesa das plantas tem sido investigado através do estudo da atividade de peptídeos purificados, através da expressão de genes padrões de LTP, bem como a sobre-expressão do gene LTP.

Foi demonstrada a inibição de diversos patógenos de plantas por LTPs, incluindo *Pseudomonas solanacearum*, *Clavibacter michiganensis*, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, *Trichoderma viride* e *Cercospora beticola* (CARVALHO *et al.*, 2001; KADER, 1996; MOLINA; SEGURA; GARCIA-OLMEDO, 1993; TERRAS *et al.*, 1992; REGENTE; DE LA CANAL, 2000). Um potente peptídeo pertencente às LTPs foi isolado a partir de sementes da cebola (Ace-AMP1) que foi capaz de inibir o crescimento de todos os 12 fungos testados e das bactérias Gram-positivas, *Bacillus megaterium* e *Sarcina lutea*, em concentrações abaixo de 10 µg/mL (CAMMUE *et al.*, 1995). Desde a descoberta das LTPs como peptídeos com capacidade para inibir fitopatogênicos, tem-se especulado que este efeito poderia resultar da interação das LTPs com as membranas biológicas, conduzindo possivelmente a permeabilização devido à perda da integridade da membrana (DIZ *et al.*, 2011).

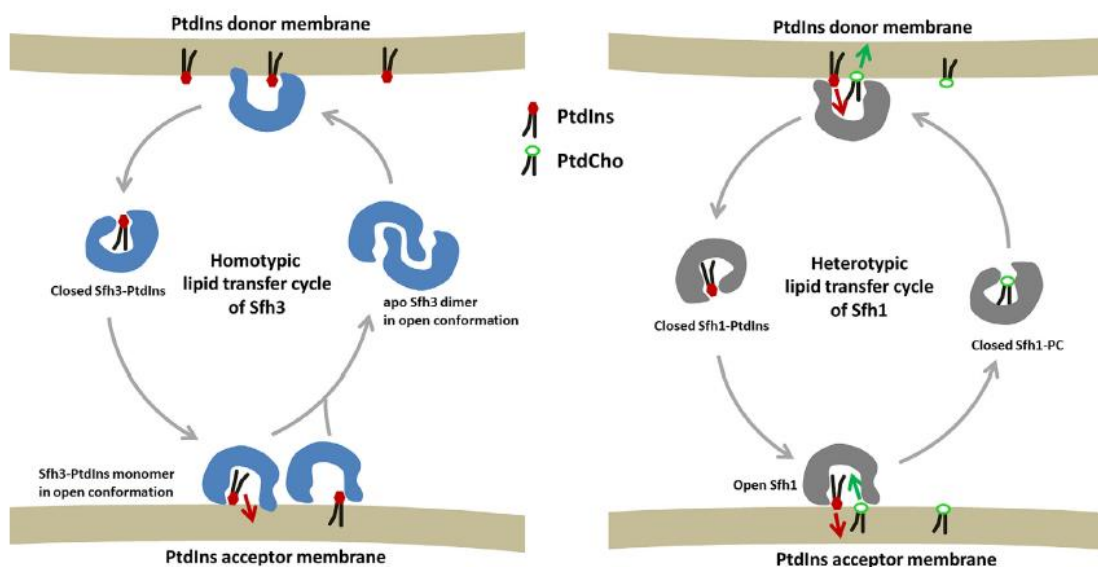
A expressão de peptídeos antimicrobianos (AMP) em plantas aumenta a resistência a fungos patogênicos devido ao seu largo espectro de atividade antimicrobiana. Plantas transgênicas de *Brassica napus* (colza), *Lycopersicon esculentum* L. (tomate) e *Nicotiana tabacum* (tabaco), superexpressando genes de proteínas semelhantes à proteína transferidora de lipídeos não específica (*LJAMP<sub>1</sub>* e *LJAMP<sub>2</sub>*) de *Leonurus japonicus*, mostraram maior resistência aos fungos *A. alternata*, *A. solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Verticillium dahliae* em experimentos *in vitro* e *in vivo* (XIANBI *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2007; JIANG *et al.*, 2013). O peptídeo antimicrobiano Ace-AMP<sub>1</sub>, isolado de sementes de *Allium cepa* (cebola), conferiu resistência à banana e ao trigo aos fungos *Blumeria graminis*, *F. oxysporum* e *Neovossia indica*. No último caso, Ace-AMP<sub>1</sub> intensificou a expressão de genes

relacionados à defesa em trigo inoculado com *Neovossia indica* (ROY-BARMAN; SAUTTER; CHATTOO, 2006; MOHANDAS *et al.*, 2013). A superexpressão de *Gt-LTP<sub>1</sub>*, uma LTP isolada de folhas de *Gentiana triflora*, em plantas de tabaco melhorou a tolerância ao fungo *B. cinerea* (KIBA *et al.*, 2012).

Yang *et al.* (2013) propuseram um modelo para os ciclos de transferência de lipídeos entre membranas de Sfh3, um homólogo da proteína Sec14 (proteína transferidora de fosfatidilinositol de *Saccharomyces cerevisiae*), que se apresenta na conformação de dímero quando não está ligada à lipídeos (**Figura 3**).

Adicionalmente, a atividade de transferência de lipídeos das LTPs para a entrega de drogas (sistemas de *drug delivery*) seria importante para a resolução de problemas relacionados à permeabilidade da membrana lipídica, podendo ser utilizada na farmacologia e na indústria de medicamentos e cosméticos (SHI *et al.*, 2013).

**Figura 3 – Modelos esquemáticos de ciclos de transferência de lipídeos para Sfh3 e Sfh1.**



Fonte: Yang *et al.* (2013).

As LTPs são moléculas de elevado potencial biotecnológico, entretanto, por serem descritas como alérgenos devem ter essa atividade investigada. Em geral,

as LTPs mostram resistência a tratamentos com calor, condições ácidas e proteólise, permitindo-as resistir às condições ácidas e proteolíticas no trato gastrointestinal (VASSILOPOULOU *et al.*, 2006). Estes são os melhores pré-requisitos para atuar como um alérgeno por sensibilização via oral (SALCEDO *et al.*, 2004).

Várias proteínas transferidoras de lipídeos já foram identificadas como alérgenos vegetais (SALCEDO *et al.*, 2004). As reações alérgicas contra LTP são mostradas para os frutos da família Rosaceae, por exemplo, pêssigo, damasco e cereja, na área do Mediterrâneo (BREITENEDER; MILLS, 2005). Além disso, a LTP foi descrita como alérgeno no pólen e em algumas outras frutas, incluindo as uvas (BREITENEDER; MILLS, 2005; PASTORELLO *et al.*, 2003a; VASSILOPOULOU *et al.*, 2007).

A ampla distribuição de LTP<sub>1</sub> em alimentos de origem vegetal, a recente evidência para as alergias alimentares induzidas por LTP<sub>1</sub> de um número de espécies botanicamente distintas de Rosaceae (CIARDIELLO *et al.*, 2010; GADERMAIER *et al.*, 2010; KRAUSE *et al.*, 2009; PASTORELLO *et al.*, 2000; SAN MIGUEL-MONCIN *et al.*, 2003), e a demonstração de reação cruzada imunológica entre LTP<sub>1</sub> a partir de tais espécies (ASERO *et al.*, 2001; TORDESILLAS *et al.*, 2009) indicam que estas proteínas representam pan-alérgenos.

Experimentos iniciais *in vitro* demonstraram que LTP<sub>1</sub> é capaz de transferir moléculas lipídicas entre membranas (KADER, 1996). No entanto, a localização extracelular de LTP<sub>1</sub> não é consistente com esse papel, de modo que as outras funções, tais como a extensão da parede celular (NIEUWLAND *et al.*, 2005) e a deposição de cera cuticular (CAMERON; TEECE; SMART, 2006) têm sido propostas para LTP<sub>1</sub>. A determinação da estrutura 3D de LTP<sub>1</sub> de pêssigo (Pru p 3), o protótipo alergênico, revelou detalhes moleculares da superfície desta proteína (PASQUATO *et al.*, 2006). A estrutura da proteína é estabilizada por quatro pontes dissulfeto, basicamente consistindo de quatro  $\alpha$ -hélices, formando uma cavidade hidrofóbica.

Essa dobra compacta confere uma elevada resistência ao calor (GAIER *et al.*, 2008; SANCHO *et al.*, 2005; SCHEURER *et al.*, 2004) e digestão proteolítica à LTP<sub>1</sub> (ASERO *et al.*, 2001; CAVATORTA *et al.*, 2010), que conservam a maior parte da sua capacidade imunogênica e alergênica após a passagem através do trato

gastrointestinal. Esta estabilidade especial de LTP<sub>1</sub> acredita-se estar associada com a sensibilização primária mediada pela interação da proteína com o sistema imunológico gastrintestinal, e representa um fator importante que contribui para as reações sistêmicas graves, muitas vezes observadas em pacientes alérgicos. Por outro lado, um estudo clínico com pacientes sensíveis aos frutos da família Rosaceae mostrou uma importante alergenicidade cruzada entre maçã, pêra e pêssego (FERNANDEZ-RIVAS; VAN; CUEVAS, 1997).

Proteínas e peptídeos terapêuticos estão ganhando crescente popularidade, devido aos avanços da biotecnologia, que lhes permitam serem as moléculas de escolha para uma variedade de doenças (CHIN *et al.*, 2012; PARK; KWAN; PARK, 2011). A elevada especificidade e atividade de proteínas e peptídeos tornam-os aplicáveis para liberação direcionada na prática clínica (BRAYDEN; MAHONY, 1998; CHIN *et al.*, 2012; PARK; KWAN; PARK, 2011). No relatório de 2013 da *Pharmaceutical Research e Manufacturers of America* (PhRMA) sobre "Medicamentos Biológicos em Desenvolvimento" foram descritos mais de 900 medicamentos de proteínas e peptídeos, dos quais 353 para o câncer e doenças relacionadas, 187 para doenças infecciosas, 69 para doenças auto-imunes e 59 para doenças cardiovasculares.

McLTP<sub>1</sub> foi caracterizada apenas parcialmente, sendo necessários estudos acerca de estrutura, como parte da caracterização desse princípio ativo e como base para o entendimento de seus efeitos biológicos em animais. Além disso, McLTP<sub>1</sub> se mostrou resistente à digestão com pepsina e foi identificada como um alérgeno em bancos de dados especializados (AllerTOP, *Allergome*, SDAP, ADFS, *Allergen on-line*), sendo necessários estudos *in vivo* de investigação de seus efeitos sobre o sistema imune, como análise de sua segurança farmacológica, para o futuro desenvolvimento de um fármaco, utilizando-se McLTP<sub>1</sub> como princípio ativo. Com a caracterização estrutural da proteína em estudo, espera-se obter informações relevantes para o entendimento de seu mecanismo de ação nos processos de inflamação e dor, bem como informações acerca de sua alergenicidade e segurança para uso clínico.

Sendo assim, as seguintes perguntas guiaram o desenvolvimento desta dissertação:



- *Existe algum parâmetro estrutural de  $McLTP_1$  que permitiria um entendimento mais aprofundado sobre a função biológica dessa proteína?*
- *$McLTP_1$  sofreria alterações estruturais frente a mudanças de temperatura, pH, uso de agentes redutores, diferentes detergentes?*
- *$McLTP_1$  teria um efeito citotóxico em diferentes linhagens de células normais e tumorais?*
- *Seria  $McLTP_1$  uma proteína alergênica?*
- *Anti- $McLTP_1$  seria capaz de reconhecer proteínas presentes em extratos de frutos da família Rosaceae e Cucurbitaceae?*

## 2 HIPÓTESE

*McLTP<sub>1</sub>* é uma proteína transferidora de lipídeos que segue padrões estruturais similares às proteínas do seu grupo e apresenta efeitos citotóxicos em células tumorais e alergênicos em camundongos.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Caracterizar bioquimicamente e avaliar o potencial citotóxico e alergênico de *McLTP*<sub>1</sub>, uma proteína isolada de sementes de Noni (*M. citrifolia* L.).

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar os possíveis efeitos de *McLTP*<sub>1</sub> sobre as atividades da tripsina, quimotripsina, papaína e  $\alpha$ -amilase.
- Analisar o padrão de oligomerização de *McLTP*<sub>1</sub> através de microscopia de força atômica.
- Obter espectros de dicroísmo circular e fluorescência de *McLTP*<sub>1</sub> em condições nativas, diferentes pHs, temperaturas, agentes redutores e detergentes.
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* de *McLTP*<sub>1</sub> em diferentes linhagens de células tumorais.
- Determinar a atividade hemolítica de *McLTP*<sub>1</sub>.
- Avaliar a alergenicidade *in silico* de *McLTP*<sub>1</sub>, tomando como base o seu N-terminal.
- Investigar a atuação de *McLTP*<sub>1</sub> na possível indução de respostas humorais em camundongos (alergenicidade).
- Verificar se *McLTP*<sub>1</sub> apresenta reações cruzadas com outras LTPs de plantas pertencentes às famílias Rosaceae e Cucurbitaceae e com a polpa do fruto de noni.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### Parte I – Caracterização bioquímica e análises estruturais da proteína transferidora de lipídeos isolada das sementes de *Morinda citrifolia* L. (McLTP<sub>1</sub>)

#### 4.1 Material Biológico

As sementes de noni (*Morinda citrifolia* var. *citrifolia*, Exsicata: N° 44.566, Herbário Prisco Bezerra - UFC) foram fornecidas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Centro Nacional de Pesquisa de Agroindústria Tropical (CNPAT – EMBRAPA, Fortaleza – Ceará), oriundas da Fazenda Antônio Alberto (latitude: 3°19'54.59"S/longitude: 39°18'50.89"O), no município do Trairí – Ceará. Após a obtenção, as sementes foram trituradas em moinho elétrico de café, de modo a produzir uma farinha fina. Posteriormente, a farinha foi tratada com éter de petróleo (1:10, m/v), à temperatura ambiente, para completa remoção dos lipídeos. A farinha delipidada foi armazenada em frascos fechados a 4 °C, até o uso nos processos de purificação de McLTP<sub>1</sub>.

#### 4.2 Reagentes

Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), ácido tricloroacético (TCA), *N*- $\alpha$ -benzoil-DL-arginina-*p*-nitroanilida (BAPNA), *N*- $\alpha$ -benzoil-DL-arginina-*p*-naftilamida (BANA), 4-dimetilaminocinamaldeído (DMACA), azocaseína, tripsina de pâncreas bovino,  $\alpha$ -quimotripsina de pâncreas bovino ( $\geq 40$  unidades/mgP), ácido dinitrosalicílico (DNS), papaína do látex de papaia ( $\geq 10$  unidades/mgP), ditiotretol (DTT), *N*-hexadecil-N, N-dimetil-3-amônio-1-propanosulfonato (HPS), brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), dodecil sulfato de sódio (SDS), acrilamida, bis-acrilamida, persulfato de amônio, N, N, N', N'-Tetrametiletlenodiamina (TEMED), Coomassie Brilliant Blue G-250 foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EUA).

Os marcadores de massa molecular (LMW-SDS Marker Kit) e a matriz cromatográfica Superose 12 10/300 foram obtidos da GE Healthcare Life Sciences

(NY, EUA). Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico e obtidos comercialmente.

#### **4.3 Purificação de *McLTP*<sub>1</sub> a partir das sementes de Noni**

*McLTP*<sub>1</sub> foi purificada a partir de sementes de noni seguindo a metodologia descrita por Campos *et al.* (2015). Brevemente, após a etapa de extração das proteínas das sementes de noni, foi realizada uma precipitação em ácido tricloroacético (TCA) 2,5% a 4 °C, por 30 minutos. A fração solúvel em TCA foi dialisada exaustivamente contra água destilada, em membrana de *cut off* de 12 kDa, a 4 °C, sob agitação moderada. Amostras (1 mgP) da fração solúvel em TCA 2,5% foram liofilizadas e aplicadas em matriz de Superose 12 10/300, previamente equilibrada com Tris-HCl 50 mM, pH 8,5, NaCl 250 mM. Para eluição das proteínas, a matriz foi percolada (4 °C, em fluxo de 20 mL/hora) com tampão de equilíbrio. As frações (1 mL) obtidas nos processos cromatográficos foram monitoradas através de absorbância a 280 nm e analisadas eletroforeticamente (LAEMMLI, 1970) para verificar o grau de pureza do material obtido. Posteriormente, as frações correspondentes a *McLTP*<sub>1</sub> foram dialisadas contra água destilada em membrana de *cut off* de 12 kDa, a 4 °C sob agitação moderada, liofilizadas e utilizadas nas demais etapas do trabalho.

#### **4.4 Determinação da atividade inibitória de tripsina de *McLTP*<sub>1</sub>**

A atividade inibitória de *McLTP*<sub>1</sub> contra tripsina bovina (E.C. 3.4.21.4) foi avaliada seguindo a metodologia descrita por Erlanger, Kokowski e Cohen (1961) utilizando BAPNA como substrato cromogênico. A concentração de enzima utilizada foi determinada previamente através de uma curva padrão de modo a produzir valores de absorbância da ordem de 0,25 a 0,30 e uma taxa de reação correspondente a  $\frac{1}{2}V_{\text{máx}}$ . O meio reacional para avaliação do efeito de *McLTP*<sub>1</sub> sobre a tripsina apresentou: 100 µL da amostra de *McLTP*<sub>1</sub> (0,2 mg/mL) dissolvido em água destilada; 10 µL de tripsina (0,3 mg/mL preparada em 1 mM de HCl) e 690 µL de Tris-HCl 50 mM, contendo 20 mM de CaCl<sub>2</sub>, pH 7,5. A mistura reacional foi incubada por 10 minutos a 37 °C, adicionando-se em seguida 500 µL de BAPNA

(N $\alpha$ -Benzoil-DL-arginina p-nitroanilida) 1,25 mM dissolvido no tampão acima. Após 15 min a 37 °C, a reação foi parada pela adição de ácido acético 30% (120  $\mu$ L). A atividade enzimática na presença e ausência de *McLTP*<sub>1</sub> foi avaliada pela liberação de p-nitroanilida a partir do BAPNA e medida em 410 nm utilizando espectrofotômetro Biochrom Libra S-12. Uma (01) unidade de atividade inibitória de tripsina (UI) foi definida como o decréscimo de 0,01 unidades de absorbância em 15 minutos de ensaio a 37 °C. O ensaio foi realizado em triplicata e os brancos para a enzima, *McLTP*<sub>1</sub> e substrato foram realizados ao longo do teste. Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média da atividade específica (UI/mgP) encontrada.

#### **4.4.1 Avaliação do efeito inibitório de tripsina de *McLTP*<sub>1</sub> em diferentes pHs e temperaturas**

Com o objetivo de avaliar o efeito da temperatura sobre a atividade inibitória de tripsina de *McLTP*<sub>1</sub>, amostras dessa proteína (0,2 mg/mL) preparadas em água Milli-Q foram incubadas por 30 minutos, nas temperaturas de 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 °C e, após resfriamento, foram testadas quanto à atividade inibitória de tripsina utilizando o mesmo ensaio descrito no item 4.4. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados expressos como percentual de atividade inibitória de tripsina (atividade residual) em relação ao efeito obtido em 37 °C.

Para avaliar os efeitos de diferentes pHs sobre a atividade de *McLTP*<sub>1</sub>, amostras da proteína foram preparadas em diferentes tampões de modo a perfazer 0,2 mgP/mL, a saber: Tampão glicina 50 mM, pH 3,0; Tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,0; Tris-HCl 100 mM, pH 8,0 e Tampão borato 100 mM, pH 12. Após o preparo, as soluções de *McLTP*<sub>1</sub> foram deixadas em repouso por 30 minutos e, em seguida, foram avaliadas quanto ao seu efeito inibitório de tripsina, segundo a metodologia já citada. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados expressos como percentual de atividade inibitória de tripsina (atividade residual) em relação ao efeito obtido em pH 7,5.

#### 4.5 Avaliação da atividade inibitória de quimotripsina de *McLTP<sub>1</sub>*

A atividade inibitória de *McLTP<sub>1</sub>* sobre a quimotripsina foi avaliada segundo metodologia descrita por Erlanger, Kokowski e Cohen (1961). Vinte microlitros de uma solução de quimotripsina bovina (E.C. 3.4.21.1) 0,1 mg/mL em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, contendo NaCl 20 mM foram pré-incubados com 100  $\mu$ L *McLTP<sub>1</sub>* (0,2 mg/mL) preparada em água destilada, por 15 minutos, a 37 °C. Após esse período, foram adicionados 200  $\mu$ L de uma solução de azocaseína 1% em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5. Passados 30 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 300  $\mu$ L de TCA 20%. A mistura foi centrifugada a 10.000 x g, por 10 minutos, 25 °C. Alíquotas dos sobrenadantes foram retiradas e foi adicionada uma solução de NaOH 2 M, na proporção de 1:1 (v/v), visando intensificar a coloração do produto de clivagem. A leitura das absorbâncias foi realizada a 440 nm, sendo analisadas as unidades de inibição (UI), representadas pela diminuição de 0,01 da absorbância da atividade da enzima. Os ensaios foram realizados em triplicata e expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média da atividade específica encontrada.

#### 4.6 Avaliação da atividade inibitória de papaína (E.C. 3.4.22.2)

A atividade anti-papainásica de *McLTP<sub>1</sub>* foi determinada segundo metodologia descrita por Abe *et al.* (1992). Para o ensaio foi utilizada uma solução de papaína do látex de papaia (20  $\mu$ g/mL) preparada em tampão fosfato 250 mM, pH 6,0, com atividade proteolítica correspondente a valores de absorbância de 0,2 a 0,3. Sessenta microlitros dessa solução de enzima (definidos através de uma curva padrão) foram misturados com 40  $\mu$ L de uma solução ativadora (tampão fosfato de sódio 250 mM, pH 6,0, contendo EDTA 2 mM e DTT 3 mM), 200  $\mu$ L da amostra *McLTP<sub>1</sub>* preparada em água Milli-Q (0,2 mg/mL) e 200  $\mu$ L de tampão fosfato de sódio 250 mM, pH 6,0. O meio reacional foi imediatamente incubado em banho-maria a 37 °C, por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 200  $\mu$ L do substrato BANA (Hidrocloreto de N $_{\alpha}$ -Benzoil-DL-arginina-2-naftilamida) 1 mM. Após 20 minutos da adição do substrato, a reação foi interrompida com 500  $\mu$ L de HCl 2% (preparado em etanol). Decorridos 5 minutos em temperatura ambiente (25 °C), foram adicionados

500  $\mu$ L do cromógeno DMACA (4-dimetilaminocinamaldeído) 0,06%, dissolvido em etanol e, após 30 minutos, a absorbância foi lida a 540 nm. Uma unidade de atividade antipapainásica (UI) foi definida como sendo a quantidade de inibidor que diminui a atividade da papaína (controle) em 0,01 da absorbância a 540 nm. Em adição, foi também determinado o percentual de inibição da papaína comparando-se o efeito inibitório com a atividade enzimática na ausência de *McLTP*<sub>1</sub>. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e com provas em branco, onde a reação foi parada com HCl 2% preparado em etanol antes da adição do substrato (BANA).

#### **4.7 Avaliação da atividade inibitória de $\alpha$ -amilase (E.C. 3.2.1.1)**

O ensaio de inibição de  $\alpha$ -amilase foi realizado utilizando-se o ácido dinitrosalicílico (DNS), segundo metodologia descrita por Sudah *et al.* (2011). A mistura de 20  $\mu$ L de solução de  $\alpha$ -amilase de saliva humana (0,1 mg/mL) em tampão fosfato 20 mM, pH 6,9, contendo NaCl 6 mM, com 60  $\mu$ L da amostra de *McLTP*<sub>1</sub> (0,2 mgP/mL) teve seu volume completado para 250  $\mu$ L com o mesmo tampão e incubada em banho-maria a 37 °C, por 10 minutos. A reação foi iniciada pela adição de 250  $\mu$ L de solução de amido 1% e a mistura foi novamente incubada a 37 °C, por 15 minutos. Posteriormente, a reação foi parada com adição de 500  $\mu$ L de solução de ácido dinitrosalicílico. A mistura foi levada a banho-maria fervente por 5 minutos e, então, diluída com 2,5 mL de água destilada e resfriada a temperatura ambiente. A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 540 nm. Uma unidade de atividade  $\alpha$ -amilásica é definida como o aumento de absorbância de 0,1 no intervalo de 30 minutos. Os ensaios foram realizados em triplicata, sendo a atividade inibitória de  $\alpha$ -amilase expressa como percentual de atividade em relação ao controle reacional (100% de atividade na ausência de *McLTP*<sub>1</sub>).

#### **4.8 Análise por microscopia de força atômica (AFM)**

Foi realizada a análise do padrão de oligomerização de *McLTP*<sub>1</sub>, utilizando-se o Microscópio de Força Atômica do Laboratório de Microscopia Avançada (Departamento de Física - UFC). *McLTP*<sub>1</sub> (0,21 mg/mL) foi solubilizada em água Milli-Q, e então centrifugada a 10.000 x *g*, por 5 minutos, a 4 °C. Em seguida,



foram aplicados 10  $\mu$ L da proteína diretamente em uma superfície de mica e incubada em dessecador por 30 minutos. As imagens foram geradas através do equipamento Nanoscope Multimode IIIa (Bruker). O método utilizado foi o de varredura por contato intermitente (*tapping mode*) utilizando-se uma sonda de cantilever retangular (TESP - Bruker) com constante de mola de 42 N/m. As imagens foram adquiridas com varreduras de 0.5 Hz e resolução de 512 x 512 linhas (máximo do equipamento). As medidas foram realizadas em temperatura ambiente, sendo feitos 40 conjuntos de medidas para a obtenção do padrão de oligomerização de *McLTP*<sub>1</sub>.

#### **4.9 Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD) de *McLTP*<sub>1</sub> nativa e em diferentes condições experimentais**

O espectro de dicroísmo circular de *McLTP*<sub>1</sub> nativa foi obtido a partir de uma solução de proteína 0,2 mg/mL, diluída em água Milli-Q, pH 7,0. As medidas foram realizadas em espectropolarímetro Jasco, modelo J - 715, em um intervalo de 185 a 280 nm, utilizando-se cubeta de quartzo de 0,1 cm de caminho óptico. Ao todo, foram realizadas 16 varreduras para definição do espectro da proteína em estudo. As análises foram feitas no Instituto de Física de São Carlos (USP) - Grupo de Biofísica Molecular Sérgio Mascarenhas - sob a tutoria da Profa. Dra. Leila Maria Beltramini. Os espectros foram analisados quanto à contribuição de estrutura secundária com o pacote de programas de desconvolução CDPPro (SELCON 3, CONTIN/LL, CDSSTR), que extrai as componentes comuns dos espectros de CD. Para desconvolução, os espectros foram transformados em elipticidade molar  $[\theta]$ . A contribuição do meio onde a proteína foi solubilizada foi subtraída de todas as análises.

