UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDOS
ESTRUTURAIS DE DUAS NOVAS LECTINAS
LIGANTES DE QUITINA DAS SEMENTES DO
GÊNERO *ARTOCARPUS***

Melissa Barbano Trindade

Tese apresentada ao Instituto
de Física de São Carlos,
Universidade de São Paulo
para a obtenção do título de
Doutor em Ciências: Área de
Física Aplicada, opção Física
Biomolecular

Orientadora: Prof. Dra. Leila Maria Beltramini

São Carlos
2005

*Dedico este trabalho às pessoas
especiais do grupo de Biofísica
como gratidão pela amizade
sincera, respeito e ajuda durante
os anos que convivemos.*

Nada se fez até agora com base apenas no fervor e na espera. É preciso agir de outro modo, entregar-se ao trabalho e responder às exigências de cada dia – tanto no campo da vida comum como no campo da vocação. Esse trabalho será simples e fácil se cada qual encontrar e obedecer ao demônio que tece as teias de Sua vida.

MAX WEBER

Ciência e Política: Duas Vocações,
1967

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi o meio motivador de uma busca diária por especialização, aprendizado, superação de obstáculos, desde pessoais (este talvez o fator limitante de uma empreitada) até técnicos, entendimento e coerência, tanto na obra como na vida. Assim, agradeço especialmente à Dra. Neusa Fernandes dos Santos, por ter me ajudado de todas as maneiras possíveis que alguém pode ser ajudado, aconselhando e educando, conforme as cobranças que estes anos me impuseram. Não posso me esquecer dos amigos integrantes do grupo de Biofísica no período que estive aqui: Andressa, Isabel (estas, muito mais que desempenhar seus papéis profissionais, me abriram seus corações), Suzana, Priscila, Marli, Leandro, André, Cristina Nordi, Cecília, Patrícia, Wânus, Marcel, Alessandra, pela amizade sincera, apoio e palavras providenciais que foram de importância ímpar para minha permanência e conclusão do trabalho. Em particular, agradeço ao mestrando José Luiz de Souza Lopes pela confiança e respeito que me possibilitou amadurecer com responsabilidade e pela dedicação no trabalho. Quero prestar meu agradecimento à Profa. Leila Maria Beltramini, minha orientadora, pelas muitas oportunidades que me ofereceu, pela preocupação em querer que eu cresça e pelo exemplo de objetividade, visão e enfrentamento; ao corpo docente deste grupo, Profs. Ana Paula, Otaciro e Jabah pela acolhida, atenção, ensinamentos e pela experiência transmitidos; às contribuições dadas pelos Profs. Ana Cristina O.M. Moreira (Unifor – Ceará; descoberta das lectinas ligantes de quitina), Maria Luiza V. Oliva (UNIFESP; N-terminal das lectinas de estudo), Heloísa S.S. Araújo e Dra. Márcia R. Cominetti (DCF – UFSCar; N-terminal da jackina e ensaio com K562), Flávio H. Silva e Dra. Andréa S. Costa (DGE – UFSCar; ensaio com fungos) e Dr. Antonio Miranda (espectrometria de massa da jackina); aos órgãos financiadores e aos diretores deste Instituto que o conduz de maneira a primar pela excelência do programa de pós-graduação. Finalmente, agradeço minha família (meus irmãos Ricardo, Marcelo e meus pais Maria Helena e Walter) pelo apoio irrestrito, liberdade, parceria e ajuda de sempre; ao Markus, minha luz pelo

caminho, que mesmo tão longe é presença constante e a Deus por mais esta lição de vida.

ÍNDICE

ÍNDICE	i
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE ABREVIACÕES	vi
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 - Generalidades	1
1.2 - Estado de Arte da Lectinologia	7
1.3 - Lectinas ligantes de quitina	12
1.4 - As espécies <i>Artocarpus integrifolia</i> e <i>Artocarpus incisa</i> : características das plantas e os estudos com lectinas de <i>Artocarpus</i>	17
2 - OBJETIVOS	22
3 - MATERIAIS	23
3.1 - Soluções, reagentes e padrões.	23
3.2 - Equipamentos:	24
3.3 - Colunas cromatográficas	25
3.4 - Outros materiais	25
4 - METODOLOGIAS	27
4.1 - Obtenção dos extratos protéicos das farinhas de sementes de jaca e fruta-pão	27
4.2- Purificação das lectinas ligantes de quitina	29
4.2.1 - Cromatografia por afinidade	29
4.2.2 - Gel filtração	29
4.2.3 - Protocolo de purificação das lectinas quitina-ligantes: jackina e frutackina	30
4.2.4 - Cromatografia em fase reversa	33
4.3 - Caracterização físico-química	34
4.3.1 - Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e tampão de arraste tricina (tricine SDS-PAGE) e dosagem de proteínas	34
4.3.2 - Espectrometria de massas	35
4.4 - Caracterização estrutural	35

4.4.1 – Estudos de variação de força iônica da jackina	35
4.4.2 – Determinação de estrutura primária	36
4.4.3 – Alinhamento	36
4.4.4 – Caracterização espectroscópica.....	38
4.5 – Atividade biológica	47
4.5.1 – Atividade hemaglutinante e inibição da hemaglutinação por monossacarídeos.....	47
4.5.2 – Ensaios de adesão e inibição de adesão de células K562..	48
4.5.3 – Ensaios de atividade antifúngica	49
5 – RESULTADOS E DISCUSSÕES	52
5.1 – Purificação e caracterização de jackina e frutackina.....	52
5.2 – Efeitos da variação da força iônica na purificação de jackina ..	57
5.2.1 - Variação da concentração de NaCl	58
5.2.2 - Variação da concentração de HCl.....	61
5.3 – Seqüenciamento e análise da estrutura primária de jackina e frutackina.....	65
5.4 – Análises Espectroscópicas.....	71
5.4.1 - Dicroísmo Circular	71
5.4.2 - Infravermelho com transformada de Fourier	73
5.4.3 - Espectroscopia de emissão de fluorescência	74
5.4.4 - Estudos de estabilidade por variação de pH	75
5.4.5 – Estudos de estabilidade térmica.....	79
5.5 – Atividade Biológica	81
5.5.1 – Atividade hemaglutinante e inibição de hemaglutinação por monossacarídeos.....	81
5.5.2 – Adesão e inibição de adesão de células K562	83
5.5.3 - Atividade Antifúngica	85
6 - CONCLUSÕES	90
7 - PERSPECTIVAS	92
8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
APÊNDICE 1	101
APÊNDICE 2	104
ANEXOS.....	106

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ilustração de um segmento da quitina	12
Figura 2: (A) Exemplo de domínio heveínico (domínio II de uma das subunidades da lectina dimérica de <i>Phytolacca americana</i> PL-D) e (B): Seqüências primárias do domínio II e da heveína	13
Figura 3: Modelo hipotético de evolução molecular das lectinas ligantes de quitina de plantas que integram a família das lectinas "hevein-like"	15
Figura 4: Estrutura de interação da UDA-VI com tri-N-acetil-quitotriose	16
Figura 5: Ilustração da espécie <i>Artocarpus integrifolia</i>	18
Figura 6: Ilustração da espécie <i>Artocarpus incisa</i>	19
Figura 7: Organograma de obtenção do extrato bruto a partir das sementes de <i>Artocarpus integrifolia</i> e <i>Artocarpus incisa</i>	28
Figura 8: Organograma das etapas da purificação das lectinas ligantes de quitina jackina e frutackina	32
Figura 9: Ilustração da propagação da luz circularmente polarizada à esquerda	40
Figura 10: Luzes circularmente polarizadas à direita e à esquerda incidentes (A) e transmitidas após interagir com molécula dicróica (B)	41
Figura 11: Diagrama de energias, ilustrando os processos que levam à emissão de fluorescência	44
Figura 12: Gel filtração de jackina (A) e frutackina (B)	53
Figura 13: Gel SDS-PAGE de tricina da jackina	54
Figura 14: Espectro de massas de jackina nativa	55
Figura 15: Gel filtração de jackina (A) e frutackina (B)	57
Figura 16: Curvas de eluição de jackina da coluna de quitina por diferentes concentrações de NaCl	58
Figura 17: Gel filtração de jackina eluída da coluna de quitina com soluções de diferentes concentrações de NaCl	59
Figura 18: Espectros de CD da jackina (A) e do pico 1 (B)	60
Figura 19: Curvas de eluição de jackina da coluna de quitina com diferentes concentrações de HCl	61
Figura 20: Gel filtração de jackina vindas da afinidade com diferentes concentrações de HCl	62
Figura 21: Espectro de CD do pico 1 da gel filtração	63

Figura 22: Cromatografia de fase reversa em coluna C18 da jackina nativa (A) e após reação de Friedman (B)	66
Figura 23: Seqüências parciais das subunidades de jackina e frutackina	67
Figura 24: Alinhamento da lectina C de <i>Phytolacca americana</i> (PL-C) com as cadeias de jackina	70
Figura 25: Filograma das lectinas ligantes de quitina, defensinas e proteínas antifúngicas	70
Figura 26: Espectros de CD de jackina e frutackina	71
Figura 27: Medidas de ATR-FT-IR de jackina. (A) espectro primário; (B) segunda derivada	73
Figura 28: Espectros de emissão de fluorescência de jackina e frutackina nativas	74
Figura 29: Espectros de CD da variação de pH da jackina obtidos com diferentes tempos de incubação	76
Figura 30: Espectros de emissão de fluorescência da jackina em diferentes pHs	78
Figura 31: Espectros de CD e curvas de variação da elipticidade da jackina em função da temperatura	80
Figura 32: Ensaio de hemaglutinação da jackina	82
Figura 33: Ensaio de interação de células K562 e jackina	84
Figura 34: Ensaio de inibição de crescimento de <i>S. cerevisiae</i> por jackina e frutackina	86
Figura 35: Ensaio de inibição de germinação de fungos filamentosos por jackina	87
Figura 36: Ensaio de inibição de crescimento micelar de <i>F. moniliforme</i> por jackina	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Trabalhos que marcaram e contribuíram para o desenvolvimento da lectinologia a partir de 1952	8
Tabela 2: Freqüências vibracionais (números de onda) da banda amida I dos grupos peptídicos em diferentes estruturas secundárias	46
Tabela 3: Rendimento protéico das lectinas extraídas de jaca e fruta-pão	56
Tabela 4: Número de ocorrência de aminoácidos hidrofóbicos, hidrofílicos e cisteínas em jackina e frutackina	68
Tabela 5: Inibição da hemaglutinação da jackina por açúcares simples	83

LISTA DE ABREVIações

ACB – Anidrase Carbônica Bovina

ATR – Reflectância total atenuada (Attenuated total reflectance)

BSA – Albumina sérica bovina (bovine serum albumine)

CD – Dicroísmo Circular (circular dichroism)

Cit C – Citocromo C

D-gal – D-galactose

D-man – D-manose

DTT – Ditioneitol

EB – Extrato bruto

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético (ethylenediaminetetraacetic acid)

FT-IR – Infravermelho com Transformada de Fourier (Fourier Transform Infrared)

GlcNAc – N-acetilglicosamina

HPLC – Cromatografia líquida de alto desempenho (High Performance Liquid Chromatography)

ITS – Inibidor de Tripsina de Soja

λ – comprimento de onda

LC/ESI/MS – Espectrometria de massas de ionização por elétronspray acoplada a cromatografia líquida (Liquid Chromatography/Electrospray Ionization/Mass Spectrometry)

OVA – Ovalbumina

PBS – Tampão fosfato salino (phosphate buffer saline)

PD – Meio nutritivo líquido de batata e dextrose (potato dextrose)

PDA – Meio nutritivo sólido; PD acrescido de agar (potato dextrose agar)

Ribof – Riboflavina

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida (Sodium dodecyl sulphate – polyacrylamide gel electrophoresis)

SEC – Cromatografia por Exclusão Molecular (size exclusion chromatography)

TFA – Ácido trifluoroacético (trifluoroacetic acid)

UV – Ultravioleta

RESUMO

Este trabalho trata da purificação em escala preparativa por técnicas cromatográficas, determinação de seqüência primária parcial, caracterização espectroscópica por dicroísmo circular, fluorescência, infravermelho e investigação de atividades biológicas de duas lectinas ligantes de quitina dos extratos salinos de *Artocarpus integrifolia*, jaca, e *Artocarpus incisa*, fruta-pão. Nossos resultados revelaram que as lectinas quitina-ligantes das sementes de jaca e fruta-pão, jackina e frutackina respectivamente, são homólogas entre si, constituindo-se por monômeros de cerca de 14 kDa formados por três subunidades, unidas por pontes S-S. Elas possuem 62% de identidade entre si, são ricas em cisteínas, aminoácidos básicos e serinas e não possuem similares identificadas até o momento, podendo constituir um novo grupo de lectinas na superfamília de lectinas quitina-específicas. Os espectros de dicroísmo circular de jackina e frutackina são similares: ambas são proteínas de estrutura toda-beta, com máximo em torno de 230 nm e mínimo em torno de 214 nm, este último, bastante distorcido por estruturas desordenadas. Os espectros de fluorescência de jackina e frutackina apresentaram máximos de emissão acima de 340 nm, sugerindo que os N-terminais de duas das 3 cadeias de jackina e frutackina (onde os triptofanos estão localizados) estão expostos. Frente a condições extremas de pH e temperatura, monitoradas por CD e fluorescência, observou-se que a estrutura de jackina é vulnerável a pH ácido e termicamente estável. Quanto às atividades biológicas, jackina e frutackina mostraram atividade inibitória de crescimento para *Saccharomyces cerevisiae*; jackina também mostrou promoção de adesão da linhagem de células de eritroleucemia K562, atividade inibitória para *Fusarium moniliforme* na concentração de 2,25 mg/mL e atividade hemaglutinante frente a células sanguíneas humanas do sistema ABO e de coelhos, que não foi inibida nem por N-acetilglicosamina, indicando sua preferência por quitina ou seus fragmentos.

ABSTRACT

This work deals with the preparative-scale purification by chromatographic techniques, the partial primary sequence determination, the spectroscopic characterization by circular dichroism, fluorescence, FT-IR and the investigation of biological activities of two novel chitin-binding lectins from the saline extracts of the seeds of *Artocarpus integrifolia*, jackfruit, and *Artocarpus incisa*, breadfruit. Our results revealed that the chitin-binding lectins from jackfruit and breadfruit, jackin and frutackin respectively, are homologous to each other, consisting of monomers of 14 kDa, made up of 3 subunits, linked by S-S bridges. They have 62% of identity between each other; they are rich in cysteines, serines and basic amino acids and they are not homologous to any other known protein, probably constituting a new group of lectins in the chitin-binding lectin superfamily. The CD spectra of jackin and frutackin are similar: both present a beta profile spectra, presenting a maximum about 230 nm and a minimum around 214 nm, this latter one, distorted by unordered structures. The fluorescence spectra of jackin and frutackin presented maxima above 340 nm, suggesting that the N-terminals of the 2 up 3 chains of jackin and frutackin (where the tryptophans are) are exposed. Regarding the pH and temperature exposure, monitored by CD and fluorescence, it was observed that the structure of jackin is vulnerable to acid pH and thermally stable. When considered the biological activities, jackin and frutackin presented growth inhibition activity towards *Saccharomyces cerevisiae*; jackin also promoted the adhesion of the erythroleukemic cell line K562, presented growth inhibition activity towards *Fusarium moniliforme* at 2,25mg/mL and hemagglutinating activity towards rabbit and human red cells from the system ABO, that was not inhibited even by N-acetylglucosamine, suggesting its preference by oligomers of N-acetylglucosamine or chitin.

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Generalidades

O estudo de lectinas data do final do séc. XIX com o trabalho de Stillmark que descobriu que extratos do feijão castor aglutinavam eritrócitos. Desde então, esta área se desenvolveu muito.

As lectinas de plantas são importantes ferramentas em Glicobiologia e Glicobioquímica devido à multiplicidade de eventos que se pode conhecer em função da habilidade de ligarem carboidratos. Esta habilidade só foi devidamente explorada segundo sua importância quando a comunidade científica se deu conta que os oligossacarídeos compreendem um extraordinário sistema de armazenagem de informação de alta densidade, constituindo o chamado código do açúcar [Rüdiger *et al.* 2000, Gabius *et al.* 2002]. A partir daí, as lectinas têm sido largamente utilizadas na investigação estrutural e funcional de carboidratos complexos, glicoproteínas e para examinar mudanças decorrentes de processos fisiológicos e patológicos na superfície celular. Portanto, o desenvolvimento da Glicociência sempre esteve atrelado às pesquisas com lectinas.

Para que uma lectina seja assim classificada, a (glico)proteína precisa satisfazer as seguintes características [Rüdiger & Gabius, 2001]:

- Uma lectina é uma (glico)proteína que liga carboidratos: por esse critério, taninos, alguns lipídios, substâncias catiônicas e carboidratos cognatos que também aglutinam ou precipitam células estão excluídos. Um domínio de reconhecimento de carboidrato pode estar ligado a outras seções funcionais da proteína, por exemplo, um outro domínio com atividade enzimática, mas é a presença desta habilidade de ligação de carboidrato distinta numa proteína multifuncional que justifica chamá-la de lectina.

- Lectinas não se enquadram na categoria de imunoglobulinas: num primeiro momento, as lectinas foram consideradas substâncias do tipo anticorpo por causa de sua aparente especificidade de ligação, mas logo o termo "lectina" foi adotado para diferenciá-las de imunoglobulinas, pois estas precisam de um estímulo antigênico para serem sintetizadas. Curiosamente, tem sido observado que a expressão de algumas lectinas de plantas aumenta como consequência de estímulos bióticos ou abióticos como estresse, infecção por vírus, seca ou alta concentração de sal, mas definitivamente elas não são produtos de uma resposta imune.
- Lectinas não modificam bioquimicamente os carboidratos aos quais ligam: segundo este requisito, glicosiltransferases, glicosidases e enzimas que introduzem substituintes nos carboidratos, como grupos sulfato, estão excluídas. Este item se fez necessário porque há relatos de que: i) a aglutinação de células em baixa temperatura promovida por algumas glicosidases precede a hidrólise das ligações glicosídicas; ii) porque é indispensável demonstrar se a atividade enzimática da proteína sob investigação é independente do centro de reconhecimento do carboidrato e iii) para que as proteínas de transporte e sensores de mono ou dissacarídeos que atuam como marcadores quimiotaxonômicos ou em sistemas operons não sejam incluídos nesta classificação.

Uma vez percebido que o modo de reconhecimento glicobiológico é operante em todos os organismos, observou-se que os receptores de carboidratos, as lectinas, também são ubíquos, o que refletiu no maior interesse da comunidade científica em pesquisar esta classe de proteínas.

Os estudos com lectinas de plantas constituem os fundamentos da Lectinologia, principalmente por ser a fonte mais abundante destas proteínas, e continuam a contribuir para os estudos de interação lectina-carboidrato e de diferentes tipos celulares. Com a introdução da cromatografia por afinidade a partir de 1965 e da tecnologia do DNA recombinante, esta área ganhou um novo ímpeto por facilitar o isolamento e estudos estruturais e biológicos de lectinas, tanto de plantas

como de bactérias, fungos, vírus e animais, onde são produzidas em pequena quantidade.

As lectinas de plantas produzidas em órgãos de estocagem (sementes, na maioria, mas também tubérculos, bulbos, raízes, dependendo da planta) dominam o cenário da Lectinologia por serem encontradas em quantidades preparativas. Entretanto, as lectinas estão distribuídas por todos os órgãos da planta, como casca, folhas, flores, mas em quantidades bem menores. As lectinas mais estudadas são da família Leguminosae, mas muitas lectinas de outras famílias também têm sido frequentemente isoladas e caracterizadas, por exemplo, lectinas de Solanaceae, Gramineae, Alliaceae, Amaryllidaceae, Araceae, Caprifoliaceae, Cucurbitaceae, Euphorbiaceae, Liliaceae, Moraceae, Orchidaceae, Urticaceae, Viscaceae, Papaveraceae, Phytolaccaceae e Convolvulaceae [Rüdiger 1998, Van Damme *et al.* 1998]. É importante que a classificação taxonômica da espécie a ser investigada seja considerada, pois ela pode ser decisiva na busca por lectinas inéditas ou homólogas.

A especificidade da grande maioria de lectinas de plantas se dá por carboidratos simples (monossacarídeos) ou complexos (oligossacarídeos e glicanas). Estes podem ser de origem vegetal ou encontrados em outros reinos, como N-acetilglicosamina, N-acetilgalactosamina, ácido glucurônico, galacturônico, xilurônico, L-idurônico, siálico e N-acetilmurâmico.

Uma aplicação biotecnológica de lectinas vegetais se dá no seu emprego em tipagem sangüínea. Lectinas de *Lotus tetragonolobus* e *Ulex europaeus*, ambas específicas de fucose, são empregadas para identificar células tipo O; a lectina de *Dolichos biflorus* é usada para distinguir entre subgrupos A₁ e A₂; a lectina de *Vicia graminea*, específica para sangue tipo N, para diferenciar células N e M e a aglutinina PNA, específica para Gal(β1-3)GalNAc é empregada na detecção de poliaglutinação, uma condição que acompanha processos de infecção viral e bacteriana, no qual eritrócitos humanos tornam-se aglutináveis por anticorpos normalmente presentes no soro de indivíduos adultos [Lis & Sharon 1998].

A rota biossintética de muitas lectinas de plantas segue a via secretória: as lectinas são sintetizadas nos ribossomos e entram no retículo endoplasmático; de lá são transportadas pelo complexo de Golgi para os vacúolos que, durante o desenvolvimento da semente, se divide em partes menores, chamados corpos protéicos, ficando lá armazenadas. Comumente, as lectinas sofrem processos co-traducionais como N-glicosilação e pós-traducionais como permutações, clivagem proteolítica para remoção de peptídeos-sinais e separação em cadeias [Van Damme *et al.* 1998, Rüdiger & Gabius 2001].

Resumidamente, em termos de estrutura global, uma lectina de planta madura pode ser formada por uma ou duas cadeias polipeptídicas, apresentando um sítio carboidrato-ligante (merolectinas) ou vários sítios idênticos ou homólogos, que reconhecem o mesmo açúcar (hololectinas); também podem ser proteínas de fusão onde o(s) domínio(s) ligante de carboidrato(s) é independente numa proteína multifuncional (quimerolectinas) e, finalmente, podem possuir domínios ligantes de carboidratos que reconhecem açúcares diferentes (superlectinas) [Van Damme *et al.* 1998].

As estruturas das lectinas de plantas são tão diferentes quanto as fontes onde são encontradas. Interessante notar que a relação filogenética das lectinas obtida via análise comparativa das seqüências primárias, ocorre muito mais freqüentemente com lectinas de plantas de famílias não-relacionadas do que com lectinas produzidas pela mesma planta, mas em órgãos diferentes [Rüdiger 1998].

As lectinas de plantas são consideradas um grupo heterogêneo por serem diferentes entre si, no que diz respeito às propriedades bioquímicas e físico-químicas, relação evolucionária, estrutura molecular, especificidade, atividades biológicas, o que torna laboriosa a tarefa de classificá-las considerando todos os aspectos que as descrevem simultaneamente. Por outro lado, a tomada de apenas um grupo de características propõe uma uniformidade tal que pode gerar classificações muito úteis numa dada abordagem. Por exemplo, analisando as similaridades de seqüências das lectinas de plantas, elas foram subdivididas em 7 famílias: lectinas de leguminosas, lectinas ligantes de

manose de monocotiledôneas, lectinas ligantes de quitina composta por domínios heveínicos, RIPs (Ribosome Inactivating Proteins) tipo 2, lectinas relacionadas à jacalina, lectinas da família das amarantinas e lectinas de floema de Cucurbitaceae, estas três últimas compostas por poucos membros [Van Damme *et al.*, 1998]. Já, baseado na especificidade, as lectinas de plantas foram subdivididas em: lectinas ligantes de manose, manose/glicose, manose/maltose, galactose/N-acetilgalactosamina, N-acetilglicosamina/(N-acetilglicosamina)_n, fucose e ácido siálico [Goldstein and Poretz, 1986; Van Damme *et al.*, 1998 *apud* Van Damme *et al.*, 1998]. Como se pode observar, cada um destes sistemas aborda aspectos distintos, logo é interessante empregá-los de maneira complementar e conjunta.

