

DANIELLE GOMES NASCIMENTO

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DE PEPTÍDEOS DE SEMENTE DE SOJA
(*Glycine max* [L.] Merryll).**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2003

DANIELLE GOMES NASCIMENTO

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DE PEPTÍDEOS DE SEMENTE DE SOJA
(*Glycine max* [L.] Merrill).**

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

APROVADA: 27 de Março de 2003.

Profa. Elizabeth Pacheco Batista Fontes
(Conselheira)

Prof. Reginaldo da Silva Romeiro
(Conselheiro)

Prof. Marcelo Matos Santoro

Prof. Sebastião Tavares Resende

Profa. Maria Cristina Baracat-Pereira
(Orientadora)

Aos meus queridos pais, José Francisco e Graça, pelo amor e incentivo durante a realização deste curso.

Ao meu querido irmão, pelo apoio e companheirismo, mesmo à distância.

AGRADECIMENTOS

À Deus, em primeiro lugar, pela presença em todos os momentos da minha vida;

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização deste curso;

Ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular/DBB da Universidade Federal de Viçosa pelo auxílio constante;

À CAPES, pelo auxílio financeiro;

À Professora Maria Cristina Baracat Pereira, pela orientação, dedicação e presença constante em todos os momentos;

À Professora Elizabeth Pacheco Batista Fontes/DBB, pela ajuda, orientação e por ter disponibilizado o seu laboratório para a realização deste projeto;

Ao Professor Marcelo Matos Santoro/UFMG, pela colaboração e orientação durante a realização da cromatografia de fase reversa e da espectrometria de massa, e pelas valiosas sugestões ao trabalho;

Ao Professor Marcelo Porto Bemquerer/UFMG, pela colaboração durante o seqüenciamento do peptídeo, e pelo grande apoio e atenção dispensados durante a realização deste trabalho;

Ao Professor Reginaldo da Silva Romeiro/ DFP, pelo apoio durante a realização dos testes de atividade antimicrobiana;

Aos Professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular/DBB/UFV, pela agradável convivência;

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas/UFV, pela excelente convivência dentro e fora do laboratório;

Às amigas Marília e Eliane do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas/UFV, pela valiosa ajuda para a realização deste trabalho;

Aos amigos do Laboratório de Enzimologia e Físico-Química de Proteínas/UFMG, pelo apoio e excelente convivência;

Aos amigos Jamil e Jacqueline do Laboratório de Enzimologia e Físico-Química de Proteínas/UFMG, pelo carinho e grande auxílio durante a realização deste trabalho;

Às amigas da república, Aline, Angela e Gabriele, pela agradável convivência e pelos momentos de lazer;

À minha grande amiga Danielle, pela presença constante em todos os momentos da minha vida;

Aos meus queridos pais e ao meu irmão, por todo apoio e incentivo para a realização deste curso.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
ÍNDICE DE TABELAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Peptídeos antimicrobianos como parte da resposta imune inata.....	5
2.2. Peptídeos antimicrobianos em mamíferos.....	6
2.3. Peptídeos antimicrobianos de insetos.....	9
2.4. Atividade antimicrobiana em plantas.....	10
2.4.1. Peptídeos antimicrobianos em plantas.....	11
2.4.2. Mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos vegetais.....	14
2.4.3. Compostos orgânicos antimicrobianos das plantas.....	16
2.4.3.1. Fitoanticipinas.....	16
2.4.3.1.1 Saponinas.....	16
2.4.3.1.2. Glicosídeos cianogênicos.....	16
2.4.3.1.3. Glicosinolatos.....	17
2.4.3.2. Fitoalexinas.....	18
2.5. Peptídeos semelhantes à insulina.....	19
2.6. Purificação dos peptídeos catiônicos.....	23
3. OBJETIVOS.....	24
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1. Material vegetal.....	25
4.2. Microrganismos.....	27
4.3. Reagentes.....	27
4.4. Membranas	27
4.5. Resinas cromatográficas.....	27
4.6. Padrões de massa molecular.....	28
4.7. Extração e purificação dos peptídeos de semente madura de soja...	28
4.7.1. Tipo e proporção do tampão de extração.....	28
4.7.2. Extração dos peptídeos.....	28
4.7.3. Fracionamento com sulfato de amônio e aquecimento seletivo.....	29