A estabilidade térmica de *McLTP*<sub>1</sub> foi também determinada utilizando-se espectroscopia de dicroísmo circular frente a diferentes temperaturas. As amostras de *McLTP*<sub>1</sub> 0,2 mg/mL foram solubilizadas em água Milli-Q, pH 7,0 e analisadas em 16 varreduras no intervalo de 185 a 280 nm. Foram analisadas variações nos espectros de CD da proteína em estudo em três protocolos distintos e citados abaixo:

**Protocolo 01** – Obtenção do espectro de CD de *McLTP<sub>1</sub>* na faixa de temperatura de 15 °C a 95 °C. Neste protocolo a proteína foi incubada na faixa indicada, com variação de 10 °C e tempo de 10 minutos para cada temperatura, antes da tomada dos espectros de CD.

**Protocolo 02** - Obtenção do espectro de CD de *McLTP<sub>1</sub>* na faixa de temperatura de 20 °C a 85 °C. Protocolo realizado de acordo com os parâmetros definidos no protocolo 01 à exceção das temperaturas avaliadas e com variação de 5 °C.

**Protocolo 03** - Obtenção do espectro de CD de *McLTP<sub>1</sub>* na faixa de temperatura aquecida a 95 °C e, em seguida, resfriada a 20 °C.

Espectros de CD de *McLTP<sub>1</sub>* (0,2 mg/mL em água Milli-Q) foram também obtidos para amostra da proteína, incubada por 4 horas, em tampão acetato/borato/fosfato de sódio 50 mM, em diferentes valores de pH (3,0, 7,0 e 11,0), antes da tomada dos espectros, bem como em soluções contendo: DTT 1 mM (30 min de incubação). Foram realizadas análises espectroscópicas de *McLTP<sub>1</sub>* em presença de micelas iônicas como: HPS 10 mM; SDS 10 mM e CTAB 1mM (30 min de incubação). Tal como descrito nos protocolos anteriores, foram feitas 16 varreduras em cada condição testada.

#### **4.10 Espectroscopia de Fluorescência de *McLTP<sub>1</sub>***

Os espectros de fluorescência de *McLTP<sub>1</sub>* foram determinados partindo-se de amostras de 0,045 mg/mL da proteína completamente solubilizadas em água Milli-Q, pH 7,0, as quais foram excitadas em 280 nm, e seus espectros de emissão registrados de 295 nm a 450 nm em espectrofluorímetro ISS K2 utilizando-se cubeta de quartzo retangular, de 1 cm de caminho óptico. Os espectros foram obtidos na temperatura de 25 °C e também na temperatura de 70 °C. Nesse último tratamento, as amostras foram incubadas por 30 min na temperatura indicada antes da coleta de dados. Os espectros de fluorescência de *McLTP<sub>1</sub>* foram ainda determinados em amostras de proteínas previamente incubadas com SDS 10 mM (30 minutos) e DTT 1mM (30 minutos antes da leitura).

## Parte II – Atividades Biológicas de *McLTP*<sub>1</sub>

### 4.11 Ensaio com animais

Os testes de alergenicidade *in vivo* foram realizados utilizando-se camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*) fêmeas, com massa corpórea variando entre 25 e 30 gramas fornecidos pelo Biotério Central da UFC. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, recebendo água e ração *ad libitum* e aclimatados, em ciclo claro/escuro de 12 horas antes da realização dos experimentos. Após o término dos protocolos experimentais, os camundongos foram eutanasiados através da inalação por halotano. O protocolo experimental de alergenicidade foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética de Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC) sob o número 37/2013.

A produção de anticorpos policlonais anti-*McLTP*<sub>1</sub>, usados nos ensaios de imunodeteção, foi realizada em coelho albino macho, da raça Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*), adquirido do coelhário do Departamento de Zootecnia (UFC), com 8 a 12 semanas de idade, mantido em gaiola apropriada e em temperatura não superior a 25 °C. Todos os procedimentos com animais foram realizados de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (CONCEA, 2013).

### 4.12 Reagentes e soluções

Albumina sérica bovina (BSA), 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT), imunoglobulinas anti-IgG e anti-IgG1 de camundongos produzidas em cabra (conjugadas com peroxidase), ortofenilenodiamina (OPD), imunoglobulina anti-IgG de coelho produzida em cabra (conjugada com fosfatase alcalina), 5-bromo-4-cloro-3-indoil-fosfato/nitro blue tetrazolium BCIP/NBT foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EEUU).

#### 4.13 Análise da Citotoxicidade em Diferentes Linhagens Tumorais

Foi realizada a análise de citotoxicidade de  $McLTP_1$ , pelo método do MTT, que vem sendo utilizado no programa de *screening* do *National Cancer Institute* dos Estados Unidos (NCI), que testa mais de 10.000 amostras a cada ano (SKEHAN *et al.*, 1990). É um método rápido, sensível e barato. A metodologia foi descrita primeiramente por Mosmann (1983), tendo a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas.

As células tumorais, HCT-116 (côlon – humano), HL-60 (leucemia – humano) Ovcara-8 (ovário – humano) e SF-295 (glioblastoma – humano), obtidas através de doação do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (Bethesda, MD), foram plaqueadas nas concentrações de  $0,1 \times 10^6$  células/mL para as linhagens Ovcara-8 e SF-295 e  $0,7 \times 10^5$  células/mL para a linhagem HCT-116 e  $0,3 \times 10^6$  células/mL para a linhagem leucêmica HL-60. Após 24 horas, a amostra de  $McLTP_1$  (2mg/mL) foi incubada juntamente com as células em concentrações seriadas, sendo a maior e a menor concentração testadas de 50 e 0,05  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Posteriormente, as placas foram incubadas por 69 horas em estufa a 5% de  $\text{CO}_2$  a 37 °C. Ao término desse período, as mesmas foram centrifugadas e o sobrenadante removido. Em seguida, foram adicionados 150  $\mu\text{L}$  da solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram incubadas por 3 horas. Como controle positivo foi utilizada a doxorubicina (50 mg/mL), diluída em PBS estéril (Tampão fosfato de sódio  $3,5 \times 10^{-2}$  M, contendo 0,15 M NaCl, pH 7,0), sendo a maior e a menor concentração de 5 e 0,009  $\mu\text{g/mL}$ . A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com 150  $\mu\text{L}$  de dimetilsulfóxido (DMSO) puro, em espectrofotômetro de placa a 595nm. Os ensaios foram realizados em triplicata e foram expressos como valores de concentração inibitória média ( $CI_{50}$ ) e 95% de intervalo de confiança para células tumorais de cólon (HCT-116), células leucêmicas (HL-60), ovário (Ovcara-8) e glioblastoma (SF-295).

#### 4.13.1 Atividade Hemolítica

A atividade hemolítica de *McLTP*<sub>1</sub> foi avaliada utilizando-se uma suspensão de hemácias de coelho 2,5% em PBS (Tampão fosfato de sódio  $3,5 \times 10^{-2}$  M, contendo 0,15 M NaCl, pH 7,0). Alíquotas de 25  $\mu$ L dessa suspensão de hemácias foram transferidas para placas de 96 poços e incubadas com 25  $\mu$ L de *McLTP*<sub>1</sub> (concentrações: 0,750, 0,375, 0,190, 0,090, 0,040, 0,020, 0,010 e 0,005 mg/mL) solubilizada em NaCl 0,15 M, por 30 minutos, a 37 °C seguida de centrifugação a  $5.000 \times g$ , por 5 minutos. A taxa de hemólise (%) foi determinada pela medida da absorbância do sobrenadante a 540 nm. Como controles foram utilizados: Triton X-100 0,1% (v/v) e NaCl 0,9% ou BSA (1 mg/mL). Os valores de absorbância do grupo NaCl 0,15 M foram considerados como 0% de hemólise, ao passo que os valores de absorbância do Triton X-100 foram considerados como controle positivo, com 100% de hemólise. Os experimentos foram feitos em triplicata, com uma repetição.

#### 4.14 Predição da alergenicidade *in silico* de *McLTP*<sub>1</sub>

Pesquisa *in silico* foi conduzida para avaliar o grau de similaridade da sequência N-terminal de aminoácidos presentes em *McLTP*<sub>1</sub> (AVPCGQVSSALSPCMSYLTGGGDDPEARCCAGV) com sequências de proteínas reconhecidamente alergênicas para o homem. Inicialmente, com a sequência N-terminal de *McLTP*<sub>1</sub> utilizou-se a ferramenta de bioinformática AllerTOP 1.0 para predição de alergenicidade, com base nas principais propriedades físico-químicas das proteínas, prevendo a rota mais provável de exposição ao alérgeno: alimento, inalante ou toxina, com sensibilidade de 94% em comparação com outras ferramentas (DIMITROV; FLOWER; DOYTCHINOVA, 2013).

Adicionalmente, pesquisa *in silico* foi conduzida para avaliar o grau de similaridade da sequência N-terminal de aminoácidos de *McLTP*<sub>1</sub> com sequências de proteínas reconhecidamente alergênicas, utilizando os critérios estabelecidos pela FAO/WHO (2001). A sequência N-terminal de *McLTP*<sub>1</sub> foi comparada às sequências de alérgenos depositadas nos seguintes bancos de dados: (1) *Allergome*, (<http://www.allergome.org>); (2) *Structural Database of Allergenic Proteins*

(SDAP), da Universidade do Texas, USA (<http://fermi.utmb.edu/SDAP>); (3) *Allergen Database for Food Safety* (ADFS) (<http://allergen.nihs.go.jsp>) e (4) *Allergen Online version 15 database*, da Universidade de Nebraska em Lincoln (<http://www.allergenonline.com>). A sequência N-terminal de *McLTP<sub>1</sub>* foi submetida a comparações do tipo FASTA completa (*Full FASTA*), usando como filtro (*cut-off*) *E-value* < 0,01, na detecção de identidade > 35% (AALBERSE, 2000).

#### 4.15 Avaliação da Alergenicidade *in vivo* de *McLTP<sub>1</sub>*

Para avaliação da alergenidade *in vivo* de *McLTP<sub>1</sub>*, grupos de camundongos ( $n = 8$ ) foram imunizados por via oral com doses de 10 µg e 50 µg da proteína diluída em água destilada, por 10 dias consecutivos (1 dose/dia). Os animais receberam um reforço de *McLTP<sub>1</sub>* 21 dias após o início da imunização. O grupo controle recebeu apenas solução salina. Amostras de sangue dos animais foram coletadas através de sangrias pelo plexo retro-orbital, nos dias 7, 14, 21, 28, 35 e 42, após o início do procedimento de imunização. As amostras foram mantidas por 15 minutos a 37 °C e posteriormente, centrifugadas a 3.000 x *g*, por 5 minutos. Os soros da resposta primária (dias 7, 14 e 21) denominados de 1º *pool* e os soros da resposta secundária (dias 28, 35 e 42) denominados de 2º *pool*, de cada grupo foram reunidos separadamente e armazenados a - 4 °C.

A determinação de anticorpos específicos anti-*McLTP<sub>1</sub>* foi feita utilizando-se o método de Elisa indireto. Para esse teste, as placas de 96 poços foram sensibilizadas com *McLTP<sub>1</sub>* (1 µg proteína/poço) diluída em salina tamponada (PBS 1 M – NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 8 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,3 mM, NaCl 130 mM, pH 7,4). As placas foram incubadas durante a noite, a 4 °C e lavadas no dia seguinte com PBS-Tween 20 (0,05%) e bloqueadas durante 2 horas, a 37 °C com PBS contendo 5% de leite desnatado em pó. Após a lavagem das placas, os anticorpos anti-*McLTP<sub>1</sub>* foram diluídos em tampão de bloqueio (1:100) e adicionados às placas, sendo novamente incubadas durante 2 horas, a 37 °C. As placas foram lavadas e as imunoglobulinas conjugadas com peroxidase anti-IgG e anti-IgG1 de camundongos, produzidas em cabra foram adicionadas às placas (1:1000) e incubadas durante 2 horas, a 37 °C. A reação foi revelada pela adição de ortofenilenodiamina (OPD) e as placas foram incubadas durante 20 minutos, a 37 °C. A reação foi interrompida pela adição de 20

$\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2,5 N e a intensidade da reação foi avaliada por espectrofotometria em comprimento de onda de 492 nm.

#### **4.16 Produção de anticorpos policlonais anti- *McLTP*<sub>1</sub>**

Antes do início do processo de imunização, uma amostra de sangue do coelho foi utilizada para obtenção do soro pré-imune. O coelho (Nova Zelândia) foi imunizado com uma emulsão contendo cerca de 200  $\mu\text{g}$  de *McLTP*<sub>1</sub>, obtidos a partir de bandas provenientes de géis de poliacrilamida 15%. Após a corrida eletroforética, os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue 0,25% para detecção e excisão das bandas referentes à *McLTP*<sub>1</sub>, as quais foram descoradas e maceradas em 0,5 mL de NaCl 0,15 M estéril. Foram administrados pela via subcutânea 200  $\mu\text{g}$  do antígeno em dez sítios dispostos bilateralmente ao longo da região tóraco-lombar da coluna vertebral do animal. Após 21 dias da primeira inoculação, foi realizada a aplicação novamente de 200  $\mu\text{g}$  de *McLTP*<sub>1</sub>, também pela via subcutânea. A segunda imunização foi acompanhada pela coleta de cerca de 10 mL de sangue, para obtenção do primeiro soro imune. Duas outras coletas (10 mL) foram realizadas em intervalos de 10 dias após a segunda imunização, sendo essas também acompanhadas pela administração de 200  $\mu\text{g}$  de antígeno. Os anti-soros obtidos nas coletas foram reunidos, precipitados com sulfato de amônio sólido a 33% de saturação e, em seguida, dialisados em trocas alternadas com água destilada e tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0, a cada 6 horas, durante três dias. O dialisado (última troca realizada com água Milli-Q) foi centrifugado (15.000 x g, 20 minutos, 4 °C) e o sobrenadante liofilizado e armazenado a 2 °C para posterior uso nos experimentos de imunodetecção.

##### **4.16.1 Determinação do Título dos Anticorpos Policlonais anti-*McLTP*<sub>1</sub>**

O ensaio de ELISA indireto foi realizado para determinação do título dos anticorpos policlonais produzidos anti-*McLTP*<sub>1</sub>. Utilizou-se uma placa de 96 poços que foi sensibilizada com 150  $\mu\text{L}$  da amostra de *McLTP*<sub>1</sub> (10  $\mu\text{g}$  amostra/poço) diluídas em tampão carbonato ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  15 mM e  $\text{NaHCO}_3$  35 mM, pH 9,6). A placa foi incubada durante a noite, a 4 °C e lavada no dia seguinte com tampão PBS (1 M

– NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 8 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,3 mM, NaCl 130 mM, pH 7,4, contendo 0,05% Tween 20) e bloqueada durante 2 horas, a 37 °C com 200 µL de BSA (10mg/mL, diluída em PBS) em cada poço. Após a lavagem da placa, os anticorpos anti-McLTP<sub>1</sub> foram diluídos em tampão PBS nas seguintes diluições: 1:1000, 1:2000, 1:5000, 1:10000, 1:20000 (v/v), sendo adicionados 150 µL em cada poço, incubando-se novamente a placa por 2 horas, a 37 °C. Posteriormente, a placa foi lavada e em seguida, 150 µL de IgG de cabra anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina foram adicionados à placa (1:5000), diluída em PBS, sendo incubada durante 2 horas, a 37 °C. A reação foi revelada pela adição de 150 µL do substrato (p-nitrofenil fosfato dissódico, diluído em água destilada) na concentração de 1 mg/mL e deixado em repouso por 30 minutos, protegido da luz. A reação foi parada com a adição de 50 µL de hidróxido de sódio (4 N) e em seguida, a leitura da absorbância foi realizada a 405 nm em leitor de ELISA. Foi utilizado como controle experimental, o soro pré-imune do coelho (1:1000 v/v, diluído em tampão PBS). O ensaio foi realizado em triplicata e o branco foi subtraído das leituras.

#### **4.17 Determinação de Reações Cruzadas em Extratos Proteicos de Cascas de Maçã, Pêssego, Melão e Polpa do Noni**

As LTPs usualmente se acumulam nas camadas epidérmicas externas de órgãos de plantas, o que explica a alergenicidade maior nas cascas do que nas polpas dos frutos da família Rosaceae, na qual fazem parte a maçã e o pêssego (VAN REE, 2002). Gandolfo-Cano *et al.* (2014) demonstrou que a LTP isolada da casca do melão é o principal alérgeno evidenciado nesse fruto, com capacidade de provocar urticária de contato em pacientes que são alérgicos à casca do melão.

Utilizou-se a técnica de *Dot Blotting* e o ensaio de ELISA indireto, para a detecção de reações cruzadas do anticorpo produzido anti- *McLTP<sub>1</sub>* com extratos proteicos das cascas de maçã (*Malus domestica*), pêssego (*Prunus persica*), melão (*Cucumis melo*) e polpa do noni (*Morinda citrifolia*).

Seguiu-se a metodologia descrita por Sánchez-Monge *et al.* (1999) para a preparação do extrato proteico das cascas de maçã (“gala”) e pêssego (“nacional”). Utilizou-se 100 g de casca provenientes de frutos higienizados e adquiridos comercialmente. As cascas foram maceradas e colocadas em contato com o tampão



de extração composto por fosfato de sódio 0,1 M e NaCl 150 mM, pH 7,0, na proporção 1:10 m/v, sob agitação, por uma hora a 4 °C. Os materiais obtidos foram filtrados e os sobrenadantes foram dialisados por 24 horas contra água destilada, em membrana de *cut off* de 8 kDa e liofilizados, sendo armazenados em – 20 °C até a utilização nos ensaios de reação cruzada.

Para a preparação do extrato proteico da casca de melão (“amarelo nacional”), utilizou-se a metodologia descrita por Gandolfo-Cano *et al.* (2014). Foram utilizados 100 g de casca em tampão PBS (fosfato de sódio 0,1 M e NaCl 150 mM, pH 7,5, 1:10 m/v), sob agitação, por 3 horas, em temperatura ambiente. Após a extração, o material foi filtrado, dialisado por 24 horas contra água destilada, em membrana de *cut off* de 8 kDa e liofilizado para posterior utilização.

Para a obtenção do extrato proteico da polpa do noni foram pesados 25g, adicionando-se tampão PBS (fosfato de sódio 50 mM e NaCl 150 mM, pH 7,0, 1:5 m/v), sob agitação, por 1 hora, a 4 °C. Após a extração, o material foi centrifugado a 10.000 x *g*, 30 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi então dialisado por 24 horas contra água destilada, em membrana de *cut off* de 12 kDa e liofilizado em seguida.

Para o ensaio do *Dot Blotting*, utilizou-se 10 µL de *McLTP*<sub>1</sub> (1,5 mg/mL em água destilada), que foram aplicados sobre membrana de nitrocelulose e deixados secar. Foi adicionado tampão de bloqueio de sítios inespecíficos (NaCl 0,13 M, KCl 25 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,7 M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5,3 M, pH 7,4) com 5% de leite desnatado em agitação por 2 horas. Após a lavagem com tampão de bloqueio sem leite, a membrana foi incubada com anticorpo primário produzido no coelho, que foi preparado a partir de uma solução contendo 1 mg de anticorpo em 1 mL de tampão de bloqueio sem leite, nas diluições de 1:100, 1:500 e 1:1000 (v/v), a 37 °C. Após a lavagem com tampão de bloqueio sem leite, o anticorpo secundário 1:5000 (IgG de cabra anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina) foi adicionado à membrana por 2 horas em agitação, a 37 °C. Após a última lavagem com tampão de bloqueio, a membrana foi revelada com o substrato cromogênico da fosfatase alcalina 5-bromo-4-cloro-3-indoil-fosfato/nitro blue tetrazolium BCIP/NBT. Foi utilizado como controle experimental, o soro pré-imune do coelho. Após essa etapa, para a determinação de reações cruzadas com os anticorpos anti-*McLTP*<sub>1</sub> produzidos em coelho, foi seguida a metodologia descrita anteriormente, utilizando o anticorpo anti-*McLTP*<sub>1</sub> na diluição de 1:500 (v/v) e aplicando-se 10 µL de *McLTP*<sub>1</sub>

(1,5 mg/mL); 10 µL de extrato proteico de maçã (0,18 mg/mL); 10 µL de extrato proteico de melão (0,92 mg/mL); 10 µL de extrato proteico de pêssego (0,18 mg/mL); 10 µL de extrato proteico da polpa do noni (0,35 mg/mL) em membrana de nitrocelulose.

Foi realizado também o ensaio de ELISA indireto, para a determinação de reações cruzadas em extratos proteicos de maçã, pêssego, melão e polpa do noni, com os anticorpos anti-McLTP<sub>1</sub> produzidos em coelho. Para esse ensaio, a placa de 96 poços foi sensibilizada com 150 µL das amostras dos extratos proteicos de maçã, pêssego, melão e polpa do noni (12,5 µg amostra/poço) diluídas em tampão carbonato (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 15 mM e NaHCO<sub>3</sub> 35 mM, pH 9,6). A placa foi incubada durante a noite, a 4 °C e lavada no dia seguinte com tampão PBS (1 M – NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 8 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,3 mM, NaCl 130 mM, pH 7,4, contendo 0,05% Tween 20) e bloqueada durante 2 horas, a 37 °C com 200 µL de BSA (10mg/mL, diluída em PBS) em cada poço. Após a lavagem da placa, os anticorpos anti-McLTP<sub>1</sub> foram diluídos em tampão PBS (1:10000, título determinado pelo método do ELISA indireto) e adicionados 150 µL em cada poço, sendo novamente incubada por 2 horas, a 37 °C. A placa foi lavada e em seguida, 150 µL de IgG de cabra anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina foram adicionados à placa (1:5000), diluído em PBS, sendo posteriormente incubada durante 2 horas, a 37 °C. A reação foi revelada pela adição de 150 µL do substrato (p-nitrofenil fosfato dissódico, diluído em água destilada) na concentração de 1 mg/mL e deixado em repouso por 30 minutos, protegido da luz. A reação foi parada com a adição de 50 µL de hidróxido de sódio (4 N) e em seguida a leitura da absorbância foi realizada em 405 nm em leitor de ELISA. O ensaio foi realizado em triplicata e o branco foi subtraído das leituras. As médias das amostras dos extratos proteicos de maçã, pêssego, melão e polpa do noni foram comparadas à média da amostra de McLTP<sub>1</sub>.

#### **4.18 Análise Estatística**

Os resultados experimentais foram expressos como média ± desvio padrão da média e foram analisados utilizando o software GraphPad Prism v.5.03 (GraphPad Inc., San Diego, CA). Para comparação de médias foi utilizada a Análise

de Variância (ANOVA) e testes de comparações múltiplas de Tukey, sendo considerados como significativos os resultados que apresentaram  $P < 0,05$ .

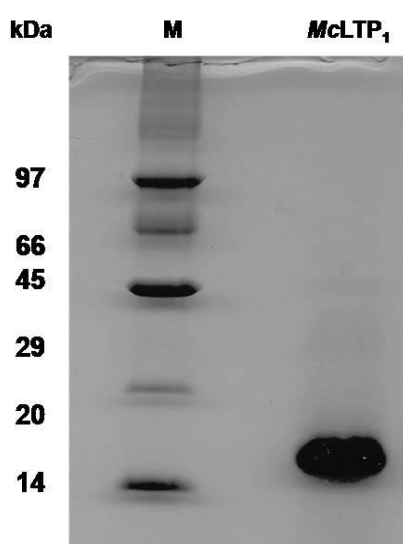
## 5 RESULTADOS

### 5.1 Caracterização Bioquímica e Análises estruturais da proteína transferidora de lipídeos isolada das sementes de *Morinda citrifolia* L. (*McLTP<sub>1</sub>*)

#### 5.1.1 Obtenção da proteína transferidora de lipídeos isolada das sementes de *Morinda citrifolia* L. (*McLTP<sub>1</sub>*)

A **Figura 4** mostra o perfil eletroforético (SDS-PAGE 15%) de *McLTP<sub>1</sub>*, obtida de acordo com a metodologia de purificação descrita por Campos *et al.* (2015). Foi aplicado 20 µg da proteína no gel de poliacrilamida, resultando em uma única banda com massa molecular aparente de 15,13 kDa. O processo de purificação foi contínuo e a partir da obtenção de *McLTP<sub>1</sub>*, foram realizados todos os experimentos desse trabalho.

**Figura 4 – Perfil eletroforético (SDS-PAGE 15%) de *McLTP<sub>1</sub>* em condições não redutoras.** Foram aplicados 20 µg de *McLTP<sub>1</sub>* por poço. A banda proteica foi corada com Coomassie blue R-250. Raia 1: marcadores de massa molecular (kDa). Raia 2: *McLTP<sub>1</sub>*.



### 5.1.2 Atividade inibitória de tripsina, quimotripsina, papaína e $\alpha$ -amilase de *McLTP*<sub>1</sub>

Na **Tabela 1**, é demonstrada a capacidade de *McLTP*<sub>1</sub> em inibir tripsina, quimotripsina e papaína, na qual foi observada uma maior atividade inibitória da tripsina – 767, 10 UI/mgP. Outros dados obtidos foram que para a papaína houve 31,69% de inibição e para  $\alpha$ -amilase 24,40% de inibição.

**Tabela 1** – Detecção e quantificação da atividade inibitória de tripsina, quimotripsina e papaína de *McLTP*<sub>1</sub>.

Atividade	(UI/mgP)
Inibitória de tripsina <sup>a</sup>	767,100 $\pm$ 8,364
Inibitória de quimotripsina <sup>b</sup>	25,364 $\pm$ 0,863
Inibitória de papaína <sup>c</sup>	65,419 $\pm$ 0,152

Os valores representam médias de triplicatas  $\pm$  desvio padrão.

<sup>a</sup> Unidade trípica de inibição da atividade (UI) é a quantidade de inibidor que reduz a atividade de tripsina em 0,01 na absorbância a 410 nm.

<sup>b</sup> Unidade quimotríptica de inibição da atividade (UI) é a quantidade de inibidor que reduz a atividade de quimotripsina de 0,01 na absorbância a 410 nm.