Apesar de serem caracterizadas segundo o monossacarídeo que reconhecem, é muito bem documentado que as lectinas de plantas já descritas predominantemente ligam oligossacarídeos com constantes de afinidade até 1000 vezes maior e que esta associação é entalpicamente favorecida. Na grande maioria, as lectinas de plantas reconhecem glicoconjugados sintetizados a partir de monossacarídeos encontrados na natureza, mas a diversidade de glicanas formadas por estas unidades básicas é tão grande que continuamente se descobre uma lectina nova com uma especificidade nova [Lis & Sharon 1998, Rüdiger 1998].

Lectinas de plantas podem assumir diferentes papéis biológicos. Todavia, não existe uma função biológica universal para todas elas. De maneira abrangente, as lectinas podem ser organizadas em dois grupos segundo seu ligante: podem assumir papéis exógenos se se associarem a ligantes externos, por exemplo, atividade antifúngica contra fitopatógenos, ou podem assumir papéis endógenos se interagirem com ligantes do próprio organismo, por exemplo, auxiliar a deposição de proteínas de reserva nos corpos protéicos. Felizmente, as questões concernentes às funções biológicas que as lectinas desempenham nos organismos em que são produzidas têm ganhado atenção crescente, diminuindo o contraste de interesses entre função e aplicação de lectinas que predominava no passado.

Como mencionado anteriormente, lectinas são encontradas em todos os reinos, exercendo funções fisiológicas diversificadas.

Até cerca de 10 anos atrás era conhecida somente a classe das galectinas, ou lectinas tipo C e S. Atualmente já estão descritas pelo menos 12 famílias de diferentes estruturas relativas às lectinas animais, sendo que muitas delas, além de carboidratos, também se ligam a outras moléculas via interações proteína-proteína, proteína-lípido e proteína-ácido nucléico.

As funções das lectinas de animais abrangem um espectro de variedades que, em termos gerais, são consideradas moléculas de reconhecimento dentro do sistema imune e, especificamente, estão implicadas na defesa contra patógenos, trânsito celular, regulação da resposta imune e prevenção de autoimunidade (para mais detalhes ver ref. Kilpatrick 2002).

A lista de aplicações das lectinas vegetais é extensa, mas existem excelentes revisões com centenas de referências bibliográficas sobre o assunto [Sharon & Lis 2004]. Algumas das aplicações biotecnológicas das lectinas estão listadas abaixo.

- Isolamento e purificação de glicoconjugados por cromatografia por afinidade;
- Detecção de epítomos tipo carboidrato de glicoconjugados em *blots* ou em placas de cromatografia em camada delgada;
- Quantificação de atividade de glicosiltransferases/glicosidades por detecção dos produtos da reação enzimática com lectinas;
- Análise de glicomas;
- Análise de mecanismos envolvidos na correta glicosilação por variantes celulares;
- Modulação da proliferação e status de ativação celular;
- Detecção de doenças relacionadas com alterações na síntese de glicanas;
- Liberação controlada de drogas;
- Marcador celular com finalidade diagnóstica (por exemplo, agentes infecciosos);

- Diagnóstico e terapêutica do câncer e doenças auto-imunes;
- Estimulação mitogênica de linfócitos e produção de linfocinas;
- Investigação de estruturas de carboidratos complexos na superfície de células e partículas subcelulares de animais, bactérias e vírus;
- Tipagem, identificação e estudos estruturais dos grupos sanguíneos;
- Agentes defensivos de pragas na Agricultura.

1.2 – Estado de Arte da Lectinologia

Nas décadas seguintes aos estudos de Stillmark, o estudo das lectinas não se desenvolveu rapidamente devido ao limitado conhecimento que se tinha sobre proteínas e a química de carboidratos. Segundo Rüdiger *et al* [Rüdiger *et al.* 2000] este panorama começou a mudar com o trabalho de Watkins e Morgan de 1952 que confirmou de maneira indubitável que as lectinas se ligavam a carboidratos. Este trabalho foi de suma importância no estudo de glicoconjugados de ocorrência natural porque permitiu que se desvendasse a natureza química dos grupos sanguíneos do sistema ABO humano. A tabela 1 abaixo cita os eventos que contribuíram sobremaneira para o avanço dos estudos envolvendo lectinas a partir de 1952 e que marcaram a história da Lectinologia.

Tabela 1: Trabalhos que marcaram e contribuíram para o desenvolvimento da lectinologia a partir de 1952

1952	Natureza sacarídica dos determinantes do grupo sangüíneo detectada por aglutinação mediada por lectinas (W.M. Watkins, W.T. Morgan).
1954	Introdução do termo "lectina" para proteínas ligantes de carboidratos (W.C. Boyd).
1960	Detecção do potencial mitogênico de lectinas em linfócitos (P.C. Nowel).
1963	Descoberta da habilidade da aglutinina de gérmen de trigo (WGA) em aglutinar preferencialmente células neoplásicas (J. C. Aub).
1965	Introdução da cromatografia por afinidade para o isolamento de lectinas (I.J. Goldstein, B.B. Agrawal).
1972	Determinação da seqüência e estrutura tridimensional de uma lectina (G.M. Edelman, K.O Hardman, C.F. Ainsworth).
1974	Isolamento de uma lectina de mamífero em fígado (G. Ashwell).
1977	Demonstração do papel crucial de selectinas no tráfego de leucócitos para os sítios de inflamação e no controle do autodirecionamento (homing) de linfócitos (E.C. Butcher).
1978	First International Lectin Meeting (T.C. Bøg-Hansen).
1979	Detecção de ligantes endógenos para lectinas de plantas (H. Hüdiger).
1983	Detecção da ação inseticida de uma lectina de planta (L.L. Murdock).
1984	Isolamento de lectinas em tumores (H.-J. Gabius, R. Lotan, A. Raz).
1987	Introdução de neoglicoconjugados para diagnóstico de tumores (H.-J. Gabius e colaboradores).
1989	Detecção da atividade fungicida de uma lectina de planta (W.J. Peumans).
1995	Análise estrutural de um complexo lectina-ligante em solução por espectroscopia de RMN (J. Jiménez-Barbero e colaboradores).

1996-1998	Detecção da seleção diferenciada de confôrmeros por lectinas (H.-J. Gabius e colaboradores; L. Poppe e colaboradores).
1999	Estudos do efeito de cluster glicosídico sobre Con A utilizando polissacarídeos multivalentes (dendrímeros) e as diferenças entre atividade hemaglutinante e afinidade (S.M. Dimick <i>et al.</i>).
2000	Identificação de uma lectina tipo-C de células dendríticas (DC-SIGN) envolvida na resposta imune primária e suas implicações como facilitadora da transinfecção do HIV-I (T.B.H. Geijtenbeek <i>et al.</i>).
2000	Descoberta de uma lectina ligante de fator de nodulação encontrada em raízes de leguminosas (Etzler & Kalsi).
2001	Isolamento da dectina-1 uma lectina de mamífero que reconhece glicanas $\beta 1,3$ e/ou $\beta 1,6$ envolvido no reconhecimento imune (G.D. Brown & S. Gordon).
2002	Estrutura cristalina do domínio de reconhecimento de carboidrato (CRD) de p58/ERGIC-53, uma proteína envolvida na saída de uma glicoproteína do retículo endoplasmático (L.M. Velloso <i>et al.</i>).
2003	Similaridades entre as interações proteína-proteína e proteína-carboidrato para estudos de mimetismo funcional (M. Hayashida <i>et al.</i>).
2004	Análise de lectinas citoplasmáticas e nucleares e implicações quanto ao papel endógeno na planta e relação evolucionária com lectinas clássicas (E.J.M. Van Damme <i>et al.</i>).

A observação de que os carboidratos podem gerar uma enormidade de isômeros devido à disponibilidade de vários grupos hidroxilas para a formação de ligações glicosídicas levou os pesquisadores a compreender que os carboidratos complexos, por sua microheterogenicidade, consistiam moléculas que podem estar envolvidas em processos de sinalização e transferência de informação entre células. Assim, a abordagem do sistema de codificação biológica, sem a inclusão dos carboidratos, seria incompleta [Rüdiger *et al.* 2000, Gabius *et al.* 2002]. Isto ressalta a importância de se estudar essa classe

de biomoléculas que, inclusive, constitui uma área de estudos estabelecida denominada Glicobiologia.

As pesquisas em Lectinologia vêm seguindo em caráter multidisciplinar. Novas lectinas continuam a ser descobertas, com elevados graus de especificidade (a lectina manose-ligante de banana reconhece também laminaribose e resíduos internos α e β 1,3-glicosil ligados na posição O-3 de oligossacarídeos; a lectina de *Xanthosoma sagittifolium* possui sítios distintos de reconhecimento: um tipo para clusters com resíduos oligomanosil e outro tipo para oligossacarídeos triantenados não-sialilados, com grupos N-acetil-lactosídeo ou lacto-N-biose) [Goldstein 2002]. Questões sobre o papel biológico extrínscico das lectinas de plantas vêm sendo investigadas e revisadas, refletindo a potencialidade e diversidade de atividades destas proteínas frente a predadores e fitopatógenos em defesa da planta. Dentre elas, atividade antifúngica, inseticida, antinutricional e tóxica vêm sendo objeto de intensa pesquisa. Investigações concernentes aos mecanismos de ação, diversidade de organismos em que elas atuam, as concentrações que promovem atividade e aplicação nos ramos agrícola (cultivo de plantas transgênicas resistentes a pragas), farmacêutico (como agentes terapêuticos contra fungos e bactérias causadores de patologias em humanos) e no estudo de reações tóxicas em animais [Selitrennikoff 2001, Carlini & Grossi de Sá 2002, Ng 2004, Vasconcelos & Oliveira 2004].

As dúvidas sobre a possibilidade de lectinas de plantas desempenharem função endógena também têm recebido atenção e gerado idéias sobre o provável envolvimento de lectinas na regulação e sinalização celular em plantas. Estudos relatam que plantas como o arroz, *Helianthus tuberosus*, e *Ipomoea batatas*, quando sujeitas ao estresse biótico ou abiótico, reagem sintetizando pequenas quantidades de lectinas ligantes de manose relacionada à jacalina citoplasmáticas e nucleares. Experimentos com tabaco também revelaram que o éster metil jasmonato induz a expressão de uma lectina específica para oligômeros de N-acetilglicosamina nas folhas, que não pode ser detectada na amostra-controle. Esta lectina se localiza no núcleo e

citoplasma, ocorrendo em todas as células de parênquima, mas não nos tecidos vasculares. Lectinas ligantes de manose de monocotiledôneas também foram encontradas no citoplasma de plantas, com uma característica comum: nenhuma delas possuía peptídeo-sinal. Assim, estes estudos indicam que lectinas de plantas também podem estar envolvidas em interações endógenas proteína-carboidrato e que também estariam implicadas na evolução das lectinas de plantas clássicas, fazendo desta abordagem, um campo fértil para novas descobertas na área de fisiologia de plantas [Peumans *et al.* 2000, Rüdiger & Gabius 2001, Van Damme *et al.* 2004].

Graças ao arsenal de técnicas como modelagem, RMN, microcalorimetria e mapeamento químico de complexos de um mesmo ligante com diferentes lectinas, as análises estruturais dos sítios de interação carboidrato-lectina, bem como a afinidade entre lectina-açúcar pode ser elucidada e discutida com muita precisão. Estes estudos fornecem informações valiosas para o desenho de miméticos que detenham afinidade superior aos ligantes naturais de lectinas-alvo (por exemplo, aquelas envolvidas na adesão de agentes infecciosos, de células tumorais e na cascata metástica) que atuariam como dispositivos de bloqueio, resultando em substâncias promissoras a serem testadas para as mais variadas aplicações [Rüdiger *et al.* 2000, Hayashida *et al.* 2003, Neumann *et al.* 2004].

Utilizar lectinas como mediadoras no transporte de drogas também vem sendo explorado por diferentes estratégias, tais como o emprego de lectinas de plantas como carregadoras específicas de drogas, já que células tumorais ou transformadas expressam glicanas de superfície celular diferentes das células normais; podem ser utilizadas como potencializadoras da absorção de drogas porque, ao acionar o transporte vesicular, algumas lectinas são endocitadas pelas células epiteliais do trato gastrointestinal, como mostram os estudos com aglutinina de germe de trigo, (WGA), ConA e lectina de tomate (TL) [Russel-Jones, 1999, *apud* Bies *et al.* 2004, Lehr, 2000]; formulações em que as nanopartículas da droga carregam galactose e fucose, tendo como alvo lectinas endógenas como selectinas e galectinas e, finalmente, testes

cujos alvos foram outras barreiras como membranas da cavidade nasal, mucosa bucal, pulmão e fígado, este último, também na terapia genética [Bies *et al.* 2004].

Com a descrição da aglutinina de germe de trigo WGA (wheat germ agglutinin, uma lectina ligante de quitina), que demonstrou pela primeira vez a propriedade de aglutinar preferencialmente células neoplásicas, uma nova classe de lectinas começou a ser estudada. Elas constituem a superfamília das lectinas ligantes de quitina. A seguir algumas colocações sobre esta família de lectinas serão feitas, uma vez que este trabalho tratou sobre este tema.

1.3 – Lectinas ligantes de quitina

Lectinas ligantes de quitina têm sido isoladas de diversas fontes, incluindo bactérias, insetos, plantas e mamíferos [Huang *et al.* 2000, Campos-Olivas *et al.* 2001, Stoeva *et al.* 2001, Vuocolo *et al.* 2001, Suzuki *et al.* 2002, Van Dellen *et al.* 2002] e muitas delas apresentam atividade antifúngica, uma vez que a quitina é o componente-chave da parede celular de fungos.

Figura 1: Ilustração de um segmento da quitina.

A quitina é um homopolímero de unidades de N-acetil-glicosamina ligadas no sentido β1-4.

Lectinas de plantas, em particular, têm sido estudadas sob vários aspectos, por exemplo, seu potencial antifúngico e inseticida para proteger as plantas que as produzem naturalmente ou pela introdução de

material genético que codifique a expressão deste tipo de lectina atóxica ao homem [Peumans & Van Damme 1996, Carlini & Grossi de Sá, 2002].

As lectinas ligantes de quitina também têm sido estudadas do ponto de vista estrutural. As mais estudadas são aquelas pertencentes à família das heveínas, assim chamadas por possuírem em comum o domínio heveínico como motivo estrutural de reconhecimento da quitina.

A heveína é uma proteína ligante de quitina, constituída por 43 aminoácidos (cerca de 4,5 kDa), encontrada na seringueira (*Hevea brasiliensis*). A heveína é especialmente rica em resíduos de glicina e cisteína. A estrutura da heveína é mantida por 4 pontes dissulfeto, o que lhe confere uma estabilidade notável, característica esta que se estende às demais lectinas da família das heveínas. Mesmo depois de ser aquecida a 90°C por 10 min, a heveína ainda inibiu o crescimento de fungos [Newman *et al.* 2004]. A figura 2 (A) mostra um exemplo tridimensional de um domínio heveínico e a figura 2 (B), a sequência de aminoácidos da heveína e do domínio ilustrado em 2 (A).

WRCGRDFGGRL	CEEDMCCSKY	GWCGYSDDH	CE	EDG--	CQS	QCD	PL-D2
1 EQCGRQAGGKLC	PNNLCCS	QWGWCGSTDE	Y	CSPDHNC	Q	SNCKD	43 heveína

Figura 2: (A) Exemplo de domínio heveínico (domínio II de uma das subunidades da lectina dimérica de *Phytolacca americana* PL-D; as pontes dissulfeto estão coloridas em verde e os aminoácidos que interagem com o carboidrato estão em cinza. [Fonte: Hayashida *et al.* 2003]). (B) Sequências primárias do domínio II e da heveína (Os gaps foram introduzidos para otimizar o alinhamento e os aminoácidos conservados estão em negrito).

Do ponto de vista biológico, a heveína, além de aglutinar eritrócitos e ligar-se a IgE, é o principal fator alérgico do látex, por isso, também, tem sido apontada como envolvida na defesa da planta frente ao ataque de insetos e fungos [Chen *et al.* 1997, Gidrol *et al.* 1994 *apud* Newman *et al.* 2004]. Uma vez que o exoesqueleto de insetos e a parede celular de fungos são constituídos por quitina, o primeiro passo dado para proteger a planta poderia ser o reconhecimento da quitina por esta pequena lectina.

Os pontos de ligação da heveína e dos oligossacarídeos de quitina envolvem um resíduo de serina e dois resíduos de triptofanos, Ser 19 e Trp 21 e 23, respectivamente. A afinidade com oligômeros de N-acetilglicosamina é maior do que com o monossacarídeo, cuja interação é entalpicamente favorecida.

Comparando-se com a heveína, os fragmentos tetra e penta-N-acetilglicosamina são ligantes grandes e, segundo dados microcalorimétricos, N-acetilquitopentose pode ligar-se a duas moléculas de heveína ao mesmo tempo. O anel da N-acetilglicosamina exibe forte interação hidrofóbica com um resíduo aromático, no caso da heveína, Trp23. Este pronunciado empacotamento do anel é permitido pela falta de grupos axiais na N-acetilglicosamina. Uma interação hidrofóbica adicional ocorre entre o grupo N-acetil e Trp21 da heveína e, finalmente, existe uma interação polar entre a Ser19 e o grupo carboxil da N-acetilglicosamina [Neuman *et al.* 2004, Asensio *et al.* 2000, Espinosa *et al.* 2000].

O domínio heveínico é o ancestral comum de muitas lectinas que, seguindo diferentes rotas evolutivas, levou à formação de diversas lectinas estruturalmente relacionadas que compõem a família das lectinas "hevein-like" ligantes de quitina. Essa evolução molecular pode ser expressa pelo modelo hipotético de evolução molecular ilustrado na figura 3.

Figura 3: Modelo hipotético de evolução molecular das lectinas ligantes de quitina de plantas que integram a família das lectinas “hevein-like”.

Apesar de possuírem vários domínios heveínicos e envolverem os mesmos aminoácidos no reconhecimento de seus ligantes, as lectinas ligantes de quitina desta família se associam diferentemente com os fragmentos de quitina, de modo que o número de domínios heveínicos não reflete o número de unidades monoméricas de açúcar que eles reconhecem. A aglutinina de *Urtica dioica* VI (UDA-VI) é constituída por uma cadeia polipeptídica, ocorre na forma monomérica onde um monômero possui dois domínios heveínicos e cada domínio possui 3 subdomínios, um principal e dois secundários que se ligam em cada resíduo do glicosídeo; a ligação do di e trissacarídeo de N-acetil glicosamina é entálpica e não é cooperativa, mas ocorre, por outro lado, o aumento da acessibilidade dos demais resíduos em virtude da ligação do primeiro. Para fragmentos tetra e pentassacarídeo, a ligação é entrópica. O Trp21 e Trp23 do domínio-1 da UDA-VI fixa a posição e

orientação de dois anéis piranose. A Tyr30 não apenas fixa o grupo acetil do segundo resíduo de açúcar por contato face-a-face, mas também reconhece o grupo hidroxil O3. Adicionalmente, Ser19 no domínio-1 e Ser65 no domínio-2 comumente participam para formar a ligação H com o oxigênio do grupo acetil dos resíduos de açúcar 1 e 2 respectivamente. O grupo N-acetilamino é único na estrutura da N-acetilglicosamina, comparado com outros açúcares reconhecidos por lectinas e o reconhecimento deste grupo é essencial para ligação exclusivamente com a quitina [Harata *et al.* 2000]. A figura 4 mostra duas ilustrações da UDA complexada com tri-N-acetilquitotriose, ressaltando os aminoácidos envolvidos na interação com o ligante e o fato de que cada molécula de tri-N-acetilquitotriose interage com dois domínios que não fazem parte da mesma molécula de lectina.

Figura 4: Estrutura de interação da UDA-VI com tri-N-acetil-quitotriose.

A aglutinina de gérmen de trigo (WGA) possui duas cadeias polipeptídicas, com cada monômero sendo composto por quatro domínios heveínicos; em pH baixo, o homodímero se separa em dois, com cada um possuindo apenas 1 sítio de ligação principal por subunidade heveínica. Na forma dimérica, os sítios de ligação estão localizados na interface entre os monômeros, portanto, não estão disponíveis para interação com carboidrato. Interessante notar que estes sítios de ligação responsáveis

pela estabilidade do dímero mostram maior afinidade de ligação do que os sítios de ligação original heveínico. Dos 8 sítios de ligação, não mais que 4 são ocupados simultaneamente [Espinosa *et al.* 2000].

1.4 – As espécies *Artocarpus integrifolia* e *Artocarpus incisa*: características das plantas e os estudos com lectinas de *Artocarpus*

A espécie *Artocarpus integrifolia*, também conhecida como *Artocarpus heterophyllus* Lam. (nome popular: jaca) acredita-se ser originária das florestas tropicais da Índia, mas se distribuiu também no sudeste asiático e Filipinas. Foi trazida para o leste africano, Brasil e Suriname, tornando-se muito popular. É uma espécie adaptada ao clima tropical úmido e resiste bastante bem a baixas temperaturas. Apesar de necessitar de um habitat ensolarado e úmido, não tolera estiagem, nem solos encharcados. É cultivada sem grandes cuidados, apenas mantida em abundante umidade. Geralmente, a árvore adquire grandes proporções (cerca de 20 metros de altura), possui flores masculina e feminina diferenciadas e folhas oblongas, verde escuras, lustrosas e espessas [www.crfg.org/pubs/ff/jackfruit.html].

O fruto de jaca, ilustrado na figura 5 é o maior fruto nascido em árvores do mundo, chegando a pesar mais de 30 kg. Seu interior é composto de bulbos comestíveis que revestem as sementes e exalam um odor muito forte e desagradável. Um único fruto pode produzir de 100 a 500 sementes, que resistem não mais que 4 dias. Comumente, também se degusta os nacos de fruta verde após cozinhar, fritar ou torrar; as sementes são apreciadas torradas e degustadas como castanhas e da polpa se faz um licor bem encorpado.

Figura 5: Ilustração da espécie *Artocarpus integrifolia*.

(fonte: <http://islamic-world.net/children/fruit/tropical%20fruit/pic/jackfruit-pic.gif>).

A espécie *Artocarpus incisa* L. (nome popular: fruta-pão), também conhecida como *A. altilis* Fosb., apresenta-se em duas variedades, fruta-pão de massa (sem sementes) e a fruta-pão com sementes. Acredita-se que a fruta-pão seja nativa da Nova Guiné, Micronésia e do arquipélago Indo-Malaio posteriormente introduzida pelos ingleses na Jamaica (produtora mundial da fruta-pão de massa para alimentação), América Central e nordeste da América do Sul, e por espanhóis no México, na costa Pacífica da América Central e do Sul, principalmente a espécie fruta-pão com sementes. A árvore de fruta-pão também adquire grandes proporções (pode alcançar 26 m de altura e 1,8 m de largura de tronco) com flores masculina e feminina diferenciadas, com folhas verde-escuras, que alcançam até 50 cm de largura por 90 cm de comprimento.