4.7.3.1. Sulfato de amônio entre 35 e 65% de saturação.....	29
4.7.3.2. Sulfato de amônio 35% de saturação.....	30
4.7.4. Cromatografia de troca aniônica em DEAE-Sepharose.....	30
4.7.5 Cromatografia de troca catiônica em CM-Sepharose.....	31
4.7.6. Cromatografia de exclusão molecular em Superose 12 HR 10/30...	31
4.7.7. Cromatografia de exclusão molecular em Superdex Peptide HR 10/30.....	31
4.7.8. Cromatografia de fase reversa em coluna C ₁₈	32
4.7.9. Determinação da concentração de proteínas.....	32
4.8. Caracterização dos peptídios.....	33
4.8.1. Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida em presença de Tricina (SDS-Tricina-PAGE).....	33
4.8.2. Revelação das proteínas em SDS-Tricina-PAGE.....	34
4.8.3. Determinação da massa molecular por espectrometria de massa...	35
4.8.4. Seqüenciamento dos peptídios isolados.....	36
4.9. Teste de inibição de patógenos.....	36
4.10. Procedimentos ensaiados para a purificação de peptídios das sementes maduras de soja.....	37
4.10.1. Protocolo 01: Fracionamento com sulfato de amônio 35-65% saturação, aquecimento seletivo, cromatografia de troca aniônica e cromatografia de exclusão molecular em Superose 12.....	37
4.10.2. Protocolo 02: Fracionamento com sulfato de amônio 35-65% saturação, aquecimento seletivo, cromatografia de troca aniônica e cromatografia de troca catiônica.....	
4.10.3. Protocolo 03: Aquecimento seletivo, diálise em membrana de 12.000 Da, cromatografia de troca aniônica e cromatografia de exclusão molecular em Superose 12.....	39
4.10.4. Protocolo 04: Precipitação com sulfato de amônio 35-65% saturação, aquecimento seletivo, cromatografia de troca aniônica e cromatografia de exclusão molecular em Superdex Peptide.....	40
4.10.5 Protocolo 05: Precipitação com sulfato de amônio 35% saturação, aquecimento seletivo, cromatografia de troca aniônica e cromatografia de exclusão molecular em Superdex Peptide.....	41
4.10.6 Protoco final: Precipitação com sulfato de amônio 35% saturação, aquecimento seletivo, cromatografia de troca aniônica, cromatografia de exclusão molecular em Superdex Peptide e cromatografia de fase reversa, seguindo-se espectrometria de massa e seqüenciamento do peptídeo.....	42