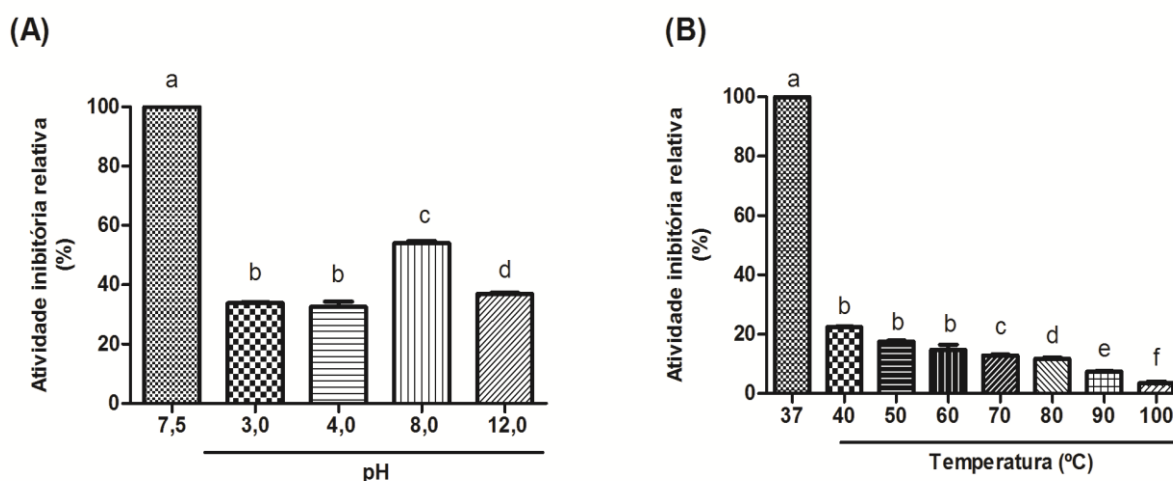
<sup>c</sup> Unidade de atividade antipapainásica (UI) é a quantidade de inibidor que reduz a atividade da papaína em 0,01 na absorbância a 540 nm.

### 5.1.3 Atividade inibitória de tripsina de *McLTP*<sub>1</sub> em diferentes pHs e temperaturas

A incubação de *McLTP*<sub>1</sub> em diferentes valores de pH (3,0, 4,0, 8,0 e 12,0) resultou em uma perda significativa de sua atividade inibitória relativa de tripsina em relação à atividade original, resultando em 33,13% (pH 3,0) e 30,17% (pH 4,0) de atividade. Em pH 8,0, houve uma perda menor e atividade inibitória relativa de tripsina foi de 63,90%. Já em pH 12,0 houve uma perda significativa da atividade inibitória relativa de tripsina, resultando em 39,05% de atividade (**Figura 5A**).

A incubação de *McLTP*<sub>1</sub> em diferentes temperaturas (40 a 100 °C, em intervalos de 10 °C), por 30 min resultou em uma perda significativa de sua atividade inibitória relativa de tripsina em relação à atividade original, quando há aumento de temperatura. Sendo que a 40 °C, a atividade inibitória relativa foi de 30,77%, a 50 °C: 24,26%, a 60 °C: 22,48%, a 70 °C: 17,75%, a 80 °C: 16,56%, a 90 °C: 10,65% e a 100 °C: 5,91% (**Figura 5B**).

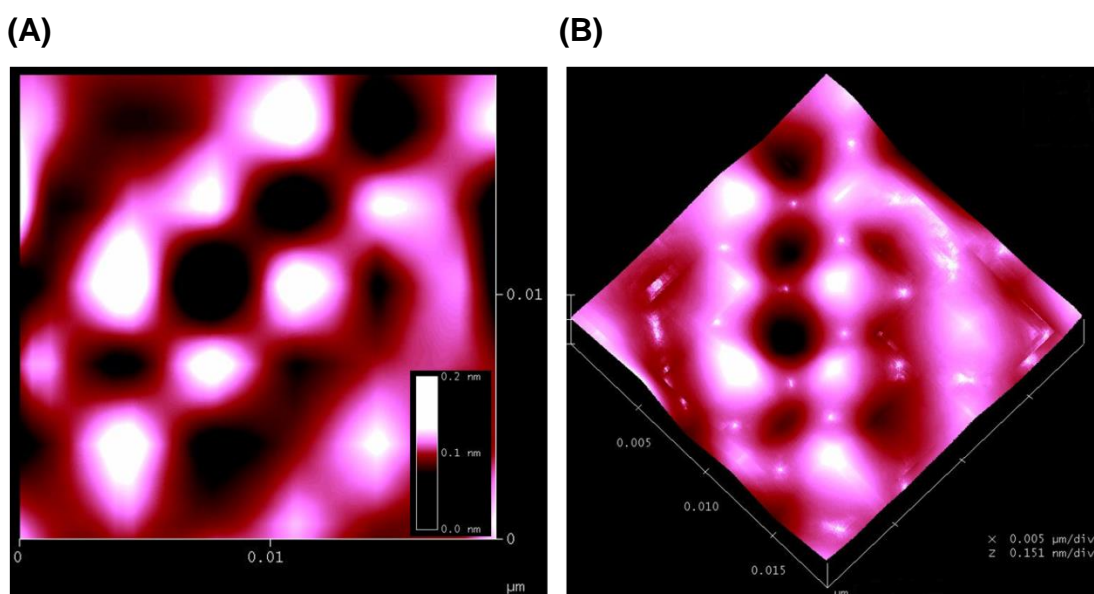
**Figura 5 – Atividade inibitória de tripsina de *McLTP*<sub>1</sub> em diferentes pHs e temperaturas.** (A) Efeito da variação de pH (3,0, 4,0, 8,0 e 12,0) na atividade inibitória de tripsina de *McLTP*<sub>1</sub>. (B) Efeito da variação de temperatura (40 – 100 °C) na atividade inibitória de tripsina de *McLTP*<sub>1</sub>. Cada barra representa a média de três experimentos. As barras verticais representam as médias. ANOVA seguido pelo teste de Tukey. Letras diferentes significam diferenças entre os tratamentos.  $P < 0,05$ .



#### 5.1.4 Análise por microscopia de força atômica (AFM)

Como parte da análise estrutural de *McLTP*<sub>1</sub>, foram obtidas imagens em alta resolução, através de microscopia de força atômica em uma concentração de 0,21 mg/mL de *McLTP*<sub>1</sub>. A **Figura 6A** mostra a topografia da amostra de *McLTP*<sub>1</sub> sobre uma superfície de mica, podendo ser observado o padrão de oligomerização de *McLTP*<sub>1</sub> que tem a capacidade de se associar, formando canais centrais com diâmetros de aproximadamente 4,4 nm. Na **Figura 6B** está representada a mesma estrutura, em uma imagem tridimensional, ressaltando o padrão de oligomerização de *McLTP*<sub>1</sub>. A imagem possui 18,98 nm de tamanho lateral e 151,2 pm de altura.

**Figura 6 - Análise de *McLTP*<sub>1</sub> por microscopia de força atômica (AFM).** (A) As imagens de alta resolução foram obtidas por adsorção de *McLTP*<sub>1</sub> sobre uma superfície de mica. A amostra de *McLTP*<sub>1</sub> utilizada foi de 0,21 mg/mL. (B) Imagem em 3D, demonstrando o padrão de oligomerização de *McLTP*<sub>1</sub>.

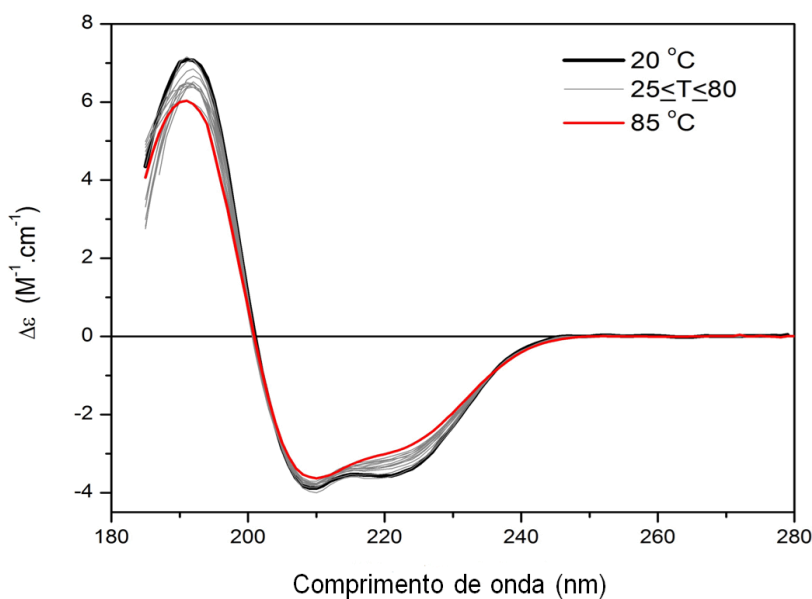


### 5.1.5 Análises por espectroscopia de dicroísmo circular

A fim de investigar a estrutura secundária e estimar a sua estabilidade térmica, *McLTP*<sub>1</sub> foi estudada através de espectroscopia de dicroísmo circular (CD). Foram obtidos os espectros de CD de *McLTP*<sub>1</sub> no intervalo entre 25 e 80 °C, a 85 °C e depois à temperatura de 20 °C (**Figura 7**), indicando uma estabilidade na estrutura secundária da proteína com as variações de temperatura. Neste protocolo a proteína foi incubada na faixa indicada, com variação de 5 °C e tempo de 10 minutos para cada temperatura, antes da tomada dos espectros de CD.

As frações de estrutura secundária de *McLTP*<sub>1</sub>, mostradas na **Tabela 2**, foram determinadas com o uso dos três programas de desconvolução do pacote CDPPro (SELCON 3, CONTIN/LL, CDSSTR) em pH 7,0.

**Figura 7 - Espectros de dicroísmo circular de *McLTP*<sub>1</sub> no ensaio de estabilidade térmica.** *McLTP*<sub>1</sub> (0,2 mg/mL) em água destilada, pH 7,0. Os espectros foram tomados em uma cubeta de quartzo de 0,1 cm de caminho óptico. Medidas feitas em far-UV.



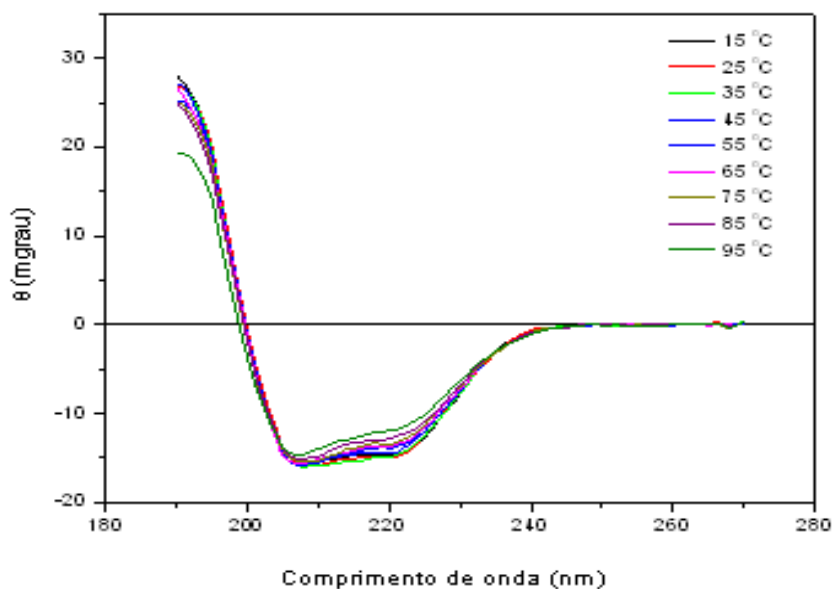


**Tabela 2** - Padrões de distribuição da estrutura secundária presentes em *McLTP*<sub>1</sub>, determinados a partir do espectro de dicroísmo circular.

Componentes da Estrutura Secundária	Percentual
$\alpha$ -hélices	26%
Estruturas não ordenadas	49%

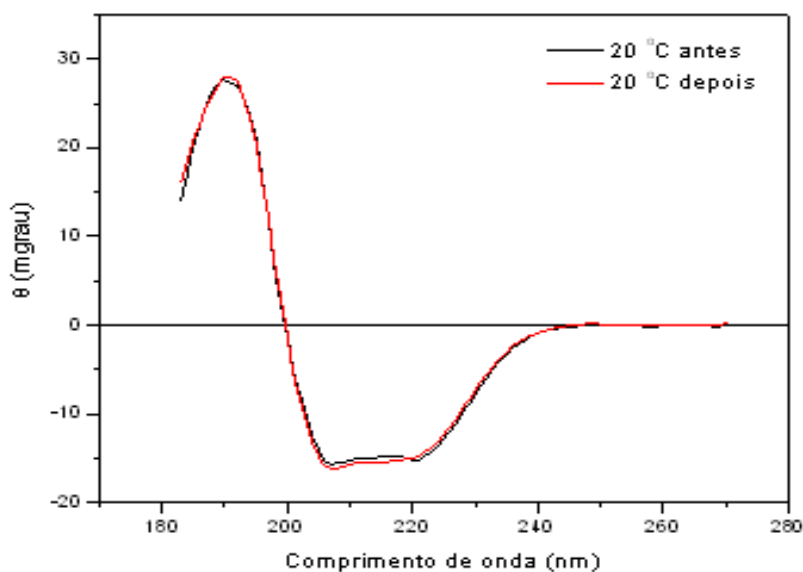
A estabilidade de *McLTP*<sub>1</sub> frente a várias temperaturas testadas também foi determinada no intervalo de temperaturas de 15 a 95 °C, com a variação de 10 °C (**Figura 8**). Os dados obtidos mostram que com o aumento gradual de temperatura não ocorreram mudanças significativas do espectro de *McLTP*<sub>1</sub>, observada em relação à proteína nativa, demonstrando uma termoestabilidade.

**Figura 8 – Estudos da estabilidade térmica de *McLTP*<sub>1</sub> monitorados por dicroísmo circular.** Efeitos da variação de temperatura na conformação de *McLTP*<sub>1</sub>, em água, pH 7,0, utilizando-se uma cubeta de quartzo de 0,1 cm de caminho óptico. Concentração de *McLTP*<sub>1</sub> - 0,2 mg/mL. Medidas feitas em far-UV.



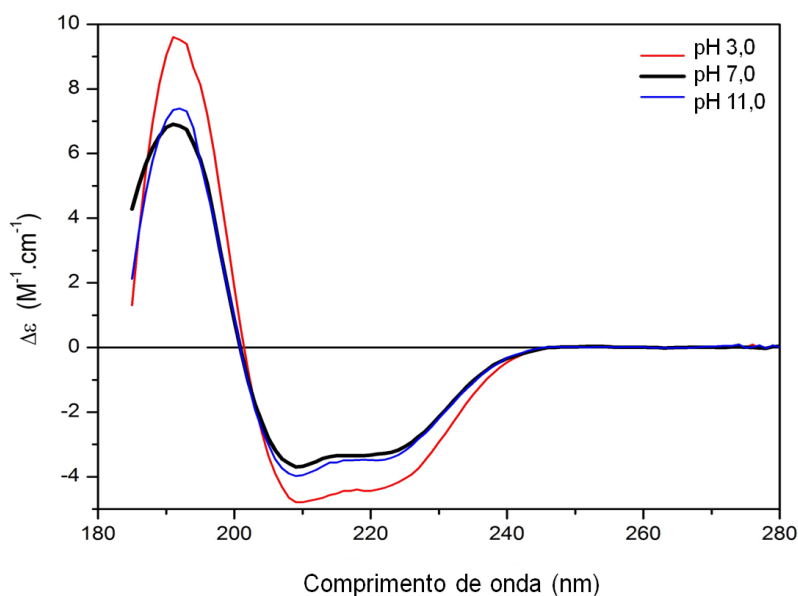
A **Figura 9** (linha vermelha) mostra o espectro de CD de  $McLTP_1$ , em água destilada, pH 7,0, a 20 °C.  $McLTP_1$  apresentou um espectro de CD caracterizado por mínimos de elipticidade molar em 208 e 222 nm e um máximo positivo observado em 195 nm. A linha preta representa o espectro de CD de  $McLTP_1$ , aquecida até 95 °C, por 10 min e retornando à temperatura de 20 °C, por 30 min, na qual não se observa uma mudança significativa na estrutura secundária de  $McLTP_1$ .

**Figura 9 - Espectros de dicroísmo circular de  $McLTP_1$  antes e depois do ensaio de desnaturação térmica.**  $McLTP_1$  (0,2 mg/mL) em água destilada. Amostra incubada a 20 °C, aquecida a 95 °C, por 10 min, seguida de incubação a 20 °C por 30 min. Medidas feitas em far-UV.



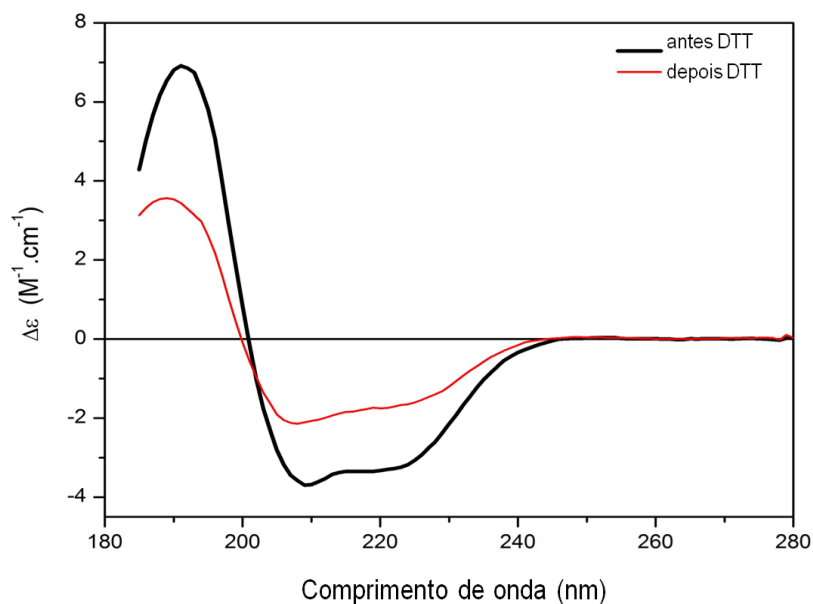
Na **Figura 10**, pode ser observado o espectro de CD de *McLTP*<sub>1</sub>, após incubação em diferentes valores de pH (3,0, 7,0 e 11,0). Não ocorreram mudanças significativas dos espectros da proteína em solução nos pHs 7,0 e 11,0. Em pH 3,0, houve alteração no mínimo de elipticidade molar e no máximo positivo.

**Figura 10 - Espectros de dicroísmo circular de *McLTP*<sub>1</sub> no ensaio de estabilidade frente a variações de pH.** A concentração de *McLTP*<sub>1</sub> foi de 0,2 mg/mL. Os espectros foram tomados em uma cubeta de quartzo de 0,1 cm de caminho óptico, a 25 °C. Medidas feitas em far-UV.



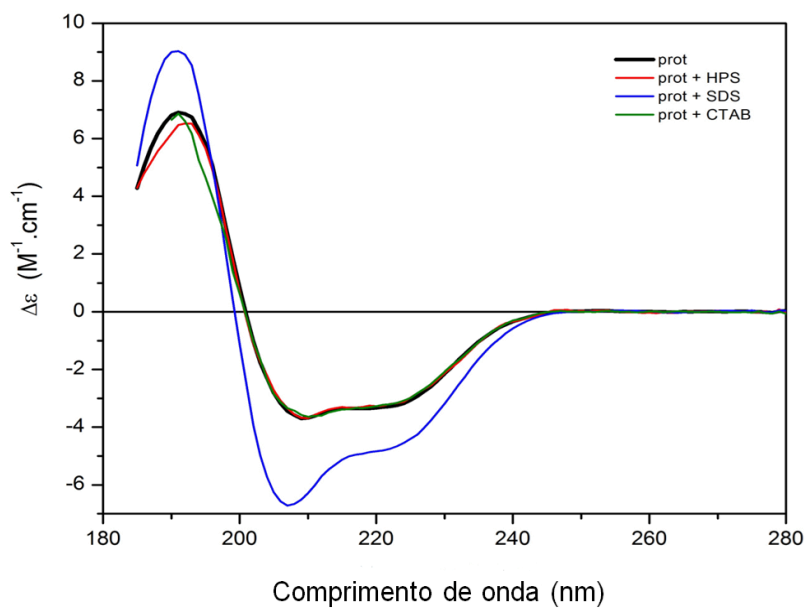
Foram obtidos os espectros de CD de *McLTP*<sub>1</sub> antes e após a incubação da proteína com o agente redutor DTT 1mM, em água destilada, pH 7,0, a 25 °C. Foram observadas alterações no espectro obtido após utilização do DTT, no mínimo de elipticidade molar e no máximo positivo da proteína, conforme **Figura 11**.

**Figura 11 – Estudos espectroscópicos de *McLTP*<sub>1</sub> em presença de agente redutor – DTT.** Conformação de *McLTP*<sub>1</sub> (0,2 mg/mL) por dicroísmo circular, em água destilada, pH 7,0, a 25 °C, utilizando-se uma cubeta de quartzo de 0,1 cm de caminho óptico, sem o uso de um agente redutor (DTT) e após o uso de DTT 1mM. Medidas feitas em far-UV.



Foram obtidos os espectros de CD de *McLTP*<sub>1</sub>, após incubação com diferentes micelas iônicas: HPS 10 mM, SDS 10 mM e CTAB 1 mM. Pode ser observado na **Figura 12**, que não houve mudanças significativas nos espectros de *McLTP*<sub>1</sub>, que é de natureza catiônica, na presença de um surfactante catiônico (CTAB) e de um surfactante zwitteriônico (HPS), que possuem concentração micelar crítica (CMC) de  $9,2 \times 10^{-4}$  mol/L e  $5 \times 10^{-5}$  mol/L, respectivamente. Mas, na presença de um surfactante aniônico, SDS (CMC =  $8 \times 10^{-3}$  mol/L) houve uma interação de *McLTP*<sub>1</sub>, sendo observadas alterações no espectro obtido.

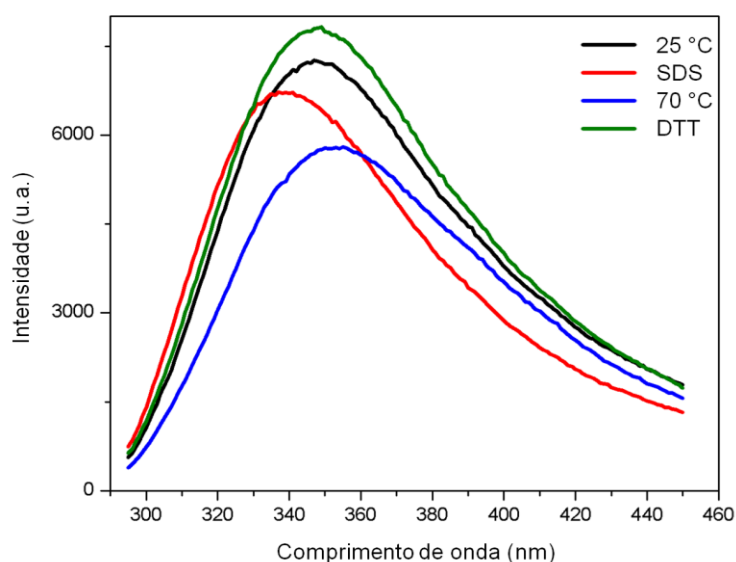
**Figura 12 – Estudos espectroscópicos de *McLTP*<sub>1</sub> em presença de micelas iônicas de CTAB, SDS e HPS.** Conformação de *McLTP*<sub>1</sub> (0,2 mg/mL), em água destilada, pH 7,0, a 25 °C, em cubeta de quartzo de 0,1 cm de caminho óptico, com uma média de 6 varreduras, utilizando-se somente *McLTP*<sub>1</sub> e depois a proteína com a adição de diferentes micelas: HPS 10 mM, SDS 10 mM e CTAB 1 mM. Medidas feitas em far-UV.



### 5.1.6 Análise por espectroscopia de fluorescência

A integridade estrutural de *McLTP*<sub>1</sub> também foi avaliada através de espectroscopia de emissão de fluorescência. Os espectros obtidos da proteína após incubação nas temperaturas de 20 e 70 °C, e na presença de DTT 1 mM, com excitação a 280 nm, apresentaram o mesmo máximo de emissão de fluorescência em 350 nm. Porém, na presença do surfactante aniônico SDS 10 mM, foi observada a alteração do máximo de emissão de fluorescência para 335 nm, após excitação a 280 nm (**Figura 13**).

**Figura 13 – Espectros de fluorescência de *McLTP*<sub>1</sub>.** Amostras da proteína (0,18 mg/mL) foram dissolvidas em água destilada, pH 7,0 e submetidas à análises no espectrofluorímetro ISS K2, utilizando-se uma cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico, na faixa de comprimentos de onda de 280 a 450 nm, nas temperaturas de 25 °C e 70 °C, e nas seguintes condições: SDS 10 mM e DTT 1 mM, com excitação em 280 nm.



## 5.2 Atividades Biológicas de *McLTP*<sub>1</sub>

### 5.2.1 Análise da Citotoxicidade em Diferentes Linhagens de Células Tumorais

A fim de avaliar a viabilidade das células tumorais das linhagens: HCT-116 (côlon – humano), HL-60 (leucemia – humano) Ovcara-8 (ovário – humano) e SF-295 (glioblastoma – humano), após incubação de 72 horas com *McLTP*<sub>1</sub>, a absorbância da cultura foi monitorada a 595 nm, para detecção do MTT, metabolizado na mitocôndria das células viáveis. Como detecção de toxicidade, um controle positivo foi empregado utilizando a doxorubicina (molécula tóxica a estas células). Os ensaios com *McLTP*<sub>1</sub> mostraram que houve efeito citotóxico na linhagem celular de câncer de ovário (Ovcara-8), com  $CI_{50} = 16,6 \mu\text{g/mL}$ . A proteína não mostrou atividade nas outras linhagens tumorais avaliadas, conforme **Tabela 3**.