O fruto maduro, mostrado na figura 6 possui polpa amarelada, de textura pastosa e aroma adocicado, que abriga as sementes reunidas na porção central. A fruta-pão é regularmente consumida pelos asiáticos em sua alimentação diária e tem mercado garantido nos restaurantes europeus, canadenses e americanos especializados em comida étnica [www.hot.purdue.edu/newcrop/nexus/Artocarpus_ssp_nex.html].

Figura 6: Ilustração da espécie *Artocarpus incisa*

(fonte: <http://web.usf.edu/sequence/feces/US%20Army%20Survival%20Manual/Edible%20Plants/Breadfruit.jpg>)

As diferentes atividades biológicas apresentadas pelas lectinas vegetais advêm da sua propriedade de interagir com acetilamino e amino-carboidratos de superfície celular ou da porção sacarídica de glicoproteínas e glicolípídios.

As lectinas do gênero *Artocarpus* têm despertando interesse desde a descoberta de uma lectina galactose-específica nas sementes de jaca [Moreira *et al.* 1977 *apud* Monteiro-Moreira 2002], posteriormente denominada jacalina, que apresentou a propriedade única de ligar-se a IgA humano, com especificidade para IgA1 [Roque-Barreira *et al.* 1986]. Num segundo momento, jacalina mostrou ligar-se com forte afinidade ao dissacarídeo Gal β 1-3GalNAc α O, que é o antígeno Thomsen-Friedereich, um antígeno associado a um tumor de origem oncofetal. A subsequente descoberta da potente atividade anti-HIV e propriedades inseticidas estimularam posteriores pesquisas com a jacalina e lectinas relacionadas, tornando-a importante ferramenta biotecnológica, especialmente em Imunologia [Kabir, 1998].

A estrutura cristalográfica da jacalina foi resolvida, mostrando que ela exibe um enovelamento muito particular, do tipo β -prisma triplamente simétrico [Sankaranarayanan *et al.* 1996], mas as

investigações estruturais não cessaram. Ela tem sido investigada quanto aos detalhes da sua especificidade, demonstrando, por exemplo, que o sítio de ligação da jacalina é formado por um sítio primário e dois sítios secundários, cujo modo de interação depende da configuração do ligante [Jeyaprakash *et al.* 2003]; estudos comparativos de afinidade de jacalina recombinante com a jacalina nativa mostraram que a modificação pós-traducional da jacalina não interfere com a ligação do carboidrato, mas pode ser um pré-requisito para uma maior afinidade [Sahasrabudhe *et al.* 2004]. Do ponto de vista aplicado, jacalina foi investigada como potencial ligante para purificação de hormônios, mostrando-se muito promissora para este fim [Amadeo *et al.* 2003].

Outras lectinas foram detectadas na semente de jaca. Uma delas, uma lectina manose-específica com forte efeito estimulador de migração de neutrófilos foi detectada sendo denominada KM+ [Santos-Oliveira *et al.* 1994]. Sua estrutura, bem como as bases estruturais responsáveis pelo reconhecimento de resíduos de manose foram propostas [Rani *et al.* 1999, Rosa *et al.* 1999] e confirmadas posteriormente pela resolução da estrutura cristalográfica [Pratap *et al.* 2002] e continuam sob investigação [Jeyaprakash *et al.* 2004]. Estudos bioquímicos com KM+ têm sido realizados, em que são relatados a indução de interleucina-12 p40 (IL-12) por KM+ em camundongos BALB/c, ocasionando-lhes um efeito protetor contra infecção por *Leishmania major* [Panunto-Castelo *et al.* 2001], e a recente descoberta do poder cicatrizante de KM+ no tratamento de queimaduras [Roque-Barreira 2004; <http://www2.tvcultura.com.br/reportereco/materia.asp?materiaid=96>].

Das sementes de *Artocarpus incisa*, duas outras lectinas foram posteriormente descobertas: a frutalina, uma lectina galactose-ligante, muito similar à jacalina [Moreira *et al.* 1998] e a frutapina, lectina manose-ligante [Monteiro-Moreira *et al.* 1999 *apud* Monteiro-Moreira 2002]. Frutalina também vem sendo objeto de estudo, sendo incluída no screening para purificação de rhEPO [Amadeo *et al.* 2003] e como modelo em estudos de processos de desenovelamento e renovelamento de proteínas oligoméricas [Campana *et al.* 2002].

Em 2001, Monteiro-Moreira detectou uma lectina ligante de quitina no extrato salino de *A. integrifolia* e outra no extrato de *A. incisa*. Elas foram isoladas e o N-terminal das cadeias polipeptídicas foram determinados, mostrando que estas lectinas não possuíam identidade com nenhuma lectina seqüenciada até o momento, tratando-se então de lectinas inéditas, estimulando-nos a caracterizá-las e investigá-las do ponto de vista estrutural.

2 - OBJETIVOS

O propósito geral deste trabalho foi caracterizar estruturalmente as lectinas quitina-ligantes das sementes de *Artocarpus integrifolia* e *Artocarpus incisa*, bem como investigar sua utilização como ferramenta biotecnológica. Particularmente, os seguintes objetivos foram traçados:

- A. Purificação em escala preparativa das novas lectinas por métodos cromatográficos clássicos;
- B. Caracterização estrutural das novas lectinas por meio de estudos espectroscópicos de dicroísmo circular, fluorescência e FT-IR, pela determinação de massa molecular, por espectrometria de massas e especificidade por carboidratos;
- C. Determinação do N-terminal das cadeias isoladas das novas lectinas por degradação de Edman;
- D. Verificar mudanças estruturais frente a variações de pH e temperatura por dicroísmo circular e fluorescência;
- E. Explorar atividades biológicas destas lectinas como adesão e inibição de adesão da linhagem de células de eritroleucemia K562 e atividade inibitória de crescimento de fungos fitopatógenos de interesse biotecnológico.

3 - MATERIAIS

3.1 – Soluções, reagentes e padrões.

- Soluções utilizadas na purificação de jackina e frutackina:
 - tampão fosfato salino (phosphate buffer saline, PBS): fosfato de sódio dibásico 0,06 M e cloreto de sódio 0,15 M pH 7,4 ajustado com fosfato de potássio monobásico 0,15 M;
 - tampão glicina / ácido clorídrico 0,1 M pH 2,6 + cloreto de sódio 0,15 M;
 - D-galactose 0,2 M em PBS;
 - D-manose 0,2 M em PBS;
 - Tampão cloreto de sódio/ácido clorídrico 0,15 M pH 2,6.
- Soluções utilizadas e redução e alquilação das cadeias de jackina e frutackina para sequenciamento e na cromatografia em fase reversa:
 - Solução estoque: 10 mL Tampão Tris/HCl 0,25 M pH 8,0 acrescido de EDTA 2 mM, guanidina-HCl 6 M;
 - Ditionotretol (DTT) 0,15 M;
 - 4-vinil-piridina (Sigma-Aldrich);
 - ácido acético glacial 10%
 - ácido trifluoroacético (TFA) e acetonitrila grau analítico (Merk).
- Soluções utilizadas no experimento de variação de pH monitorada por dicroísmo circular:
 - Tampão cloreto de potássio/ácido clorídrico 20 mM pH 2,0;
 - Tampão ácido cítrico/hidróxido de sódio 20 mM pH 4,0;
 - Tampão ácido cítrico/hidróxido de sódio 20 mM pH 6,0;
 - Tampão Tris/HCl 20 mM pH 8,0;
 - Tampão borato de sódio/ácido clorídrico 20 mM pH 10,0
- Soluções utilizadas no experimento de variação de pH monitorada por fluorescência:

- Tampão acetato de sódio/fosfato de sódio/borato de sódio 20 mM nos seguintes pHs: 4,0; 6,0; 8,0; 10,0 e 12,0.
- Soluções utilizadas no ensaio de inibição de hemaglutinação por monossacarídeos:
 - 0,4 M de D-frutose, D-galactose, D-manose, D-glicose, L-fucose, N-metil-manosídeo, N-acetil-galactosamina e N-acetil-glicosamina dissolvidos separadamente em PBS;
 - suspensão de eritrócitos a 2% em PBS.
- Meio de cultura de fungos filamentosos:
 - Estoque de meio nutritivo (potato dextrose, PD) para ensaio em placa de 96 poços: 20 g de batatas cozidas; 20 g de dextrose; água para 1L de meio. O meio sólido (potato dextrose agar, PDA) para ensaio em placas de Petri é feito com adição de 10 g de Agar ao meio PD.
- Marcadores e padrões de massa molecular: albumina sérica bovina (BSA – 66 kDa), ovalbumina (OVA – 45 kDa), anidrase carbônica bovina (ACB – 30 kDa), inibidor de tripsina de soja (ITS - 20,1 kDa), citocromo C (cit C - 12,4 kDa), riboflavina (ribof; 375 Da), fragmentos de mioglobina: 153 aminoácidos (16,95 kDa); aminoácidos 1 a 131 (14,44 kDa); 56 a 153 (10,6 kDa); 56 a 131 (8,16 kDa); 1 a 55 (6,21 kDa); 132 a 153 (2,51 kDa) (todos são Sigma Chemical Co., EUA).

3.2 - Equipamentos:

- Espectropolarímetro mod. J-715 (Jasco) com banho TC-100 (Jasco) acoplado para experimentos de desnaturação térmica;
- Espectrofotômetro Magna-IR 560 (Nicolet) com kit de reflectância total atenuada (Attenuated Total Reflectance – ATR; SpectraTech) com cristal de ZnSe a 45°;

- Espectrofluorímetro ISS K2 (ISS Fluorescence, Analytical and Biomedical Instruments);
- Espectrofotômetro mod U-2201 (Hitachi);
- Sistema para cromatografia de alta e baixa pressão ÄKTA purifier system (Amersham Pharmacia Biotech);
- Sistema para cromatografia de alta pressão HPLC (Bio-rad, Califórnia - EUA);
- Centrífuga refrigerada comum (mod 5B e RC5C plus, Sorval) e de bancada (mod 5414D Eppendorf e mod 206-R excelsa baby-II, Fanem);
- Sistema centrífugo/liofilizador Savant (Speedvac);
- Sistema para eletroforese (Bio-rad);
- Balanças analíticas e convencionais, bombas de vácuo, geladeiras e freezers (-20° C) convencionais.

3.3 - Colunas cromatográficas

- Matriz galactomanana reticulada extraída do endosperma de *Adenanthera pavonina* preparada no Laboratório de Lectinas e Glicoconjugados, Universidade Federal do Ceará;
- Matrizes Sepharose D-galactose e Sepharose D-manose (Pierce);
- Quitina (Sigma-Aldrich);
- Superdex 75 HR 10/30 (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Suécia);
- Coluna de fase reversa C₁₈ (250 x 4.6 mm, partícula 6 µm YMC Inc, Waters, Alemanha);

Demais itens: sistema Amicon para dialofiltração; membranas, centricon, centriprep e sacos de diálise YM (*cutoff* 3,5 kDa, Amicon Corp).

3.4 – Outros materiais

- Material vegetal: As sementes de *Artocarpus incisa* L. (fruta-pão de sementes) foram obtidas de frutos maduros provenientes do

município de Maranguape estado do Ceará. As sementes de *Artocarpus integrifolia* (jaca) utilizadas nos primeiros 2 anos de trabalho são provenientes do mesmo município no Ceará e na segunda metade, foram utilizadas sementes de frutos provenientes da Chácara Aracê de Santo Antônio, município de São Carlos, São Paulo.

- Hemácias: As hemácias de coelho foram obtidas de animais mantidos no biotério do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos. As hemácias humanas (sistema ABO) foram obtidas de doadores sadios do Grupo de Biofísica deste Instituto de Física.

4 – METODOLOGIAS

4.1 – Obtenção dos extratos protéicos das farinhas de sementes de jaca e fruta-pão

As sementes de *A integrifolia* e *A incisa* foram separadas do tegumento, lavadas e secadas em estufa por 24 h a 37 °C. Em seguida, foram trituradas em liquidificador comum, peneiradas e a farinha foi acondicionada em frascos e mantidas em freezers a -20 °C.

A obtenção dos extratos brutos (Eb) das sementes de jaca e fruta-pão seguiu a rotina mostrada na figura 4.1.1. Assim, as respectivas farinhas foram suspendidas em tampão PBS 0,15 M NaCl pH 7,4 na proporção 1:10 (m/v), sob agitação constante, a 10 °C por 4 horas. A suspensão foi centrifugada a 12.000 x g por 20 min a 7 °C. O sobrenadante foi então filtrado em papel de filtro comum e dialisado em sacos YM 3,5 contra PBS por 3 dias, a 10 °C, com trocas regulares de tampão a cada 6 horas. Finda a diálise, os extratos foram aliquotados e mantidos a -20 °C.

Figura 7: Organograma de obtenção do extrato bruto a partir das sementes de *Artocarpus integrifolia* e *Artocarpus incisa*.

4.2– Purificação das lectinas ligantes de quitina

4.2.1 – Cromatografia por afinidade

Esta técnica cromatográfica utiliza a habilidade de certas proteínas em se ligar especificamente com um determinado ligante, podendo-se então, utilizar esta informação (especificidade) na construção de colunas onde o ligante está covalentemente ligado numa matriz. Deste modo, quando uma mistura de proteínas é passada pela fase estacionária, apenas as proteínas que se ligam ao ligante da coluna ficarão retidas. A posterior liberação das proteínas retidas é feita eluindo-as com uma solução do ligante ou por variação de pH e força iônica [Manual AKTA afinidade]. No caso de purificação de anticorpos e lectinas, a cromatografia por afinidade é clássica e amplamente utilizada, justamente porque muitas lectinas são altamente específicas e esta técnica é rápida, simples e, na maioria dos casos, fornece ótimos resultados.

4.2.2 – Gel filtração

Também conhecida como cromatografia por exclusão molecular, esta técnica se vale dos diferentes tamanhos das proteínas contidas numa dada mistura para que haja efetiva separação. Assim, a matriz consiste de um material hidratado e poroso em que estes poros (de tamanhos controlados que abrangem uma faixa de peso molecular) funcionam como pequenas gaiolas, resultando numa acessibilidade diferenciada para proteínas de diferentes volumes hidrodinâmicos. Então, proteínas maiores não penetram nos poros da matriz, sendo eluídas mais rapidamente. Já proteínas menores, que experimentam maior volume de contato, por serem capazes de penetrar nos poros da matriz, são eluídas mais tardiamente [Manual AKTA gel filtração].

Neste método, uma proteína pode ser caracterizada por seu volume de eluição, que é o volume de solvente necessário para eluí-la da coluna. Padronizando-se a coluna com proteínas de massa molecular conhecida, esta técnica também é utilizada para se estimar o peso molecular da proteína de estudo. No entanto, é importante ter em mente que, para proteínas não-globulares, a estimativa está sujeita a desvios e a análise deve ser feita com o devido critério.

4.2.3 – Protocolo de purificação das lectinas quitina-ligantes: jackina e frutackina

As duas lectinas quitina-ligante foram purificadas segundo a metodologia de Monteiro-Moreira *et al* [Monteiro-Moreira 2002] utilizando-se os mesmos procedimentos e soluções (exceto as colunas, que foram separadas para cada tipo de Eb) descritos em termos gerais a seguir e mostrado no esquema da figura 8

Depleção das lectinas D-galactose ligantes: Partiu-se de um volume de Eb de 120 mL que foi aplicado em alíquotas de 12 mL na coluna de galactomanana (25 mL de resina) arranjada em série com uma coluna de *sepharose*-D-galactose (14 mL). Este sistema foi lavado com PBS e o material não-ligado foi coletado e reunido (*void*-D-gal). As colunas foram separadas e o material ligado na coluna de galactomanana foi eluído com tampão glicina/HCl 0,1 M pH 2,6 e o da coluna de *sepharose* D-gal, com D-galactose 0,2 M em PBS. Estes materiais que estavam ligados e que foram coletados de cada coluna são jacalina, de *A integrifolia* e frutalina, de *A incisa*. As proteínas foram armazenadas a -20 °C.

Depleção das lectinas D-manose ligantes: A fração não ligada da etapa anterior, *void*-D-gal, foi aplicada numa coluna de *sepharose*-D-manose (10 mL de resina). A coluna foi lavada com PBS e a fração não-ligada (*void*-D-man), recolhida. O material ligado, KM+, de *A integrifolia* e frutapina, de *A incisa*, foram eluídos com 0,2 M de D-manose em PBS e armazenado a -20 °C.

Purificação das lectinas quitina-ligantes: A fração não-ligada da etapa anterior, *void-D-man*, foi aplicada em coluna de quitina (12 mL) equilibrada com PBS. A fração não ligada foi descartada e a fração ligada foi eluída com HCl 0,01 M /NaCl 0,15 M pH 2,6, que foi imediatamente ajustada para pH 7,4, monitorada em pHmetro, com solução NaOH. Esta fração foi lavada com PBS e concentrada 30 vezes por dialofiltração em sistema Amicon utilizando-se membrana YM 3,5 sendo, subseqüentemente, submetida a gel filtração. A gel filtração foi feita em coluna Superdex-75 HR 10/30 equilibrada e eluída com PBS 0,15 M NaCl pH 7,4, fluxo de 0,5 mL/min, monitorada em 280 nm com coleta de frações de 1 mL. A coluna foi padronizada com BSA, anidrase carbônica, citocromo C e riboflavina.

Figura 8: Organograma das etapas da purificação das lectinas ligantes de quitina jackina e frutackina.

4.2.4 – Cromatografia em fase reversa

O princípio da cromatografia em fase reversa está em explorar as propriedades de solubilidade da amostra entre um meio hidrofóbico (matriz cromatográfica ou fase estacionária) e um meio hidrofílico (eluente ou fase móvel) de polaridade variada. A fase estacionária é composta de longas cadeias hidrocarbônicas ligadas numa matriz de sílica, onde as proteínas ficam adsorvidas forte ou fracamente, dependendo de sua hidrofobicidade. Estas proteínas adsorvidas na coluna em condições aquosas (fase móvel inicialmente polar) serão eluídas por uma mistura de solvente aquoso e orgânico, com gradiente crescente de solvente orgânico, de maneira a deslocá-las seletivamente (mecanismo de partição) para a fase móvel, promovendo a separação. Esta técnica é a última palavra em purificação de biomoléculas quando se busca alta resolução na purificação de proteínas e peptídeos para fins analíticos, como seqüenciamento [Manual Akta reverse phase].

A cromatografia em fase reversa foi utilizada para purificar amostras de jackina e frutackina nativas que seriam posteriormente submetidas a reações de redução e alquilação das cadeias polipeptídicas a serem seqüenciadas, bem como para separação das cadeias derivatizadas. Uma amostra de jackina também foi previamente purificada em fase reversa para ser submetida à determinação da massa molecular por espectrometria de massas.

As cromatografias em fase reversa da jackina e frutackina nativas e reduzidas foram realizadas em coluna de fase reversa C₁₈ acoplada a um sistema HPLC (High Performance Liquid Chromatography), monitoradas em 220 nm. A coluna foi equilibrada com 100% de solvente A (TFA 0,1% em H₂O) durante 5 minutos para a jakina nativa e para a jackina clivada, eluída com gradiente de 0 a 60% de solvente B (TFA 0,1% em 90% de acetonitrila: 10% de H₂O) em 60 minutos, de 60 a 100% de solvente B em 5 minutos e de 100 a 0% de B em 5 minutos, num fluxo de 0,7 mL/min, frações coletadas de 0,5 mL.

4.3 – Caracterização físico-química

4.3.1 – Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e tampão de arraste tricina (tricine SDS-PAGE) e dosagem de proteínas.

A eletroforese é uma técnica de separação de proteínas que ocorre por meio da migração diferenciada de proteínas carregadas pela ação de um campo elétrico por um gel de poliacrilamida. O SDS-PAGE se tornou um método analítico comumente utilizado na avaliação do grau de pureza de uma proteína, além de fornecer estimativas de peso molecular, presença de subunidades e ponto isoelétrico (este último, sem a presença de SDS; Lehninger 2000).

Neste trabalho, as eletroforeses das amostras de jackina e frutackina foram realizadas segundo método proposto por Schägger & von Jagow [Schägger & von Jagow 1987] que utiliza géis de SDS-PAGE a 16% e tampão tricina (tricina 0,1 M em Tris 0,1 M e SDS 0,1%) para se obter melhor resolução de proteínas pequenas (5 a 20 kDa). As amostras de proteínas foram dissolvidas em tampão contendo corante (azul de bromofenol), na presença e ausência de β -mercaptoetanol, fervidas por 5 minutos e aplicadas no gel. As corridas foram realizadas a 30 V por 1 hora (ou até as proteínas saírem do gel de empilhamento) e a 100 V por mais 4 horas. Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue 250 R a 0,05% e descorados com uma solução de ácido acético/metanol/água (1:3:8). Os marcadores de massa molecular (MM) alta foram BSA, OVA, ACB, ITS, CIT-C e os de massa molecular baixa foram fragmentos de mioglobina (153 aminoácidos): fragmentos 1 a 131; 56 a 153; 56 a 131; 1 a 55 e 132 a 153.

A determinação da concentração de proteínas pelo método de Lowry se baseia na reação de oxidação dos aminoácidos catalisada pelo cobre (sob condições alcalinas) pela redução do reagente Folin-Ciocalteu (ácido fosfomolibdicofosfotungstico) para a formação do azul de heteropolimolibdenio. O produto formado na reação gera uma coloração azul intenso e o método é largamente empregado devido a sua alta sensibilidade (0,1 mg/mL de proteína) [Harris 1989 *in* Scopes 1994].

4.3.2 – Espectrometria de massas

A espectrometria de massas é uma técnica analítica muito poderosa na identificação de amostras desconhecidas e na elucidação estrutural de moléculas. Suas maiores vantagens são a quantidade de amostra necessária (picomol) e sua precisão (10^{-3} Daltons).

Em linhas gerais, a determinação da massa molecular de proteínas é feita medindo-se a massa de moléculas individuais convertidas em íons. A massa molecular, bem como a análise estrutural de proteínas se faz pela presença do íon molecular, que é o íon gerado a partir da proteína íntegra, e pelo padrão de fragmentação de cada proteína, interpretado pelo seu espectro de massas [ASMS booklet].

A massa molecular de jackina foi determinada num sistema LC/ESI/MS utilizando-se ionização por eletrospray e analisador íon-trap, realizada pelo Dr. Antônio Miranda da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

4.4 – Caracterização estrutural

4.4.1 – Estudos de variação de força iônica da jackina

Devido à mudança de lote de sementes de jaca, testes de variação de força iônica para recuperação de jackina foram realizados, utilizando-se tampões de eluição com diferentes concentrações de cloreto de sódio e ácido clorídrico. Os tampões ácidos usados foram: NaCl/HCl, com concentrações de NaCl de 0,15, 0,3, 0,4, e 0,5 M, todos com pH 2,6 e soluções de HCl nas concentrações 0,01, 0,025, 0,050, 0,075 e 0,1 M. Após a eluição da coluna de quitina, o pH da fração coletada foi ajustado à neutralidade, lavado com PBS e concentrado por dialofiltração. Em seguida, a amostra foi aplicada em coluna superdex-75 e os principais picos obtidos (fração 10-11, pico 1 e fração 13-15, pico 2) foram analisados por dicroísmo circular, em que as medidas foram obtidas como descrito na seção 4.4.4.2.

4.4.2 – Determinação de estrutura primária

O seqüenciamento parcial das cadeias polipeptídicas de jackina e frutackina foi realizado pela degradação de Edman automatizada, com as cadeias previamente reduzidas e alquiladas pela reação de Friedman [Friedman *et al.*1970].