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
5.1. Tipo e proporção do tampão de extração.....	44
5.2. Seleção de variedades de soja resistentes a patógenos como fonte de peptídeos.....	44
5.3. Purificação dos peptídeos antimicrobianos.....	46
5.3.1. Etapas iniciais não-cromatográficas da purificação.....	46
5.3.2. Etapas Cromatográficas do processo de purificação dos peptídeos catiônicos utilizadas nos diferentes protocolos.....	47
5.3.2.1. Cromatografia de troca aniônica em DEAE-Sephadex.....	48
5.3.2.2. Protocolo 1.....	49
5.3.2.3. Protocolo 2: Cromatografia de troca catiônica.....	51
5.3.2.4. Protocolo 3: Cromatografias de exclusão molecular em Superose 12	53
5.3.2.5. Protocolos 4, 5 e Final: Cromatografias de exclusão molecular em Superdex Peptide.....	56
5.4. Cromatografia de fase reversa.....	62
5.5. Espectrometria de massa e seqüenciamento de peptídeos purificados.....	64
5.6. Atividade antimicrobiana.....	72
6. CONCLUSÕES.....	78
7. PERSPECTIVAS.....	79
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1. Modelo molecular das diferentes classes de CAMPs.....	7
FIGURA 2. Estrutura dos peptídeos antimicrobianos humanos.....	9
FIGURA 3.Representação da interação de um peptídeo catiônico com a membrana externa de uma bactéria Gram negativa	15
FIGURA 4.Exemplo de saponinas antifúngicas de aveia e de plantas da família das solanáceas.....	17
FIGURA 5.Exemplos de glicosídeos cianogênicos, glicosinolatos e seus produtos de degradação.....	18
FIGURA 6. Exemplo de fitoalexinas flavonóides de leguminosas.....	19
FIGURA 7.Fluxogramas das condições de extração das sementes e de preparo das amostras ricas em peptídeos, submetidas à análise por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida com Tricina (SDS-Tricina-PAGE).....	29
FIGURA 8.Representação esquemática da clivagem da ligação peptídica	36
FIGURA 9.Fluxograma dos procedimentos utilizados no Protocolo 01 para a purificação dos peptídeos presentes nas sementes de soja.....	38
FIGURA 10.Fluxograma dos procedimentos utilizados no Protocolo 02 para a purificação dos peptídeos presentes nas sementes de soja.....	40
FIGURA 11.Fluxograma dos procedimentos utilizados no Protocolo 03 para a purificação dos peptídeos presentes nas sementes de soja.....	40
FIGURA 12.Fluxograma dos procedimentos utilizados no Protocolo 04 para a purificação dos peptídeos presentes nas sementes de soja.....	41
FIGURA 13.Fluxograma dos procedimentos utilizados no Protocolo 05 para a purificação dos peptídeos presentes nas sementes de soja.....	42
FIGURA 14.Fluxograma dos procedimentos utilizados no Protocolo Final para a purificação dos peptídeos presentes nas sementes de soja.....	43
FIGURA 15.Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (16,5%), em presença de tricina, de extratos de diferentes variedadesde soja resistentes a patógenos após fracionamento com sulfato de amônio (35-65% de sat.) e aquecimento a 80°C / 15 min.....	45
FIGURA 16.Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (16,5%) em presença de tricina, das cromatografias de troca aniônica, após fracionamento com sulfato de amônio	

35-65% sat. dialisadas em coluna PD-10 ou após precipitação com sulfato de amônio 35% sat. Dialisadas em membrana de volume de exclusão de 1.000 Da.....	48
FIGURA 17. Cromatografia de troca aniônica em coluna DEAE-Sephrose (8,0 mL) dos extratos de sementes maduras de soja da variedade UFV 16 precipitados com sulfato de amônio (35% sat.) e aquecidos a 80 °C / 15 min (Protocolo Final).....	49
FIGURA 18. Cromatografia de exclusão molecular em coluna Superose 12 Da fração catiônica eluída da cromatografia de troca aniônica (Protocolo 1).....	50
FIGURA 19. Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (16,5%) em presença de Tricina das frações eluídas da cromatografia de troca aniônica e das frações 15 a 21 eluídas da cromatografia de exclusão molecular.....	51
FIGURA 20. Cromatografia de troca catiônica em coluna CM-Sephrose Da fração catiônica eluída da cromatografia de troca aniônica (Protocolo 2).....	52
FIGURA 21. Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (16%) em presença de Tricina do <i>pool</i> formado pelas frações eluídas da cromatografia de troca aniônica e das frações 46, 49, 52, 55, 58 e 80 eluídas da cromatografia de troca catiônica.....	53
FIGURA 22. Cromatografia de exclusão molecular em coluna Superose 12 da fração catiônica eluída da cromatografia de troca aniônica (Protocolo 3).....	54
FIGURA 23. Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (16,5%) em presença de Tricina do extrato bruto de sementes de soja da variedade UFV 16, após aquecimento a 80°C/15min, cromatografia de troca aniônica e de exclusão molecular em coluna Superose 12.....	55
FIGURA 24. Cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex Peptide da fração catiônica eluída da cromatografia de troca Aniônica (Protocolo 4).....	56
FIGURA 25. Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (16,5%) em presença de Tricina das frações eluídas da cromatografia de exclusão molecular.....	58
FIGURA 26. Cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex Peptide da fração catiônica eluída da cromatografia de troca aniônica (Protocolo 5).....	59
FIGURA 27. Valores de absorvância a 214 e 280 nm das frações separadas em coluna Superdex Peptide (Protocolo 5).....	59
FIGURA 28. Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (16,5%) em presença de Tricina do <i>pool</i> formado pelas frações eluídas da cromatografia de troca aniônica e cromatografia	