**Tabela 3** - Atividade citotóxica de *McLTP*<sub>1</sub> em células tumorais após 72h de incubação.

Linhagens de Células Tumorais Humanas				
Amostra	HCT-116 (côlon)	HL-60 (leucemia)	Ovcara-8 (ovário)	SF-295 (glioblastoma)
<i>McLTP</i> <sub>1</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )	> 50	> 50	16,6 (14,8 - 18,7)	> 50
Doxorubicina ( $\mu\text{g/mL}$ )	0,12 (0,09 - 0,17)	0,02 (0,01 - 0,02)	0,26 (0,17 - 0,3)	0,24 (0,2 - 0,27)

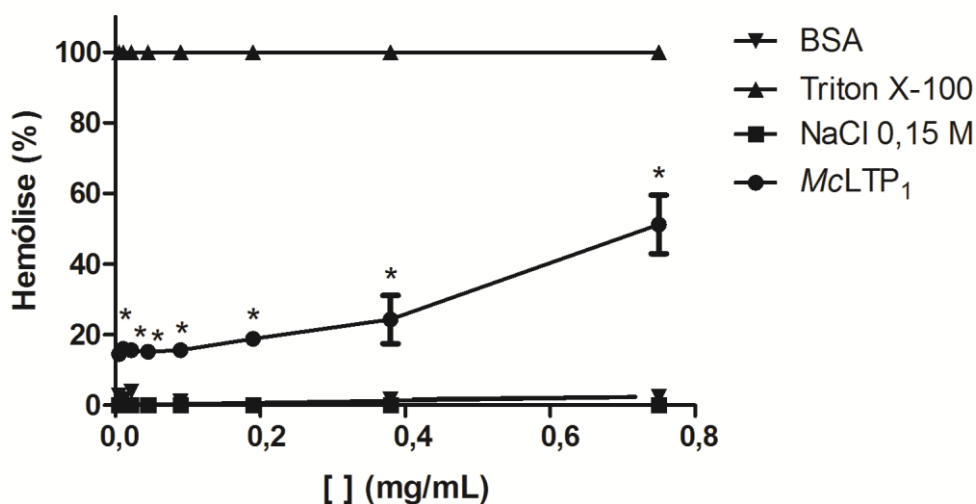
Dados são apresentados como valores de  $CI_{50}$  e 95% de intervalo de confiança para células tumorais de côlon (HCT-116), células leucêmicas (HL-60), ovário (Ovcara-8) e glioblastoma (SF-295). Doxorubicina foi utilizada como controle positivo (0,009 – 5  $\mu\text{g/mL}$ ).



### 5.2.2 Atividade hemolítica

Neste ensaio, a hemólise foi detectada visualmente no controle positivo logo após a adição da solução de Triton X-100 a 0,1 % (v/v), devido à formação de uma solução vermelha, enquanto nos controles negativos: NaCl 0,15 M e BSA (1 mg/mL) foi observada apenas a sedimentação das células. A medida da absorbância para monitorar a lise das células, mostrou que  $McLTP_1$  apresentou efeito hemolítico significativo desde a menor concentração testada (0,005 mg/mL) até a concentração de 0,75 mg/mL, onde o efeito hemolítico foi de 50%, quando comparado ao controle, conforme **Figura 14**.

**Figura 14 – Avaliação do efeito hemolítico de  $McLTP_1$  em hemácias de coelho.** Uma suspensão de hemácias lavadas foi incubada com diferentes concentrações de  $McLTP_1$ . Controles negativos – NaCl 0,15 M e BSA (1mg/mL), controle positivo Triton X-100 0,1%. Cada ponto representa a média de três experimentos. O desvio padrão foi menor que 10%. ANOVA seguido pelo teste de Tukey. \* $P < 0,05$ .



### 5.2.3 Predição da alergenicidade *in silico* de *McLTP<sub>1</sub>*

Inicialmente, com a sequência N-terminal de *McLTP<sub>1</sub>* (AVPCGQVSSALSPCMSYLTGGGDDPEARCCAGV) utilizou-se a ferramenta de bioinformática AllerTOP 1.0 para predição de alergenicidade, prevendo a rota mais provável de exposição ao alérgeno: alimento, inalante ou toxina, com sensibilidade de 94% em comparação com outras ferramentas (DIMITROV; FLOWER; DOYTCHINOVA, 2013), obtendo-se como resultado, a probabilidade de 33% de ser um alérgeno alimentar, 33% inalante e 33% salivar ou toxina.

Adicionalmente, pesquisa *in silico* foi conduzida para avaliar o grau de similaridade da sequência N-terminal de aminoácidos de *McLTP<sub>1</sub>* com sequências de proteínas reconhecidamente alergênicas, utilizando os critérios estabelecidos pela FAO/WHO (2001). A sequência N-terminal de *McLTP<sub>1</sub>* foi comparada às sequências de alérgenos depositadas nos seguintes bancos de dados: **(1) Allergome**: apresentou identidade com 80 LTPs reconhecidamente alergênicas, sendo a maior identidade encontrada 69% para *Triticum turgidum ssp. durum* (trigo); **(2) SDAP**: apresentou identidade com 50 LTPs alergênicas, com identidade maior encontrada de 60,6% para *Arachis hypogaea* (amendoim); **(3) ADFS**: apresentou identidade com 52 LTPs reconhecidamente alergênicas, sendo a maior identidade encontrada: 60,6% para *Arachis hypogaea* (amendoim) e *Actinidia deliciosa* (kiwi) e **(4) Allergen Online**: apresentou identidade com 69 LTPs alergênicas, e a maior identidade encontrada: 60,6% para *Arachis hypogaea* (amendoim) e *Actinidia deliciosa* (kiwi). A sequência N-terminal de *McLTP<sub>1</sub>* foi submetida a comparações do tipo FASTA completa (*Full FASTA*), usando como filtro (*cut-off*), *E-value* < 0,01, na detecção de identidade > 35% (AALBERSE, 2000).

Na **Tabela 4**, observa-se o alinhamento do N-terminal de *McLTP<sub>1</sub>*, com outras LTPs listadas como alergênicas nos bancos de dados (*Allergome*; SDAP; ADFS e *Allergen Online*): *Triticum turgidum ssp. durum* (trigo), *Oryza sativa ssp. japonica* (arroz), *Actinidia deliciosa* (kiwi), *Lactuca sativa* (alface), *Arachis hypogaea* (amendoim), *Prunus persica* (pêssego), *Zea mays ssp. parviglumis* (milho), *Prunus armeniaca* (damasco), *Lens culinary* (lentilha), *Malus domestica* (maçã). As maiores porcentagens de identidade encontradas foram das espécies: *Triticum turgidum ssp. durum* (69%), *Oryza sativa ssp. japonica* (60%) e *Actinidia deliciosa* (60%).

**Tabela 4** – Sequência N-terminal de *McLTP<sub>1</sub>* em comparação com outras proteínas transferidoras de lipídeos consideradas alérgenos, presentes em diferentes espécies de plantas. Os dados foram obtidos através dos bancos de alérgenos: *Allergome*, *SDAP*, *ADFS* e *Allergen Online*.

NsLTP	Família	Resíduo nº	Sequência	Resíduo nº	% identidade	Identificação da sequência	Banco de Dados
<i>Morinda citrifolia</i>	Rubiaceae	1	AVPCGQVSSALSPCMSYLTGGGDDPEARCCAGV	33	100	C0HJH5	-
<i>Triticum turgidum ssp. durum</i>	Poaceae	14	AVSCGQVSSALSPCISYARGNGASPSAACCSGV	46	69	Q5NE26	<i>Allergome</i>
<i>Oryza sativa ssp. japônica</i>	Poaceae	26	AISCGQVNSAVSPCLSYAR-GGSGPSAACCSGV	57	60	Q2QYL2	<i>Allergome</i>
<i>Actinidia deliciosa</i>	Actinidiaceae	1	AVSCGQVDTALTPCLTYLTKGG-TPSTQCCSGV	32	60	P85205	ADFS; <i>Allergen Online</i> ; <i>Allergome</i>
<i>Lactuca sativa</i>	Asteraceae	26	AITCGQVVSSLSQCASYLRNGGAVPPA-CCSGV	57	60	A1E2H5	<i>Allergome</i>
<i>Arachis hypogaea</i>	Fabaceae	24	AISCGQVNSALAPCIPFLTKGGAPPPA-CCSGV	55	60	B6CEX8	ADFS; SDAP; <i>Allergen Online</i> ; <i>Allergome</i>

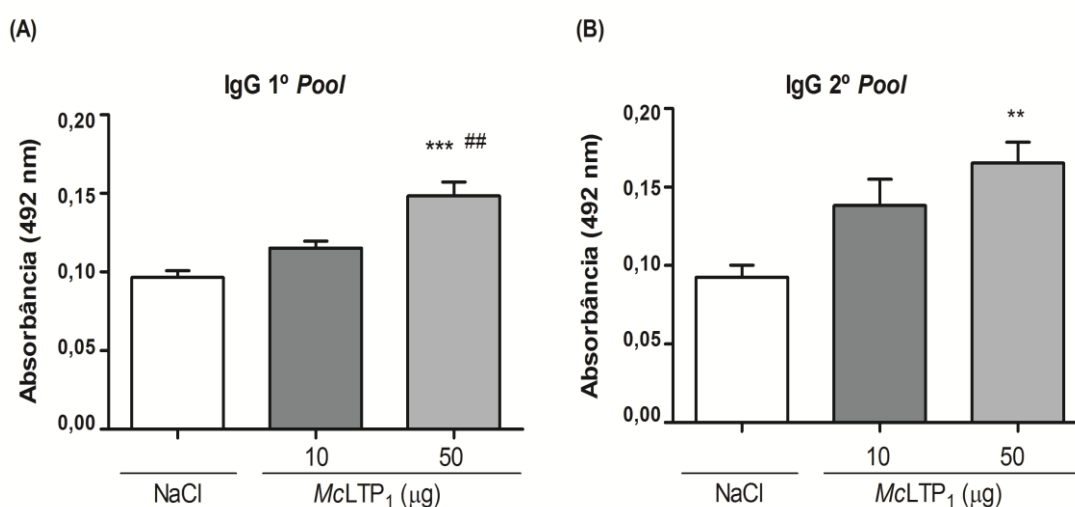
**Tabela 4 (Continuação)** – Sequência N-terminal de *McLTP<sub>1</sub>* em comparação com outras proteínas transferidoras de lipídeos consideradas alérgenos, presentes em diferentes espécies de plantas. Os dados foram obtidos através dos bancos de alérgenos: *Allergome*, SDAP, ADFS e *Allergen Online*.

NsLTP	Família	Resíduo n°	Sequência	Resíduo n°	% identidade	Identificação da sequência	Banco de Dados
<i>Zea mays ssp. Parviglumis</i>	Poaceae	28	AISCGQVASAIAPCISYARGQSGPSAGCCSGV	60	57	Q2XX25	ADFS; SDAP; <i>Allergen Online</i> ; <i>Allergome</i>
<i>Prunus armeniaca</i>	Rosaceae	27	AITCGQVSSSLAPCIGYVRGGGAVPPA-CCNGI	57	57	E7CLQ6	ADFS; SDAP; <i>Allergen Online</i> ; <i>Allergome</i>
<i>Lens culinary</i>	Fabaceae	18	AISCGAVTSDLSPCLTYLT-GGPGPSPQCCGGV	49	57	A0AT33	SDAP; <i>Allergen Online</i> ; <i>Allergome</i>
<i>Malus domestica</i>	Rosaceae	24	AITCGQVSSNLVPCFDYVRSGGPVPPA-CCNGI	55	54	Q5J009	ADFS; SDAP; <i>Allergen Online</i> ; <i>Allergome</i>

### 5.2.4 Avaliação da Resposta Humoral em Camundongos – Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

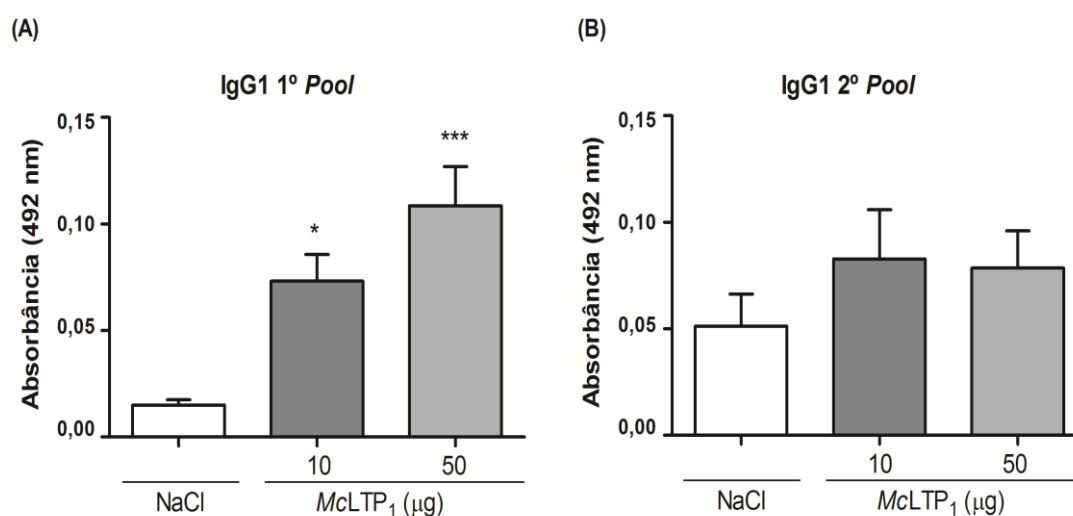
A síntese de anticorpos em camundongos imunizados por via oral com 10  $\mu\text{g}$  e 50  $\mu\text{g}$  de  $\text{McLTP}_1$  foi analisada por ELISA indireto. A **Figura 15A** demonstra a síntese de IgG específicas contra  $\text{McLTP}_1$ , no *pool* primário. Os resultados demonstraram que houve um aumento significativo nos títulos dos anticorpos específicos no grupo imunizado com 50  $\mu\text{g}$  de  $\text{McLTP}_1$ , em relação ao grupo controle e que houve diferença significativa entre os grupos 50  $\mu\text{g}$  e 10  $\mu\text{g}$ , na resposta primária. Os resultados apresentados na **Figura 15B** mostraram que houve um aumento significativo na síntese de IgG anti- $\text{McLTP}_1$  no grupo imunizado com 50  $\mu\text{g}$  de  $\text{McLTP}_1$ , em relação ao grupo controle, na resposta secundária.

**Figura 15 – Análise por ELISA da síntese de anticorpos IgG em camundongos imunizados pela via oral com  $\text{McLTP}_1$ .** (A) 1<sup>o</sup> *Pool* anti-soro: resposta primária (7, 14 e 21 dias após a imunização) <sup>\*\*\*</sup>  $P < 0,001$  vs controle; <sup>##</sup>  $P < 0,01$  vs 10  $\mu\text{g}$   $\text{McLTP}_1$ . (B) 2<sup>o</sup> *Pool* anti-soro: resposta secundária (28, 35 e 42 dias após a imunização) <sup>\*\*</sup>  $P < 0,01$  vs controle. Grupo controle: NaCl 0,9%. Cada coluna representa média  $\pm$  desvio padrão da média ( $n = 8$ ). ANOVA seguido pelo teste de Tukey.



A **Figura 16A** demonstra a síntese de anticorpos IgG1 específicos contra *McLTP*<sub>1</sub>, no *pool* primário. Os resultados demonstraram que houve um aumento significativo em relação ao grupo controle, nos títulos dos anticorpos específicos nos grupos imunizados com 10 µg e 50 µg de *McLTP*<sub>1</sub>, na resposta primária. Os resultados apresentados na **Figura 16B** mostraram que não houve um aumento significativo na síntese de IgG1 anti- *McLTP*<sub>1</sub> nos grupos imunizados com 10 µg e 50 µg de *McLTP*<sub>1</sub>, na resposta secundária.

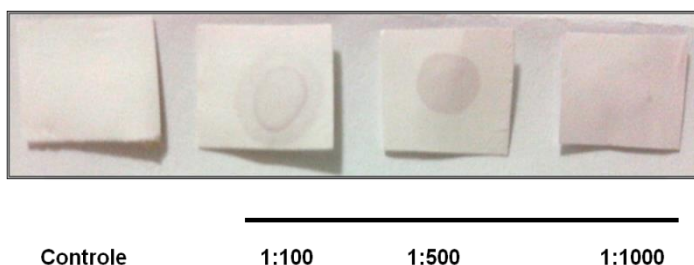
**Figura 16 – Análise por ELISA da síntese de anticorpos IgG1 em camundongos imunizados pela via oral com *McLTP*<sub>1</sub>.** (A) 1<sup>o</sup> *Pool* anti-soro: resposta primária (7, 14 e 21 dias após a imunização) \**P* < 0,01 vs controle; \*\*\**P* < 0,001 vs controle (B) 2<sup>o</sup> *Pool* anti-soro: resposta secundária (28, 35 e 42 dias após a imunização). Grupo controle: NaCl 0,9%. Cada coluna representa média ± desvio padrão da média (*n* = 8). ANOVA seguido pelo teste de Tukey.



### 5.2.5 Determinação do Título dos Anticorpos Policlonais anti- *McLTP*<sub>1</sub>

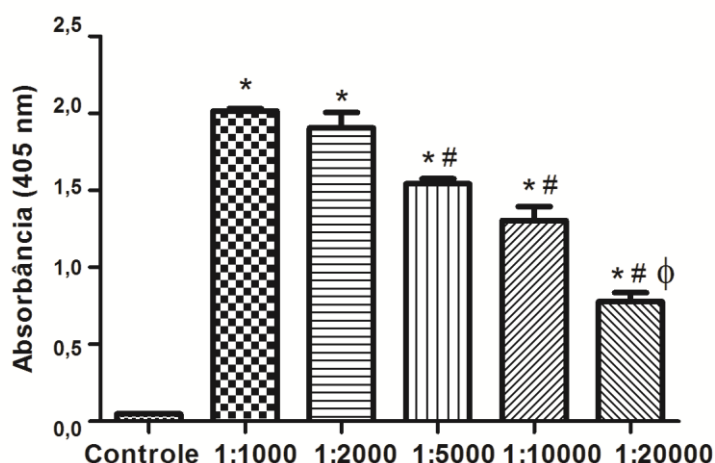
Após a produção de anticorpos policlonais em coelho contra *McLTP*<sub>1</sub>, como uma etapa prévia em relação aos experimentos de imunodeteccção, os anticorpos produzidos foram avaliados quanto ao título por *Dot Blotting* e por ELISA indireto. A **Figura 17** mostra imagens do ensaio de *Dot Blotting* usado para determinar o título dos anticorpos produzidos. Como pode ser observado, os anticorpos policlonais produzidos contra *McLTP*<sub>1</sub> foram capazes de reconhecer amostras da proteína imobilizadas em membrana de nitrocelulose nas três diluições utilizadas no ensaio. Em função da resposta obtida, a diluição 1:500 (v/v) foi utilizada nos testes de imunodeteccção por *Dot Blotting*. Como controle experimental foi utilizado soro pré-imune do coelho.

**Figura 17** - *Dot Blotting* usando os anticorpos policlonais produzidos no coelho contra *McLTP*<sub>1</sub> (1,5 mg/mL) nas diluições de 1:100, 1:500, 1:1000 (v/v), partindo-se de uma solução de 1 mg/mL. Como controle experimental foi utilizado soro pré-imune como fonte de anticorpos primários.



A **Figura 18** demonstra o título obtido para os anticorpos anti-McLTP<sub>1</sub> produzidos, através do método de ELISA indireto. Em função da resposta obtida, a diluição 1:10000 (v/v) foi utilizada nos testes de imunodeteção por ELISA. Como controle experimental foi utilizado soro pré-imune do coelho.

**Figura 18 - Determinação do título dos anticorpos anti-McLTP<sub>1</sub> produzidos em coelho, pelo método de ELISA indireto.** Utilizados 150 µL da amostra de McLTP<sub>1</sub> (10 µg amostra/poço) e 150 µL dos anticorpos anti- McLTP<sub>1</sub>, nas diluições de 1:1000, 1:2000, 1:5000, 1:10000 e 1:20000 (v/v) Como controle experimental foi utilizado soro pré-imune como fonte de anticorpos primários. Cada coluna representa média ± desvio padrão da média. ANOVA seguido pelo teste de Tukey. \**P* < 0,05 vs controle; #*P* < 0,05 vs 1:1000;  $\phi$ *P* < 0,05 vs 1:5000.





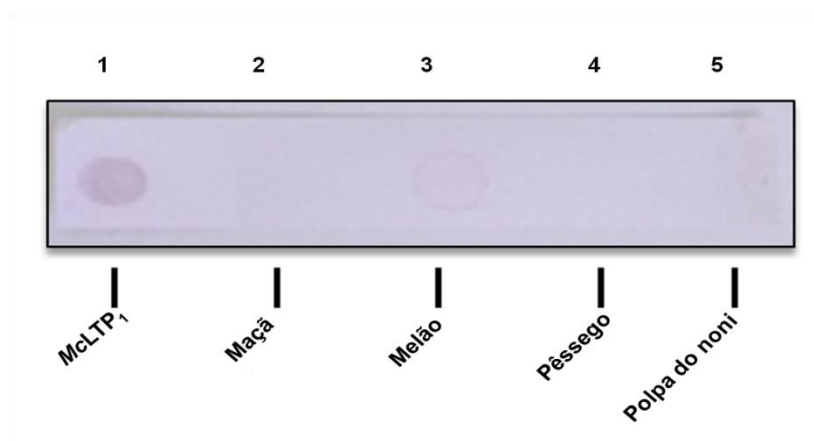
## 5.2.6 Determinação de Reações Cruzadas em Extratos Proteicos de Maçã, Pêssego, Melão e Polpa do Noni

### 5.2.6.1 Dot Blotting

Para investigar possíveis reações cruzadas com *McLTP*<sub>1</sub>, foram utilizados extratos proteicos de frutos como a maçã e o pêssego, da família Rosaceae, o melão, da família Cucurbitaceae e a polpa do noni, da família Rubiaceae.

A **Figura 19** mostra imagem do ensaio de *Dot Blotting* usado para determinar possíveis reações cruzadas dos extratos proteicos de maçã, pêssego, melão e polpa do noni, utilizando-se os anticorpos policlonais produzidos no coelho contra *McLTP*<sub>1</sub>, na diluição de 1:500 (v/v), partindo-se de uma solução de 1 mg/mL dos anticorpos produzidos. Como pode ser observado, os anticorpos policlonais produzidos contra *McLTP*<sub>1</sub> foram capazes de reconhecer amostra do extrato proteico de melão.

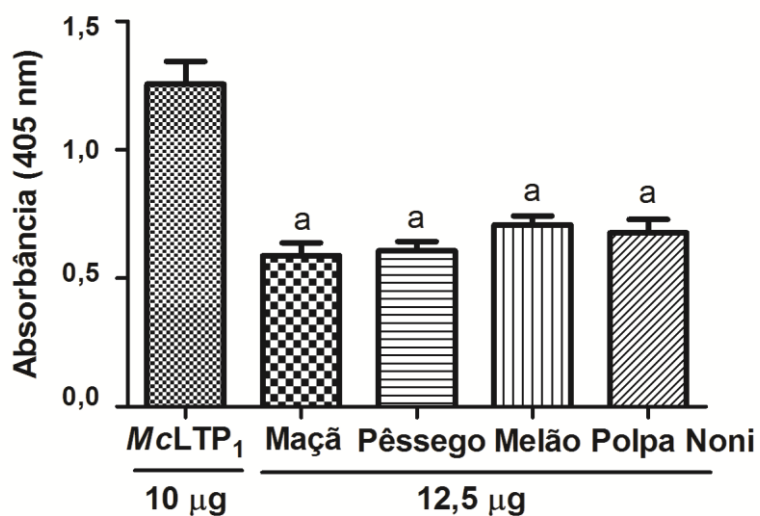
**Figura 19** – Determinação de reações cruzadas em extratos proteicos de maçã, pêssego, melão e polpa do noni, pela técnica do *Dot Blotting* usando os anticorpos policlonais produzidos no coelho contra *McLTP*<sub>1</sub>, na diluição de 1:500 (v/v), partindo-se de uma solução de 1 mg/mL dos anticorpos produzidos. 1. 10 µL de *McLTP*<sub>1</sub> (1,5 mg/mL) 2. 10 µL de extrato proteico de maçã (0,18 mg/mL) 3. 10 µL de extrato proteico de melão (0,92 mg/mL) 4. 10 µL de extrato proteico de pêssego (0,18 mg/mL) 5. 10 µL de extrato proteico da polpa do noni (0,35 mg/mL).



### 5.2.6.2 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

Pelo método do ELISA indireto foi observado o reconhecimento do anticorpo produzido em coelho anti-McLTP<sub>1</sub>, nos extratos proteicos das cascas de maçã, pêssigo, melão e polpa do noni, não havendo diferença significativa entre os extratos testados (**Figura 20**).

**Figura 20** – Determinação de reações cruzadas em extratos proteicos das cascas de maçã, pêssigo, melão e polpa do noni pelo método do ELISA indireto, com anticorpos anti-McLTP<sub>1</sub> produzidos em coelho (1:10000 v/v). Amostras de McLTP<sub>1</sub> (10 µg) e dos extratos proteicos das cascas de maçã, pêssigo, melão e polpa do noni (12,5 µg) foram aplicadas por poço (em triplicata). Cada coluna representa média ± desvio padrão da média. ANOVA seguido pelo teste de Tukey. <sup>a</sup>P < 0,001 vs McLTP<sub>1</sub> (10 µg).



## 6 DISCUSSÃO

As proteínas transferidoras de lipídeos pertencem a um grupo de compostos envolvidos na defesa de plantas denominadas de peptídeos antimicrobianos (AMP). AMPs são de interesse contra patógenos humanos e são excelentes candidatos como pesticidas para uso na agricultura (MONTESINOS, 2007).

As LTP<sub>1</sub>s de plantas podem estar envolvidas em diversos processos de fisiologia celular e desenvolvimento: formação da cera e cutina, adesão do pólen, mobilização dos lipídeos de sementes e extensão da parede celular e defesa antimicrobiana através da inibição do crescimento de bactérias e fungos patogênicos (DIZ *et al.*, 2011). Vários patógenos de plantas, incluindo os fungos: *F. solani*, *F. oxysporum*, *Pythium aphanidermathum*, *Sclerotium rolfsii*, *Pyricularia oryzae*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe* (MOLINA; SEGURA; GARCIA-OLMEDO, 1993; REGENTE; DE LA CANAL, 2000; DIZ *et al.*, 2006; SEGURA; MORENO; GARCIA-OLMEDO, 1993; WANG *et al.*, 2004) e as bactérias: *Pseudomonas syringae*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *Sepedonicus* e *Rhizoctonia (Pseudomonas) solanacearum* (MOLINA; SEGURA; GARCIA-OLMEDO, 1993) têm se mostrado sensíveis ao efeito das LTPs. Em relação aos agentes patogênicos humanos, as LTPs de plantas mostraram inibição para leveduras patogênicas: *C. albicans* (DIZ *et al.*, 2006; OOI *et al.*, 2006) e as bactérias: *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (WANG *et al.*, 2004; OOI *et al.*, 2006).