Amostras de jackina e frutackina previamente purificadas por fase reversa e liofilizadas foram reduzidas e alquiladas, baseando-se no trabalho de Friedman com algumas modificações, como segue: 0,4 mg de proteína liofilizada foi dissolvida em 200 μ L de tampão Tris-HCl 0,25 M pH 8,0, guanidina-HCl 6 M, EDTA 2 mM, DTT 0,15 M e incubada por 4 horas, a 56 °C, no escuro, em atmosfera de N₂. Os grupos sulfidril livres das cadeias foram expostos a 6 μ L de 4-vinil-piridina e a reação prosseguiu por mais 2 horas nas condições acima citadas. A reação foi interrompida com ácido acético glacial 10% e as cadeias S-4-piridil-etil derivatizadas foram purificadas e separadas por cromatografia de fase reversa em coluna C₁₈, acoplada em sistema HPLC.

O sequenciamento das cadeias procedeu da seguinte forma: uma alíquota contendo entre 200 e 300 pmol de cada cadeia purificada e ressuspendida em água e Sequa-Brene (Sigma-Aldrich) foi aplicada num disco de fibra de vidro especial (Wako, Osaka, Japão), previamente tratado com Sequa-Brene. A análise da seqüência N-terminal foi realizada através da degradação de Edman, num seqüenciador automatizado de proteínas, PPSQ-23A Shimadzu (Kyoto, Japan). Os procedimentos foram realizados seguindo as recomendações do fabricante.

4.4.3 – Alinhamento

O programa CLUSTALW (www.ebi.ac.uk/clustalw) é um programa de alinhamento de múltiplas seqüências de DNA e proteínas que fornece várias informações como similaridades, identidades, mostrando os resultados em forma de alinhamento e de pontuação (score). O programa também faz filogramas, assumindo que as seqüências de entrada possam formar uma árvore filogenética e, assim, mostra o ancestral comum e

estima mudanças evolucionárias que são ilustradas proporcionalmente aos comprimentos dos ramos da árvore.

As seqüências parciais das cadeias de jackina e frutackina foram alinhadas com seqüências de proteínas ligantes de quitina de famílias conhecidas (lectinas de invertebrados, lectinas da família das heveínas, etc) e com proteínas ricas em cisteínas que apresentassem atividade antifúngica (defensinas, tioninas, etc) escolhidas para representar as famílias das quais fazem parte. As representantes foram:

1. NLTP1: non specific lipid-transfer protein isolada de *L. esculentum*; acesso: P93224;
2. hevamina: quitinase classe-h de *H. brasiliensis*; acesso: CAC19408;
3. gama-tionina: defensina não-classificada acesso: CAA64653;
4. AFP2: defensina classe I de *R. sativus*; acesso: P30230;
5. AMP1: defensina classe II de *C. ternatea*; acesso: S66219
6. gama-2-purotionina: defensina classe III; acesso: P20159
7. zeamatina: thaumatina; acesso: 1DU5_B;
8. barley: quitinase classe-b de *H. Vulgare*; acesso: AAA56786
9. Jessie1: proteína ligante de quitina de *E. histolítica* com domínio ligante de quitina formada por 8 cisteínas; acesso: AAK94929
- 10.tachycitina: proteína ligante de quitina de *Tachypleus tridentatus* domínio ligante de quitina formado por 6 cisteínas; acesso: BAA12864;
- 11.peritrofina-44: proteína ligante de quitina de *Lucilia cuprina*, domínio ligante de quitina formado por 6 cisteínas; acesso: AAC37261
12. AGCP2p: proteína cuticular de *Anopheles gambiae*; acesso: AAC05660
13. PR-1_barley: pathogenesis-related protein classe 1 de *H. vulgare*; acesso: Q05968;
- 14.PR-1_mayze: pathogenesis-related protein classe 1 de *Z. mayz*; acesso: T02054

15. CH_Eh_jacob: proteína ligante de quitina de parede celular (*E. histolítica*), com domínio formado por 6 cisteínas; acesso: AAK94927
- 16.heveína: proteína ligante de quitina de *H. brasiliensis* e ancestral de lectinas ligantes de quitina de plantas; acesso: 1HEV;
- 17.UDA7: precursor da aglutinina isolectina VII de *Urtica dioica* da família das heveínas; acesso: AAD15811;
- 18.PL-C: lectina-C de *Phytolacca americana* da família das heveínas; acesso: AAB35257
- 19.cardiotoxina-3: proteína de veneno de *Naja atra*, ligante da heparina, acesso: CAB42055
- 20.chain_1_jackin: cadeia 1 da jackina;
- 21.chain_2_jackin: cadeia 2 da jackina;
- 22.chain_3_jackin: cadeia 3 da jackina;
- 23.chain_1_frutackin: cadeia 1 da frutackina;
- 24.chain_2_frutackin: cadeia 2 da frutackina;

O alinhamento foi feito aos pares e o filograma foi gerado com a entrada de todas as seqüências mencionadas acima.

4.4.4 – Caracterização espectroscópica

4.4.4.1 – ABSORÇÃO ELETRÔNICA

O espectro eletrônico envolve transições entre diferentes níveis de energia (estados) dos elétrons nas moléculas. Quando uma frequência de radiação eletromagnética coincide com a diferença em energia entre dois diferentes estados eletrônicos, uma transição eletrônica é muito provável de suceder.

A espectroscopia de absorção eletrônica voltada à caracterização de proteínas *in vitro* é principalmente utilizada para determinar concentrações, uma vez que existe uma relação direta entre concentração de amostra e absorbância (*A*) ou densidade ótica, regida

pela lei de Lambert-Beer, onde A é proporcional ao coeficiente de extinção (ϵ), concentração (c) e caminho ótico (l).

$$A = \epsilon cl,$$

Além disso, ela pode monitorar eventos biológicos como a ligação substrato/enzima, desnaturação e agregação de proteínas, uma vez que o espectro de absorção de uma molécula pode mudar em função do ambiente molecular em que a proteína está sendo influenciada [Campbel 1984].

Medidas de densidade ótica de jackina e frutackina foram largamente obtidas por todo o trabalho para quantificá-las após cada etapa de purificação, determinar a concentração de proteína a ser submetida a todos os processos de caracterização e atividade biológica. As medidas foram feitas em $\lambda = 220$ e 280 nm, que são os comprimentos de onda de absorção dos cromóforos amida e da cadeia lateral dos aminoácidos aromáticos, respectivamente, em espectrofotômetro com dois compartimentos, um para amostra e outro para a referência, utilizando-se cubetas de quartzo de 0,5 mL.

4.4.4.2 – ESPECTROSCOPIA DE DICROÍSMO CIRCULAR (CD) E ESTIMATIVA DAS FRAÇÕES DE ESTRUTURA SECUNDÁRIA.

O fenômeno de dicroísmo circular refere-se à absorção diferenciada da luz circularmente polarizada à direita e à esquerda.

A luz circularmente polarizada é gerada quando a fonte de luz oscila em duas direções perpendiculares entre si (horizontal e vertical), com amplitudes iguais, mas com uma diferença de fase $\pi/2$. Quando isto acontece, a trajetória do vetor resultante de propagação de luz é helicoidal, como mostra a figura 9, que exemplifica a propagação da luz circularmente polarizada à esquerda. Assim, a onda resultante será circularmente polarizada à direita ou esquerda conforme a diferença de fase for $+\pi/2$ ou $-\pi/2$. [Campbel 1984].

Figura 9: Ilustração da propagação da luz circularmente polarizada à esquerda.

Na prática, os espectropolarímetros possuem um cristal diaxial que, dependendo da voltagem aplicada, se move de modo a permitir que as luzes circularmente polarizadas à direita (D) e esquerda (E) emergjam alternadamente e, assim, o sinal detectado seja a diferença de absorção entre D e E.

Os dois tipos de luzes circularmente polarizadas obedecem à lei de Lamber-Beer:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (1) \quad \text{Assim,}$$

$$\Delta A = A_E - A_D \Rightarrow \Delta A = (\varepsilon_E c l) - (\varepsilon_D c l), \text{ logo,} \quad \Delta A = \Delta \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (2)$$

Por razões históricas, os espectropolarímetros comerciais representam CD como elipticidade (dada em graus) que se relaciona com a equação (2) por:

$$[\theta]_\lambda = 3300 \cdot \Delta \varepsilon \quad (3), \text{ onde } [\theta]_\lambda \text{ é a elipticidade molar dada em graus} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}.$$

Para apresentar o efeito de dicroísmo circular, uma molécula deve possuir cromóforos quirais, ou seja, centros assimétricos, de modo que a componente circularmente polarizada à direita seja absorvida com diferente quantidade da componente à esquerda. Dessa forma, as duas ondas transmitidas, quando combinadas, resultarão numa luz

elipticamente polarizada, caracterizando assim o fenômeno, como está ilustrado na figura 10.

Figura 10: Luzes circularmente polarizadas à direita e à esquerda incidentes (A) e transmitidas após interagir com molécula dicrótica (B)

A espectroscopia de CD é uma das técnicas mais úteis no estudo estrutural de proteínas, uma vez que suas unidades básicas, os resíduos de aminoácidos, possuem centro quiróforo (o grupo amida ligado ao carbono α que é assimétrico). A análise de um espectro de CD geralmente se concentra na região do ultravioleta distante (180 a 250 nm), onde as transições $n-\pi^*$ (em torno de 210 nm) e $\pi-\pi^*$ (em torno de 190 nm) da amida estão compreendidas.

Além disso, de acordo com a conformação estrutural que as proteínas adquirem (hélices- α , folhas- β , estruturas desordenadas), é possível caracterizar a estrutura secundária destas macromoléculas devido ao perfil espectral de CD particular destes arranjos, bem como estimar as frações destas estruturas na estrutura global das mesmas. Estudos concernentes a processos de desnaturação e renovelamento de proteínas, um dos eventos mais intrigantes que abrange o estudo estrutural destas biomoléculas, são comumente estudados por CD [Kelly & Price 1997, Nakanishi *et al.*, 1994]. Mudanças conformacionais que podem ocorrer nas proteínas em função de ligações com ligantes específicos, variações de temperatura, pH e força iônica do meio também podem ser monitoradas por CD.

Os espectros de CD das lectinas nativas (concentração de 0,28 mg/mL) em tampão PBS foram obtidos na faixa de 198 a 250 nm em

espectropolarímetro Jasco como uma média de 8 varreduras, utilizando-se cubetas de quartzo de 0,1 cm de caminho ótico.

Para os experimentos de variação de pH da jackina, a proteína foi diluída em cada tampão de modo a ter concentração de 0,28 mg/ml. Os espectros foram medidos após 20 min e 40 horas de incubação em tampões 20 mM de KCl/HCl pH 2, ácido cítrico/NaOH pH 4 e 6, Tris/HCl pH 8 e borato de sódio/HCl pH 10.

No experimento de estabilidade térmica, uma amostra de jackina (0,5 mg/mL) foi submetida a uma rampa de aquecimento gradual de 10 a 80° C usando um banho de água acoplado ao espectropolarímetro, em que a temperatura foi aumentada a cada 5° C. A proteína foi incubada por 5 minutos em cada etapa e os espectros foram então medidos.

Em todos os casos, os espectros foram transformados em elipticidade molar ($[\theta]$) pela relação:

$$[\theta] = \frac{\theta_{obs} \cdot M_R \cdot 100}{l \cdot c} \times 10^{-3} \quad (4), \text{ onde:}$$

θ_{obs} é a elipticidade observada (graus);

M_R é massa molecular média por resíduo (115 g/mol)

l é o caminho ótico (cm)

c é a concentração (mg/cm³ ou mg/mL).

A estimativa de frações de estrutura secundária está apoiada no conceito de que o espectro de CD de uma proteína é uma combinação linear de todas as frações de estrutura secundária que a constitui. Dada à complexidade do espectro, a determinação quantitativa da estrutura secundária de uma proteína apenas pela análise do espectro de CD é inviável.

Por outro lado, os métodos de desconvolução de espectros extraem diretamente as componentes comuns dos espectros experimentais de CD, permitindo a obtenção de suas curvas puras (hélices- α , folhas- β , voltas- β , estruturas desordenadas, contribuição de resíduos aromáticos, pontes dissulfeto) e porcentagens que representam no espectro.[Sreerama & Woody 2000].

As estimativas das frações de estrutura secundária de jackina e frutackina foram obtidas pela desconvolução dos espectros de CD das lectinas nativas usando os programas CLUSTER, SELCON 3, CDSSTR e CONTIN/LL [Sreerama & Woody 2000]. O programa CLUSTER determina a classe de estrutura terciária de uma determinada proteína a partir de seu espectro de CD e cria um grupo de referências apropriado para ser usado nos programas de análise de CD. [Sreerama *et al.* 2001].

Os programas de análise de CD, CDSSTR e SELCON3 utilizam o formalismo autoconsistente (*self-consistent*) e o algoritmo de decomposição do valor singular (*singular value decomposition, SVD*). O CONTIN/LL utiliza o procedimento *ridge regression*, que ajusta o espectro de CD experimental como uma combinação linear dos espectros de CD do grupo de referência. [Sreerama & Woody 2000, Sreerama *et al.* 2001].

Neste trabalho, utilizou-se o programa CLUSTER para classificar as lectinas quanto à estrutura terciária e também que ele gerasse um grupo de referências para ser usado nos programas de análise. Posteriormente, as estimativas de frações de estrutura secundária foram feitas com os programas mencionados acima, tomando-se como solução válida o melhor ajuste do espectro calculado com o espectro experimental.

4.4.4.3 – ESPECTROSCOPIA DE EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA

A emissão da radiação ocorre quando uma molécula que está no estado eletrônico excitado retorna para seu estado fundamental. No entanto, o evento de emissão de fluorescência sucede dois outros eventos, a absorção de energia que promove os elétrons do estado fundamental S_0 para o estado excitado S_1 (excitação) e um relaxamento não-radiativo (por exemplo, calor ou vibração) entre os níveis vibracionais no estado S_1 , como mostra o diagrama ilustrado na figura 11. Isso explica por que a fluorescência ocorre em comprimentos de onda menores do que o de excitação.[Campbel 1984].

Figura 11: Diagrama de energia, ilustrando os processos que levam à emissão de fluorescência.

A espectroscopia de emissão de fluorescência também é largamente empregada no estudo estrutural de moléculas biológicas, por exemplo, para verificar mudanças conformacionais discretas no microambiente dos fluoróforos naturais como triptofano, tirosina e fenilalanina. Alterações no padrão do espectro de emissão, no rendimento quântico ou na posição dos máximos de emissão podem inferir informações relacionadas à ação de solventes, ligantes, pH e força iônica na vizinhança dos grupos fluorescentes sob investigação. [Lakowicz, 1983].

Em condições nativas, jackina e frutackina recém-purificadas por gel filtração tiveram suas concentrações ajustadas para 0,07 mg/mL com PBS e seus espectros foram coletados. No experimento de variação de pH, uma solução-estoque de jackina (0,6 mg/mL) foi diluída em cada tampão (20 mM de tampão acetato/fosfato/borato, pHs 4, 6, 8, 10 e 12) para que tivesse concentração final de 0,07 mg/mL. As amostras foram incubadas por 40 minutos e os espectros foram obtidos em um espectrofluorímetro ISS K2 a 18 °C, mantida por banho de água, utilizando-se cubetas de quartzo retangular de 1 mL. O comprimento de onda de excitação foi 295 nm e o espectro de emissão foi coletado na faixa de 310 a 450 nm. Cada espectro de referência foi obtido e subtraído de sua respectiva medida.

4.4.4.4 – ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR)

A região do infravermelho no espectro eletromagnético corresponde à energia de muitas vibrações moleculares, em que a faixa de maior interesse está entre 4000 a 1400 cm^{-1} . Assim, a espectroscopia de infravermelho fornece informação sobre a energia de transições vibracionais envolvidas numa molécula.

As vibrações observadas no infravermelho comum são aquelas que resultam em alterações rítmicas no momento dipolar da molécula e a frequência de uma dada vibração depende das massas reduzidas dos átomos envolvidos e da constante de força de ligação entre eles, relacionando-se pela equação abaixo:

$$\phi = \frac{1}{2\pi \cdot c} \sqrt{\frac{\kappa}{\mu}} \quad (4), \text{ onde}$$

ϕ é o número de onda do pico vibracional (cm^{-1});

c é a velocidade da luz (cm/s);

κ é a constante de força da ligação química (dinas/cm);

μ é a massa reduzida (g). (A dedução desta equação a partir da lei de Hooke e do oscilador harmônico está apresentada no apêndice 1)

A espectroscopia de infravermelho aplicada aos estudos estruturais de biomoléculas tornou-se muito vantajoso com o surgimento de espectrômetros de infravermelho, com software acoplado de modo que os espectros sejam tratados por transformada de Fourier (FT-IR). Nestes equipamentos são usados instrumentos baseados no interferômetro de Michelson e a fácil aplicação de rápidos algoritmos de transformada de Fourier, trazendo, assim, enorme ganho de tempo, aumento de resolução, aumento na sensibilidade das medidas e facilidade no tratamento dos dados. Métodos de aumento de resolução como a derivada e a desconvolução permitem visualizar as componentes de estrutura secundária contidas na banda do espectro de proteínas.

O espectro de infravermelho de proteínas possui diversas bandas relativamente grandes, associadas com a ligação peptídica, daí chamá-las de bandas amida. As bandas consideradas no estudo de proteínas são as bandas amida I, II e III que ocorrem aproximadamente em 1650, 1550 e 1300 cm^{-1} , respectivamente, sendo que a maioria dos estudos analisa apenas a banda amida I [<http://cbmc.umh.es/CBMCpraticas/PB/TeoriaFTIR.htm>].

A banda amida I é formada fundamentalmente por vibrações do tipo estiramento axial (no eixo da ligação química) da ligação C=O acopladas com vibrações de estiramento da ligação C-N e de deformação (angular) CCN. As frequências das vibrações são dependentes de ligações de hidrogênio que os grupos C=O e N-H estabelecem. Os padrões destas, por sua vez, dependem da estrutura secundária presente na proteína, portanto, justificando sua importância para determinar estruturas secundárias de proteínas, bem como mudanças conformacionais decorrentes de alterações no ambiente em que a proteína está inserida, que são pertinentes aos sistemas biológicos.[Campbel 1984, Silverstein 1989]. As frequências vibracionais de absorção da amida I dos grupos peptídicos em diferentes conformações secundárias são mostradas na tabela 2 abaixo.

Tabela 2: Frequências vibracionais (números de onda) da banda amida I dos grupos peptídicos em diferentes estruturas secundárias (Iconomidou et al. 2000).

estrutura secundária	amida I (cm^{-1})
hélice- α	1650-1660
folhas- β	1630
voltas- β	1660-1690
desordenadas	1640-1650

O espectro primário de FT-IR de jackina (2,0 mg/mL em PBS) foi obtido num espectrofotômetro Nicolet Magna-IR utilizando-se um acessório de reflectância total atenuada (ATR), como uma média de 400 varreduras, com 4 cm^{-1} de resolução, na faixa de 400 a 4000 cm^{-1} em

atmosfera de nitrogênio. O espectro do tampão também foi obtido nas mesmas condições e subtraído do espectro da proteína. A segunda derivada do espectro primário foi feita no programa Origin 6.0.

4.5 – Atividade biológica

4.5.1 – Atividade hemaglutinante e inibição da hemaglutinação por monossacarídeos

A atividade hemaglutinante de jackina e frutackina foi testada frente a células sangüíneas de coelho e humanos, incubando-se 50 µL de solução de proteína, com igual volume de suspensão 2% de eritrócitos de coelho e humano em microplacas de 96 poços, por 2 horas, temperatura ambiente e a atividade hemaglutinante foi avaliada visualmente.

Após a caracterização inicial de jackina e frutackina, outras propriedades foram investigadas somente com jackina em função do rendimento desta lectina ser 2 vezes maior do que frutackina. Assim, para jackina, as investigações foram além, buscando-se a concentração mínima de proteína que promovesse hemaglutinação visível e determinar (ou obter mais informações sobre) a especificidade da lectina.

O ensaio para determinação de mínima concentração hemaglutinante de jackina também foi feito em microplaca de 96 poços utilizando-se 50 µL de solução de proteína, inicialmente a 0,56 mg/mL. A amostra foi submetida à diluição duplo-seriada em PBS e, posteriormente, foi adicionado igual volume de suspensão 2% de eritrócitos de coelho em PBS. A placa foi incubada à temperatura ambiente por 2 horas e a atividade hemaglutinante foi avaliada visualmente. Poços contendo PBS e células vermelhas serviram como controle negativo.

Depois de determinada a concentração mínima hemaglutinante, 8 monossacarídeos que pudessem promover a inibição da hemaglutinação foram testados, na tentativa de se determinar a especificidade de jackina. Foram testados D-frutose, D-galactose, D-glicose, D-manose, L-

fucose, N-metil-manosídeo, N-acetil-galactosamina e N-acetil-D-glicosamina, inicialmente a 0,4 M. Procedeu-se a diluição duplo seriada e a placa foi incubada com igual volume de solução de jackina a 0,33 mg/mL, durante 2 horas. Posteriormente, adicionou-se 50 µL de suspensão 2% de células sangüíneas de coelho. A placa foi incubada por 2 horas, à temperatura ambiente e a inibição de hemaglutinação foi avaliada visualmente, comparando-se com o controle positivo contendo apenas jackina e eritrócitos.

4.5.2 – Ensaio de adesão e inibição de adesão de células K562

A linhagem celular K562 é constituída por células de eritroleucemia humana, assim concluída após investigações das propriedades de superfície da membrana desta linhagem celular. Este estudo revelou que os tipos de glicoproteínas expressos em K562 (entre elas a glicoforina, exclusivamente encontrada em células eritróides presentes na medula óssea humana) foram muito similares àsquelas encontradas em eritrócitos normais e completamente diferentes dos padrões de proteínas de granulócitos, sejam de células normais ou malignas, de qualquer estágio de maturação dos mesmos, desde mieloblastos até a diferenciação em granulócitos [Andersson *et al.* 1979].

Processos de adesão celular de K562 mediados por fibronectina, uma proteína que compõe matrizes extracelulares, são extensivamente abordados na literatura. O processo de reconhecimento da fibronectina com a superfície celular ocorre por interação proteína-proteína, mediado por receptores integrinas, particularmente pelo reconhecimento de epítomos RGDS pela integrina $\alpha 5 \beta 1$ ou CS pela $\alpha 4 \beta 1$ [Zheng & Hakomori 2000].

Reconhecida a presença de regiões cisteína-serina na sequência primária de jackina, propôs-se investigar a existência de algum tipo de interação entre jackina e a linhagem K562 por meio de um ensaio de adesão e inibição de adesão de K562 promovido por jackina.

O ensaio de adesão celular foi realizado com células K562, em microplaca de 96 poços, seguindo o procedimento: recobrimento dos

poços com fibronectina (10 µg/mL) no poço denominado "controle (+)", com jackina (100 µg/mL) no poço denominado "lectina", com BSA 1% no "controle (-)" e incubados por 12 horas, a 4 °C. A seguir, os poços foram bloqueados com 200 µL de BSA 1%, e a placa incubada por 1 hora a 37 °C. Subseqüentemente, adicionou-se 150 µL de células de eritroleucemia K562 previamente lavadas, marcadas com 5-clorometil-fluoresceína-diacetato, (CMFDA) e ajustadas para 1×10^5 células/poço. Após incubação por 30 minutos a 37 °C, os poços foram lavados com BSA 1%, adicionou-se 100 µL de Triton X-100 0,5% e a leitura foi feita em fluorímetro de placa SpectraMax Gemini XS (Molecular Devices). Este ensaio, bem como a curva-padrão, foram feitos em duplicata. A curva padrão foi obtida com células marcadas nos volumes 20, 10, 5 e 2,5 µL diluídos em 100 µL de Triton X-100 0,5% em cada poço.

O ensaio de inibição de adesão celular promovida por jackina foi feito como segue: na mesma placa de 96 poços, juntamente com o ensaio de adesão, fez-se o recobrimento com fibronectina (10 µg/mL) nos poços denominados "controle (+)" e "lectina". Adicionou-se 150 µL de jackina (100 µg/mL) na suspensão celular destinada ao poço denominado "lectina". Seguindo as mesmas condições descritas acima para o ensaio de adesão. O ensaio foi feito em duplicata, utilizando-se a curva-padrão obtida no ensaio anterior.

4.5.3 – Ensaio de atividade antifúngica

Atualmente estima-se que 8.000 espécies de fungos causem doenças em plantas e cada fungo parasita ataca a um ou mais tipos de plantas.

Os fungos, em sua maioria, são constituídos de filamentos microscópicos com parede celular bem definida, rija e rica em quitina, chamados hifas e uma célula fúngica é constituída pelos principais componentes encontrados nos organismos eucariotos.

Como os fungos não podem utilizar energia solar para sintetizar seu próprio alimento, eles retiram os nutrientes de que necessitam de um

substrato, que podem ser organismos mortos, plantas vivas, entre outros.

Além da fase vegetativa que envolve o crescimento das hifas e formação do micélio, os fungos também têm uma fase reprodutiva dentro do ciclo de desenvolvimento. A fase reprodutiva se desenvolve por ação dos esporos, as estruturas reprodutivas dos fungos, que são produzidos nos esporóforos, ramificações especializadas do talo ou da hifa.[<http://www.ufrpe.br:6789/fitopatologia/teoricas/T06.pdf>].

Assim como os fungos podem ser muito úteis à vida humana, sendo empregados para diversos fins como na indústria de bebidas, alimentos e farmacêutica (produção de antibióticos), eles também podem causar problemas de grandes proporções como patologias em monoculturas (arroz, milho e cana de açúcar), resultando em perdas econômicas substanciais que, para a maioria dos países em desenvolvimento, são muito críticas. Em vista disso, conhecer substâncias que controlem o crescimento ou mesmo previna o ataque de fungos fitopatógenos se justifica.

Ambos *Fusarium moniliforme* e *Aspergillus niger* pertencem à mesma classe, Deuteromicetos, cujas características principais são micélio septado e bem desenvolvido, possuem apenas reprodução assexual e os esporos são produzidos em conidióforos, sendo denominados conidiosporos ou conídios. O *Aspergillus niger* (família Moniliaceae) pode causar, por exemplo, o mofo negro em bulbos de cebola; o *Fusarium moniliforme* (família Tuberculariaceae) é o responsável por causar a podridão das espigas de milho [<http://www.ufrpe.br:6789/fitopatologia/teoricas/T06.pdf>].

Uma vez que jackina e frutackina demonstraram interação com a coluna de quitina, seria interessante observar potenciais atividades antifúngicas destas lectinas frente a fungos filamentosos fitopatogênicos e a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

A atividade antifúngica foi observada colocando jackina e frutackina na presença de *Saccharomyces cerevisiae*. Em virtude da falta de frutackina em quantidades necessárias para posterior ensaio, os

testes com fungos filamentosos *Aspergillus niger* e *Fusarium moniliforme* foram feitos apenas com jackina.

O ensaio foi conduzido adicionando-se 100 μL de proteína (2,25 mg/mL) em 90 μL de meio PD (potato dextrose), numa microplaca de 96 poços, procedendo-se então uma diluição duplo seriada (225 μg – 3,5 μg). A cada poço foi adicionada 10 μL de uma suspensão contendo 1×10^7 esporos/mL, volume final de 200 μL . A microplaca foi incubada por 5 dias a 28 °C e a inibição do crescimento micelar foi visualmente avaliada, comparando-se com a microcultura-controle contendo somente esporos e meio nutritivo.

A atividade antifúngica também foi avaliada utilizando-se o ensaio de inibição de expansão das hifas. Em placas de Petri estéreis com meio sólido PDA (potato dextrose agar) foi colocada uma massa de micélio de *F. moniliforme* no meio da placa e discos estéreis de papel de filtro foram distribuídos sobre a mesma ao redor de cada micélio. Em cada disco, foram aplicadas soluções de jackina nas concentrações 2,25 mg/mL, 1,12 mg/mL e tampão PBS em cada disco e a atividade foi avaliada visualmente depois de incubação por 5 dias, a 28 °C.

5 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 – Purificação e caracterização de jackina e frutackina

Jackina e frutackina foram submetidas ao mesmo procedimento de purificação, que compreendeu na eluição do extrato bruto de sementes de jaca e fruta-pão em PBS pH 7,4 por uma coluna de galactomanana e/ou Sepharose-D-gal imobilizada. Este procedimento levou à separação das lectinas ligantes de D-gal, jacalina e frutalina. Subseqüentemente, a fração não ligada, foi aplicada em coluna de Sepharose-D-man para a retirada de KM+ e frutapina, respectivamente, as lectinas ligantes de D-manose oriundas das sementes de jaca e fruta pão.

Apesar da separação de duas lectinas diferentes em cada Eb, os materiais não ligados na coluna de sepharose ainda apresentavam atividade hemaglutinante. Assim, essas frações foram aplicadas em coluna de quitina e a eluição foi feita com uma solução de NaCl 0,15M/ HCl 0,01M pH 2,6. As lectinas foram desligadas da coluna e imediatamente neutralizadas para pH 7,4 com NaOH 0,2 M As frações quitina-ligantes coletadas (cerca de 300 mL) foram dialofiltradas contra PBS e concentradas em sistema Amicon. Em seguida, foram submetidas à gel filtração em coluna Superdex-75 equilibrada e eluída com PBS. Os cromatogramas das figuras 12 A e B mostram a separação resultante em 2 picos bem definidos que, após testes de atividade hemaglutinante, o pico 2 de cada purificação foi aquele que demonstrou atividade, sendo então denominados jackina e frutackina, respectivamente purificados das sementes de jaca e fruta-pão.

Figura 12: Gel filtração de jackina (A) e frutackina (B). As frações oriundas da coluna de quitina foram separadas por gel filtração em Superdex-75 equilibrada e eluída com PBS 0,15 M NaCl pH 7,4, fluxo 0,5 mL/min, coletadas em frações de 1 mL, monitoradas em 280 nm.

Como mostram os cromatogramas da figura 12, as lectinas ligantes de quitina não foram adequadamente purificadas na coluna de quitina, de modo que a cromatografia por exclusão molecular foi indispensável para ambas as lectinas, não apenas para a determinação da massa molecular aparente, mas para o necessário isolamento das mesmas.

As frações contendo jackina e frutackina foram coletadas e analisadas por eletroforese. A figura 13 mostra um gel SDS-PAGE de tricina dos picos I e II da jackina.

Figura 13: Gel SDS-PAGE de tricina da jackina.

Raia 1) marcador de massa molecular baixo; 2) entrada da Superdex; 3) pico I; 4) jackina.

Pela análise do cromatograma e do gel da jackina, o pico I, eluído em torno de 10 mL, constituía uma mistura de substâncias de massas moleculares variadas, representada por várias bandas na raia 3 do gel de SDS. Jackina foi eluída em torno de 13 mL, que corresponde a um peso molecular aparente de 12 kDa, também observada por SDS-PAGE de tricina, na raia 4.

A gel filtração de frutackina demonstrou o mesmo perfil de eluição da jackina, verificado pela semelhança dos cromatogramas na figura 12. Assim, frutackina, que também foi eluída em torno de 13 mL, também

tem massa molecular aparente de 12 kDa, confirmado por SDS –PAGE de tricina.

Ambas jackina e frutackina são produzidas em quantidades bastante pequenas. Para confirmação, foram realizadas dosagens protéicas de jackina e frutackina após a gel filtração pelo método de Lowry, resultando em 1% de frutackina do conteúdo protéico total no EB de fruta-pão e 2% de jackina do conteúdo protéico total no EB de jaca.

A massa molecular exata de jackina foi determinada por espectrometria de massas, em que uma amostra da lectina nativa foi purificada por HPLC em coluna de fase reversa C₁₈ e injetada num espectrômetro de massas. A figura 14 ilustra o espectro de massas da jackina.

Figura 14: Espectro de massas de jackina nativa. Foram utilizados 60 µL de jackina em PBS numa concentração de 2nM.

N figura 14, observa-se que o pico do íon molecular, que é o pico mais intenso do espectro, tem valor m/z de 14.255 Da, concluindo-se que jackina tem massa molecular de **14.255Da**.

A tabela 3 abaixo resume o rendimento do procedimento de purificação das lectinas jackina e frutackina, discriminadas na última linha como lectinas quitina-ligantes de jaca e fruta-pão, respectivamente.

Tabela 3: Rendimento protéico das lectinas extraídas de jaca e fruta-pão (as dosagens dos EBs e de todas as proteínas citadas na tabela foram determinadas pelo método de Lowry).

	Jaca (mg)	Fruta-pão (mg)
Extrato bruto	444	372
Void D-galactose	288	260
Void D-manose	200	220
Lectinas quitina-ligantes	8,3	3,1

A extração das lectinas a partir do EB envolveu a utilização de diferentes lotes de sementes (de jaca e fruta-pão). Nesta ocasião, foi observada uma queda de mais de 50% no rendimento de jackina, provavelmente em virtude de nosso estoque de sementes trituradas já datar de mais de 4 anos, já que as sementes eram originárias da região de Fortaleza, CE. Decidimos então utilizar sementes coletadas de frutas maduras desta região e investigar se o rendimento poderia ser melhorado. Assim, foi realizado um estudo mais detalhado do qual se desenvolveu pela investigação da variação da força iônica na última etapa das cromatografias de afinidade, ou seja, na eluição das lectinas da coluna de quitina.

5.2 – Efeitos da variação da força iônica na purificação de jackina

Depois de alguns meses de trabalho, jackina e frutackina passaram a mostrar um perfil cromatográfico da gel filtração alterado, com aumento significativo do pico 1, como mostram as figuras 15 (A) e (B); as lectinas de interesse eram obtidas com rendimento menor e apresentavam estabilidade reduzida comparada com o habitual.

Figura 15: Gel filtração de jackina (A) e frutackina (B).

Passamos a utilizar extrato salino obtido das sementes da região de São Carlos e assim foi avaliado o produto eluído da coluna de quitina.

A estratégia foi utilizar diferentes soluções de NaCl/HCl, variando-se ora a concentração de NaCl, ora de HCl, par coletar a fração ligada da coluna de quitina e, posteriormente, submetê-la à seqüência de procedimentos estabelecidos para isolamento das lectinas. Este estudo se deu apenas com as frações vindas do extrato de sementes de jaca pela facilidade na obtenção das frutas. Por outro lado (como pode ser verificado nos itens subseqüentes) já havíamos demonstrado que jackina e frutackina são muito similares.

5.2.1 - Variação da concentração de NaCl

Para a obtenção de cada curva de eluição, um grande volume de *void*-D-manose foi recolhido, aliquotado e as alíquotas foram aplicadas na coluna de quitina. Depois de lavada com PBS, a fração ligada foi eluída com o primeiro tampão da série de experimentos (NaCl 0,5 M), coletada em frações de 4 mL e as densidades óticas foram lidas em espectrofotômetro em 280 nm. Isso foi feito sucessivamente, utilizando-se soluções com NaCl 0,5; 0,4; 0,3; e 0,15 M. A figura 16 mostra as curvas de eluição obtidas nesta etapa.

Figura 16: Curvas de eluição de jackina da coluna de quitina por diferentes concentrações de NaCl. As curvas foram traçadas a partir das medidas em 280 nm das frações coletadas da eluição com cada solução de NaCl. Volume morto: 800mL.

Analisando a figura 16 pôde-se afirmar que a resolução da eluição do material ligado na coluna de quitina por NaCl em diferentes molaridades variou proporcionalmente com o aumento da concentração de sal. Segundo este gráfico, a melhor resolução, no que tange a eficiência em desligar o material retido na coluna, foi observada com NaCl 0,5 M, seguindo em ordem decrescente pela eluição feita com NaCl 0,4 e 0,3 M sucessivamente. A eluição com solução contendo 0,15 M de NaCl foi muito ruim porque a força iônica promovida aqui não foi efetiva o bastante para o desligamento da fração retida, resultando num arraste e demandando grande volume desta solução. Apesar desta diferença de resolução, o rendimento da fração ligada não pareceu ter sido afetado

pela variação da molaridade de NaCl, uma vez que as áreas dos picos de eluição foram próximas.

Depois de retiradas da coluna de quitina, as frações coletadas foram dialofiltradas com PBS para posterior cromatografia por exclusão molecular. A figura 17 mostra dois cromatogramas obtidos das frações eluídas com NaCl 0,3 e 0,5 M.

Figura 17: gel filtração de jackina eluída da coluna de quitina com soluções de diferentes concentrações de NaCl.

Os resultados obtidos na gel filtração das diferentes frações vindas da coluna de quitina esclareceram alguns pontos previamente mencionados segundo a figura 16. De acordo com os perfis cromatográficos da figura 17, a melhor resolução da etapa de cromatografia por afinidade mostrada na figura anterior não traduziu uma melhor obtenção da jackina, mas um aumento no conteúdo de material eluído no pico 1. Assim, concluiu-se que, quanto maior a concentração de NaCl empregada na cromatografia por afinidade da coluna de quitina, menor o rendimento líquido de jackina, até a concentração de 0,3 M de NaCl. Além disso, concentrações menores de NaCl não proporcionaram uma eluição conveniente devido ao arraste observado na eluição com NaCl 0,15 M.

Com o intuito de se obter informações mais detalhadas sobre aspectos estruturais dos picos separados na gel filtração, foram feitas medidas de CD da jackina nativa e do pico 1, mostradas na figura 18 (A) e (B).

Figura 18: Espectros de CD da jackina (A) e do pico 1 (B). Os espectros são referentes à gel filtração anterior.

Os espectros de CD da figura 18 revelaram um ponto interessante: a similaridade do padrão espectral do pico 1 com a jackina, principalmente pela presença da banda positiva em 230 nm, que é uma peculiaridade desta lectina por se tratar de um acoplamento resultante de estrutura terciária. Já a banda em 214 nm presente no espectro da jackina e que caracteriza o tipo de estrutura beta-II estava bastante distorcida no espectro do pico 1, apresentando um aspecto de estrutura desnaturada. Assim, reunindo os dados obtidos (o comportamento das eluições com soluções salinas, das respectivas cromatografias em gel filtração e os espectros de CD), pôde-se propor que o pico 1 também continha agregados solúveis da própria lectina. A formação destes agregados pode ter sido favorecida em virtude das altas concentrações de íons Na^+ e Cl^- aos quais jackina foi exposta, que perturbariam a rede de carga da proteína, gerando desestabilização de sua estrutura secundária. Deste modo, pela ação das altas concentrações de sal associadas ao baixo pH quando jackina foi eluída da coluna de afinidade, era possível que a formação de estados parcialmente desnaturados decorrentes de alterações na distribuição de cargas da lectina tenha ocorrido e que favoreceram as interações eletrostáticas inespecíficas, caracterizando a formação dos agregados.

Buscando verificar os mesmos pontos analisados no experimento anterior, mas com força iônica de outra natureza, optou-se por empregar soluções com diferentes concentrações de HCl e repetir os procedimentos seguidos acima.

5.2.2 - Variação da concentração de HCl

Experimentos de cromatografia por afinidade de quitina com soluções de HCl de diferentes molaridades foram conduzidos. A figura 19 mostra as curvas de eluição obtidas, seguindo-se os mesmos procedimentos executados no experimento anterior, utilizando-se soluções de HCl 0,1; 0,075; 0,050; 0,025 e 0,01 M.

Figura 19: Curvas de eluição de jackina da coluna de quitina com diferentes concentrações de HCl. As curvas foram traçadas a partir das medidas de absorbância em 280 nm das frações coletadas na eluição com cada solução de HCl. Volume morto: 800mL

Analisando as curvas de eluição obtidas a partir das cromatografias por afinidade com soluções contendo apenas HCl, mostradas na figura 19, observou-se padrões de eluição muito semelhantes àqueles apresentados na figura 16. Neste experimento também se observou que a resolução da eluição foi proporcional ao aumento da força iônica. Além disso, a solução de HCl 0,01 M não foi efetiva para promover a retirada

do material ligado da coluna de quitina. Neste caso, a recuperação do material foi feita com tampão NaCl/HCl 0,15 M.

Depois de cada eluição, as frações coletadas foram submetidas à gel filtração em Superdex-75, e os cromatogramas foram comparados, como mostra a figura 20.

Figura 20: Gel filtração de jackina vindas da afinidade com diferentes concentrações de HCl.

A partir dos cromatogramas mostrados na figura acima (figura 20), verificou-se a ocorrência do mesmo fenômeno observado no experimento de eluição com diferentes concentrações de NaCl, em que as melhores resoluções foram obtidas com soluções de maior força iônica. No entanto, esta melhora também foi aparente, uma vez que, quanto maior a molaridade da solução ácida, maior a quantidade do pico 1. Neste experimento, o efeito foi mais evidente porque nos cromatogramas correspondentes às eluições da coluna de afinidade por HCl 0,1 e 0,075

M, a presença de jackina nativa na região esperada na gel filtração (em torno de 12 kDa), não foi observada, havendo exclusivamente a presença do pico 1.

Com isso, partindo-se da premissa de que o pico 1 também seria constituído por agregados solúveis da própria jackina, concluiu-se que, na eluição da fração ligada da cromatografia por afinidade com altas concentrações de HCl, todo o conteúdo de jackina nativa foi desnaturado ou parcialmente desenovelado, favorecendo o processo de agregação. Isto ocorreu principalmente pela alta concentração de prótons a que a proteína foi exposta, levando à protonação dos resíduos hidrofílicos (que são a maioria em sua constituição, como já mencionado anteriormente) que estariam envolvidos no balanço de cargas da jackina. Uma vez que esta rede de cargas foi modificada, a estrutura da proteína foi perturbada, favorecendo a formação dos agregados.

Em seguida, realizou-se uma medida de CD do pico 1 resultante da gel filtração da fração eluída da coluna de quitina com HCl 0,1 M, mostrado na figura 21.

Figura 21: Espectro de CD do pico 1 da gel filtração. Pico 1 oriundo de eluição da afinidade por HCl 0,1 M

Segundo o espectro de CD mostrado acima (figura 21), observou-se que o material do pico 1 deteve um arranjo conformacional característico de estruturas desordenadas com valor de mínimo deslocado para maior comprimento de onda (acima de 215 nm). Além disto, o máximo em 230 nm, que caracterizava o acoplamento das amidas vizinhas e cadeias laterais de resíduos de aminoácidos aromáticos, estava ausente, indicando que as estruturas do tipo beta-II, que promoviam tal acoplamento, foram drasticamente alteradas.

Portanto, partindo-se dos resultados obtidos das curvas de eluição, a gel filtração e o CD do pico 1, concluiu-se que soluções com altas concentrações de HCl foram menos adequadas para a eluição da jackina na cromatografia por afinidade do que tampões com altas concentrações de NaCl, provavelmente por expor a jackina a condições drásticas de pH que poderia levar ao desarranjo eletrostático da mesma, uma vez que o aumento do pico 1 observado na gel filtração, das frações vindas da cromatografia por afinidade, aumentava conforme o aumento da concentração de HCl. Estes eram constituídos, provavelmente, por produto de agregação da própria lectina, formado por espécies parcialmente degradadas ou desenoveladas.

A solução para superar esse problema foi utilizar sementes recém-retiradas de frutos maduros para a extração do conteúdo protéico, na tentativa de trabalhar com extrato bruto mais fresco possível. Esta providência foi acertada, pois resultou na obtenção de bons rendimentos de jackina, perdas mínimas pela formação de agregados solúveis e precipitados e ganho na estabilidade.

5.3 – Seqüenciamento e análise da estrutura primária de jackina e frutackina.

Jackina e frutackina foram preparadas para serem seqüenciadas, seguindo um protocolo bastante comum e largamente utilizado para esta finalidade. Amostras de jackina e frutackina nativas foram purificadas por fase reversa em coluna C₁₈ como descrito na seção Metodologias, coletadas e liofilizadas. Em seguida, foram submetidas à redução e alquilação de Friedman, que consiste em, primeiramente, reduzir as pontes S-S com ditioneitol (DTT) em condições alcalinas. Uma vez expostas ao agente 4-vinil-piridina, as cisteínas reduzidas são alquiladas, formando adutos S-beta-(4-piridiletil)-cisteína, que são estáveis o suficiente para posterior degradação de Edman e identificação dos PTH de aminoácidos.

Feitas estas modificações, as cadeias foram separadas por fase reversa nas mesmas condições que as proteínas nativas. A figura 22 ilustra os resultados dos procedimentos acima descritos, mostrando os cromatogramas obtidos para o tratamento com jackina.

Figura 22: Cromatografia de fase reversa em coluna C18 da jackina nativa (A) e após reação de Friedman (B). Os demais picos em B são excessos de reagente.

Na figura 22 (A), observa-se a presença de um único pico eluído com cerca de 30% de solvente B (aproximadamente em 35 min), correspondendo a jackina nativa. Por este cromatograma, também se pode inferir o excelente grau de pureza da jackina, resultado da gel filtração. Confirmado pela cromatografia de fase reversa (figura 22) e espectroscopia de massas (figura 14), pode-se afirmar que jackina não é acompanhada por isoformas.

Já na figura 22 (B), além do excesso de reagente que foi removido logo no início da corrida cromatográfica, observa-se a presença de 3 picos eluídos com 18% de solvente B (denominado "pico 1"), o seguinte, com 20% de B ("pico 2") e o último, eluído com 30% de B ("pico 3") onde cada fração corresponde a uma cadeia polipeptídica. Elas foram coletadas, liofilizadas e submetidas à degradação de Edman para determinação de N-terminal. A figura 23 mostra os resultados das análises feitas com cada cadeia de jackina e frutackina.

ch1jackin	SQKFCSS-CKCT---KESGTSCYRT	21
ch1frutac	SQ-FCLCNCKCTPKEKEQGTCTYYVDDVCNPNVIGICPAV	37
ch2jackin	WQKFCNSSKKSCTKESAGCKCLYNRKVQKIGCAPAVECGRNLCQLNRKQP	51
ch2frutac	WEQKFCSSCKK-CTKESAGTKCYTDD--VKIGGAPAV-CGS	37
ch3jackin	GWQQKFCSMKKTTEBQAQYKCY	22
ch3frutac	GWQQK	5

Figura 23: Sequências parciais das subunidades de jackina e frutackina.

ch1-jackin: cadeia 1 de jackina; ch1-frutac: cadeia 1 de frutackina; ch2-jackin: cadeia 2 de jackina; ch2-frutac: cadeia 2 de frutackina; ch3-jackin: cadeia 3 de jackina; ch3-frutac: cadeia 3 de frutackina; aminoácidos marcados em cinza: identidade; traços: gaps inseridos para otimizar o alinhamento.

As cadeias de jackina e frutackina foram alinhadas utilizando-se o programa ClustalW. As cadeias foram comparadas e alinhadas aos pares e a maior homologia entre os pares, julgada a partir da maior pontuação (escore) calculada pelo programa, bem como os aminoácidos conservados entre as cadeias alinhadas, é mostrada na figura 23.

Destes resultados, pode-se afirmar que jackina e frutackina possuem 62% de identidade sequencial (correspondentes aos 70% de aminoácidos de cada proteína). Também são marcantes as grandes quantidades de cisteínas e a maioria de aminoácidos hidrofílicos presentes em ambas lectinas. A tabela 4 abaixo resume estes dados, lembrando que correspondem a cerca de 70% da sequência das proteínas.