As proteínas antifúngicas apresentam-se como possíveis candidatas para a obtenção de plantas transgênicas resistentes a fungos, podendo atuar através de efeitos tóxicos diretos aos fungos ou interferindo em seu crescimento. Embora ainda não exista no mercado uma planta transgênica contendo genes que codifiquem para proteínas que confirmam resistência contra fungos fitopatogênicos, vários estudos descrevem a eficácia de proteínas antifúngicas expressas em diferentes plantas hospedeiras (LACERDA *et al.*, 2014). PR-proteínas como glucanases, quitinases, proteínas tipo taumatina, tioninas, defensinas, LTP e outras proteínas são alguns dos exemplos de proteínas candidatas a transgenia (FERREIRA *et al.*, 2007).

As LTPs também podem ser utilizadas na indústria de medicamentos, nos chamados sistemas de *drug delivery*, como carreadores, devido à sua atividade de transferência de lipídeos entre as membranas, solucionando problemas envolvendo a permeabilidade da membrana lipídica (SHI *et al.*, 2013). Além disso, a elevada estabilidade destas proteínas pode proporcionar um ambiente estável para evitar a oxidação ou degradação de medicamentos (CHENG *et al.*, 2004a).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa isolou uma proteína transferidora de lipídeos (denominada de *McLTP<sub>1</sub>*) das sementes de *Morinda citrifolia* L., popularmente conhecida como noni, com massa molecular de 9,45 kDa. *McLTP<sub>1</sub>* mostrou-se ativa contra os processos de inflamação e dor, com grande potencial para uso clínico, dados os seus efeitos potentes mesmo após a administração da proteína pela via oral. Nos testes de toxicidade realizados foi demonstrado que não houve mortalidade e alterações comportamentais nos animais tratados com *McLTP<sub>1</sub>*, assim como não promoveu alterações nos parâmetros hematológicos e bioquímicos avaliados. E estudos de estabilidade demonstraram que *McLTP<sub>1</sub>* mantém suas propriedades terapêuticas (atividades anti-inflamatória e analgésica) inalteradas sob refrigeração, mesmo após 3 meses de armazenamento. Além disso, *McLTP<sub>1</sub>* se mostrou resistente à digestão com pepsina. E estudos com fungos de interesse clínico demonstraram que as espécies foram sensíveis ao tratamento com *McLTP<sub>1</sub>* e quando foi testada em sinergismo com anfotericina B (droga antifúngica) diminui os valores de IC<sub>100%</sub> pela metade de alguns fungos testados.

*McLTP<sub>1</sub>* foi caracterizada apenas parcialmente por Campos *et al.* (2015), sendo necessários estudos acerca de sua estrutura, como parte da caracterização desse princípio ativo e como base para o entendimento de seus efeitos biológicos em animais. Considerando as atividades biológicas promissoras apresentadas por *McLTP<sub>1</sub>*, este trabalho objetivou caracterizar bioquimicamente *McLTP<sub>1</sub>* e avaliar seu potencial citotóxico e alergênico *in silico* e em camundongos.

Para a realização da caracterização bioquímica, citotoxicidade e atividades imunomodulatórias, foi realizada a purificação da proteína *McLTP<sub>1</sub>*, utilizando a metodologia descrita por Campos *et al.* (2015). A sequência NH<sub>2</sub>-

Terminal de aminoácidos de *McLTP<sub>1</sub>*, composta por 33 resíduos de aminoácidos (AVPCGQVSSALSPCMSYLTGGGDDPEARCCAGV) obtida por Campos *et al.* (2015) foi submetida ao programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) com busca no banco de dados de domínios conservados (CDD – *Conserved Domain Database*). Foram então observados os seguintes domínios conservados: **1)** nsLTP<sub>1</sub> (Acesso: cd01960): proteína transferidora de lipídeos não específica do tipo 1. **2)** AAI\_LTSS (Acesso: cd00010): família composta de inibidores de  $\alpha$ -amilase, proteínas de reserva de sementes e proteínas transferidoras de lipídeos de plantas. **3)** *Tryp\_alpha\_amyl* (Acesso: pfam00234): uma família composta de inibidores de tripsina e  $\alpha$ -amilase, proteínas de reserva de sementes e proteínas transferidoras de lipídeos de plantas. Dessa forma, como parte da caracterização bioquímica de *McLTP<sub>1</sub>*, algumas atividades vinculadas à proteína foram analisadas, dentre elas a inibitória de tripsina, quimotripsina, papaína e  $\alpha$ -amilase.

*McLTP<sub>1</sub>* apresentou resultado positivo para a atividade inibitória de tripsina, uma protease do tipo serínica (767,100 UI/mgP) e atividade inibitória de quimotripsina, cujo valor observado foi de 25,364 UI/mgP. Este resultado está de acordo com o que foi observado através da sequência NH<sub>2</sub>-Terminal de *McLTP<sub>1</sub>*, na qual foi identificada a presença de domínios conservados de inibidores de tripsina. Outras nsLTPs são altamente expressas no endosperma das sementes em germinação e podem ter um papel na reciclagem de lipídeos no endosperma ou como inibidores de proteases protegendo os cotilédones de proteases liberadas a partir do endosperma, durante a morte celular programada (EDQVIST; FARBOS, 2002; EKLUND; EDQVIST, 2003).

Como parte da caracterização bioquímica foi avaliada a atividade inibitória de tripsina de *McLTP<sub>1</sub>* em diferentes pHs e temperaturas. Quando *McLTP<sub>1</sub>* foi submetida a faixas de pH que variaram entre 3 e 12, houve uma perda significativa da atividade inibitória relativa de tripsina em relação à atividade original, principalmente em pHs ácidos: em pH 3,0, a atividade foi de 33,13% e em pH 4,0 foi de 30,17%. Contudo, Campos *et al.* (2015) mostraram que a administração oral de *McLTP<sub>1</sub>* em camundongos, na dose de 8 mg/kg, 30 ou 60 min antes da administração do ácido acético, reduziu significativamente a ocorrência de contorções abdominais. Sugere-se então que o efeito analgésico

de  $McLTP_1$  em camundongos pode não estar associado à inibição de tripsina, pois mesmo com a diminuição da atividade inibitória relativa de tripsina, o efeito analgésico de  $McLTP_1$  é observado, mesmo com a administração por via oral, passando por pHs ácidos. A estrutura da  $LTP_1$  é estabilizada por quatro pontes de dissulfeto, basicamente consistindo de quatro  $\alpha$ -hélices, formando uma cavidade hidrofóbica, conferindo uma elevada resistência ao calor e digestão proteolítica de  $LTP_1$  que conservam a maior parte da sua capacidade imunogênica após a passagem através do trato gastrointestinal (GAIER *et al.*, 2008; SANCHO *et al.*, 2005; SCHEURER *et al.*, 2004; ASERO *et al.*, 2001; CAVATORTA *et al.*, 2010; FERNANDEZ-RIVAS; VAN; CUEVAS, 1997).

Foi observada diminuição da atividade inibitória relativa de tripsina comparada à atividade original, quando  $McLTP_1$  foi submetida a uma variação de temperaturas (40 a 100 °C), no qual a 80 °C, atividade inibitória encontrada foi de 16,56%. No entanto, Campos *et al.* (2015) demonstraram que  $McLTP_1$ , na dose de 8 mg/kg, administrada pela via i.p. (intra-peritoneal), em camundongos, foi capaz de manter o seu efeito analgésico, mesmo quando incubada a 80 °C, por 30 minutos, não sendo observadas diferenças significativas na redução das contorções abdominais quando comparada à proteína não aquecida (25 °C), indicando que o efeito analgésico de  $McLTP_1$  em camundongos não está relacionado à inibição de tripsina e que a proteína se mantém estável mesmo após aquecimento, sem perda de estrutura secundária.

Também foi encontrado para  $McLTP_1$ , atividade inibitória de papaína (65,419 UI/mgP). Já é relatado que os inibidores de proteases cisteínicas estão presentes em mono e dicotiledôneas e são encontradas em sementes, raízes, tubérculos, folhas e frutos. E o alto teor desses inibidores nas sementes sugere atuação no armazenamento de nutrientes, ação protetora contra ataque de animais predadores, insetos e ainda no controle fisiológico das enzimas proteolíticas durante a dormência e germinação, prevenindo a hidrólise prematura do material de reserva, controlando assim, a mobilização de proteínas durante estes períodos (LOPES, 2006).

Adicionalmente, foi verificada a presença de atividade inibitória de  $\alpha$ -amilase (34,710 UI/mgP). Zottich *et al.* (2011) obtiveram a primeira  $LTP$  com

atividade inibitória de  $\alpha$ -amilase *in vitro* na saliva humana, isolada das sementes de *Coffea canephora*. A LTP isolada de sementes de *Capsicum annuum*, denominada de Ca-LTP<sub>1</sub> também apresentou atividade inibitória de  $\alpha$ -amilase *in vitro*, sendo capaz de inibir a atividade da  $\alpha$ -amilase da saliva humana completamente na concentração de 25  $\mu$ g (DIZ *et al.*, 2011). Muitas funções têm sido atribuídas a LTPs de plantas, incluindo o transporte de moléculas hidrofóbicas (fosfolipídeos) entre membranas, formação de cera e cutina (CAMERON; TEECE; SMART, 2006; HAN *et al.*, 2001; PYEE; YU; KOLATTUKUDY, 1994) proteção contra fungos e bactérias patogênicos (CARVALHO; GOMES, 2007; GONORAZKY; REGENTE; DE LA CANAL, 2005; LIN; XIA; NG, 2007; TERRAS *et al.*, 1992; VELAZHAHAN *et al.*, 2001; YANG *et al.*, 2006) mobilização de lipídeos de armazenamento de sementes (EDQVIST; FARBOS, 2002; TSUBOI *et al.*, 1992) e extensão da parede celular (NIEUWLAND *et al.*, 2005). A capacidade de peptídeos antimicrobianos em inibir a atividade da  $\alpha$ -amilase também tem sido atribuída à família defensina de plantas por alguns autores (BLOCH; RICHARDSON, 1991; PELEGRINI *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2009). Com base na capacidade LTPs de plantas em inibir a  $\alpha$ -amilase, é provável que também desempenhem um papel na defesa de plantas contra insetos (DIZ *et al.*, 2011).

Como parte da análise estrutural de *McLTP*<sub>1</sub>, foram obtidas imagens em alta resolução, através de microscopia de força atômica. O princípio de um microscópio de força atômica (AFM) é baseado na alteração das características de vibração de uma viga cantilever, devido a forças entre a ponta do cantilever e a amostra. Uma vez que estas forças são inter-atômicas na natureza, não é necessário que a amostra seja uma superfície eletricamente condutora. Como resultado, AFM é aplicável aos condutores e não condutores, bem como superfícies (SINHA, 2005). Há vários modos de operação para a digitalização e mapeamento de superfície. Esses modos incluem não contato, o modo de contato, e modo de contato intermitente. O modo intermitente (*tapping*) tem sido amplamente utilizado em nanômetro-escala na caracterização da superfície de materiais, especialmente para materiais macios como polímeros, moléculas de DNA e proteínas (HORNSTEIN; GOTTLIEB, 2008).

A utilização da microscopia de força atômica como uma ferramenta de análise de biomoléculas, sugerindo como as subunidades de proteínas interagem para formação de complexos moleculares tem sido descritas na literatura (SOUZA, 2014). Souza (2014) mostrou através da microscopia de força atômica que monômeros de CgOsm, uma proteína purificada do látex de *Cryptostegia grandiflora*, interagem formando complexos moleculares de três unidades. Silva *et al.*, (2012) evidenciou através de AFM, que após tratamento com 100 mM DTT, a Vu-2-Cis-Prx, uma 2-Cis-peroxiredoxina isolada de folhas de *Vigna unguiculata* L. revelou a presença de decâmeros individuais.

A topografia apresentada por *McLTP<sub>1</sub>* através da microscopia de força atômica mostra que a proteína se associou umas às outras formando canais centrais com diâmetros de aproximadamente 4,4 nm e a imagem tridimensional ressaltou o padrão de oligomerização de *McLTP<sub>1</sub>*. Alguns autores relataram a formação de dímeros em LTPs de plantas. Terras *et al.* (1992) isolaram uma ns-LTP-like das sementes de rabanete (*Raphanus sativus* L.). Na análise por SDS-PAGE dessa proteína, a forma reduzida de ns-LTP-like apareceu como uma banda de 9 kDa. Na forma não reduzida, ns-LTP-like apresentou massa molecular aparente de 18 kDa. Uma estrutura dimérica foi descrita para uma ns-LTP de mudas de milho por Douady *et al.* (1982). Em concentrações altas, agregação desse tipo de proteína também foi observada (KADER; JULIENNE; VERGNOLLE, 1984). Gorjanovic *et al.* (2005) também isolaram uma *LTP<sub>1</sub>* de *Hordeum vulgare* cuja forma não reduzida é dimérica, apresentando uma massa molecular aparente de 16 kDa em SDS-PAGE. IWF5, uma LTP isolada de *Beta vulgaris* L. também foi capaz de formar dímeros, evidenciados por espectrometria de massas (KRISTENSEN; BRUNSTEDT; KLAUS, 2000). Além disso, estudos realizados por Yang *et al.* (2013) demonstraram um modelo para os ciclos de transferência de lipídeos entre membranas de Sfh3, um homólogo da proteína Sec14 (proteína transferidora de fosfatidilinositol de *Saccharomyces cerevisiae*), que se apresenta na conformação de dímero quando não está ligada à lipídeos. Para *McLTP<sub>1</sub>*, Campos *et al.* (2015), através de análise eletroforética, relataram massa molecular aparente de 15,13 kDa. A massa molecular precisa de *McLTP<sub>1</sub>* foi determinada através de análise em espectrômetro de massa. O



espectro de *McLTP*<sub>1</sub> nativa foi processado usando ionização por eletrospray em modo positivo (ESI+) e os espectros desconvoluídos mostraram dois picos de razão m/z de 9,45 e 9,46.

Outra etapa importante deste trabalho consistiu nas análises espectroscópicas por dicroísmo circular de *McLTP*<sub>1</sub>. O dicroísmo circular (CD) é uma técnica valiosa que atualmente tem se tornado cada vez mais útil no entendimento de parâmetros estruturais. A técnica de CD se baseia na absorção da luz circularmente polarizada por cromóforos que possuem quiralidade intrínseca ou são colocados em ambientes quirais (KELLY; JESS; PRICE, 2005). As proteínas possuem vários cromóforos que podem dar origem a sinais de CD. Na região do UV distante (180-240 nm), que corresponde à faixa de comprimentos de onda na qual ocorre a absorção por parte dos peptídeos, o espectro de CD pode ser analisado, fornecendo informações sobre conteúdo de estrutura secundária em relação à presença de  $\alpha$ -hélices, folhas- $\beta$ , voltas e estruturas não ordenadas. O espectro de CD na região do UV de 260 a 320 nm é utilizado para análises de cadeias laterais de aminoácidos aromáticos e, portanto, confere informações sobre a estrutura terciária da proteína (KELLY; PRICE, 2000). Essa técnica possibilita o estudo da estrutura da molécula na condição em que ela exerce sua atividade biológica.

*McLTP*<sub>1</sub> apresentou um espectro de CD caracterizado por mínimos de elipticidade molar em 208 e 222 nm e um máximo positivo observado a 195 nm, com um total de 26 % de  $\alpha$ -hélices. Zaman e Abassi (2009) relataram um total de 50,06 % de  $\alpha$ -hélices para a *nsLTP*<sub>1</sub> isolada do cominho (*Cuminum cyminum*). Para *Ca-LTP*<sub>1</sub>, uma LTP isolada das sementes de pimenta (*Capsicum annuum*) foi observado um total de 54 % de  $\alpha$ -hélices (Diz *et al.*, 2011). Ramírez-Medeles *et al.* (2003) também mostraram um espectro de CD para uma LTP isolada de *Amaranthus hypochondriacus* que revelou uma estrutura secundária predominantemente em  $\alpha$ -hélice, o que é uma característica típica das LTPs de plantas. O resultado encontrado para *McLTP*<sub>1</sub> está de acordo com os espectros de CD encontrados para outras LTPs de plantas, com uma estrutura secundária em  $\alpha$ -hélice, com mínimos de 208 e 222 nm e máximo positivo entre 195 e 200 nm, como LTP de pêssego, cereja, avelã, aipo, feijão verde, pólen de artemísia, pimenta, uvas, cominho e pêra

(GADERMAIER *et al.*, 2009, 2010; HARTZ *et al.*, 2010; MARI; FERREIRA, 2009; ZOCCATELLI *et al.*, 2010; DIZ *et al.*, 2011; JAECKELS *et al.*, 2013; ZAMAN; ABBASI, 2009; RAMAZZINA *et al.*, 2012). Estruturas tridimensionais de LTP<sub>1</sub>s de plantas já descritas, determinadas por cristalografia de raios-X ou espectroscopia de RMN, demonstraram que são compostas de quatro  $\alpha$ -hélices e uma região C-terminal (LEE *et al.*, 1998; LIN *et al.*, 2005).

Foi observado que mesmo com o aquecimento até 95 °C, quando há o retorno de *McLTP*<sub>1</sub> para a temperatura inicial de 20 °C, não houve mudanças significativas no espectro de CD em relação ao espectro da proteína nativa. Esse dado está de acordo com o que já foi descrito para as LTPs, que possuem alta resistência à desnaturação, calor e proteases, devido à sua estrutura compacta formando uma cavidade hidrofóbica com quatro  $\alpha$ -hélices e quatro pontes dissulfeto (LINDORFF-LARSEN; WINTER, 2001; YEATS; ROSE, 2008). Uma das características estruturais claramente relacionadas com a estabilidade são as pontes dissulfeto, tanto intra como inter-cadeias (BREITENEDER; MILLS, 2005).

A espectroscopia de CD em proteínas e peptídeos é uma ferramenta muito utilizada no estudo de mudanças conformacionais (sofridas devido a variações de solventes, temperatura e de pH), na interação com ligantes e em ensaios de desnaturação e renaturação de proteínas (NAKANISHI; BEROVA; WOODY, 1994; KELLY; PRICE, 1997).

Através da técnica de CD, os espectros obtidos com o aumento gradual de temperatura (15 a 95 °C) mostraram que não ocorreram mudanças significativas no padrão de estrutura secundária de *McLTP*<sub>1</sub>, observada em relação à proteína nativa, demonstrando uma estabilidade na estrutura secundária da proteína com as variações de temperatura, assim como outras LTPs se mostraram notavelmente termoestáveis (PACE, 1986; MUNDY; ROGERS, 1986; ASTWOOD; LEACH; FUCHS, 1996; PFEIL, 1998; ASERO *et al.*, 2001; LINDORFF-LARSEN; WINTER, 2001; ASERO *et al.*, 2003).

Campos *et al.* (2015) demonstraram que *McLTP*<sub>1</sub>, na dose de 8 mg/kg, administrada pela via i.p. (intra-peritoneal), em camundongos, foi capaz de manter o seu efeito antinociceptivo, mesmo quando incubada a 80 °C, por 30 minutos, não sendo observadas diferenças significativas na redução das

contorções abdominais quando comparada à proteína não aquecida (25 °C). Dessa forma, os espectros de CD de *McLTP*<sub>1</sub> obtidos no intervalo entre 25 e 80 °C, a 85 °C e depois a 20 °C reforçaram que não houve mudanças significativas no padrão de estrutura secundária de *McLTP*<sub>1</sub> com o aquecimento no intervalo entre 25 e 80 °C e a 85 °C e o retorno da proteína à temperatura de 20 °C. Ramazzina *et al.* (2012) demonstraram que LTPa e LTPb de pêra mesmo quando aquecidas até 85 °C, por 5 min, recuperaram seus espectros iniciais com o retorno da temperatura a 25 °C. Evidenciaram também que o espectro nativo de Pru p 3, uma LTP<sub>1</sub> de pêsego, é recuperado mesmo após o aquecimento a 85 °C e quase completamente recuperado após aquecida a 95 °C, e retornando a 25 °C.

Foram obtidos os espectros de CD de *McLTP*<sub>1</sub> em três valores de pH (3,0, 7,0 e 11). Nos pHs 7,0 e 11 não houve mudanças significativas nos espectros. Porém, no pH 3,0 houve mudanças nos mínimos de elipticidade molar e no máximo positivo. No entanto, Campos *et al.* (2015) demonstraram que *McLTP*<sub>1</sub> foi resistente à proteólise com pepsina. Mesmo após 4 horas de incubação com a referida protease, a banda referente à *McLTP*<sub>1</sub> através de análise eletroforética ainda pode ser observada como intacta. A resistência à digestão em fluido gástrico simulado (pH ácido, pepsina) tem sido demonstrada em várias nsLTPs alergênicas, tais como pêsego - Pru p 3, cereja - Pru av 3, uva - Vit v 1 e cevada – nsLTP<sub>1</sub> (ASERO *et al.*, 2001; DUFFORT *et al.*, 2002; LINDORFF-LARSEN; WINTER, 2001; VASSILOPOULOU *et al.*, 2006). Campos *et al.* (2015) também demonstraram que o efeito analgésico e anti-inflamatório de *McLTP*<sub>1</sub> em camundongos, na dose de 8 mg/kg também era observado pela via oral, indicando que a proteína pode passar pelo trato gastrointestinal, ou seja, por diferentes valores de pH, sem perder sua potência.

As proteínas transportadoras de lipídeos (LTPs) são formadas por resíduos de cisteínas conservados e uma estrutura tridimensional formada por quatro hélices, estabilizada por quatro pontes dissulfeto (YEATS; ROSE, 2008). As quatro pontes dissulfeto são conservadas e são importantes para estabilizar a estrutura das LTPs (JAECKELS *et al.*, 2013). Dessa forma, foi obtido o espectro de CD de *McLTP*<sub>1</sub> com a utilização de um agente redutor, DTT 1 mM.

Com a redução das pontes dissulfeto, houve mudanças nos mínimos e no máximo positivo de elipticidade molar, em relação ao espectro de *McLTP<sub>1</sub>* sem a utilização do agente redutor (DTT 1 mM), indicando a importância das pontes dissulfeto para manutenção da estrutura.

As LTPs são descritas na literatura como peptídeos catiônicos e possuem uma larga cavidade hidrofóbica, com espaço suficiente para a ligação de um ou dois lipídeos (YEATS; ROSE, 2008). As interações hidrofóbicas desempenham papel importante na ligação à lipídeos. LTP<sub>1</sub>s de plantas podem se ligar à várias moléculas hidrofóbicas, incluindo os ácidos graxos, fosfolipídeos, liso-derivados, prostaglandina B2 e acil-coenzima A. (HAN *et al.*, 2001; CHARVOLIN *et al.*, 1999; SODANO *et al.*, 1997; GOMAR *et al.*, 1996; TASSIN-MOINDROT *et al.*, 2000). A capacidade de LTP<sub>1</sub>s em interagir com lipídeos de micelas ou bicamadas varia de uma proteína para outra (SUBIRADE *et al.*, 1995). Devido à complexidade das membranas biológicas, utilizam-se modelos simplificados, como detergentes na forma de micelas, para um estudo inicial de um grande número de fenômenos que ocorrem nas membranas, a fim de se obter informações da interação de drogas com as membranas celulares (SONG *et al.*, 1998; MAITI; MAZUMDAR; PERIASAMY, 1998; GANDINI *et al.*, 1999). Uma vez que o estudo das propriedades espectroscópicas de *McLTP<sub>1</sub>* com micelas pode fornecer subsídios importantes para a compreensão da interação de *McLTP<sub>1</sub>* com as membranas biológicas, investigou-se a influência de diferentes micelas (CTAB, HPS e SDS).

Dessa forma, foram obtidos os espectros de CD de *McLTP<sub>1</sub>*, após incubação com diferentes micelas: HPS 10 mM, SDS 10 mM e CTAB 1 mM. Foi observado que não houve mudança nos espectros de *McLTP<sub>1</sub>*, que é de natureza catiônica, na presença de uma micela catiônica (CTAB) e de uma micela zwitteriônica (HPS). A interação não significativa entre *McLTP<sub>1</sub>* e a micela catiônica CTAB pode ser atribuída à repulsão eletrostática que ocorre entre as micelas, ambas carregadas positivamente. Mas, na presença de uma micela aniônica (SDS) houve interação de *McLTP<sub>1</sub>*, ocasionando mudança no mínimo de elipticidade molar e no máximo positivo do espectro obtido. As interações hidrofóbicas que são importantes na ligação à lipídeos, quando ambas as moléculas são carregadas, a interação é determinada

predominantemente por fatores eletrostáticos. Petit *et al.* (1994) observaram que a interação eletrostática entre as cargas positivas de LTP e cargas negativas de fosfolípido aniônico da bicamada podem também explicar a melhora da atividade de transferência de lipídeos, quando lipídeos aniônicos são adicionados às lipossomas zwitteriônicas.

O comportamento de *McLTP*<sub>1</sub> foi analisado também por espectroscopia de emissão de fluorescência, que se baseia na absorção e emissão de luz por compostos aromáticos presentes na molécula. A espectroscopia de emissão de fluorescência estática também é largamente usada no estudo de proteínas e peptídeos para fornecer informações relacionadas às vizinhanças dos grupos fluorescentes (fluoróforos naturais), que em proteínas são os aminoácidos aromáticos: fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr) e triptofano (Trp). A fluorescência destes resíduos é altamente sensível ao ambiente em que se encontram, portanto, monitorar suas alterações pelos parâmetros da espectroscopia de fluorescência, tais como posição do máximo de emissão ( $\lambda_{max}$ ) e mudanças no rendimento quântico ( $\phi F$ ) devido à ação de solventes, ligantes e pH, sugerem discretas mudanças conformacionais sofridas nas vizinhanças dos fluoróforos (LAKOWICZ, 1999). A variação de temperatura (25 °C e 70 °C) e a utilização do agente redutor DTT 1 mM não afetaram os espectros de emissão excitados a 280 nm, apresentando um máximo de intensidade de emissão de fluorescência a 350 nm, sugerindo a conservação da posição espacial dos resíduos aromáticos na estrutura tridimensional (LOPES, 2006, 2010). Entretanto, na presença do surfactante aniônico SDS 10 mM, após excitação a 280 nm, a emissão máxima de fluorescência foi 335 nm. Então, é possível que essa alteração estrutural esteja relacionada à mudança do espectro de emissão de fluorescência detectado para *McLTP*<sub>1</sub>.