Tabela 4: Número de ocorrência de aminoácidos hidrofóbicos, hidrofílicos e cisteínas em jackina e frutackina (70% da sequência).

jackina	Cadeia 1	Cadeia 2	Cadeia 3
Resíduos hidrofóbicos	2	11	3
Resíduos hidrofílicos	16	32	17
cisteínas	4	8	2
frutackina			
Resíduos hidrofóbicos	13	12	1
Resíduos hidrofílicos	18	20	4
cisteínas	6	5	-

As seqüências parciais de jackina e frutackina (com exceção da cadeia 3 da frutackina) foram submetidas ao programa BlastP (www.ncbi.nlm.nih.gov/blastP) na busca por proteínas similares. O resultado foi que jackina e frutackina não apresentaram nenhuma similaridade com as seqüências do banco de dados.

Entretanto, lectinas ligantes de quitina compreendem uma classe de proteínas muito comum, sendo encontradas em plantas,

invertebrados, fungos e bactérias. Além disso, a literatura vem relatando estudos de fenômenos estruturais conhecidos como evolução convergente, fenômeno este observado entre as lectinas ligantes de quitina de plantas e invertebrados que resulta na adoção do mesmo motivo de reconhecimento de quitina por proteínas que não descendem do mesmo ancestral. Em outras palavras, lectinas ligantes de quitina produzidas por organismos não relacionados (por exemplo, plantas e invertebrados) adotam a mesma estrutura em função de interagirem com o mesmo ligante [Shen & Jacobs-Lorena 1999, Suetake *et al.* 2000, Loris 2002].

Isso posto, realizou-se o alinhamento multiseqüencial pelo programa ClustalW com lectinas ligantes de quitina que fossem representativas de seus grupos, dentre elas, lectinas ligantes de quitina de plantas da família das heveínas [Hayashida *et al.* 2003], quitinases com domínio ligante de quitina [Beintema 1994], lectinas de invertebrados [Frisardi *et al.* 2000, Rebers & Willis 2001, Vuocolo *et al.* 2001, Van Dellen *et al.* 2002] e outras proteínas de plantas ricas em cisteínas da família das defensinas [Almeida *et al.* 2000] e PR (pathogenesis-related, Selitrennikoff 2001), que estão listadas na seção 4.4.3. A tabela de pontuação (escores) resultante do alinhamento podem ser encontrada no anexo 1.

Estes resultados mostram que jackina possui 28 % de identidade com PL-C, que é uma lectina da família das heveínas. Entretanto, esta lectina (e, por conseguinte, frutackina) não pode ser agrupada na família das heveínas, pois não apresentam as características principais que determinam um domínio heveínico, como pontes dissulfeto intracadeia e cisteínas absolutamente conservadas. A figura 24 ilustra o alinhamento da seqüência de jackina com PL-C, a lectina que representa a família das heveínas.

```

PL-C          APVCGVRASGRVCPDGYCCSQWGYCGTTEBYCGKGCQSQCDYNRCREFGCKECLDELCC 60
chain1jackfruit  -----SQRFCSS-CK-----CTKE-SGTSQWRT--- 21
chain2jackfruit  -----WQKC-----FCNS-----SKKSCITESAG----- 19
chain3jackfruit  -----G-----W-----QQKFCSS-----MKKTTEEAQYKCN----- 22

PL-C          SQYGWCCNSDGHCCGEGCQSQCSYWRCCGKDFGGRLC TEDMCSSQYCWCLITDDHCEDCGQS 120
chain1jackfruit  -----CK--CLYNRRVQKIG--CAPAVECCR-NLC-LQNR----- 48
chain2jackfruit  -----
chain3jackfruit  -----

PL-C          QCDLPT 126                                score: 28%
chain1jackfruit -----
chain2jackfruit  --RQP- 51                                score: 23%
chain3jackfruit  -----                                score: 18%

```

Figura 24: Alinhamento da lectina C de *Phytolacca americana* (PL-C) com as cadeias de jackina. O alinhamento foi feito usando-se o programa ClustalW. Os aminoácidos conservados estão destacados em cinza e as substituições conservadas estão em negrito. Os gaps foram inseridos para otimizar o alinhamento.

Este panorama pode ser melhor visualizado no filograma gerado pelo ClustalW mostrada na figura 25. Esta figura dá idéia de posicionamento evolutivo das diferentes lectinas ligantes de quitina e as demais proteínas de defesa ricas em cisteínas.

Figura 25: Filograma das lectinas ligantes de quitina, defensinas e proteínas antifúngicas. O filograma foi gerado pelo programa ClustalW a partir do alinhamento múltiplo das seqüências de entrada.

Analisando-se a figura 25, nota-se que as cadeias de jackina e frutackina não têm relação com o ramo formado pelas lectinas com domínio heveínico (PL-C, UDA7 e heveína), haja vista a grande distância que separa os ramos em questão, nem com as demais proteínas comparadas, devido à identidade irrelevante obtida no alinhamento (ver tabela de escores no anexo 1). Estes resultados são indicativos de que jackina e frutackina formam um novo grupo de lectinas quitina-ligantes.

5.4 – Análises Espectroscópicas

5.4.1 - Dicroísmo Circular

Espectros de CD de jackina e frutackina foram obtidos na faixa de 200 a 250 nm (região do UV distante), e utilizados para determinação das frações de estruturas secundárias que contribuem para o arranjo tridimensional das mesmas. A figura 26 mostra os espectros das lectinas obtidos em condições nativas.

Figura 26: Espectros de CD de jackina e frutackina. As lectinas estavam em PBS 0,15 M NaCl pH 7,4, 25 °C, com concentração de 0,28 mg/mL.

Jackina e frutackina possuem as mesmas características espectrais. Ambos os espectros apresentam uma banda positiva centrada em 230 nm para jackina e 229 nm para frutackina e uma banda negativa centrada em 214 nm para jackina e 212 nm para frutackina. A banda em 230 nm é devido a contribuições de pontes S-S já descritas na literatura para ribonuclease A (Woody & Woody 2003) e interações entre as cadeias laterais de aminoácidos aromáticos Trp ou Tyr com as amidas imediatamente vizinhas da cadeia polipeptídica principal. Este tipo de acoplamento é freqüentemente observado em proteínas ricas em estruturas- β [Woody 1978; Sreerama & Woody 2003]. A banda em 214 nm é devida a transições $n-\pi^*$ de estruturas tipo folhas- β , fortemente distorcidas por estruturas desordenadas [Sreerama & Woody 2003], classificadas como proteínas do tipo beta-II. Como mencionado acima, jackina e frutackina detêm as mesmas características espectroscópicas, exceto pelas intensidades das bandas em 230 e 214 nm no espectro da frutackina serem menos intensas.

A classificação de estruturas terciárias destas proteínas foi determinada pelo programa CLUSTER e as frações de estrutura secundária foram estimadas pelos programas SELCON3, CDSSTR e CONTIN/LL a partir de um grupo de referência criado pelo CLUSTER. O CLUSTER classificou-as como pertencentes ao grupo **toda-beta** e o resultado adotado foi aquele determinado pelo SELCON3, que gerou um espectro mais próximo do espectro experimental. As frações de estrutura secundária estimadas foram:

42% de folhas- β , 23% de voltas- β e 35% de estruturas desordenadas para jackina; 40% de folhas- β , 22% de voltas- β e 38% de estruturas desordenadas para frutackina, com RMS de 1%.

Os ajustes de curvas experimentais e calculadas para jackina e frutackina resultantes dos programas de desconvolução podem ser vistas no Apêndice 2.

5.4.2 - Infravermelho com transformada de Fourier

Um espectro de FT-IR foi obtido para confirmar os dados de estrutura secundária. A técnica de FT-IR tem sido explorada para elucidar aspectos estruturais e dinâmicos de proteínas. As varreduras numa ampla faixa de comprimentos de onda minimizam problemas de espalhamento de luz, promove versatilidade à análise conformacional e rapidez nas medidas. Os espectros primário e da segunda derivada da jackina estão mostrados na figura 27.

Figura 27: Medidas de ATR-FT-IR de jackina. (A) espectro primário; (B) segunda derivada. Os espectros são a média de 400 varreduras, utilizando-se um acessório de ATR (attenuated total reflectance). A proteína estava a 2,0 mg/mL em tampão PBS 0,15 M pH 7,4.

Quanto ao espectro primário da jackina, mostrado na figura 27 (A), é possível observar que a banda amida I, banda referente ao estiramento vibracional da ligação C=O do grupo amida, está centrada em 1640 cm⁻¹, indicando vibrações características de estrutura predominantemente beta [Susi *et al.* 1985], apesar de estar pouco definida devido ao encobrimento pela banda OH da água que também ocorre nesta região.

Conquanto, no espectro de 2^a derivada, na figura 27 (B), observa-se contribuições de frequências na banda da amida I em 1627, 1633 e 1640 cm^{-1} , previstas para estrutura secundária do tipo folhas- β (as duas primeiras) e voltas- β [Iconomidou *at al.* 2000], bem como ausência de vibrações em 1650 cm^{-1} previstas para hélices- α .

5.4.3 - Espectroscopia de emissão de fluorescência

Os espectros de fluorescência de jackina e frutackina nativas foram obtidos com as amostras dissolvidas em tampão PBS 0,15 M pH 7,4 e excitadas em 295 nm para que se observasse apenas a emissão de fluorescência dos triptofanos.

Figura 28: Espectros de emissão de fluorescência de jackina e frutackina nativas. As amostras estavam a 0,08 mg/mL em PBS 0,15 M NaCl pH 7,4, com λ (excitação) de 295 nm.

O espectro da jackina nativa mostra um máximo de emissão de fluorescência em 344 nm, que é típico de cadeias laterais de triptofanos altamente expostos ao meio externo. Já frutackina exibiu um máximo em cerca de 338 nm, que também indica que os anéis aromáticos dos seus

triptofanos também estão projetados para o solvente [Campbel, 1984]. Como pode ser observado na sequência das cadeias 2 e 3 das duas lectinas, ocorrem resíduos de Trp como N-terminais. Assim, estes resultados permitem sugerir que o N-terminal das cadeias 2 e 3, tanto em jackina quanto em frutackina, podem estar voltados para o exterior da molécula.

5.4.4 - Estudos de estabilidade por variação de pH

O comportamento estrutural da jackina foi investigado frente a uma faixa de pH (de 2,0 a 10,0) em 2 diferentes tempos de incubação, 20 minutos e 40 horas, e as mudanças conformacionais foram monitoradas por CD, como mostra a figura 29.

Figura 29: Espectros de CD da variação de pH da jackina obtidos com diferentes tempos de incubação. (A): 20 minutos; (B): 40 horas. A concentração inicial de jackina foi 0,28 mg/mL

Pela análise dos espectros depois de 20 minutos de incubação (figura 29 (A)) observa-se que ocorrem mudanças pronunciadas na estrutura secundária em pH ácido, uma vez que a banda beta foi deslocada para o azul em pH 2,0 e 4,0. Já o pH alcalino promoveu mudanças menos significativas no perfil de CD da jackina, onde a

principal diferença é observada pela diminuição da elipticidade da banda em 214 nm. Assim, esse experimento revela que jackina é particularmente vulnerável em pH ácido.

Após 40 horas, observa-se que todos os espectros (inclusive aquele em pH 7,4 mostrados na figura 29 (B)) foram alterados, demonstrando que jackina tem estabilidade limitada em função do tempo de manipulação, mesmo em condições fisiológicas. Curiosamente, pode-se observar que o pH ácido promove um aumento relativo da banda em 230 nm e o pH básico, diminuição da intensidade da mesma banda. Já na banda em 214 nm, a modificação espectral tornou-se mais pronunciada nas medidas feitas depois de 40 horas de incubação, com deslocamento para o azul de 5 nm nos pH 2,0 e 4,0. Portanto, esses resultados mostram que jackina também tem estabilidade limitada em função do tempo, enfatizando o cuidado e as medidas de precaução que se deve ter quando do armazenamento desta lectina.

Também foi investigada a influência do pH nos microambientes dos triptofanos de jackina, como já mencionado, presentes no N-terminal. A figura 30 mostra as medidas de variação de pH monitoradas pela emissão de fluorescência de triptofano. As amostras de jackina, excitadas em 295 nm, foram incubadas por 40 min em tampão acetato-fosfato-borato de sódio 20 mM em diferentes pHs (de 4 a 12) a 25°C e o espectro de emissão foi coletado na faixa de 310 a 450 nm.

Figura 30: Espectros de emissão de fluorescência da jackina em diferentes pHs. As amostras de jackina foram excitadas em 295 nm e a concentração da proteína foi de 0,07 mg/mL.

A análise dos espectros de jackina obtidos em tampões com diferentes pHs permite inferir que as principais mudanças nos ambientes dos triptofanos ocorrem em pH ácido, pois resultou em deslocamento para o azul do comprimento de onda de emissão e discreta diminuição na intensidade da fluorescência relativo ao espectro da lectina nativa. No entanto, no pH alcalino não houve mudança no comprimento de onda do máximo de emissão, mas a promoção de aumento de intensidade de emissão. Este resultado concorda com aquele observado no experimento monitorado por CD, refletindo também a maior susceptibilidade de jackina a mudanças conformacionais em pH ácido do que em pH alcalino.

Em conclusão, estes experimentos de pH monitorados por CD e fluorescência demonstram que jackina é particularmente vulnerável em pHs abaixo de 6,0. Tal comportamento, somado à intensidade aumentada de fluorescência em pH básico, pode ser pensado em nível da natureza básica da jackina: no pH ácido, os prótons podem preferencialmente interagir com os oxigênios dos grupos amida das cadeias principais que,

por sua vez, pode resultar em mudanças no perfil do espectro, em especial, na banda em 214 nm, que é referente à transição $n-\pi^*$ destes mesmos átomos de oxigênio que estão caracterizando as estruturas-beta da proteína. Por outro lado, no pH básico, as cadeias laterais dos resíduos básicos (15 lisinas e 4 argininas identificados até o momento na estrutura primária de jackina) também podem perder prótons para o meio, já que os pK_{as} das cadeias laterais de tirosina, lisina e arginina são 10,07, 10,53 e 12,48 respectivamente. Em consequência, a estrutura secundária da proteína pode ser perturbada em menor escala do que no pH ácido, o que está de acordo com os espectros de CD da figura 29.

5.4.5 – Estudos de estabilidade térmica

A estabilidade térmica de jackina foi estudada submetendo a proteína a uma rampa de aquecimento de 10 a 80 °C em que a temperatura foi aumentada a cada 5 °C por 5 minutos e as modificações de estrutura secundária foram monitoradas por CD como mostra a figura 31.

Figura 31: Espectros de CD e curvas de variação da elipticidade da jackina em função da temperatura. A temperatura da amostra variou de 10 a 80 °C a cada 5 °C. A proteína estava em PBS pH 7.4, numa concentração de 0,5 mg/mL e foi incubada em cada temperatura por 5 min.

Os resultados mostrados na figura 31 revelam que o calor afeta as estruturas beta representadas pela banda em 214 nm (figuras 31 (A) e (B)). Os contatos terciários promovidos pelo arranjo conformacional entre anéis aromáticos de tirosina e triptofano e suas amidas imediatamente vizinhas também foram afetados, como se observa pela diminuição da elipticidade da banda em 230 nm (figuras 31 (A) e (C)). Entretanto, apesar da estrutura de jackina ter sido significativamente perturbada, sua estabilidade é notável, uma vez que suas características estruturais nativas são preservadas até 80 °C, temperatura esta que não foi capaz de desnaturar a lectina. Esta alta estabilidade térmica era esperada, baseada na literatura que mostra que lectinas pequenas (de 10 a 15 kDa), raramente possuem regiões hidrofóbicas. Para compensar essa ausência e ajudar na estabilidade estrutural, estas lectinas (em especial as lectinas ligantes de quitina de plantas) são ricas em cisteínas que unem covalentemente pontos distantes da cadeia polipeptídica [Neuman *et al.* 2004, Peumans & Van Damme 1996], conferindo-lhes alta estabilidade como observado para jackina.

5.5 – Atividade Biológica

5.5.1 – Atividade hemaglutinante e inibição de hemaglutinação por monossacarídeos

A habilidade da jackina e frutackina para aglutinar células foi testada frente a hemácias humanas do sistema ABO e de coelhos, não sendo específica para nenhum grupo. Este teste simples foi empregado para as duas lectinas para checar a manutenção da atividade biológica e, conseqüentemente, da estrutura nativa, por todo o trabalho, sempre que necessário.

A hemaglutinação mais efetiva se deu com eritrócitos de coelho. Por esta razão, a concentração mínima de jackina capaz de aglutinar eritrócitos foi determinada por verificação a olho nu da microplaca ilustrada na figura 32 abaixo, utilizando-se hemácias de coelho.

Figura 32: Ensaio de hemaglutinação da jackina. Utilizou-se diluição duplo-seriada da concentração de jackina frente a suspensão de 2% de células sangüíneas de coelho. Poço 1: controle negativo; poços 2 a 9: jackina a 0,6; 0,3; 0,15; 0,075; 0,038; 0,019; 0,009; 0,005 mg/mL respectivamente após 2 horas de incubação.

Por este ensaio semiquantitativo, a concentração mínima de jackina capaz de aglutinar eritrócitos de coelho foi de 0,15 mg/mL (poço 4), onde ainda é possível observar uma discreta atividade.

O ensaio de inibição da atividade hemaglutinante foi utilizado a fim de se investigar com maior profundidade a especificidade da jackina, uma vez que ela foi purificada em matriz de quitina, que é um homopolímero constituído de unidades de N-acetil-glicosamina. Neste ensaio, foi investigada a inibição da atividade hemaglutinante de jackina (com concentração de 0,3 mg/mL) por monossacarídeos simples frente a células sangüíneas de coelho, em que o resultado está listado na tabela 5. A fim de não dar margem para equívocos, utilizou-se jackina na concentração de 0,3 mg/mL porque, como se pode verificar na microplaca da figura 32, promoveu uma aglutinação mais evidente.

O experimento foi então realizado do seguinte modo: inicialmente a 0,4 M, procedeu-se a diluição duplo seriada do monossacarídeo e a placa foi incubada com igual volume de solução de jackina a 0,33 mg/mL, durante 2 horas. Posteriormente, adicionou-se 50 μ L de suspensão 2% de células sangüíneas de coelho. A placa foi incubada por 2 horas, à temperatura ambiente e a inibição de hemaglutinação foi avaliada visualmente, comparando-se com o controle positivo contendo apenas jackina e eritrócitos.

Tabela 5: Inibição da hemaglutinação da jackina por açúcares simples. Os monossacarídeos estavam na concentração máxima de 0,4 M.

D-frutose	(-)
L-fucose	(-)
D-galactose	(-)
D-glicose	(-)
D-manose	(-)
N-acetil-galactosamina	(-)
N-acetil-D-glicosamina	(-)
N-metil-manosídeo	(-)

Dos açúcares testados, nenhum deles preveniu a hemaglutinação da jackina, como mostra a tabela 5 acima, sugerindo que jackina tenha afinidade preferencial por quitina ou por fragmentos de quitina, do que pelos monossacarídeos simples, uma vez que nem mesmo o monômero GlcNAc inibiu sua atividade hemaglutinante.

Segundo estudos termodinâmicos e estruturais [Asensio *et al.* 2000, Espinosa *et al.* 2000, Harata & Muraki 2000], lectinas ligantes de quitina que possuem domínio heveínico e estão envolvidas na defesa de plantas ligam-se a polissacarídeos de (GlcNAc)_n com afinidade maior para os oligômeros maiores ($n \geq 3$). Assim, estes resultados vão ao encontro aos estudos estruturais mencionados, confirmando esta preferência das lectinas quitina-ligantes por polissacarídeos de GlcNAc.

5.5.2 – Adesão e inibição de adesão de células K562

A diversificada aplicabilidade da jacalina em pesquisa imunobiológica é um exemplo clássico do uso de lectinas no âmbito biotecnológico, principalmente pela sua conhecida capacidade de interação com diversas linhagens de células tumorais, entre elas, promoção de adesão de K562 [Kabin, 1998].

Tendo conhecimento da interação de fibronectina com células K562 da presença de regiões serina-cisteína na seqüência primária de jackina, além de jackina e jacalina advirem da mesma fonte, propôs-se um ensaio de promoção de adesão de K562 por jackina, usando como controle a adesão das mesmas por fibronectina. Também foi proposto um ensaio de inibição da adesão de K562 promovida pela fibronectina, onde o inibidor testado foi jackina. Os resultados destes ensaios são apresentados abaixo na figura 33 que apresenta ensaios de promoção de adesão de jackina numa suspensão celular de K562, de ação inibitória de jackina da adesão de K562 promovida por fibronectina e uma curva dose-resposta da promoção de adesão de K562 pela jackina em diferentes concentrações da lectina.

Figura 33: Ensaios de interação de células K562 e jackina. (A) Ensaio de promoção de adesão de células K562 e jackina; (B) Curva dose-resposta do ensaio de adesão mediado por jackina; (C) Ensaio de inibição de células K562 por jackina. Em (A): controle (+) fibronectina (10 μ g/mL); lectina: lectina (0,1 mg/mL); controle (-) BSA; (B) controles (+) e (-): idem anteriores; demais barras: jackina nas concentrações indicadas. (C) controle (+) e (-): idem anteriores; lectina: fibronectina + lectina 0,1 mg/mL).

Como mostram as figuras 33 (A) e (C), jackina promoveu adesão das células K562 em suspensão, mas a mesma lectina não foi capaz de inibir o processo de adesão promovido pela fibronectina.

Em função destes resultados, partiu-se para a verificação da resposta do processo de adesão em função da concentração de lectina adicionada à suspensão celular. O resultado, como mostra a figura 33 (B), indica que houve uma linearidade constante entre a resposta de interação e a concentração de jackina adicionada à suspensão celular.

De maneira geral, analisando conjuntamente os 3 ensaios realizados de interação jackina-K562, pode-se sugerir que ocorre mecanismo de interação das células K562 com jackina. A especificidade desta interação poderia ser investigada incubando-se a lectina aderida e oligossacarídeos solúveis de quitina e, posteriormente, as células K562. Entretanto, não contávamos com estes oligossacarídeos naquele momento, mas deve-se deixar claro que este aspecto necessita ser explorado para que se aponte alguma conclusão. Além disso, existe a possibilidade de que outro mecanismo de interação entre superfície celular-jackina tenha operado, por exemplo, interação mediada por carboidratos, já que existem relatos de interações entre fibronectinas solúveis e superfície celular que são mediadas por carboidratos [Zheng & Hakomori 2000].

5.5.3 - Atividade Antifúngica

5.5.3.1 - INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

S. cerevisiae é uma levedura amplamente empregada na indústria para fermentação de alimentos. No entanto, pode haver muitos inconvenientes quando não há controle sobre o crescimento de culturas desta levedura. Assim sendo, é interessante que se conheça uma substância que atue eficientemente como agente de controle biológico específico para *Saccharomyces*. Por isso, testes de inibição de crescimento de *S. cerevisiae* por jackina e frutackina foram feitos e as curvas de crescimento estão ilustradas na figura 34.

Figura 34: Ensaio de inibição de crescimento de *S. cerevisiae* por jackina e frutackina. Controle: levedura + meio de cultura, controle + açúcar: levedura + meio de cultura acrescido de açúcar. PIIQuiJacaT e PIIQuiFPT: jackina e frutackina purificadas por gel filtração; PII AFT: jackina purificada em coluna de quitina.

Comparando as curvas-controle de crescimento da levedura na ausência e presença de glicose, observa-se que, além do aumento da densidade ótica da cultura cultivada com glicose (traduzindo o aumento da população de células), num mesmo espaço de tempo, também há aumento na resistência das células, refletida no maior número de horas que a cultura mantém sua taxa de crescimento. Em outro aspecto, analisando-se a curva-controle com açúcar e as curvas de crescimento obtidas com jackina vinda da cromatografia por afinidade (PII AFT), jackina vinda da gel filtração (PII Qui JacaT) e da frutackina (PII Qui FPT), as lectinas ligantes de quitina mostraram uma inibição bastante efetiva, o que desperta interesse sobre estas lectinas quanto ao crescimento controlado de *S. cerevisiae*.

5.5.3.2 - INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DE FUNGOS FILAMENTOSOS *FUSARIUM MONILIFORME* E *ASPERGILLUS NIGER*

A habilidade de lectinas ligantes de quitina interferir no desenvolvimento de fungos e insetos, ou mesmo interrompê-lo é notória, já que quitina é o principal componente da parede celular de fungos filamentosos e do exoesqueleto de insetos. Há décadas o papel de defesa de lectinas contra organismos fitopatogênicos e predadores têm sido investigado, tanto do ponto de vista de mecanismo de ação como de aplicação, por exemplo, a manipulação genética destas lectinas, na tentativa de proteger as monoculturas que integram a base alimentar do homem [Carlini & Grossi-de-Sá 2002, Selitrennikoff 2001, Peumans & Van Damme 1996].

Com este panorama, a atividade antifúngica de jackina foi testada nos fungos filamentosos *F. moniliforme* e *A. niger*. Jackina foi adicionada a uma suspensão de esporos (1×10^7 esporos/mL) de *Fusarium* e *Aspergillus*, procedendo-se uma diluição duplo-seriada da concentração de jackina, como mostra a figura 35.

Figura 35: Ensaio de inibição de germinação de fungos filamentosos por jackina. 1ª linha: *A. niger*; 2ª linha: branco; 3ª linha: *F. moniliforme*. Utilizou-se diluição duplo-seriada de jackina nas concentrações: 2.25, 1.12, 0.56, 0.28, 0.14, 0.07, 0.035 mg/mL (colunas 1 a 7) e microcultura-controle (coluna 8) para os dois fungos. Jackina foi incubada com uma suspensão de 1×10^7 esporos.

O ensaio ilustrado na figura 35 acima mostra que jackina exerceu atividade inibitória na germinação de *F. moniliforme* na concentração de 2,25 mg/mL. A lectina não teve efeito sobre o desenvolvimento de *A. niger* até a concentração de 4,5 mg/mL.

Um ensaio de inibição de crescimento micelar de *F. moniliforme* foi feito em placa de Petri com meio PD sólido colocando-se micélio de *Fusarium* no centro da placa e, ao redor, discos de papel com jackina (2,25 e 1,12 mg/mL). A figura 36 mostra o resultado avaliado após 5 dias de incubação.

Figura 36: Ensaio de inibição de crescimento micelar de *F. moniliforme* por jackina. Disco A: jackina a 2,25 mg/mL; disco B: jackina a 1,25 mg/mL; disco C: PBS 0,15 M NaCl, pH 7,4.

Após cinco dias de incubação, o micélio, de tonalidade roxa, havia crescido radialmente, correspondendo ao seu desenvolvimento vegetativo que se caracteriza pela expansão das hifas. Em seguida, as hifas geraram esporos, de cor branca, com aspecto semelhante ao de algodão, que corresponde ao seu desenvolvimento reprodutivo.

Neste ensaio de inibição em placa com PD sólido, jackina impediu o desenvolvimento do fungo por prevenir que os micélios produzissem esporos, resultando em fungos estéreis em torno do disco que continha a mesma concentração de proteína que inibiu a germinação deste fungo no ensaio anterior. Esta atividade pode ter ocorrido devido à ligação da

jackina (que é uma lectina ligante de quitina) com a parede celular das hifas, impedindo-as de se desenvolver por completo [Selitrennikoff 2001, Huang *et al.* 2000].

6 - CONCLUSÕES

Este trabalho relata que duas novas lectinas foram isoladas, uma das sementes de *A integrifolia*, denominada jackina e outra de *A incisa*, denominada frutackina. Estas lectinas são homólogas entre si, em termos de massa molecular, estrutura secundária e seqüência primária. Um aspecto interessante é que elas são diferentes das lectinas ligantes de quitina de plantas e invertebrados mais comuns descritas na literatura. Apesar da identidade da jackina com uma lectina da família das heveínas, a PL-C, ter sido de 28%, não existe qualquer semelhança entre o domínio heveínico (formado por cisteínas unidas em pontes S-S intracadeia, serinas e aminoácidos aromáticos altamente conservados entre os membros desta família) e as seqüências de jackina e frutackina, justamente pelo fato dos aminoácidos-chave envolvidos no reconhecimento da quitina na PL-C não serem conservados nas novas lectinas de *Moraceae*. Entretanto, é importante salientar que: i) jackina e frutackina são ricas em cisteínas, aminoácidos aromáticos e serinas; ii) os anéis aromáticos dos triptofanos destas lectinas estão expostos ao solvente; iii) jackina mostrou preferência de interação com a quitina, já que foi isolada por afinidade em coluna de quitina e sua atividade hemaglutinante não foi inibida por nenhum monossacarídeo comumente encontrado na natureza. Posto isso, é muito tentador não especular que o modo de reconhecimento da quitina por jackina (e também frutackina) possa ser similar àquele operante nas lectinas da família das heveínas, mas estudos de ligação com fragmentos de quitina por RMN e cristalografia são fundamentais para responder estas questões. Contudo, diante das observações até aqui feitas, sugere-se que estas novas lectinas, jackina e frutackina, podem constituir um novo ramo na superfamília das lectinas ligantes de quitina, principalmente pelo fato de serem monômeros formados por 3 cadeias polipeptídicas, unidas por pontes dissulfeto. Também é digno de nota a alta estabilidade térmica de jackina, sua vulnerabilidade em pH ácido e a importância de se trabalhar sempre com sementes frescas para garantir a integridade, estabilidade e

bons rendimentos da proteína a ser estudada. Quanto à atividade biológica, a capacidade que estas lectinas ligantes de quitina tiveram em inibir o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* e *Fusarium moniliforme* é de grande valor, principalmente do ponto de vista biotecnológico.

7 - PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos com os estudos realizados para jackina e frutackina levantaram questões que merecem resposta. As seqüências parciais de jackina e frutackina (70%) nos revelaram que estas lectinas são inéditas, tanto em nível de estrutura primária quanto de arranjo estrutural. Assim, a obtenção da seqüência primária completa vai esclarecer indubitavelmente seus graus de identidade com as demais lectinas ligantes de quitina, bem como auxiliar no desenho de modelos tridimensionais que elas porventura adotam. A seqüência primária e estudos dinâmicos de jackina e frutackina monitorados por fluorescência e RMN poderiam fornecer resultados sobre as bases estruturais de interação das lectinas em questão com fragmentos de quitina. Determinar constantes de associação e eventuais mudanças conformacionais decorrentes da interação lectina-carboidrato podem gerar dados extremamente interessantes do ponto de vista bioquímico uma vez que estas lectinas demonstraram possuir um domínio ligante de quitina diferente dos domínios conhecidos (como o heveínico), principalmente por envolver três cadeias na constituição da unidade monomérica. Realizar testes de atividade antifúngica com as cadeias de jackina separadas também faz parte de investigações futuras, pensando em, porventura, construir um gene sintético e expressá-las, visando a produção de uma substância que seja ativa no controle biológico de microorganismos patogênicos de monoculturas.

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, M.S.; CABRAL, D.M.S.; ZINGALI, R.B.; KURTENBACH, E. (2000);** Characterization of two novel defense peptides from pea (*Pisum sativum*) seeds; *Arch. Biochem. Biophys.* 378, 278-286.
- AMADEO, G.I.; MOREIRA, R.; LIMA, R.; TEIXEIRA, D.; KRATJE, R.; ETCHEVERRIGARAY, M. (2003).** Screening of lectins from South American plants used as affinity ligands to purify rhEPO, *Braz. J. Chem. Eng.*, 20 21-26.
- ANDERSSON, L.C.; NILSSON, K.; GAHMBERG, C.G. (1979).** K562 - a human erythroleukemic cell line, *Int J Cancer* 23, 143-147.
- ASENSIO, J.L.; CAÑADA, F.J.; SIEBERT, H.-C.; LAYNEZ, J.; POVEDA, A.; NIETO, P.M.; SOEDJANAAMADJA, U. GABIUS, H.-J. JIMÉNEZ-BARBERO, J. (2000)** Structural basis for chitin recognition by defense proteins: GlcNAc residues are bound in a multivalent fashion by extended binding sites in hevein domains, *Chem. Biol.* 7, 529-543.
- ASMS BOOKLET (1998);** *What is mass spectrometry?* American Society for Mass Spectrometry, 3rd ed., 25p.
- BEINTEMA, J.J. (1994).** Structural features of plant chitinases and chitin-binding proteins, *FEBS Lett.* 350, 159-163.
- BIES, C.; LEHR, C.-M.; WOODLEY, J.F. (2004);** Lectin-mediated drug targeting: history and applications; *Adv. Drug Deliver. Rev.* 56, 425-435.
- BYLER, D.M.; SUSI, H. (1986)** Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra, *Biopolymers* 25, 469-487.
- CAMPANA, P.T.; MORAES, D.I.; MONTEIRO-MOREIRA, A.C.O.; BELTRAMINI, L.M. (2002)** Unfolding and refolding studies of frutalin, a tetrameric D-galactose binding lectin, *Eur. J. Biochem.* 269, 753-758.
- CAMPBELL, I.D. & DWEK, R.A. (1984),** *Biological Spectroscopy*, Benjamin Cummings Publish Co. Inc.
- CAMPOS-OLIVAS, R.; HÖRR, I.; BORMANN, C.; JUNG, B.; GRONENBORN, A.M. (2001);** Solution structure, backbone dynamics and chitin-binding of the anti-fungal protein from *Streptomyces tendae* TÜ901, *J. Mol. Biol.* 308, 765-782.

- CARLINI, C.R.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. (2002);** Plant toxic proteins with insecticidal properties: A review on their potentialities as bioinsecticides, *Toxicon* 40, 1515-1539.
- CARUSO, CECÍLIA SULZBACHER. (2002)** Interferência de peptídeos contendo histidinas na estrutura de proteínas recombinantes: um estudo aplicado à adenina fosforibosil transferase (APRT) de *Leishmania tarentolae*. São Carlos, 82p. *Tese (Doutorado)* – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- COLOMBO, G.; MELI, M.; CAÑADA, J.; ASENSIO, J.L.; JIMÉNEZ-BARBERO, J. (2004).** Toward the understanding of the structure and dynamics of protein-carbohydrate interactions: molecular dynamics studies of the complexes between hevein and oligosaccharidic ligands, *Carbohydr. Res.* 339, 985-994.
- DUNN, M.J. (1992);** Protein determination of total protein concentration. Harris, E. L. V., Angal, S., [Eds], *Protein Purification Methods*, Oxford: IRL Press.
- ESPINOSA, J.F.; ASENSIO, J.L.; GARCIA, J.L.; LAYNEZ, J.; BRUIX, M.; WRIGHT, C.; SIEBERT, H.-C.; GABIUS, H.-J.; CAÑADA, F.J.; JIMÉNEZ-BARBERO, J. (2000);** NMR investigations of protein-carbohydrate interactions; binding studies and refined three-dimensional solution structure of the complex between the B domain of wheat germ agglutinin and N,N',N''-triacylchitotriose. *Eur. J. Biochem.* 267, 3965-3978.
- FRIEDMAN, M.; KRULL, L.H.; CAVINS, J.F. (1970);** The chromatographic determination of cystine and cysteine residues in proteins as S- β -(4-pyridylethyl) cysteine, *J. Biol. Chem.* 245, 3868-3871.
- FRISARDI, M.; GHOSH, S.K.; FIELD, J.; VAN DELLEN, K.; ROGERS, R.; ROBBINS, P.; SAMUELSON, J. (2000);** The most abundant glycoprotein of amebic cyst walls (Jacob) is a lectin with five cyst-rich, chitin-binding domains; *Infect. Immun.* 68, 4217-4224.
- GABIUS, H.-J.; ANDRÉ, S.; KALTNER, H.; SIEBERT, H.-C. (2002);** The sugar code: functional lectinomics; *Biochim. Biophys. Acta* 1572, 165-177.
- GOLDSTEIN, I.J. (2002)** Lectin Structure-Activity: the story is never over. *J. Agric. Food Chem.* 50, 6583-6585.
- HARATA, K.; MURAKI, M. (2000);** Crystal structures of *Urtica dioica* agglutinin and its complex with tri-N-acetylchitotriose, *J. Mol. Biol.* 297, 673-671.

- HAYASHIDA, M.; FUJII, T.; HAMASU, M.; ISHIGURO, M.; HATA, Y. (2003).** Similarity between protein-protein and protein-carbohydrate interactions, revealed by two crystal structures of lectins from the roots of pokeweed, *J. Mol. Biol.* 334, 551-565.
- HUANG, X.; XIE, W.; GONG, A. (2000);** Characteristics and antifungal activity of a chitin binding protein from *Ginkgo biloba*, *FEBS Lett.* 478, 123-126.
- ICONOMIDOU, V.A.; CHRYSIKOS, D.G.; GIONIS, V.; PAVLIDIS, M.A.; PAIPETIS, A.; HAMODRAKAS, S.J. (2000).** Secondary structure of chorion proteins of the teleostean fish dentex dentex by ATR FT-IR and FT-Raman spectroscopy; *J. Struct. Biol.* 132, 112-122.
- JEYAPRAKASH, A.A.; KATİYAR, S.; SWAMINATHAN, C.P.; SEKAR, K.; SUROLIA, A.; VIJAYAN, M. (2003);** Structural basis of the carbohydrate specificities of jacalin: an x-ray and modeling study; *J. Mol. Biol.* 332, 217-228.
- JEYAPRAKASH, A.A.; SRIVASTAV, A.; SUROLIA, A.; VIJAYAN, M. (2004);** Structural basis for the carbohydrate specificities of artocarpin: variation in the length of a loop as a strategy for generating ligand specificity; *J. Mol. Biol.* 338, 757-770.
- KABIR, S. (1998).** Jacalin: a jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seed derived lectin of versatile applications in immunobiological research, *J. Immunol. Methods* 212, 193-211.
- KATİYAR, S.; VAN DAMME, E.J.M.; PEUMANS, W.J.; SUROLIA, A. (1999);** Thermodynamic analysis of chitoooligosaccharide binding to *Urtica dioica* agglutinin by isothermal titration calorimetry, *Bioscience Rep.* 19, 411-419.
- KELLY, S.M.; PRICE, N.C. (1997);** The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding; *Biochim. Biophys. Acta* 1338, 161-185.
- KILPATRICK, D.C (2002);** Animal lectins: a historical introduction and overview; *Biochim. Biophys. Acta* 1572, 187-197.
- KOO, J.C.; LEE, S.Y.; CHUN, H.J.; CHEONG, Y.H.; CHOI, J.S.; KAWABATA, S.; MIYAGI, M.; TSUNASAWA, S.; HA, K.S.; BAE, D.W.; HAN, C.; LEE, B.L.; CHO, M.J. (1998).** Two hevein homologs isolated from the seed of *Pharbitis nil* L. exhibit potent antifungal activity; *Biochim. Biophys. Acta*, 1382, 80-90.
- LAKOWICZ, JR (1983).** *Principles of Fluorescence*; Plenum Press, New York

- LEHNINGER (2000).** *Principles of Biochemistry*, David L. Nelson, Michael M. Cox ed.; 3rd. ed., Worth Publishers.
- LEHR, C.-M. (2000);** Lectin-mediated drug delivery: the second generation of bioadhesives; *J. Control. Release* 65, 19-29.
- LIS, H.; SHARON, N. (1998);** Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition; *Chem. Rev.*, 98, 637-674.
- LORIS, R. (2002).** Principles of structures of animal and plant lectins, *Biochim. Biophys. Acta*, 1572, 198-108.
- MANUAL AKTA AFFINITY CHROMATOGRAPHY (2002):** principles and methods; edition AC, 18-1022-29.
- MANUAL AKTA GEL FILTRATION (2002):** principles and methods; edition AI, 18-1022-18.
- MANUAL AKTA REVERSED PHASE CHROMATOGRAPHY (2002):** principles and methods; edition AB, 18-1134-16.
- MONTEIRO-MOREIRA, ANA CRISTINA DE OLIVEIRA (2002).** Caracterização Estrutural de três Lectinas Apresentando Especificidades por Açúcar Distintas, Isoladas de Sementes de Fruta-Pão (*Artocarpus incisa* L.). Fortaleza, 117p. *Tese (Doutorado)* Universidade Federal do Ceará.
- MOREIRA, R.A.; CASTELO-BRANCO, C.C.; MONTEIRO, A.C.O.; TAVARES, R.O.; BELTRAMINI, L.M. (1998).** Isolation and partial characterization of a lectin from *Artocarpus incisa* L. seeds, *Phytochemistry* 46, 139-144.
- MURAKI, M.; ISHIMURA, M.; HARATA, K. (2002);** Interactions of wheat-germ agglutinin with GlcNAc β 1,6Gal sequence; *Biochim. Biophys. Acta* 1569, 10-20.
- NAKANISHI, K; BEROVA, N., WOODY, R.W. ED. (1994);** *Circular Dichroism – Principles and Applications*, editora VCH.
- NEUMANN, D.; LEHR, C.-M.; LENHOF, H.-P.; KOHLBACHER, O. (2004).** Computational modeling of the sugar-lectin interaction, *Adv. Drug Deliver. Rev.* 56, 437-457.
- NG, T.B. (2004);** Antifungal proteins and peptides of leguminous and non-leguminous origins, *Peptides* 25, 1215-1222.
- PANUNTO-CASTELO, A.; SOUZA, M.A.; ROQUE-BARREIRA, M.C.; SILVA, J.S. (2001);** KM+, a lectin from *Artocarpus integrifolia*, induces IL-

12 p40 production by macrophages and switches from type 2 to type 1 cell-mediated immunity against *Leishmania major* antigens, resulting in BALB/c mice resistance to infection; *Glycobiology* 11, 1035-1042.

PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J.M. (1996). Prevalence, biological activity and genetic manipulation of lectins in foods; *Trends in Food Sci. Tech.*, 7, 132-138.

PEUMANS, W.J.; HAUSE, B.; VAN DAMME, E.J.M. (2000); The galactose-binding and mannose-binding jacalin-related lectins are located in different sub-cellular compartments; *FEBS Lett.* 477, 186-192.

PRATAP, J.V.; JEYAPRAKASH, A.A.; RANI, P.G.; SEKAR, K.; SUROLIA, A.; VIJAYAN, M. (2002); Crystal structures of artocarpin a Moraceae lectin with mannose specificity, and its complex with methyl- α -D-mannose: implications to the generation of carbohydrate specificity; *J. Mol. Biol.* 317, 237-247.

RANI, P.G.; BACHHAWAT, K.; MISQUITH, S.; SUROLIA, A. (1999); Thermodynamic studies of saccharide binding to artocarpin, a B-cell mitogen, reveals the extended nature of its interaction with mannotriose [3.6-di-o-(α -D-mannopyranosyl)-D-mannose]. *J. Biol. Chem.* 274, 29694-29698.

REBERS, J.E.; WILLIS, J.H. (2001); A conserved domain in arthropod cuticular proteins binds chitin, *Insect Biochem. Molec.*, 31, 1083-1093.

ROQUE-BARREIRA, M.C.; PRAZ, F.; MECARELLI-HALBWACHS, L.; GREENE, L.J.; CAMPOS-NETO, A. (1986); IgA-affinity purification and characterization of the lectin jacalin; *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 19, 149-157.

ROSA, J.C.; OLIVEIRA, P.S. L.; GARRAT, R.; BELTRAMINI, L.; RESING, K.; ROQUE-BARREIRA, M.C.; GREENE, L.J. (1999); KM+, a mannose-binding lectin from *Artocarpus integrifolia*: amino acid sequence, predicted tertiary structure, carbohydrate recognition and analysis of the β -prism fold; *Protein Sci.*, 8, 13-24.

RÜDIGER, H. (1998). Plant lectins – more than just tools for glycoscientists: occurrence, structure, and possible functions of plant lectins; *Acta Anat.* 161, 130-152.

RÜDIGER, H.; SIEBERT, H.-C.; SOLIS, D.; JIMÉNEZ-BARBERO, J.; ROMERO, A.; VON DER LIETH, C.-W.; DIAZ-MAURIÑO, T.; GABIUS, H.-J. (2000). Medicinal chemistry based on the sugar code:

- fundamentals of lectinology and experimental strategies with lectins as targets; *Curr. Med. Chem.*, 7, 389-416.
- RÜDIGER, H.; GABIUS, H.-J. (2001).** Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications. *Glycoconjugate J.* 18, 589-613.
- SAHASRABUDDHE, A. A.; GAIKWAD, S.M.; KRISHNASASTRY, M.V.; KHAN, M.I. (2004);** Studies on recombinant single chain jacalin lectin reveal reduced affinity for saccharides despite normal folding like native jacalin; *Protein Sci.* 13, 3264-3273.
- SANKARANARAYANAN, R.; SEKAR, K.; BANERJEE, R.; SHARMA, V.; SUROLIA, A.; VIJAYAN, M. (1996);** A novel mode of carbohydrate recognition in jacalin, a Moraceae plant lectin with a β -prism fold; *Nat. Struct. Biol.* 3, 596-603.
- SANTOS-OLIVEIRA, R.; DIAS-BARUFFI, M.; THOMAZ, S.M.O.; BELTRAMINI, L.M.; ROQUE-BARREIRA, M.C. (1994);** A neutrophil migration inducing lectin from *Artocarpus integrifolia*; *J. Immunol.*, 153, 1798-1807.
- SCHÄGGER, H.; VON JAGOW, G. (1987);** Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa; *Anal. Biochem.* 166, 368-379.
- SCOPES, R.K. (1994);** *Protein Purification*, 3a. edition, Springer-Verlag.
- SELITRENNIKOFF, C.P. (2001).** Antifungal Proteins, *Appl. Environ. Microb* 67, 2883-2894.
- SHARON, N.; LIS, H. (2004);** History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules; *Glycobiology* 14, 53R-64R.
- SHEN, Z.; JACOBS-LORENA, M. (1999);** Evolution of chitin-binding proteins in invertebrates, *J. Mol. Evol.* 48, 341-347.
- SILVA-LUCCA, R.A.; TABAK, M.; NASCIMENTO, O.R.; ROQUE-BARREIRA, M.C.; BELTRAMINI, L.M. (1999);** Structural and thermodynamic studies of KM+, a D-mannose binding lectin from *Artocarpus integrifolia* seeds; *Biophys. Chem.* 79, 81-93.
- SREERAMA, N.; WOODY, R.W. (2000);** Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with and expanded reference set; *Anal Biochem.* 287 252-260.