Na segunda parte deste trabalho, algumas atividades biológicas importantes foram realizadas. Estudos relacionados à *Morinda citrifolia* L. e câncer já foram relatados por Brown (2012) em uma revisão de literatura, utilizando a fonte de dados MEDLINE, encontrando 19 estudos, nos quais, 7 foram estudos *in vitro*, 9 foram *in vivo* com animais e 3 *in vivo* com humanos, sendo utilizado o precipitado, extrato ou suco do fruto e extrato de folhas.

Furusawa *et al.* (2003) mostraram que a atividade antitumoral de Noni-ppt, uma substância rica em polissacarídeos extraída de *Morinda citrifolia* produziu a cura em 25% a 45% dos camundongos testados contra Sarcoma 180. Kamiya *et al.* (2010) estudaram o potencial anticarcinogênico de diversas antraquinonas isoladas da raiz de *Morinda citrifolia* L. (noni), no qual foram encontradas 10 antraquinonas, e dentre elas, os compostos 1,3-diidroxi-2-etoximetilantraquinona, 3-hidroxi-1-metoxi-2-metoximetilantraquinona, nordamnacantal, damnacantal e morindona exibiram notável inibição contra o câncer, e o composto morindona foi o mais forte inibidor de todas as antraquinonas investigadas.

Dessa forma, a fim de avaliar a viabilidade das células tumorais das linhagens: HCT-116 (côlon – humano), HL-60 (leucemia – humano) Ovc8-8 (ovário – humano) e SF-295 (glioblastoma – humano), após incubação de 72 horas com *McLTP*<sub>1</sub>, a absorbância da cultura foi monitorada a 595 nm, para detecção do MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromide) metabolizado na mitocôndria das células viáveis. Como detecção de toxicidade, um controle positivo foi empregado utilizando a doxorrubicina (molécula tóxica a estas células). Os ensaios com *McLTP*<sub>1</sub> mostraram que houve efeito citotóxico na linhagem celular de câncer de ovário (Ovc8-8), com  $CI_{50} = 16,6 \mu\text{g/mL}$ . Estudo de citotoxicidade com nsLTPs isoladas das folhas de *Pandanus amaryllifolius*, denominadas FBP e BGBP, apresentaram  $CI_{50}$ , contra células de leucemia humana (HL-60), de 277,1  $\mu\text{g/mL}$  e 477,6  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente (LINDA *et al.*, 2006). Linda *et al.* (2008) demonstraram que a nsLTP isolada de bulbos de *Narcissus tazetta*, denominada NTP, apresentou uma atividade inibitória sobre a proliferação de células de leucemia humana (HL-60), com  $CI_{50}$  de 168  $\mu\text{g/mL}$ . A LTP isolada das sementes de *Peganum harmala*, PHP, apresentou atividade antiproliferativa contra várias linhagens de células tumorais, incluindo as de carcinoma de esôfago (Eca-109), carcinoma de cervical (HeLa), carcinoma gástrico (MGC-7) e melanoma (B16), com  $CI_{50}$  de 0,7  $\mu\text{M}$ , 2,74  $\mu\text{M}$ , 3,13  $\mu\text{M}$  e 1,47  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Entretanto, algumas nsLTPs, como a nsLTP isolada de feijão mungo não apresentou atividade citotóxica contra linhagens de células tumorais (LIN *et al.*, 2007). O estudo

citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (SKEHAN *et al.*, 1990).

Outro dado importante obtido para *McLTP<sub>1</sub>* está relacionado à atividade hemolítica. A medida da absorbância para monitorar a lise das células, mostrou que *McLTP<sub>1</sub>* apresentou efeito hemolítico desde a menor concentração testada (0,005 mg/mL). E na maior concentração testada (0,75 mg/mL) apresentou um efeito hemolítico de até 50%. Dessa forma, se *McLTP<sub>1</sub>* apresentou efeito citotóxico contra a linhagem celular de câncer de ovário (Ovcar-8) e não apresentou para as demais linhagens celulares tumorais testadas (HCT-116, HL-60 e SF-295) pode este efeito não estar relacionado somente à lise da membrana celular, sugerindo então que pode estar relacionado também a diferentes composições das membranas das linhagens tumorais testadas. Estudos envolvendo LTPs e a defesa contra bactérias e fungos patogênicos têm relacionado o efeito em inibir esses patógenos à capacidade das LTPs em interagir com as membranas biológicas, conduzindo possivelmente a sua permeabilização devido à perda da integridade da membrana (KADER, 1996; REGENTE *et al.*, 2005; DIZ *et al.*, 2011).

Várias proteínas transferidoras de lipídeos já foram identificadas como alérgenos vegetais (SALCEDO *et al.*, 2004). Tais peptídeos foram relatados em frutos da família Rosaceae, como pêssego, damasco e cereja, Vitaceae, como as uvas, bem como em outras espécies de plantas como *Asparagus officinalis*, *B. oleraceae var. capitata* e *Z. mays* (DÍAZ-PERALES *et al.*, 2002; PASTORELLO *et al.*, 1999, 2000, 2001, 2003a; PALACÍN *et al.*, 2006; VAN REE, 2002). Têm sido demonstrado que as LTPs são relativamente estáveis, resistentes à desnaturação térmica e química e digestão enzimática (ASERO *et al.*, 2001; LINDORFF-LARSEN; WINTER, 2001; PASTORELLO *et al.*, 2003b; VASSILOPOULOU *et al.*, 2006). Estas características físico-químicas estáveis sugerem que as LTPs mantêm seus motivos alergênicos e imunogênicos após a passagem pelo trato gastrointestinal, e pode interagir com o sistema imune epitelial para induzir sensibilização e sintomas sistêmicos (SALCEDO *et al.*, 2007).

Para prever o risco alergênico de uma determinada proteína, vários fatores devem ser considerados. O potencial alergênico de uma proteína

pode ser avaliado pela comparação de sua sequência primária de aminoácidos com aquelas de proteínas alergênicas depositadas em bancos de dados (FAO/WHO, 2001; LADICS, 2008; CODEX ALIMENTARIUS, 2009; LADICS *et al.*, 2011; CRESSMAN; LADICS, 2009). Dessa forma, pesquisa *in silico* foi conduzida para avaliar o grau de similaridade da sequência N-terminal de aminoácidos de *McLTP<sub>1</sub>* (AVPCGQVSSALSPCMSYLTGGGDDPEARCCAGV) com sequências de proteínas reconhecidamente alergênicas para o homem. Inicialmente, com a sequência N-terminal de *McLTP<sub>1</sub>* utilizou-se a ferramenta de bioinformática AllerTOP 1.0 para predição de alergenicidade, com base nas principais propriedades físico-químicas das proteínas, prevendo a rota mais provável de exposição ao alérgeno: alimento, inalante ou toxina, com sensibilidade de 94% em comparação com outras ferramentas (DIMITROV; FLOWER; DOYTCHINOVA, 2013), tendo como resultado, a probabilidade de 33% de ser um alérgeno alimentar, 33% inalante e 33% salivar ou toxina.

Adicionalmente, pesquisa *in silico* foi conduzida para avaliar o grau de similaridade da sequência N-terminal de aminoácidos de *McLTP<sub>1</sub>* com sequências de proteínas reconhecidamente alergênicas, utilizando os critérios estabelecidos pela FAO/WHO (2001). A sequência N-terminal de *McLTP<sub>1</sub>* foi comparada às sequências de alérgenos depositadas nos seguintes bancos de dados: (1) *Allergome*, (<http://www.allergome.org>); (2) *Structural Database of Allergenic Proteins* (SDAP), da Universidade do Texas, USA (<http://fermi.utmb.edu/SDAP>); (3) *Allergen Database for Food Safety* (ADFS) (<http://allergen.nihs.gov.jsp>) e (4) *Allergen Online version 15 database*, da Universidade de Nebraska em Lincoln (<http://www.allergenonline.com>), apresentando identidade com LTPs reconhecidamente alergênicas. A sequência N-terminal de *McLTP<sub>1</sub>* foi submetida a comparações do tipo FASTA completa (*Full FASTA*), usando como filtro (*cut-off*) *E-value* < 0,01, na detecção de identidade > 35% (AALBERSE, 2000).

É importante ressaltar que a bioinformática somente, não pode ser utilizada para prever se a proteína é um alérgeno (THOMAS *et al.*, 2005). Portanto, a resposta imunológica de camundongos imunizados com 10 µg e 50 µg de *McLTP<sub>1</sub>*, na ausência de adjuvante foi testada por ELISA. Os modelos animais têm grande potencial para serem ferramentas importantes nas



respostas a algumas das perguntas que ainda cercam a alergia alimentar. Há evidências na literatura sobre o papel da alergia mediada por IgE em reações gastrointestinais para alimentos básicos (BENGTSSON *et al.*, 1996). As investigações em seres humanos são limitadas por restrições de ordem ética e pela possibilidade de reações anafiláticas fatais (BOCK; MUÑOZ-FURLONG; SAMPSON, 2001). Isto estimula maior interesse na utilização de modelos animais para prever possíveis origens da alergia, para identificar possíveis mecanismos envolvidos no estímulo de alergias, e testes de novos tratamentos terapêuticos (ALDEMIR; BARS; HEROUET-GUICHENEY, 2009; HELM; ERMEL; FRICK, 2003; LEHRER; MCCLAIN, 2009).

Foi possível observar que  $McLTP_1$  revelou atividade imunogênica, induzindo a síntese de anticorpos policlonais dos tipos IgG e IgG1. A síntese de IgG foi detectada a partir do sétimo dia após o início da imunização, para o grupo imunizado com 50  $\mu$ g de  $McLTP_1$  e continuou ao longo do experimento na resposta secundária, como demonstrado pelo teste de ELISA. Houve também diferença estatística entre os grupos imunizados com 10  $\mu$ g e 50  $\mu$ g de  $McLTP_1$  na resposta primária. A síntese de IgG1 foi detectada a partir do sétimo dia após o início da imunização, tanto para os grupos imunizados com 10  $\mu$ g e 50  $\mu$ g de  $McLTP_1$ , mas não persistiu ao longo do experimento na resposta secundária.

Os resultados deste estudo sugerem que  $McLTP_1$  pode causar reações alérgicas, uma vez que alguns isotipos de IgG, especialmente IgG1 e IgG2a, estão envolvidos em processos alérgicos (PASCHOAL, 2007; SANTOS *et al.*, 2012). O aumento da produção de IgG1 sugere a ocorrência de uma modulação da resposta imune para o perfil Th2, indicando a deflagração provável de processos alérgicos. Estudos demonstram que a IgG1 pode aumentar a inflamação pulmonar eosinofílica e hipersensibilidade das vias respiratórias (MACEDO-SOARES *et al.*, 2004).

$McLTP_1$  induziu uma resposta imune humoral em camundongos com a síntese de IgG e IgG1. Mais estudos, com a utilização da IgE são necessários para elucidar os mecanismos imunológicos envolvidos na reação alérgica à  $McLTP_1$ . Porém, vale ressaltar que nos testes de toxicidade em doses repetidas realizados com  $McLTP_1$ , não houve alterações nos parâmetros

comportamentais, hematológicos e bioquímicos avaliados, não sendo observados sinais de toxicidade (COSTA, 2013).

As LTPs são consideradas pan-alérgenos, mostrando frequentemente reações cruzadas com LTPs de diferentes fontes, principalmente frutos da família Rosaceae e pólen. No entanto, essa reação cruzada é variável entre as diferentes fontes (TORDESILLAS *et al.*, 2011). A distribuição ubíqua das LTPs em uma variedade de tecidos de muitas espécies de plantas sugere seu potencial como pan-alérgeno em alimentos de origem vegetal (KADER, 1996). Os principais alérgenos, atualmente identificados, envolvidos nas alergias às rosáceas (como a maçã e o pêssego) são as proteínas homólogas de Bet v 1 (pólen de bétula), as profilinas (Bet v 2) e as proteínas transferidoras de lipídeos (CARRAPATOSO *et al.*, 2004).

Gandolfo-Cano *et al.* (2014) demonstraram que a LTP isolada da casca do melão é o principal alérgeno evidenciado nesse fruto, com capacidade de provocar urticária de contato em pacientes que são alérgicos à casca do melão. Em alguns casos, reações alérgicas atribuídas à ingestão da polpa do melão podem realmente ser causadas pelo contato com a casca deste fruto ao ingerí-lo. Estes tipos de pacientes podem tolerar a ingestão da polpa do melão, se eles não forem sensibilizados para as proteínas presentes nesta parte do fruto (tal como profilina), mas sim apenas para a LTP presente na casca do melão.

Dessa forma, para investigar possíveis reações cruzadas com *McLTP*<sub>1</sub>, o ensaio de *Dot Blotting* foi realizado, utilizando-se os anticorpos policlonais produzidos em coelho contra *McLTP*<sub>1</sub>, para reconhecimento em amostras de extratos proteicos das cascas de frutos como a maçã e o pêssego, da família Rosaceae, da casca do melão, da família Cucurbitaceae e da polpa do noni, da família Rubiaceae, imobilizadas em membrana de nitrocelulose. Foram utilizadas cascas dos frutos maçã, pêssego e melão, pois já foi relatado que as LTPs costumam se acumular nas camadas externas da epiderme de órgãos de plantas, o que explica a alergenicidade maior de cascas em comparação com polpas de frutos da família Rosaceae (VAN REE, 2002). Foi obtido um resultado interessante, pois os anticorpos policlonais produzidos contra *McLTP*<sub>1</sub> foram capazes de reconhecer a amostra do extrato proteico de

melão, mas não reconheceram as amostras dos extratos proteicos de maçã, pêsego e polpa do noni, diante da maior frequência de reações cruzadas envolvendo LTPs de frutos da família Rosaceae. Entretanto, no ensaio do Elisa indireto, os anticorpos produzidos em coelho anti- *McLTP*<sub>1</sub> foram capazes de reconhecer outras LTP<sub>1</sub>s presentes nos extratos proteicos das cascas da maçã, pêsego, melão e polpa do noni. Apesar de possuírem baixa identidade estrutural primária, aproximadamente 30 % identidade, as LTP<sub>1</sub>s possuem mesma estrutura tridimensional, com quatro  $\alpha$ -hélices, cadeia C-terminal, formando uma cavidade hidrofóbica com espaço para ligação à um ou dois lipídeos, sugerindo a presença de determinantes antigênicos comuns (YEATS; ROSE, 2008; GIZATULLINA *et al.*, 2013). Alguns autores já relacionaram a estrutura conservada das LTPs com a reatividade cruzada frequentemente observada (DÍAZ-PERALES *et al.*, 2000; GARCIA-SELLES *et al.*, 2002; LOMBARDERO *et al.*, 2004).

## 7 CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que *McLTP<sub>1</sub>* apresentou *in vitro* atividades inibitórias de tripsina, quimotripsina, papaína e  $\alpha$ -amilase. É uma proteína termoestável, mantendo sua estrutura secundária em diferentes temperaturas (15 – 95 °C), assim como se mantém em pHs neutros e básicos e interage eletrostaticamente com micelas aniônicas. Com o uso de um agente redutor (DTT) foram observadas alterações em sua estrutura secundária. *McLTP<sub>1</sub>* possui um padrão de oligomerização, formando possíveis dímeros ou dímeros de dímeros, demonstrado por microscopia de força atômica.

*McLTP<sub>1</sub>* foi citotóxica contra células tumorais de ovário humano, mas não para as células tumorais de cólon, leucemia e glioblastoma humanas, com uma  $CI_{50}$  menor em comparação com outras LTPs, sendo promissora para futuros estudos *in vivo*. *McLTP<sub>1</sub>* apresentou identidade com LTPs reconhecidamente alergênicas quando comparado seu N-terminal nos seguintes bancos de dados de alérgenos: *Allergome*, SDAP, ADFS e *Allergen Online*.

*McLTP<sub>1</sub>* induziu uma resposta imune humoral em camundongos, por via oral, com a síntese de IgG e IgG1. Os anticorpos produzidos em coelho anti- *McLTP<sub>1</sub>* foram capazes de reconhecer proteínas presentes em extratos de Rosaceae, Curcubitaceae e na polpa do fruto de noni.

Os dados obtidos permitiram caracterizar parcialmente a proteína em estudo, bem como avaliar o seu potencial imunogênico após administração oral. Novos testes serão conduzidos objetivando avaliar a importância clínica dessas respostas, uma vez que testes de toxicidade demonstraram que *McLTP<sub>1</sub>* não foi capaz de promover reações adversas em camundongos, mesmo após administração da dose de 8 mg/kg por 28 dias. Os dados também servirão para o entendimento do mecanismo de ação de *McLTP<sub>1</sub>*, nos processos de inflamação e dor em estudos a serem realizados.

## REFERÊNCIAS

AALBERSE, R. C. Structural biology of allergens. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 106, p. 228-38, 2000.

ABE, M.; ABE, K.; KURODA, M.; ARAI, S. Corn kernel cysteine proteinase inhibitor as a novel cystatin superfamily member of plant origin: molecular cloning and expression studies. **European Journal of Biochemistry**, v. 209, p. 933–937, 1992.

ALDEMIR, H.; BARS, R.; HEROUET-GUICHENEY, C. Murine models for evaluating the allergenicity of novel proteins and foods. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 54, p. 52–57, 2009.

ALENCAR, N. M. N.; TEIXEIRA, E. H.; ASSREUY, A. M. S.; CAVADA, B. S.; FLORES, C. A.; RIBEIRO, R. A. Leguminous lectins as tools for studying the role of sugar residues in leukocyte recruitment. **Mediators of Inflammation**, v. 8, p. 107–113, 1999.

ALENCAR, V. B.; ALENCAR, N. M.; ASSREUY, A. M.; MOTA, M. L.; BRITO, G. A.; ARAGÃO, K. S.; BITTENCOURT, F. S.; PINTO, V. P.; DEBRAY, H.; RIBEIRO, R. A.; CAVADA, B. S. Pro-inflammatory effect of *Arum maculatum* lectin and role of resident cells. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 37, p. 1805–1814, 2005.

ARONDEL, V.; VERGNOLLE, C.; CANTREL, C.; KADER, J. C. Lipid transfer proteins are encoded by a small multigene family in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Science**, v. 157, p. 1–12, 2000.

ASERO, R.; MISTRELLO, G.; RONCAROLO, D.; VRIES, S. C.; GAUTIER, M. F.; CIURANA, C. L.; VERBEEK, E.; MOHAMMADI, T.; KNUL-BRETTLOVA, V.; AKKERDAAS, J. H.; BULDER, I.; AALBERSE, R. C.; VAN REE, R. Lipid transfer protein: a pan-allergen in plant-derived foods that is highly resistant to pepsin digestion. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 124, p. 67–69, 2001.

ASERO, R.; MISTRELLO, G.; RONCAROLO, D.; AMATO, S.; FALAGIANI, P. Analysis of the heat stability of lipid transfer protein from apple. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 112, n. 5, p. 1009-1011, 2003.

ASTWOOD, J. D.; LEACH, J. N.; FUCHS, R. L. Stability of food allergens to digestion *in vitro*. **Nature Biotechnology**, v. 14, p. 1269-1273, 1996.

ATKINSON, N. Antibacterial substances from flowering plants. 3. Antibacterial activity of dried Australian plants by rapid direct plate test. **Australian Journal of Experimental Biology**, v. 34, p. 17-26, 1956.

- BATISTA, A. B. Caracterização estrutural da *Mo*-CBP3, uma albumina 2S de sementes de *Moringa oleifera* Lamarck e seu modo de ação contra fungos fitopatogênicos. 2013. **Tese (Doutorado em Bioquímica)** - Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.
- BENGTSSON, U.; NILSSON-BALKNAS, U.; HANSON, L. A.; AHLSTEDT, S. Double blind, placebo controlled food reactions do not correlate to IgE allergy in the diagnosis of staple food related gastrointestinal symptoms. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 39, p. 130–135, 1996.
- BEWLEY, C. A. Solution structure of a cyanovirin-N: Mana 1-2 Mana complex: structural basis for high-affinity carbohydrate-mediated binding to gp120. **Structure**, v. 9, p. 931-940, 2001.
- BLACKMAN, S. A.; OBENDORF, R. L.; LEOPOLD, A. C. Desiccation tolerance in developing soybean seeds: the role of stress proteins. **Physiologia Plantarum**, v. 93, p. 630–638, 1995.
- BLEIN, J. P.; COUTOS-THEVENOT, P.; MARION, D.; PONCHET, M. From elicitors to lipid transfer proteins: a new insight in cell signalling involved in plant defense mechanisms. **Trends in Plant Science**, v. 7, p. 293–296, 2002.
- BLOCH, C.; RICHARDSON, M. A new family of small (5 kDa) protein inhibitors of insect  $\alpha$  amylases from seeds of sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench) have sequence homologies with wheat  $\gamma$  -purothionins. **FEBS Letters**, v. 279, p. 101–104, 1991.
- BOCK, S. A.; MUÑOZ-FURLONG, A.; SAMPSON, H. A. Fatalities due to anaphylactic reactions to foods. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 107, p. 191–193, 2001.
- BRAYDEN, D. J.; O'MAHONY, D. J. Novel oral drug delivery gateways for biotechnology products: polypeptides and vaccines. **Pharmaceutical Science and Technology Today**, v. 1, p. 291-299, 1998.
- BREITENEDER, H.; MILLS, C. Nonspecific lipid-transfer proteins in plant foods and pollens: An important allergen class. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v. 5, n. 3, p. 275–279, 2005.
- BROWN, A. C. Anticancer Activity of *Morinda citrifolia* (Noni) Fruit: A Review. **Phytotherapy**, v. 26, p. 1427–1440, 2012.
- BUCKERIDGE, M. D.; AIDAR, M. P. M.; SANTOS, H. P.; TINÉ, M. A. S. Acúmulo de reservas. In: A. G. Ferreira e F. Borghetti (eds.). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre, Artmed, p. 31-50, 2004.

CAMERON, K. D.; TEECE, M. A.; SMART, L. B. Increased accumulation of cuticular wax and expression of lipid transfer protein in response to periodic drying events in leaves of tree tobacco. **Plant Physiology**, v. 140, p. 176–183, 2006.

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

CAMPOS, D. C. O.; COSTA, A. S.; LIMA, A. D. R.; SILVA, F. D. A.; LOBO M. D. P.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O.; MOREIRA, R. A.; VASCONCELOS, I. M.; OLIVEIRA, H. D. First isolation and antinociceptive activity of a thermostable lipid transfer protein from Noni (*Morinda citrifolia* L.) seeds. **Phytochemistry**, v. 99, p. 999 (Artigo Submetido), 2015.

CARRAPATOSO, I.; TAVARES, B.; PEREIRA, C.; RODRIGUES, F.; BARBOSA, A.; CHIEIRA, C. Alergia alimentar a rosáceas e frutos secos. A propósito de um caso clínico. **Revista Portuguesa de Imunoalergologia**, v. 12, p. 68-74, 2004.

CARVALHO, A. O.; MACHADO, O. L. T.; DA CUNHA, M.; SANTOS, I. S.; GOMES, V. M. Antimicrobial peptides and immunolocalization of a LTP in *Vigna unguiculata* seeds. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 39, p. 137–146, 2001.

CARVALHO, A. O.; GOMES, V. M. Role of plant lipid transfer proteins in plant physiology – a concise review. **Peptides**, v. 28, p. 1144–1153, 2007.

CASTRO, M. S.; GERHARDT, I. R.; ORRU, S.; PUCCI P.; BŁOCH, C. J. R. Purification and characterization of a small (7.3 kDa) putative lipid transfer protein from maize seeds. **Journal of Chromatography. B: Biomedical Sciences and Applications** v. 794, p. 109-114, 2003.

CAVATORTA, V.; SFORZA, S.; AQUINO, G.; GALAVERNA, G.; DOSSENA, A.; PASTORELLO, E. A.; MARCHELLI, R. In vitro gastrointestinal digestion of the major peach allergen Pru p 3, a lipid transfer protein: molecular characterization of the products and assessment of their IgE binding abilities. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 54, p. 1452–1457, 2010.

CHAN-BLANCO, Y.; VAILLANT, F.; REYNES, M.; BRILLOUET, J. M.; BRAT, P. The noni fruit (*Morinda citrifolia* L.): A review of agricultural research, nutritional and therapeutic properties. Review. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 645–654, 2006.

CHARVOLIN, D.; DOULIEZ, J. P.; MARION, D.; COHEN-ADDAD, C.; PEBAY-PEYROULA, E. The crystal structure of a wheat nonspecific lipid transfer protein (ns-LTP1) complexed with two molecules of phospholipid at 2.1 Å resolution. **European Journal of Biochemistry/FEBS**, v. 264, n. 2, p. 562–568, 1999.

CHENG, C. S.; CHEN, M. N.; LIU, Y. J.; HUANG, L. Y.; LIN, K. F.; LYU, P. C. Evaluation of plant nonspecific lipid transfer proteins for potential application in drug delivery. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 532–539, 2004a.

CHENG, H. C.; CHENG, P. T.; PENG, P.; LYU, P. C.; SUN, Y. J. Lipid binding in Rice nonspecific lipid transfer protein-1 complexes from *Oryza sativa*. **Protein Science: A Publication of the Protein Society**, v. 13, n. 9, p. 2304–2315, 2004b.

CHIN, J.; MAHMUD, K. A. F.; KIM, S. E.; PARK, K.; BYUN, Y. Insight of current technologies for oral delivery of proteins and peptides. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 9, p. 105-112, 2012.

CIARDIELLO, M. A.; PALAZZO, P.; BERNARDI, M. L.; CARRATORE, V.; GIANGRIECO, I.; LONGO, V.; MELIS, M.; TAMBURRINI, M.; ZENNARO, D.; MARI, A.; COLOMBO, P. Biochemical, immunological and clinical characterization of a cross-reactive nonspecific lipid transfer protein 1 from mulberry. **Allergy**, v. 65, p. 597–605, 2010.

CLOSE, T.J. Dehydrins: a commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. **Physiologia Plantarum**, v. 100, p. 291–296, 1997.

CODEX ALIMENTARIUS. **Foods derived from modern biotechnology**. Rome, Italy, Codex Alimentarius Commission, Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Second Edition. 2009. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/011/a1554e/a1554e00.htm>. Acesso em: 10.02.2015.

Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) - Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. **Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos – DBCA**, Brasília, DF, 2013. Disponível em: [http://www.cobea.org.br/arquivo/download?ID\\_ARQUIVO=20](http://www.cobea.org.br/arquivo/download?ID_ARQUIVO=20). Acesso em: 10.08.2014.

CORREIA, A. A.; GONZAGA, M. L. C.; AQUINO, A. C.; SOUZA, P. H. M.; FIGUEIREDO, R. W.; MAIA, G. A. Caracterização química e físico-química da polpa de noni (*Morinda citrifolia*) cultivado no Estado do Ceará. **Revista Alimentos e Nutrição**, v. 22, n. 4, p. 609-615, 2011.

COSTA, A. S. Testes de estabilidade e de segurança farmacológica de uma proteína isolada de sementes de *Morinda citrifolia* L.: bases para a produção de um fármaco contra a inflamação e a dor. 2013. **Monografia (Graduação em Biotecnologia)**, Curso de Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

COSTA, A. B.; OLIVEIRA, A. M. C.; SILVA, A. M. O.; MANCINI-FILHO, J.; LIMA, A. Antioxidant activity of the pulp, skin and seeds of the noni (*Morinda citrifolia* Linn). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 2, p. 345-354, 2013.



- COSTA, H. P. S.; OLIVEIRA, J. T. A.; SOUSA, D. O. B.; MORAIS, J. K. S.; MORENO, F. B.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O.; VIEGAS, R. A.; VASCONCELOS, I. M. JcTI-I: a novel trypsin inhibitor from *Jatropha curcas* seed cake with potential for bacterial infection treatment. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 1-12, 2014.
- CRESSMAN, R. F.; LADICS, G. Further evaluation of the utility of “Sliding Window” FASTA in predicting cross-reactivity with allergenic proteins. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 54, p. 20-25, 2009.
- DERBYSHIRE, E.; WRIGHT, D. J.; BOULTER, D. Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds. **Phytochemistry**, v. 15, p. 3-24, 1976.
- DIMITROV, I.; FLOWER, D. R.; DOYTCHINOVA, I. AllerTOP - a server for *in silico* prediction of allergens. **BioMed Central Bioinformatics**, v. 14, n. 6, p. 2105-2114, 2013.
- DÍAZ-PERALES, A.; LOMBARDERO, M.; SANCHEZ-MONGE, R.; GARCIA-SELLES, F. J.; PERNAS, M.; FERNANDEZ-RIVAS, M.; BARBER, D.; SALCEDO, G. Lipid-transfer proteins as potential plant panallergens: cross-reactivity among proteins of Artemisia pollen, Castanea nut and Rosaceae fruits, with different IgE-binding capacities. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 30, p. 1403–1410, 2000.
- DÍAZ-PERALES, A.; TABAR, A. I.; SANCHEZ-MONGE, R.; GARCÍA, B. E.; GOMEZ, B.; BARBER, D.; SALCEDO, G. Characterization of asparagus allergens: a relevant role of lipid transfer proteins. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 110, p. 790–796, 2002.
- DITTMAR, A. *Morinda citrifolia* L: Use in indigenous Samoan medicine. **Journal of Herbs and Medicinal Plants**, v. 1, n. 3, p. 77-92, 1993.
- DIZ, M. S. S.; CARVALHO, A. O.; RODRIGUES, R.; NEVES-FERREIRA, A. G. C.; DA CUNHA, M.; ALVES, E. W.; OKOROKOVA, A. L.; OLIVEIRA, M. A.; PERALES, J.; MACHADO, O. L. T.; GOMES, V. M. Antimicrobial peptides from chilli pepper seeds causes yeast plasma membrane permeabilization and inhibits the acidification of the medium by yeast cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1760, p. 1323–1332, 2006.
- DIZ, M. A.; CARVALHO, A. O.; RIBEIRO, S. F. F.; CUNHA, M.; BELTRAMINI, L.; RODRIGUES, R.; NASCIMENTO, V. V.; OLGA L. T. MACHADO, O. L. T.; GOMES, V. M. Characterisation, immunolocalisation and antifungal activity of a lipid transfer protein from chili pepper (*Capsicum annuum*) seeds with novel  $\alpha$ -amylase inhibitory properties. **Physiologia Plantarum**, v. 142, p. 233–246, 2011.
- DOUADY, D.; GROSBOIS, M.; GUERBETTE, F.; KADER, J. C. Purification of a basic phospholipid transfer protein from maize seedlings. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 710, p. 143-153, 1982.

DUFFORT, O. A.; POLO, F.; LOMBARDERO, M.; DÍAZ-PERALES, A.; SANCHEZ-MONGE, R.; GARCIA-CASADO, G.; SALCEDO, G.; BARBER, D. Immunoassay to quantify the major peach allergen Pru p 3 in foodstuffs. Differential allergen release and stability under physiological conditions, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 7738–7741, 2002.

EDQVIST, J.; FARBOS, I. Characterization of germination specific lipid transfer proteins from *Euphorbia lagascae*. **Planta**, v. 215, n. 1, p. 41–50, 2002.

EKLUND, D. M.; EDQVIST, J. Localization of nonspecific lipid transfer proteins correlate with programmed cell death responses during endosperm degradation in *Euphorbia lagascae* seedlings. **Plant Physiology**, v. 132, p. 1249–1259, 2003.

ELKINS, R. Noni (*Morinda citrifolia*) la hierba preciada del pacífico sur. **Woodland Publishing**. Pleasant Grove, UT, p. 31-36, 1997.

ERLANGER, B. F.; KOKOWSKI, N.; COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Archives of Biochemistry Biophysics**, v. 95, p. 271–278, 1961.

FAO/WHO. Evaluation of allergenicity of genetically modified foods. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on allergenicity of foods derived from biotechnology. **Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)**, 2001.

FEDER, M. E.; HOFMANN, G. E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. **Annual Review of Physiology**, v. 61, p. 243–282, 1999.

FERNANDEZ-RIVAS, M.; VAN, R. R.; CUEVAS, M. Allergy to Rosaceae fruits without related pollinosis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 100, p. 728–733, 1997.

FERREIRA, R. B.; MONTEIRO, S.; FREITAS, R.; SANTOS, C. N.; CHEN, Z.; BATISTA, L. M.; DUARTE, J.; BORGES, A.; TEIXEIRA, A. R. The role of plant defence proteins in fungal pathogenesis. **Molecular Plant Pathology**, v. 8, p. 677-700, 2007.

FRANÇA, H. J. Proteínas de Sementes de *Morinda citrifolia* L.: Caracterização Bioquímica e Avaliação do seu Potencial Biotecnológico. 2013. **Monografia (Ciências Biológicas)** – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

FREIRE, J. E. C. Análise *in silico* da sequência deduzida de Mo-CBP3, uma proteína ligante à quitina de *Moringa oleifera* LAM. 2013. **Dissertação (Mestrado em Bioquímica)** - Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

FURUSAWA, E.; HIRAZUMI, A.; STORY, S.; JENSEN, J. Antitumor Potential of a Polysaccharide-rich Substance from the Fruit Juice of *Morinda citrifolia* (Noni) on Sarcoma 180. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 10, p. 1158-1164, 2003.

GADERMAIER, G.; HARRER, A.; GIRBL, T.; PALAZZO, P.; HIMLY, M.; VOGEL, L.; BRIZA, P.; MARI, A.; FERREIRA, F. Isoform identification and characterization of Art v 3, the lipid transfer protein of mugwort pollen. **Molecular Immunology**, v. 46, n. 10, p. 1919–1924, 2009.

GADERMAIER, G.; EGGER, M.; GIRBL, T.; ERLER, A.; HARRER, A.; VEJVAR, E.; LISO, M.; RICHTER, K.; ZUIDMEER, E.; MARI, A.; FERREIRA, F. Molecular characterization of Api g 2, a novel allergenic member of the lipid transfer protein 1 family from celery stalks. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 54, p. 1–10, 2010.

GAIER, S.; MARSH, J.; OBERHUBER, C.; RIGBY, N. M.; LOVEGROVE, A.; ALESSANDRI, S.; BRIZA, P.; RADAUER, C.; ZUIDMEER, L.; REE, R. V.; HEMMER, W.; SANCHO, A. I.; MILLS, C.; HOFFMANN-SOMMERGRUBER, K.; SHEWRY, P. R. Purification and structural stability of the peach allergens Pru p 1 and Pru p 3. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 52, n. 2, p. 220–229, 2008.

GANDINI, S. C. M.; YUSHMANOV, V. E.; BORISSEVITCH, I. E.; TABAK, M. Interaction of the tetra (4-sulfonatophenyl) porphyrin with Ionic Surfactants: Aggregation and Location in Micelles. **Langmuir**, v. 15, n. 19, p. 6233-6243, 1999.

GANDOLFO-CANO, M.; BARTRA, J.; GONZÁLEZ-MANCEBO, E.; FEO-BRITO, F.; GÓMEZ, E.; BARTOLOMÉ, B.; MUNOZ-GARCÍA, E.; SANZ MAROTO, A.; VIVANCO, F.; CUESTA-HERRANZ, J.; PASTOR-VARGAS, C. Molecular characterization of contact urticaria in patients with melon allergy. **British Journal of Dermatology**, v. 170, p. 651-656, 2014.

GARCIA-SELLES, F. J.; DÍAZ-PERALES, A.; SANCHEZ-MONGE, R.; ALCANTARA, M.; LOMBARDERO, M.; BARBER, D.; SALCEDO, G.; FERNANDEZ-RIVAS, M. Patterns of reactivity to lipid transfer proteins of plant foods and Artemisia pollen: an in vivo study. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 128, p. 115–122, 2002.

GASTEIGER, E.; HOOGLAND, C.; GATTIKER, A.; DUVAUD, S.; WILKINS, M. R.; APPEL, R. D. Identification and analysis tools on the ExPASy Server. In John M. Walker (Ed.). **The proteomics protocols handbook**, Humana Press, p. 571-607, 2005.

GIFONI, J. M. Propriedades bioquímicas e funcionais de uma proteína ligante à quitina purificada das sementes de *Moringa oleifera* Lamarck. 2009. **Tese (Doutorado em Bioquímica)** - Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

GIFONI, J. M.; OLIVEIRA, J. T. A.; OLIVEIRA, H. D.; BATISTA, A. B.; PEREIRA, M. L.; GOMES, A. S.; OLIVEIRA, H. P.; GRANGEIRO, T. B.; VASCONCELOS, I. M. A novel chitin-binding protein from *Moringa oleifera* seed with potential for plant disease control. **Biopolymers (Peptide Science)**, v. 98, p. 406-415, 2012.

GIZATULLINA, A. K.; FINKINA, E. I.; MINEEV, K. S.; MELNIKOVA, D. N.; BOGDANOV, I. V.; TELEZHINSKAYA, I. N.; BALANDIN, S. V.; SHENKAREV, Z. O.; ARSENIYEV, A. S.; OVCHINNIKOVA, T. V. Recombinant production and solution structure of lipid transfer protein from lentil *Lens culinaris*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 439, p. 427–432, 2013.

GOMAR, J.; PETIT, M. C.; SODANO, P.; DENISE, S. Y.; MARION, D.; KADER, J. C.; VOVELLE, F.; PTAK, M. Solution structure and lipid binding of a nonspecific lipid transfer protein extracted from maize seeds. **Protein Science**, v. 5, p. 565–577, 1996.

GONORAZKY, A. G.; REGENTE, M. C.; DE LA CANAL, L. Stress induction and antimicrobial properties of a lipid transfer protein in germinating sunflower seeds. **Journal Plant Physiology**, v. 162, p. 618–624, 2005.

GORJANOVIC, S.; SPILLNER, E.; BELJANSKI, M. V.; GORJANOVIC, R.; PAVLOVIC, M.; GOJGIC-CVIJANOVIC, G. Malting barley grain non-specific lipid-transfer protein (ns-LTP): importance for grain protection. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 111, n. 2, p. 99-104, 2005.

GUERBETTE, F. M.; GROSBOIS, M.; JOLLIOT-CROQUIN, A.; KADER, J. C.; ZACHOWSKI, A. Lipid-transfer proteins from plants: Structure and binding properties. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 192, p. 157–161, 1999.

HAN, G. W.; LEE, J. Y.; SONG, H. K.; CHANG, C.; MIN, K.; MOON, J. Structural basis of non-specific lipid binding in maize lipid-transfer protein complexes revealed by high-resolution X-ray crystallography. **Journal of Molecular Biology**, v. 308, n. 2, p. 263–278, 2001.

HARTZ, C.; LAUER, I.; DEL MAR SAN MIGUEL MONCIN, M.; CISTERO-BAHIMA, A.; FOETISCH, K.; LIDHOLM, J.; VIETHS, S.; SCHEURER, S. Comparison of IgE-binding capacity, cross-reactivity and biological potency of allergenic non-specific lipid transfer proteins from peach, cherry and hazelnut. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 153, n. 4, p. 335–346, 2010.

HEINEMANN, B.; ANDERSEN, K. V.; NIELSEN, P. R.; BECH, L. M.; POULSEN, F. M. Structure in solution of a four-helix lipid binding protein. **Protein Science: A Publication of the Protein Society**, v. 5, n. 1, p. 13–23, 1996.

HELM, R. M.; ERMEL, R. W.; FRICK, O. L. Nonmurine animal models of food allergy. **Environmental Health Perspectives**, v. 111, p. 239–244, 2003.

- HIRAZUMI, A.; FURUSAWA, E.; CHOU, S. C.; HOKAMA, Y. Immunomodulation contributes to the anticancer activity of *Morinda citrifolia* (noni) fruit juice. **Western Pharmacology Society - Proceedings of the Thirty-Ninth Annual Meeting**, v. 39, p. 7-9, 1996.
- HIRAZUMI, A.; FURUSAWA, E. An immunomodulatory polysaccharide-rich substance from the fruit juice of *Morinda citrifolia* (noni) with antitumour activity. **Phytotherapy Research**, v. 13, n. 5, p. 380-387, 1999.
- HORNSTEIN, S.; GOTTLIEB, O. Nonlinear dynamics, stability and control of the scan process in noncontacting atomic force microscopy. **Nonlinear Dynamics**, v. 54, p. 93-122, 2008.
- JAECKELS, N.; TENZER, S.; ROSFA, S.; SCHILD, H.; DECKER, H.; WIGAND, P. Purification and structural characterisation of lipid transfer protein from red wine and grapes. **Food Chemistry**, v. 138, p. 263–269, 2013.
- JAYARAMAN, S. K.; MANOHARAN, M. S.; ILLANCHEZIAN, S. Antibacterial, antifungal and tumor cell suppression potential of *Morinda citrifolia* fruit extracts. **International Journal of Integrative Biology**, v. 3, n. 1, p. 44-49, 2008.
- JIANG, Y.; FU, X.; WEN, M.; WANG, F.; TANG, Q.; TIAN, Q.; LUO, K. Overexpression of an nsLTPs-like antimicrobial protein gene (LJAMP<sub>2</sub>) from motherwort (*Leonurus japonicus*) enhances resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* oil seed rape (*Brassica napus*). **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 82, p. 81-87, 2013.
- KADER, J. C.; JULIENNE, M.; VERGNOLLE, C. Purification and characterization of a spinach-leaf protein capable of transferring phospholipids from liposomes to mitochondria or chloroplasts. **European Journal of Biochemistry**, v. 139, p. 411-416, 1984.
- KADER J. C. Lipid-transfer protein in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 47, p. 627-654, 1996.
- KAMIYA, K.; TANAKA, Y.; ENDANG, H.; UMAR, M.; SATAKE, T. Chemical constituents of *Morinda citrifolia* fruits inhibit copper-induced low-density lipoprotein oxidation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 19, p. 5843–5848, 2004.
- KAMIYA, K.; HAMABE, W.; TOKUYAMA, S.; HIRANO, K.; SATAKE, T.; YONEZAWA, Y. K.; YOSHIDA, H.; MIZUSHINA, Y. Inhibitory effect of anthraquinones isolated from the Noni (*Morinda citrifolia*) root on animal A-, B- and Y-families of DNA polymerases and human cancer cell proliferation. **Food Chemistry**, v. 118, p. 725–730, 2010.
- KELLY, S. M.; PRICE, N. C. The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1338, p. 161-185., 1997.

KELLY, S. M.; PRICE, N. C. The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. **Current Protein and Peptide Science**, v. 1, p. 349-384, 2000.

KELLY, S. M.; JESS, T. J.; PRICE, N. C. How to study proteins by circular dichroism. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1751, p. 119-139, 2005.

KENNEDY, A. R. Chemopreventive Agents: Protease Inhibitors. **Pharmacology and Therapeutics Journal**, v. 78, n. 3, p. 167-209, 1998.

KHAN, A. A.; TAO, K. L.; KNYPL, J. R.; BORKOWSKI, B.; POWELL, L. E. Osmotic conditioning of seeds: physiological and biochemical changes. **Acta Horticulturae**, v. 83, p. 267-278, 1978.

KIBA, A.; NAKATSUKA, T.; YAMAMURA, S.; NISHIHARA, M. Gentian lipid transfer protein homolog with antimicrobial properties confers resistance to *Botrytis cinerea* in transgenic tobacco. **Plant Biotechnology**, v. 29, p. 95-101 2012.

KRAUSE, S.; REESE, G.; RANDOW, S.; ZENNARO, D.; QUARATINO, D.; PALAZZO, P.; CIARDIELLO, M. A.; PETERSEN, A.; BECKER, W. M.; MARI, A. Lipid transfer protein (Ara h 9) as a new peanut allergen relevant for a Mediterranean allergic population. **Journal of Allergy Clinical Immunology**, v. 124, p. 771–778, 2009.

KRISTENSEN, A. K.; BRUNSTEDT, J.; KLAUS, K. Characterization of a new antifungal non-specific lipid transfer protein (nsLTP) from sugar beet leaves. **Plant Science**, v. 155, p. 31–40, 2000.

LACERDA, A. F.; VASCONCELOS, E. A. R.; PELEGRINI, P. B.; GROSSI DE SA, M. F. Antifungal defensins and their role in plant defense. **Frontiers Microbiology**, v. 5, p. 1-10, 2014.

LADICS, G. S. Current codex guidelines for assessment of potential protein allergenicity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 20-23, 2008.

LADICS, G. S.; CRESSMAN, R. F.; HEROUET-GUICHENEY, C.; HERMAN, R. A.; PRIVALLE, L.; SONG, P.; WARD, J. M.; MCCLAIN, S. Bioinformatics and the allergy assessment of agricultural biotechnology products: Industry practices and recommendations. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 60, p. 46-53, 2011.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. Edt. Plenum Publishers., 2<sup>a</sup> ed., New York, 1999.

LEE, J. Y.; MIN, K.; CHA, H.; HWANG, D.; SUH, S. W. Rice non-specific lipid transfer protein: the 1.6 Å crystal structure in the unliganded state reveals a small hydrophobic cavity. **Journal of Molecular Biology**, v. 276, p. 437–448, 1998.

LEHRER, S. B.; MCCLAIN, S. Utility of animal models for predicting human allergenicity. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 54, p. 46–51, 2009.

LEÓN, J.; POVEDA, L. J. **Nombres comunes de las plantas en Costa Rica**. Edt. Guayacán, 1ª ed., San José, 2000.

LERCHE, M. H.; KRAGELUND, B. B.; BECH, L. M.; POULSEN, F. M. Barley lipid-transfer protein complexed with palmitoyl CoA: the structure reveals a hydrophobic binding site that can expand to fit both large and small lipid-like ligands. **Structure**, v. 5, p. 291–306, 1997.

LI, R. W.; MYERS, S. P.; LEACH, D. N.; LIN, G. D.; LEACH, G. J. A cross-cultural study: anti-inflammatory activity of Australian and Chinese plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 85, n. 1, p. 25-32, 2003.

LIMA, A. D. R.; CAMPOS, D. C. O.; COSTA, A. S.; FIGUEIREDO, H. O. S.; VASCONCELOS, I. M.; OLIVEIRA, H. D. Atividade Anti-helmíntica *in vitro* das Proteínas de Sementes de *Morinda citrifolia* L. In: **XXXII Encontro de Iniciação Científica da Universidade Federal do Ceará. Resumos...** Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

LIN, K. F.; LIU, Y. N.; HSU, S. T. D.; SAMUEL, D.; CHENG, C. S.; BONVIN, A. M. J. J.; LYU, P. C. Characterization and structural analyses of nonspecific lipid transfer protein 1 from mung bean. **Biochemistry**, v. 44, p. 5703–5712, 2005.

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

LIN, P.; XIA, L. X.; WONG, J. H.; NG, T. B.; YE, X.; WANG, S.; SHI, X. Lipid transfer proteins from Brassica campestris and mungbean surpass mung bean chitinase in exploitability. **Journal of Peptide Science**, v.13, p. 642–648, 2007.

LINDA, S. M.; ELAINE, Y. L.; WONG, S. M.; VINCENT E. C. Purification and characterization of non-specific lipid transfer proteins from the leaves of *Pandanus amaryllifolius* (Pandanaceae) **Peptides**, v. 27, p. 626–632, 2006.

LINDA, S. M.; LI, T.; MIAOXIAN, S.; WING-SHAN, H.; SAMUEL, S. M.; CHUNG, S. H. Y.; HENRY, N. C.; WONG, S. M.; VINCENT, E. C. Isolation, characterization, molecular cloning and modeling of a new lipid transfer protein with antiviral and antiproliferative activities from *Narcissus tazetta*. **Peptides**, v. 29, p. 2101–2109, 2008.

LINDORFF-LARSEN, K.; WINTER, J. R. Surprisingly high stability of barley lipid transfer protein, LTP1, towards denaturant, heat and proteases. **FEBS Letters**, v. 488, n. 3, p. 145-148, 2001.

LOCHER, C. P.; BURCH, M. T.; MOWER, H. F.; BERESTECKY, J.; DAVIS, H.; VAN POEL, B.; LASURE, A.; VANDEN BERGHE, D. A.; VLIETINCK, A. J. Anti microbial activity and anti-complement activity of extracts obtained from selected Hawaiian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 49, n. 1, p. 23-32, 1995.

LOMBARDERO, M.; GARCIA-SELLES, F. J.; POLO, F.; JIMENO, L.; CHAMORRO, M. J.; GARCIA-CASADO, G.; SANCHEZ-MONGE, R.; DIAZ-PERALES, A.; SALCEDO, G.; BARBER, D. Prevalence of sensitization to Artemisia allergens Art v 1, Art v 3 and Art v 60 kDa. Crossreactivity among Art v 3 and other relevant lipid-transfer protein allergens. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 34, p. 1415–1421, 2004.

LOPES, J. L. S. Purificação e investigação das propriedades físico-químicas de inibidores de proteases extraídos de sementes de *Acacia plumosa* Lowe. **Dissertação (Ciências)**, Universidade de São Paulo, Curso de Pós-Graduação em Física, Instituto de Física de São Carlos, São Paulo, 2006.

LOPES, J. L. S. Plantaricina 149 e análogos: atividade antimicrobiana, estudos estruturais e mecanismos de ação. **Tese (Ciências)**, Universidade de São Paulo, Curso de Pós-Graduação em Física, Instituto de Física de São Carlos, São Paulo, 2010.

LÜBECK, W.; HANNES, H. **Noni el valioso tesoro de los mares del sur**. Madrid: EDAF, p. 173, 2001.

LV, L.; CHEN, H.; HO, C. T.; SANG, S. Chemical components of the roots of Noni (*Morinda citrifolia*) and their cytotoxic effects. **Fitoterapia**, v. 84, p. 704-708, 2011.

MACEDO-SOARES, M. F.; ITAMI, D. M.; LIMA, C.; PERINI, A.; FAQUIM-MAURO, E. L.; MARTINS, M. A.; MACEDO, M. S. Lung eosinophilic inflammation and airway hyperreactivity are enhanced by murine anaphylactic, but not nonanaphylactic, IgG1 antibodies. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 114, p. 97–104, 2004.

MACPHERSON, H.; DANIELLS, J.; WEDDING, B.; DAVIS, C. **The potential for a new value adding industry for noni tropical fruit producers**. Australia: Rural Industries Research and Development Corporation, p. 55, 2007.

MCKOY, M. L.; THOMAS, E. A.; SIMON, O. R. Preliminary investigation of the anti-inflammatory properties of an aqueous extract from *Morinda citrifolia* (noni). **Proceedings of the Western Pharmacology Society Journal**, v. 45, p. 76–78, 2002.



MAITI, N.C.; MAZUMDAR, S.; PERIASAMY, N. J- and H- aggregates of Porphyrin-Surfactant Complexes. **Journal of Physical Chemistry B.**, v. 102, p. 1528-1538, 1998.

MARI, A.; FERREIRA, F. Isoform identification and characterization of Art v 3, the lipid-transfer protein of mugwort pollen. **Molecular Immunology**, v. 46, n. 10, p. 1919–1924, 2009.

MASUDA, M.; MURATA, K.; FUKUHAMA, A.; NARUTO, S.; FUJITA, T.; UWAYA, A.; ISAMI, F.; MATSUDA, H. Inhibitory effects of constituents of *Morinda citrifolia* seeds on elastase and tyrosinase. **Journal Natural of Medicine**, v. 63, p. 267–273, 2009.

MILLONIG, G.; STADLMANN, S.; WOLFGANG, V. Herbal hepatotoxicity: acute hepatitis caused by a noni preparation (*Morinda citrifolia*). **European Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 17, n. 4, p. 445-447, 2005.

MOHANDAS, S.; SOWMYA, H. D.; SAXENA, A. K.; MEENAKSHI, R.; THILAKA RANI, R.; MAHMOOD, R. Transgenic banana cv. *Rasthali* (AAB, Silk gp) harboring Ace-AMP<sub>1</sub> gene imparts enhanced resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense race 1. **Scientia Horticulturae**, v. 164, p. 392-399, 2013.

MOLINA, A.; SEGURA, A.; GARCIA-OLMEDO, F. Lipid transfer proteins (nsLTPs) from barley and maize leaves are potent inhibitors of bacterial and fungal plant pathogens. **FEBS Letters**, v. 316, p. 119–122, 1993.

MONTESINOS, E. Antimicrobial peptides and plant disease control. **FEMS Microbiology Letters**, v. 270, p. 1–11, 2007.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Immunology Methods**, v. 16, p. 55 . 63, 1983.

MUNDY, J.; ROGERS, J. C. Selective expression of a probable amylase/protease inhibitor in barley aleurone cells: comparison to the barley amylase/subtilisin inhibitor. **Planta**, v. 169, p. 51-63, 1986.

NAKANISHI, K.; BEROVA, N.; WOODY, R. W. **Circular Dichroism – Principles and Applications**. Edt. VCH., 1994.