- SREERAMA, N.; VENYAMINOV, S.Y.; WOODY, R.W. (2001);** Analysis of protein circular dichroism spectra based on the tertiary structure classification, *Anal. Biochem.* 299, 271-274.
- SREERAMA, N.; WOODY, R.W. (2003);** Structural composition of β_1 - and β_{II} -proteins, *Protein Sci.* 12, 384-388.
- STOEVA, S.; FRANZ, M.; WACKER, R.; KRAUSPENHAAR, R.; GUTHÖHRLEIN, E.; MIKHAILOV, A.; BETZEL, C.; VOELTER, W. (2001).** Primary structure, isoforms and molecular modeling of a chitin-binding mistletoe lectin; *Arch. Biochem. Biophys.* 392, 23-31.
- SUETAKE, T.; TSUDA, S.; KAWABATA, S.; MIURA, K.; IWANAGA, S.; HIKICHI, K.; NITTA, K.; KAWANO, K. (2000);** Chitin-binding proteins in invertebrates and plants comprise a common chitin-binding structural motif, *J. Biol. Chem.* 275 17929-17932.
- SUSI, H.; D. BYLER, M. J.; PURCELL, M. (1985);** Estimation of β -structure content of proteins by means of deconvolved FT-IR spectra, *J. Biochem. Biophys. Meth* 11, 235-240.
- SUZUKI, M.; MORIMATSU, M.; SYUTO, B. (2002);** The identification and properties of chitin-binding protein b01 (CBPb01), *J. Vet. Med. Sci.* 64, 477-481.
- VAN DAMME, E.J.M.; PEUMANS, W.J.; BARRE, A.; ROUGÉ, P. (1998)** Plant Lectins: A Composite of Several Distinct Families of Structurally and Evolutionary Related Proteins with Diverse Biological Roles; *Crit Rev Plant Sci* 17(6), 575-692.
- VAN DAMME, E.J.M.; BARRE, A.; ROUGÉ, P.; PEUMANS, W.J. (2004);** Cytoplasmic/nuclear plant lectins: a new story; *Trends Plant Sci.* 10, 484-489.
- VAN DELLEN, K.; GHOSH, S.K.; ROBBINS, P.W.; LOFTUS, B.; SAMUELSON, J. (2002);** *Entamoeba histolytica* lectins contain unique 6-Cys or 8-Cys chitin-binding domains, *Infect. Immun.* 70, 3259-3263.
- VAN DEN BERGH, K.P.B.; PROOST, P.; VAN DAMME, J.; COOSEMANS, J.; VAN DAMME, E.J.M.; PEUMANS, W.J. (2002);** Five disulfide bridges stabilize a hevein-type antimicrobial peptide from the bark of spindle tree (*Euonymus europaeus* L.); *FEBS Lett.* 530, 181-185.
- VASCONCELOS, I.M.; OLIVEIRA, J.T.A. (2004);** Antinutritional properties of plant lectins, *Toxicon* 44, 385-403.

- VUOCOLO, T.; EISEMANN, C.H.; PEARSON, R.D.; WILLADSEN, P.; TELLAM, E.L. (2001);** Identification and molecular characterization of a peritrophin gene, peritrophin-48 from the myiasis fly *Chrysomya bezziana*, *Insect Biochem. Molec.* 31 919-932.
- WANG, P.; LI, G.; GRANADOS, R.R. (2004);** Identification of two new peritrophic membrane proteins from larval *Trichoplusia ni*: structural characteristics and their functions in the protease rich insect gut. *Insect Biochem. Molec.* 34, 215-227.
- WOODY, A-Y. M. & WOODY, R.W. (2003);** Individual tyrosine side-chain contribution to circular dichroism of ribonuclease, *Biopolymers* 72, 500-513.
- WOODY, R.W. (1978);** Aromatic side-chain contributions to the far ultraviolet circular dichroism of peptides and proteins, *Biopolymers* 17, 451-1467.
- ZHENG, M.; HAKOMORI, S. (2000);** Soluble fibronectin interaction with cell surface and extracellular matrix is mediated by carbohydrate-to-carbohydrate interaction; *Arch. Biochem. Biophys.* 374, 93-99.

APÊNDICE 1

Demonstração do cálculo do número de onda vibracional no Infravermelho

Uma vibração de estiramento atômico pode ser aproximada a um movimento harmônico simples, obedecendo à Lei de Hooke;

$$F = -\kappa x \quad (1),$$

onde F é a força de restauração para o estado inicial, κ é a constante de força da ligação e x é a distância do deslocamento.

A variação de energia potencial de um oscilador harmônico é calculada a partir de:

$$dE = -Fdx \quad (2)$$

combinando 1 e 2 temos,

$$dE = -\kappa x dx. \quad \text{Assim,}$$

$$\int_0^E dE = \kappa \int_0^x x dx \Rightarrow E = \frac{1}{2} \kappa x^2 \quad (3).$$

A frequência vibracional é dada pelo deslocamento de massa em função do tempo segundo a Lei de Newton:

$$F = ma \quad (4); \quad \text{mas } a = \frac{d^2 x}{dt^2} \quad (5)$$

Substituindo 4 e 5 em 1, temos:

$$-\kappa x = m \frac{d^2 x}{dt^2} \quad \text{A solução desta derivada é}$$

$$x = A \sin \left(\sqrt{\frac{k}{m}} t \right) \quad (6)$$

Uma vez que 2π corresponde a 1 ciclo completo da função seno, que é um período (τ), temos que:

$$\text{Quando } t = \tau, \quad t = 2\pi \sqrt{\frac{m}{k}} \quad (7).$$

A frequência vibracional ν é a recíproca do período, portanto,

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{m}} \quad (8).$$

Entretanto, as energias vibracionais são quantizadas, de modo que as equações de onda para a energia potencial do oscilador harmônico encontram soluções quando:

$$\left(\nu + \frac{1}{2} \right) \frac{h}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (9) \text{ onde } h \text{ é a constante de Planck e } \mu \text{ é}$$

a massa reduzida, calculada a partir da massa simples dos átomos envolvidos na ligação:

$$\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}. \text{ Combinando 8 e 9, temos}$$

$$E = \left(\nu + \frac{1}{2} \right) h \nu \quad (10).$$

A diferença de energia entre quaisquer 2 níveis vibracionais adjacentes é idêntica quando ν é um número inteiro, ou seja,

$$\Delta E = h \nu = \frac{h}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (11).$$

Uma transição do estado fundamental $\left(E_0 = \frac{1}{2} h \nu\right)$ para o 1º estado excitado $\left(E_1 = \frac{3}{2} h \nu\right)$ requer energia igual a $E_1 - E_0 = h\nu$:

$$\Delta E_{\text{radiação}} = \frac{h}{2\pi} \sqrt{\frac{\kappa}{\mu}} = h \nu_{\text{quantizada}}, \text{ logo,}$$

$$\nu_{\text{quantizada}} = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{\kappa}{\mu}} \quad (12).$$

Para expressar esta equação de energia vibracional em função do número de onda, é preciso lembrar das relações:

$$\nu = \frac{c}{\lambda} \text{ ou } \nu = c \cdot \frac{1}{\lambda} \quad (13), \text{ e } \phi = \frac{1}{\lambda}, \quad (14), \text{ onde } \nu \text{ é a}$$

freqüência, c é a velocidade da luz e λ é o comprimento de onda e ϕ é o número de onda. Assim, $\nu = c \cdot \phi$ e a equação (12) pode ser escrita como:

$$\phi = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{\kappa}{\mu}}, \text{ onde}$$

ϕ =número de onda do pico de absorção (cm^{-1});

κ =constante de força da ligação química (dinas/cm);

c = velocidade da luz (3×10^{10} cm/s)

μ =massa reduzida (g).

APÊNDICE 2

Ajuste das curvas experimental x calculada resultantes dos programas de desconvolução de espectros de CD SELCON3, CDSSTR E CONTIN/LL para jackina e frutackina.

SELCON3

CONTIN/LL

O programa CDSSTR não conseguiu convergência dos resultados, de modo que não houve nem mesmo compatibilidade entre as curvas e, por isso não foram consideradas.

ANEXOS

Anexo 1: Tabela de Pontuação (score) de alinhamento das proteínas ligantes de quitina (incluindo jackina e frutackina)

SeqA Name	Len(aa)	SeqB Name	Len(aa)	Score
=====				
21 PR1_barley	164	22 PR1_mayze	163	70
18 ch3jackfruit	22	20 ch2bread	37	63
17 ch2jackfruit	51	20 ch2bread	37	62
16 chljackfruit	21	20 ch2bread	37	61
4 AMP1	49	5 AFP2	80	48
13 hevein	43	15 PL-C	126	48
13 hevein	43	14 UDA7	112	44
16 chljackfruit	21	19 chlbread	37	42
2 gama_2_purotionin	47	3 gama_tionin	75	40
16 chljackfruit	21	18 ch3jackfruit	22	38
14 UDA7	112	15 PL-C	126	36
3 gama_tionin	75	4 AMP1	49	30
2 gama_2_purotionin	47	14 UDA7	112	29
19 chlbread	37	20 ch2bread	37	29
3 gama_tionin	75	16 chljackfruit	21	28
15 PL-C	126	16 chljackfruit	21	28
2 gama_2_purotionin	47	5 AFP2	80	27
17 ch2jackfruit	51	18 ch3jackfruit	22	27
3 gama_tionin	75	5 AFP2	80	26
4 AMP1	49	11 quitinase_barley	266	26
4 AMP1	49	14 UDA7	112	26
1 zeamatin	206	19 chlbread	37	24
4 AMP1	49	8 peritrophin_44	356	24
8 peritrophin_44	356	9 tachycitin	98	24
9 tachycitin	98	14 UDA7	112	24
11 quitinase_barley	266	14 UDA7	112	24
14 UDA7	112	19 chlbread	37	24
15 PL-C	126	19 chlbread	37	24
17 ch2jackfruit	51	19 chlbread	37	24
20 ch2bread	37	24 NLTP1	114	24
2 gama_2_purotionin	47	16 chljackfruit	21	23
4 AMP1	49	16 chljackfruit	21	23
6 CYS_WALL_JACOB	151	13 hevein	43	23
7 JESSIE1	90	16 chljackfruit	21	23
8 peritrophin_44	356	15 PL-C	126	23
14 UDA7	112	16 chljackfruit	21	23

15	PL-C	126	17	ch2jackfruit	51	23
4	AMP1	49	15	PL-C	126	22
5	AFP2	80	18	ch3jackfruit	22	22
6	CYS_WALL_JACOB	151	18	ch3jackfruit	22	22
18	ch3jackfruit	22	19	chl1bread	37	22
2	gama_2_purotionin	47	4	AMP1	49	21
5	AFP2	80	14	UDA7	112	21
7	JESSIE1	90	19	chl1bread	37	21
8	peritrophin_44	356	17	ch2jackfruit	51	21
20	ch2bread	37	21	PR1_barley	164	21
1	zeamatin	206	13	hevein	43	20
6	CYS_WALL_JACOB	151	15	PL-C	126	20
7	JESSIE1	90	13	hevein	43	20
11	quitinase_barley	266	13	hevein	43	20
13	hevein	43	17	ch2jackfruit	51	20
2	gama_2_purotionin	47	8	peritrophin_44	356	19
5	AFP2	80	16	chl1jackfruit	21	19
6	CYS_WALL_JACOB	151	16	chl1jackfruit	21	19
8	peritrophin_44	356	16	chl1jackfruit	21	19
9	tachycitin	98	16	chl1jackfruit	21	19
11	quitinase_barley	266	17	ch2jackfruit	51	19
13	hevein	43	16	chl1jackfruit	21	19
16	chl1jackfruit	21	24	NLTP1	114	19
1	zeamatin	206	18	ch3jackfruit	22	18
5	AFP2	80	11	quitinase_barley	266	18
8	peritrophin_44	356	18	ch3jackfruit	22	18
8	peritrophin_44	356	20	ch2bread	37	18
9	tachycitin	98	18	ch3jackfruit	22	18
12	cardiotoxin3	81	18	ch3jackfruit	22	18
14	UDA7	112	18	ch3jackfruit	22	18
15	PL-C	126	18	ch3jackfruit	22	18
18	ch3jackfruit	22	21	PR1_barley	164	18
18	ch3jackfruit	22	22	PR1_mayze	163	18
20	ch2bread	37	22	PR1_mayze	163	18
2	gama_2_purotionin	47	15	PL-C	126	17
2	gama_2_purotionin	47	24	NLTP1	114	17
6	CYS_WALL_JACOB	151	17	ch2jackfruit	51	17
17	ch2jackfruit	51	22	PR1_mayze	163	17
1	zeamatin	206	4	AMP1	49	16
2	gama_2_purotionin	47	13	hevein	43	16
3	gama_tionin	75	24	NLTP1	114	16
5	AFP2	80	19	chl1bread	37	16
6	CYS_WALL_JACOB	151	20	ch2bread	37	16
8	peritrophin_44	356	13	hevein	43	16
9	tachycitin	98	20	ch2bread	37	16

10	hevamine	164	13	hevein	43	16
1	zeamatin	206	5	AFP2	80	15
1	zeamatin	206	15	PL-C	126	15
5	AFP2	80	7	JESSIE1	90	15
6	CYS_WALL_JACOB	151	7	JESSIE1	90	15
6	CYS_WALL_JACOB	151	14	UDA7	112	15
11	quitinase_barley	266	15	PL-C	126	15
1	zeamatin	206	14	UDA7	112	14
1	zeamatin	206	16	chljackfruit	21	14
2	gama_2_purotionin	47	9	tachycitin	98	14
2	gama_2_purotionin	47	10	hevamine	164	14
3	gama_tionin	75	6	CYS_WALL_JACOB	151	14
3	gama_tionin	75	9	tachycitin	98	14
3	gama_tionin	75	10	hevamine	164	14
3	gama_tionin	75	11	quitinase_barley	266	14
4	AMP1	49	7	JESSIE1	90	14
4	AMP1	49	12	cardiotoxin3	81	14
8	peritrophin_44	356	14	UDA7	112	14
11	quitinase_barley	266	16	chljackfruit	21	14
16	chljackfruit	21	17	ch2jackfruit	51	14
16	chljackfruit	21	21	PR1_barley	164	14
16	chljackfruit	21	22	PR1_mayze	163	14
1	zeamatin	206	8	peritrophin_44	356	13
1	zeamatin	206	12	cardiotoxin3	81	13
1	zeamatin	206	20	ch2bread	37	13
2	gama_2_purotionin	47	18	ch3jackfruit	22	13
3	gama_tionin	75	8	peritrophin_44	356	13
5	AFP2	80	24	NLTP1	114	13
6	CYS_WALL_JACOB	151	19	chlbread	37	13
7	JESSIE1	90	14	UDA7	112	13
7	JESSIE1	90	18	ch3jackfruit	22	13
7	JESSIE1	90	22	PR1_mayze	163	13
8	peritrophin_44	356	11	quitinase_barley	266	13
8	peritrophin_44	356	19	chlbread	37	13
8	peritrophin_44	356	24	NLTP1	114	13
9	tachycitin	98	13	hevein	43	13
10	hevamine	164	20	ch2bread	37	13
10	hevamine	164	24	NLTP1	114	13
12	cardiotoxin3	81	15	PL-C	126	13
13	hevein	43	18	ch3jackfruit	22	13
15	PL-C	126	20	ch2bread	37	13
18	ch3jackfruit	22	23	CP2b	231	13
18	ch3jackfruit	22	24	NLTP1	114	13
19	chlbread	37	21	PR1_barley	164	13
19	chlbread	37	24	NLTP1	114	13

2	gama_2_purotionin	47	12	cardiotoxin3	81	12
4	AMP1	49	10	hevamine	164	12
4	AMP1	49	24	NLTP1	114	12
5	AFP2	80	9	tachycitin	98	12
5	AFP2	80	15	PL-C	126	12
9	tachycitin	98	10	hevamine	164	12
9	tachycitin	98	12	cardiotoxin3	81	12
9	tachycitin	98	22	PR1_mayze	163	12
12	cardiotoxin3	81	24	NLTP1	114	12
14	UDA7	112	24	NLTP1	114	12
1	zeamatin	206	24	NLTP1	114	11
5	AFP2	80	8	peritrophin_44	356	11
5	AFP2	80	12	cardiotoxin3	81	11
6	CYS_WALL_JACOB	151	8	peritrophin_44	356	11
7	JESSIE1	90	9	tachycitin	98	11
7	JESSIE1	90	17	ch2jackfruit	51	11
9	tachycitin	98	15	PL-C	126	11
9	tachycitin	98	17	ch2jackfruit	51	11
13	hevein	43	24	NLTP1	114	11
14	UDA7	112	21	PR1_barley	164	11
17	ch2jackfruit	51	24	NLTP1	114	11
21	PR1_barley	164	23	CP2b	231	11
22	PR1_mayze	163	23	CP2b	231	11
1	zeamatin	206	7	JESSIE1	90	10
1	zeamatin	206	9	tachycitin	98	10
1	zeamatin	206	10	hevamine	164	10
1	zeamatin	206	21	PR1_barley	164	10
2	gama_2_purotionin	47	11	quitinase_barley	266	10
2	gama_2_purotionin	47	20	ch2bread	37	10
2	gama_2_purotionin	47	21	PR1_barley	164	10
4	AMP1	49	9	tachycitin	98	10
4	AMP1	49	20	ch2bread	37	10
4	AMP1	49	21	PR1_barley	164	10
4	AMP1	49	23	CP2b	231	10
5	AFP2	80	20	ch2bread	37	10
5	AFP2	80	23	CP2b	231	10
6	CYS_WALL_JACOB	151	9	tachycitin	98	10
7	JESSIE1	90	10	hevamine	164	10
7	JESSIE1	90	20	ch2bread	37	10
7	JESSIE1	90	21	PR1_barley	164	10
9	tachycitin	98	19	chl1bread	37	10
11	quitinase_barley	266	19	chl1bread	37	10
11	quitinase_barley	266	20	ch2bread	37	10
13	hevein	43	19	chl1bread	37	10
14	UDA7	112	20	ch2bread	37	10

19	chlbread	37	22	PR1_mayze	163	10
1	zeamatin	206	6	CYS_WALL_JACOB	151	9
1	zeamatin	206	11	quitinase_barley	266	9
1	zeamatin	206	17	ch2jackfruit	51	9
3	gama_tionin	75	12	cardiotoxin3	81	9
3	gama_tionin	75	13	hevein	43	9
3	gama_tionin	75	15	PL-C	126	9
3	gama_tionin	75	18	ch3jackfruit	22	9
4	AMP1	49	18	ch3jackfruit	22	9
5	AFP2	80	13	hevein	43	9
6	CYS_WALL_JACOB	151	11	quitinase_barley	266	9
6	CYS_WALL_JACOB	151	24	NLTP1	114	9
10	hevamine	164	16	chljackfruit	21	9
10	hevamine	164	17	ch2jackfruit	51	9
10	hevamine	164	18	ch3jackfruit	22	9
10	hevamine	164	23	CP2b	231	9
11	quitinase_barley	266	18	ch3jackfruit	22	9
11	quitinase_barley	266	21	PR1_barley	164	9
12	cardiotoxin3	81	14	UDA7	112	9
12	cardiotoxin3	81	16	chljackfruit	21	9
12	cardiotoxin3	81	21	PR1_barley	164	9
13	hevein	43	23	CP2b	231	9
14	UDA7	112	22	PR1_mayze	163	9
15	PL-C	126	22	PR1_mayze	163	9
16	chljackfruit	21	23	CP2b	231	9
17	ch2jackfruit	51	21	PR1_barley	164	9
1	zeamatin	206	2	gama_2_purotionin	47	8
1	zeamatin	206	3	gama_tionin	75	8
2	gama_2_purotionin	47	6	CYS_WALL_JACOB	151	8
2	gama_2_purotionin	47	17	ch2jackfruit	51	8
2	gama_2_purotionin	47	19	chlbread	37	8
2	gama_2_purotionin	47	22	PR1_mayze	163	8
3	gama_tionin	75	14	UDA7	112	8
3	gama_tionin	75	19	chlbread	37	8
3	gama_tionin	75	20	ch2bread	37	8
4	AMP1	49	6	CYS_WALL_JACOB	151	8
4	AMP1	49	17	ch2jackfruit	51	8
4	AMP1	49	19	chlbread	37	8
5	AFP2	80	6	CYS_WALL_JACOB	151	8
5	AFP2	80	10	hevamine	164	8
7	JESSIE1	90	12	cardiotoxin3	81	8
7	JESSIE1	90	15	PL-C	126	8
8	peritrophin_44	356	10	hevamine	164	8
8	peritrophin_44	356	23	CP2b	231	8
10	hevamine	164	15	PL-C	126	8

10	hevamine	164	19	chlbread	37	8
12	cardiotoxin3	81	22	PR1_mayze	163	8
13	hevein	43	20	ch2bread	37	8
20	ch2bread	37	23	CP2b	231	8
5	AFP2	80	17	ch2jackfruit	51	7
8	peritrophin_44	356	12	cardiotoxin3	81	7
8	peritrophin_44	356	22	PR1_mayze	163	7
9	tachycitin	98	21	PR1_barley	164	7
11	quitinase_barley	266	12	cardiotoxin3	81	7
11	quitinase_barley	266	22	PR1_mayze	163	7
12	cardiotoxin3	81	17	ch2jackfruit	51	7
12	cardiotoxin3	81	23	CP2b	231	7
15	PL-C	126	21	PR1_barley	164	7
17	ch2jackfruit	51	23	CP2b	231	7
22	PR1_mayze	163	24	NLTP1	114	7
1	zeamatin	206	22	PR1_mayze	163	6
2	gama_2_purotionin	47	7	JESSIE1	90	6
4	AMP1	49	13	hevein	43	6
4	AMP1	49	22	PR1_mayze	163	6
5	AFP2	80	21	PR1_barley	164	6
6	CYS_WALL_JACOB	151	12	cardiotoxin3	81	6
8	peritrophin_44	356	21	PR1_barley	164	6
10	hevamine	164	11	quitinase_barley	266	6
10	hevamine	164	12	cardiotoxin3	81	6
12	cardiotoxin3	81	13	hevein	43	6
13	hevein	43	21	PR1_barley	164	6
13	hevein	43	22	PR1_mayze	163	6
3	gama_tionin	75	7	JESSIE1	90	5
3	gama_tionin	75	17	ch2jackfruit	51	5
3	gama_tionin	75	23	CP2b	231	5
5	AFP2	80	22	PR1_mayze	163	5
6	CYS_WALL_JACOB	151	22	PR1_mayze	163	5
7	JESSIE1	90	8	peritrophin_44	356	5
7	JESSIE1	90	24	NLTP1	114	5
9	tachycitin	98	24	NLTP1	114	5
12	cardiotoxin3	81	19	chlbread	37	5
12	cardiotoxin3	81	20	ch2bread	37	5
14	UDA7	112	17	ch2jackfruit	51	5
15	PL-C	126	24	NLTP1	114	5
19	chlbread	37	23	CP2b	231	5
23	CP2b	231	24	NLTP1	114	5
2	gama_2_purotionin	47	23	CP2b	231	4
3	gama_tionin	75	21	PR1_barley	164	4
3	gama_tionin	75	22	PR1_mayze	163	4
7	JESSIE1	90	11	quitinase_barley	266	4

9	tachycitin	98	11	quitinase_barley	266	4
10	hevamine	164	14	UDA7	112	4
10	hevamine	164	21	PR1_barley	164	4
10	hevamine	164	22	PR1_mayze	163	4
14	UDA7	112	23	CP2b	231	4
6	CYS_WALL_JACOB	151	10	hevamine	164	3
6	CYS_WALL_JACOB	151	23	CP2b	231	3
9	tachycitin	98	23	CP2b	231	3
11	quitinase_barley	266	23	CP2b	231	3
11	quitinase_barley	266	24	NLTP1	114	3
15	PL-C	126	23	CP2b	231	3
21	PR1_barley	164	24	NLTP1	114	3
1	zeamatin	206	23	CP2b	231	2
6	CYS_WALL_JACOB	151	21	PR1_barley	164	2
7	JESSIE1	90	23	CP2b	231	2
=====						