NAPIMOGA, M. H.; CAVADA, B. S.; ALENCAR, N. M .N.; MOTA, M. L.; BITENCOURT, F. S.; ALVES-FILHO, J. C.; GRESPAN, R.; GONÇALVES, R. B.; CLEMENTE-NAPIMOGA, J. T.; FREITAS, A.; PARADA, C. A.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. *Lonchocarpus sericeus* lectin decreases leukocyte migration and mechanical hypernociception by inhibiting cytokine and chemokines production. **International Journal of Immunopharmacology**, v. 7, p. 824–835, 2007.

NELSON, S. Noni seeds handling and seedling production. **Fruits and Nuts**, v. 10, p. 1-4, 2005.

NELSON, S. C.; ELEVITCH, C. R. **Noni: the complete guide for consumers and growers**. Holualoa-Hawaii: Permanent Agriculture Resources, p. 1-46, 2006.

NEVES, R. L. P.; LAMEIRA, O. A.; RIBEIRO, F. N. S.; PORTAL, R. K. V. P. In: **XVII Seminário de Iniciação Científica e I Seminário de Pós-graduação da Embrapa Amazônia Oriental. Resumos...** Embrapa, Belém, Pará, 2013.

NIEUWLAND, J.; FERON, R.; HUISMAN, B. A. H.; FASOLINO, A.; HILBERS, C. W.; DERKSEN, J.; MARIANI, C. Lipid transfer proteins enhance cell wall extension in tobacco. **Plant Cell**, v. 17, p. 2009–2019, 2005.

NUALSANIT, T.; ROJANAPANTHU, P.; GRITSANAPAN, W.; LEE, S. H.; LAWSON, D.; BAEK, S. J. Damnacanthal, a noni component, exhibits antitumorigenic activity in human colorectal cancer cells. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 23, p. 915-923, 2012.

OLIVEIRA, M. E. B.; BASTOS, M. S. R.; FEITOSA, T.; BRANCO, M. A. A. C.; SILVA, M. G. G. Avaliação de parâmetros de qualidade físico-químicos de polpas congeladas de acerola, cajá e caju. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 19, n. 3, p. 326-332, 1999.

OLIVEIRA, K. P.; BATISTA, D. S.; SOUZA, D. C. F.; BENEDITO, C. P.; RIBEIRO, M. C. C. Desponte e embebição em sementes de noni (*Morinda citrifolia* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, p.513-517, 2011.

OLIVEIRA, C.; ALBUQUERQUE-JUNIOR, R.; SERAFINI, M.; SILVA, G.; ARAUJO, A. *Morinda citrifolia* and the pharmaceutical industry: technological prospecting and potential. **BMC Proceedings**, v. 8, n. 4, p. 196, 2014.

OOI, L. S. M.; WONG, E. Y. L.; SUN, S. S. M.; OOI, V. E. C. Purification and characterization of non-specific lipid transfer proteins from the leaves of *Pandanus marylifolius* (Pandanaceae). **Peptides**, v. 27, p. 626–632, 2006.

OSBORNE, T.B. **The Vegetable Protein**. Longmans Green and Co, New York, USA, 1924.

PACE, C. N. Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. **Methods Enzymology**, v. 131, p. 266-280, 1986.

PALACÍN, A.; CUMPLIDO, J.; FIGUEROA, J.; AHRAZEM, O.; SÁNCHEZ-MONGE, R.; CARRILLO, T.; SALCEDO, G.; BLANCO, C. Cabbage lipid transfer protein Brao 3 is a major allergen responsible for cross-reactivity between plant foods and pollens food and pollen allergies. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 117:p. 1423–1429, 2006.

PALU, A. K.; KIM, A. H.; WEST, B. J.; DENG, S.; JENSEN, J.; WHITE, L. The effects of *Morinda citrifolia* L. (noni) on the immune system: Its molecular mechanisms of action. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, n. 3, p. 502-506, 2008.

PARK, K.; KWAN, I. C.; PARK, K. Oral protein delivery: current status and future prospect. **Reactive and Functional Polymers**, v. 71, p. 280-287, 2011.

PASCHOAL, P. O. Alergia Alimentar: temporalidade x antigenicidade. 2007. **Dissertação (Mestrado em Patologia Investigativa)**, Curso de Pós-Graduação em Patologia, Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 2007.

PASQUATO, N.; BERNI, R.; FOLLI, C.; FOLLONI, S.; CIANCI, M.; PANTANO, S. Crystal structure of peach Pru p 3, the prototypic member of the family of plant nonspecific lipid transfer protein pan-allergens. **Journal of Molecular Biology**, v. 356, n. 3, p. 684–694, 2006.

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

PASTORELLO, E. A.; FARIOLI, L.; PRAVETTONI, V.; ISPANO, M.; SCIBOLA, E.; TRAMBAIOLI, C.; GIUFFRIDA, M. G.; ANSALONI, R.; GODOVAC-ZIMMERMANN, J.; CONTI, A.; FORTUNATO, D.; ORTOLANI, C. The maize major allergen, which is responsible for food-induced allergic reactions, is a lipid transfer protein. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 106, p. 744–751, 2000.

PASTORELLO, E. A.; FARIOLI, L.; PRAVETTONI, V.; GIUFFRIDA, M. G.; ORTOLANI, C.; FORTUNATO, D.; TRAMBAIOLI, C.; SCIBOLA, E.; CALAMARI, A. M.; ROBINO, A. M.; CONTI, A. Characterization of the major allergen of plum as a lipid transfer protein. **Journal of Chromatography B**, v. 756, p. 95–103, 2001.

PASTORELLO, E. A.; FARIOLI, L.; PRAVETTONI, V.; ORTOLANI, C.; FORTUNATO, D.; GIUFFRIDA, M. G. Identification of grape and wine allergens as an endochitinase 4, a lipid-transfer protein, and a thaumatin LTP cross-reacting with the peach major allergen. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 111, n. 2, p. 350–359, 2003a.

PASTORELLO, E. A.; POMPEI, C.; PRAVETTONI, V.; FARIOLI, L.; CALAMARI, A. M.; SCIBILIA, J.; ROBINO, A. M.; CONTI, A.; IAMETTI, S.; FORTUNATO, D.; BONOMI, S.; ORTOLANI, C. Lipid-transfer protein is the major maize allergen maintaining IgE-binding activity after cooking at 100 degrees C, as demonstrated in anaphylactic patients and patients with positive Double-blind, placebo-controlled food challenge results. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 112, p. 775–83, 2003b.

PAWLUS, A. D.; KELLER, W. J.; KINGHORN, A. D. An anthraquinone with potent quinone reductase-inducing activity and other constituents of the fruits of *Morinda citrifolia* (noni). **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 1720–1722, 2005.

PAWLUS, A. D.; KINGHORN, D. A. Review of the ethnobotany, chemistry, biological activity and safety of the botanical dietary supplement *Morinda citrifolia* (Noni). **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 59, p. 1587–1609, 2007.

PELEGRINI, P. B.; LAY, F. T.; MURAD, A. M.; ANDERSON, M. A.; FRANCO, O. L.; Novel insights on the mechanism of action of  $\alpha$ -amylase inhibitors from the plant defensin family. **Proteins**, v. 73, p. 719–729, 2008.

PEREIRA, M. L.; OLIVEIRA, H. D.; OLIVEIRA, J. T. A.; GIFONI, J. M.; ROCHA, R. O.; SOUSA, D. O. B.; VASCONCELOS, I. M. Purification of a Chitin-Binding Protein from *Moringa oleifera* Seeds with Potential to Relieve Pain and Inflammation. **Protein and Peptide Letters**, v. 18, 2011.

PETIT, M. C.; SODANO, P.; MARION, D.; PTAK, M. Two-dimensional <sup>1</sup>H-NMR studies of maize lipid-transfer protein: sequence specific assignment and secondary structure. **European Journal of Biochemistry**, v. 222, p. 1047–1054, 1994.

PFEIL, W. **Protein Stability and Folding: A Collection of Thermodynamic Data**. Springer-Verlag, Berlin, 1998.

PINTO, C. E. M. Biossegurança alimentar da proteína antifúngica *Mo*-CBP3 de sementes de *Moringa oleifera* Lam: uma candidata para o desenvolvimento de plantas transgênicas. 2014. **Dissertação (Mestrado em Bioquímica)** - Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

POTTERAT, O.; HAMBURGER, M. *Morinda citrifolia* (noni) fruit phytochemistry, pharmacology, safety. **Planta Medica**, v. 73, p.191 – 199, 2007.

PYEE, J.; YU, H.; KOLATTUKUDY, P. E. Identification of a lipid transfer protein as the major protein in the surface wax of broccoli (*Brassica oleracea*) leaves. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 311, p. 460–468, 1994.

RAMAZZINA, I.; AMATO, S.; PASSERA, E.; SFORZA, S.; MISTRELLO, G.; BERNI, R.; FOLLI, C. Isoform identification, recombinant production and characterization of the allergen lipid transfer protein 1 from pear (Pyr c 3). **Gene**, v. 491, p. 173–181, 2012.

RAMÍREZ-MEDELES, M. C.; AGUILAR, M. B.; MIGUEL, R. N.; BOLÑOS-GARCÍA, V. M.; GARCÍA-HERNÁNDEZ, E.; SORIANO-GARCÍA, M. Amino acid sequence, biochemical characterization, and comparative modeling of a nonspecific lipid transfer protein from *Amaranthus hypochondriacus*. **Archives of Biochemistry Biophysics**, v. 415, p. 24–33, 2003.

REGENTE, M. C.; DE LA CANAL, L. Purification, characterization and antifungal properties of a lipid transfer protein from sunflower (*Heliantus annuus*) seeds. **Physiology Plant**, v. 110, p. 158–163, 2000.

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

RENAN, M.; FRANCOIS, J.; DIDIER, M.; AXELOS, M.; DOULIEZ, J. P. Study of the interaction between end-capped telechelic polymers and the wheat lipid transfer protein LTP<sub>1</sub>, in solution and in the air/water interface. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 32, p. 213–221, 2003.

RODRÍGUEZ, F. J. M.; PINEDO, D. M. Mito y realidad de *Morinda citrifolia* L. (noni). **Revista Cubana de Plantas Medicinables**, v. 9, n. 3, p. 1034-1048, 2004.

ROY-BARMAN, S.; SAUTTER, C.; CHATTOO, B. B. Expression of the lipid transfer protein Ace-AMP<sub>1</sub> in transgenic wheat enhances antifungal activity and defense responses. **Transgenic Research**, v. 15, p. 435-446, 2006.

SAFI, H.; SAIBI, W.; ALAOUI, M. M.; HMYENE, A.; MASMOUDI, K.; HANIN, M.; BRINI, F. A wheat lipid transfer protein (TdLTP4) promotes tolerance to abiotic and biotic stress in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 89, p. 64–75, 2015.

SALCEDO, G.; SANCHEZ-MONGE, R.; DÍAZ-PERALES, A.; GARCIA-CASADO, G.; BARBER, D. Plant non-specific lipid transfer proteins as food and pollen allergens. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 34, n. 9, p. 1336–1341, 2004.

SALCEDO, G.; SÁNCHEZ-MONGE, R.; BARBER, D.; DÍAZ-PERALES, A. Plant non-specific lipid transfer proteins: An interface between plant defence and human allergy. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1771, p. 781–791, 2007.

SALUDES, J. P.; GARSON, M. J.; FRANZBLAU, S. G.; AGUINALDO, A. M. Antitubercular constituents from the hexane fraction of *Morinda citrifolia* L. (Rubiaceae). **Phytotherapy Research**, v. 16, n. 7, p. 683-685, 2002.

SAN MIGUEL-MONCIN, M.; KRAIL, M.; SCHEURER, S.; ENRIQUE, E.; ALONSO, R.; CONTI, A.; CISTERÓ-BAHÍMA, A.; VIETHS, S. Lettuce anaphylaxis: identification of a lipid transfer protein as the major allergen. **Allergy**, v. 58, p. 511–517, 2003.

SÁNCHEZ-MONGE, R.; LOMBARDERO, M.; GARCÍA-SELÉS, F. J.; BARBER, D.; SALCEDO, G. Lipid-transfer proteins are relevant allergens in fruit allergy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 103, p. 514-519, 1999.

SANCHO, A. I.; RIGBY, N. M.; ZUIDMEER, L.; ASERO, R.; MISTRELLO, G.; AMATO, S.; GONZÁLEZ-MANCEBO, E.; FERNÁNDEZ-RIVAS, M.; VAN REE, R.; MILLS, E. N. The effect of thermal processing on the IgE reactivity of the non-specific lipid transfer protein from apple, Mal d 3. **Allergy**, v. 60, p. 1262–1268, 2005.

SANTOS, I. S.; CARVALHO, A. O.; SOUZA-FILHO, G. A.; NASCIMENTO, V. V.; MACHADO, O. L. T.; GOMES, V. M. Purification of a defensin isolated from *Vigna unguiculata* seeds, its functional expression in *Escherichia coli*, and assessment of its insect  $\alpha$ -amylase inhibitory activity. **Protein Expression and Purification**, v. 71, p. 8-15, 2009.

SANTOS, S. C. C.; DA SILVA, A. R. A.; DE ARAGÃO, M. E. F.; DE OLIVEIRA, M. R.; LUCENA, F. M. P.; DE ALMEIDA, L. M.; GUEDES, M. I. F. Humoral immune response in mice immunised by oral and subcutaneous routes with isosoy proteins. **Food and Agricultural Immunology**, v. 23, p. 363–372, 2012.

SCHEURER, S.; LAUER, I.; FOETISCH, K.; SAN MIGUEL-MONCIN, M.; RETZEK, M.; HARTZ, C.; ENRIQUE, E.; LINDHOLM, J.; CISTERO-BAHIMA, A.; VIETHS, S. . Strong allergenicity of Pru av 3, the lipid transfer protein from cherry, is related to high stability against thermal processing and digestion. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 114, p. 900–907, 2004.

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

SHI, Z.; WANG, Z.; XU, H. L.; TIAN, Y.; LI, X.; BAO, J. K.; SUN, S. R.; YUE, B. S. Modeling, docking and dynamics simulations of a non-specific lipid transfer protein from *Peganum harmala* L. **Computational Biology and Chemistry**, v. 47, p. 56– 65, 2013.

SHIN, D. H.; LEE, J. Y.; HWANG, K. Y.; KIM, K. K.; SUH, S. W. High-resolution crystal structure of the non-specific lipid-transfer protein from maize seedlings. **Structure**, v. 3, p.189–199, 1995.

SINHA, A. Nonlinear dynamics of atomic force microscope with PI feedback. **Journal of Sound and Vibration**, v. 288, p. 387-394, 2005.

SILVA, F. D. A.; VASCONCELOS, I. M.; MARINA D.P. LOBO, M. D. P.; DE CASTRO, P. G.; MAGALHÃES, V. G.; DE FREITAS, C. D. T.; CARLINI, C. R. R. S.; PINTO, P. M.; BELTRAMINI, L. M.; FILHO, J. H. A.; BARROS, E. B.; ALENCAR, L. M. R.; GRANGEIRO, T. B.; OLIVEIRA, J. T. A. Biochemical, physicochemical and molecular characterization of a genuine 2-Cys-peroxiredoxin purified from cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walpers] leaves. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1820, p. 1128–1140, 2012.

SIMÕES, R. C. Purificação, caracterização físico-química e biológica de SLA: uma nova lectina extraída de sementes de *Swartzia laevicarpa* Amshoff. 2013. **Tese (Doutorado em Bioquímica)** - Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

SINGH, D. R. *Morinda citrifolia* L. (Noni): A review of the scientific validation for its nutritional and therapeutic properties. **Journal of Diabetes and Endocrinology**, v. 3, n. 6, p. 77-91, 2012.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J. T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n. 13, p. 1107-12, 1990.

SODANO, P.; CAILLE, A.; SY, D.; DE PERSON, G.; MARION, D.; PTAK, M. <sup>1</sup>H NMR and fluorescence studies of the complexation of DMPG by wheat non-specific lipid transfer protein. **FEBS Letters**, v. 416, p. 130–134, 1997.

SOUZA, D. P. Caracterização molecular e correlações estruturais com adiponectina humana de uma proteína purificada do látex de *Cryptostegia grandiflora* r. br. 2014. **Tese (Doutorado em Bioquímica)**, Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

SONG, X. Z.; JIA, S. L.; MIURA, M.; MA, J. G.; SHELNUTT, J. A. Electron transfer photosensitized by a tin lipoporphyrin in solution, micelles, and at water organic solvent interfaces. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 113, p. 233-241, 1998.

STERK, P.; BOOIJ, H.; SCHELLEKENS, G. A.; VAN KAMMEN, A.; DE VRIES, S. C. Cell specific expression of the carrot EP2 lipid transfer protein gene. **Plant Cell**, v. 3, p. 907–921, 1991.

SU, C.; WANG, M. Y.; NOWICKI, D.; JENSEN, J.; ANDERSON, G. Selective COX-2 inhibition of *Morinda citrifolia* (Noni) *in vitro*. The proceedings of the eicosanoids and other bioactive lipids in cancer, inflammation and related disease. In: **Annals of The VII Annual Conference**, Tennessee, USA, 2001.

SU, B.; PAWLUS, A. D.; JUNG, H.; KELLER, J. K.; MCLAUGHLIN, J. L.; KINGHORN, D. Chemical Constituents of the Fruits of *Morinda citrifolia* (Noni) and Their Antioxidant Activity. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 4, p. 592-595, 2005.

SUBIRADE, M.; SALESSE, C.; MARION, D.; PEZOLET, M. Interaction of a nonspecific wheat lipid transfer protein with phospholipid monolayers imaged by fluorescence microscopy and studied by infrared spectroscopy. **Biophysical Journal**, v. 69, p. 974–988, 1995.

SUDAH, P.; SMITA, S. Z.; SHOBHA, Y. Z.; AMEETA, R. K. Potent  $\alpha$ -amilase inhibitory activity of India Ayurvedic medicinal plant. **Complementary and Alternative Medicine**, v.11, p. 1-10, 2011.

STADLBAUER, V.; FICKERT, P.; LACKNER, C.; SCHMERLAIB, J.; KRISPER, P.; TRAUNER, M.; STAUBER, R. E. Hepatotoxicity of Noni juice: Report of two cases. **World Journal Gastroenterology**, v. 11, n. 30, p. 4758-4760, 2005.

TASSIN-MOINDROT, S.; CAILLE, A.; DOULIEZ, J. P.; MARION, D.; VOVELLE, F. The wide binding properties of a wheat nonspecific lipid transfer protein. Solution structure of a complex with prostaglandin B2. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p. 1117–1124, 2000.

TCHANG, F.; THIS, P.; STIEFEL, V.; ARONDEL, V.; MORCH, M.D.; PAGES, M.; PUIGDOMENECH, P.; GRELLET, F.; DELSENY, M.; BOUILLON, P.; HUET, J. C.; GUERBETTE, F.; BEAUVAISCANTE, F.; DURANTON, H.; PERNOLLET, J. C.; KADER, J. C. Phospholipid transfer protein: full-length cDNA and amino-acid sequence in maize. Amino-acid sequence homologies between plant phospholipid transfer proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, p. 16849–16855, 1988.

TERRAS, F. R.G.; SCHOOF, H. M.E.; DE BOLLE, M. F. C.; VAN LEUVEN, F.; RESS, S. B.; VANDERLEYDEN, J.; CAMMUE, B. P. A.; BROEKAERT, W. F. Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, p. 15301–15309, 1992.

THOMAS, K.; BANNON, G.; HEFLE, S.; HEROUET, C.; HOLSAPPLE, M.; LADICS, G.; MACINTOSH, S.; PRIVALLE, L. *In silico* methods for evaluating human allergenicity to novel proteins. **Toxicological Sciences**, v. 88, n. 2, p. 307–310, 2005.

TOMBOLATO, A. F. C.; VEIGA, R. F. A.; BARBOSA, W.; HIROCE, R.; MENDACOLLI, S. L. J.; COSTA, A. A. Noni: Frutífera medicinal em introdução e aclimação no Brasil. **Informações técnicas: O agrônomo**, v. 57, n. 1, p. 20-21, 2005.

TORDESILLAS, L.; PACIOS, L. F.; PALACIN, A.; QUIRCE, S.; ARMENTIA, A.; BARBER, D.; SALCEDO, G.; DÍAZ-PERALES, A. Molecular basis of allergen cross-reactivity: non-specific lipid transfer proteins from wheat flour and peach fruit as models. **Molecular Immunology**, v. 47, p. 534–540, 2009.

TORDESILLAS, L.; SIRVENT, S.; DÍAZ-PERALES, A.; VILLALBA, M.; CUESTA-HERRANZ, J.; RODRÍGUEZ, R.; SALCEDO, G. Plant lipid transfer protein allergens: no cross-reactivity between those from foods and olive and Parietaria pollen. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 156, p. 291–296, 2011.

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

VAN DAMME, E. J. M.; PEUMANS, W. J.; BARRE, A.; ROU GÉ, P. Plant Lectins: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 17, n. 6, p. 575–692, 1998.

VAN DEN BERGH, K. P. B.; PROOST, P.; VAN DAMME, J.; COOSEMANS, J.; VAN DAMME, E. J. M.; PEUMANS, W. J. Five disulfide bridges stabilize a heveintype antimicrobial peptide from the bark of spindle tree (*Euonymus europaeus* L.). **FEBS Letters**, v. 530, p. 181-185, 2002.



VAN REE, R. Clinical importance of non-specific lipid transfer proteins as food allergens. **Biochemical Society Transactions**, v. 30, p. 910–913, 2002.

VASSILOPOULOU, E.; RIGBY, N.; MORENO, F. J.; ZUIDMEER, L.; AKKERDAAS, J.; TASSIOS, I. Effect of in vitro gastric and duodenal digestion on the allergenicity of grape lipid transfer protein. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 118, n. 2, p. 473–480, 2006.

VASSILOPOULOU, E.; ZUIDMEER, L.; AKKERDAAS, J.; TASSIOS, I.; RIGBY, N. R.; MILLS, E. N. Severe immediate allergic reactions to grapes: Part of a lipid transfer protein-associated clinical syndrome. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 143, n.2, p. 92–102, 2007.

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

XIANBI, L.; XINGYONG, Y.; DEMOU, L.; SHAOHUI, G.; YAN, P. Enhancing disease resistance in transgenic tomato over-expressing antimicrobial proteins, LjAMP<sub>1</sub> and LjAMP<sub>2</sub> from motherwort seeds. **Acta Phytophylacica Sinica**, v. 34, p. 354-358, 2007.

ZAMAN, U.; ABBASI, A. Isolation, purification and characterization of a nonspecific lipid transfer protein from *Cuminum cyminum*. **Phytochemistry**, v. 70, p 979–987, 2009.

ZOCATELLI, G.; POKOJ, S.; FOETISCH, K.; BARTRA, J.; VALERO, A.; DEL MAR SAN MIGUEL-MONCIN, M. D. S.; VIETHS, S.; SCHEURER, S. Identification and characterization of the major allergen of green bean (*Phaseolus vulgaris*) as a non-specific lipid transfer protein (Pha v 3). **Molecular Immunology**, v. 47, p. 1561–1568, 2010.

ZOTTICH, U.; DA CUNHA, M.; CARVALHO, A. O.; DIAS, G. B.; SILVA, N. C.; SANTOS, I. S.; DO NACIMENTO, V. V.; MIGUEL, E. C.; MACHADO, O. L.; GOMES, V. M. Purification, biochemical characterization and antifungal activity of a new lipid transfer protein (LTP) from *Coffea canephora* seeds with  $\alpha$ -amylase inhibitor properties. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1810, p. 375-383, 2011.

WANG, M. Y.; SU, C. Cancer preventive effect of *Morinda citrifolia* (noni). **Annals of the New York Academic Sciences**, v. 952, p. 161-168, 2001.

WANG, M. Y.; WEST, B. J.; JENSEN, C. J.; NOWICKI, D.; SU, C.; PALU, A. K.; ANDERSON, G. *Morinda citrifolia* (Noni): a literature review and recent advances in Noni research. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 23, p. 1127–1141, 2002.

WANG, Y.; SATOH, A.; WARREN, G.; MEYER, H. H. VCIP135 acts as a deubiquitinating enzyme during p97–p47-mediated reassembly of mitotic golgi fragments. **Journal of Cellular Biology**, v. 164, p. 973–978, 2004.

WELIN, B. V.; OLSON, A.; NYLANDER, M.; PALVA, E. T. Characterization and differential expression of *dhn/lea/rab*-like genes during cold acclimation and drought stress in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Molecular Biology**, v. 26, p. 131–144, 1994.

WEST, B. J.; JENSEN, C. J.; WESTENDORF, J.; WHITE, L. D. A safety review of noni fruit juice. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 8, p. 100-106, 2006.

WEST, B. J.; JENSEN, C. J.; WESTENDORF, J. A new vegetable oil from noni (*Morinda citrifolia*) seeds. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, n. 11, p. 1988-1992, 2008.

WHITFORD, D. The three-dimensional structure of proteins. **In: Proteins: Structure and Function**. Edt. John Wiley and Sons Ltd, Chichester, UK, 2005.

YANG, X.; LI, J.; LI, X.; SHE, R.; PEI, Y. Isolation and characterization of a novel thermostable non-specific lipid transfer protein-like antimicrobial protein from motherwort (*Leonurus japonicus* Houtt) seeds. **Peptides**, v. 27, p. 3122–3128, 2006.

YANG, X.; XIAO, Y.; WANG, X.; PEI, Y. Expression of a novel small antimicrobial protein from the seeds of motherwort (*Leonurus japonicus*) confers disease resistance in tobacco. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 939- 946, 2007.

YANG, X.; JIANG, M.; HSIEH, K.; LIU, J. Chemical constituents from the seeds of *Morinda citrifolia*. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 7, p. 119-122, 2009.

YANG, H.; TONG, J.; LEONARD, T. A.; IM, Y. J. Structural determinants for 8phosphatidylinositol recognition by Sfh3 and substrate-induced dimer–monomer transition during lipid transfer cycles. **FEBS Letters**, v. 587, p. 1610–1616, 2013.

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

YOUNOS, C.; ROLLAND, A.; FLEURENTIN, J.; LANHERS, M. C.; MISSLIN, R.; MORTIER, F. Analgesic and Behavioral effects of *Morinda citrifolia*. **Planta Medica**, v. 56, p. 430 – 434, 1990.

YU, H.; LI, S.; HUANG, M.; HO, C. Antiinflammatory Constituents in Noni (*Morinda citrifolia*) Fruits. **American Chemical Society**, v. 987, p. 179-190, 2008.