de exclusão molecular em coluna Superdex Peptide (Protocolo 5).....	60
FIGURA 29. Cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex Peptide da fração catiônica eluída da cromatografia de troca aniônica (Protocolo Final).....	62
FIGURA 30. Cromatografia de fase reversa em coluna C ₁₈ do <i>pool</i> 2 eluído da cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex Peptide (Protocolo Final).....	63
FIGURA 31. Espectrometria de massa dos picos eluídos em 28,8 e 30,2% de acetonitrila na cromatografia de fase reversa do P2 eluído da cromatografia de exclusão molecular.....	65
FIGURA 32. Espectrometria de massa do pico eluído em 32,9% de acetonitrila na cromatografia de fase reversa do P2 eluído da cromatografia de exclusão molecular, e as fragmentações dos picos 288,32 e 316,37.....	65
FIGURA 33. Espectrometria de massa do pico eluído em 37,0% de acetonitrila na cromatografia de fase reversa do P2 eluído da cromatografia de exclusão molecular.....	66
FIGURA 34. Espectrometria de massa do pico eluído em 37,6% de acetonitrila na cromatografia de fase reversa do P2 eluído da cromatografia de exclusão molecular.....	67
FIGURA 35. Comparação da sequência de aminoácidos do peptídeo isolado (Pept. Isolado) com as sequências da pró-insulina humana (Pró-insul.Hu), da leg insulina de soja (<i>glycine max</i>), da insulina bovina (Insl. Bov) e da insulina de feijão-de-porco (<i>Canavalia ensiformis</i>) (Insl. Plnt).....	70
FIGURA 36. Sequência de aminoácidos do peptídeo de 8.526 Da comparada com a sequência de aminoácidos da proteína hipotética de <i>Arabidopsis thaliana</i>	71
FIGURA 37. Testes de inibição do crescimento das bactérias <i>Ralstonia solanacearum</i> e <i>Clavibacter michiganensis</i> , pela fração de peptídeos parcialmente purificada por fracionamento com sulfato de amônio 35-65% sat. e aquecimento seletivo.....	73
FIGURA 38. Testes de inibição do crescimento das bactérias <i>Ralstonia solanacearum</i> e <i>Clavibacter michiganensis</i> , para os <i>pools</i> 1, 2 e 3 eluídos da cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex Peptide.....	74
FIGURA 39. Testes de inibição do crescimento das bactérias <i>Ralstonia solanacearum</i> nas diferentes concentrações das frações peptídicas eluídas da cromatografia de exclusão molecular <i>Pool</i> a e <i>Pool</i> b.....	76
FIGURA 40. Testes de inibição do crescimento das bactérias <i>Ralstonia solanacearum</i> nas diferentes concentrações das frações peptídicas eluídas da cromatografia de exclusão molecular <i>Pool</i> c e <i>Pool</i> d.....	77

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
TABELA 1. Peptídeos antimicrobianos presentes em insetos.....	10
TABELA 2. Lista dos filos (Eubactéria, Fungi, Protista e Plantae) e espécies com antígenos semelhantes à insulina testados com anticorpos para insulina humana.....	21
TABELA 3. Variedades de soja e níveis de resistências a doenças.....	26
TABELA 4. Composição do gel de separação (gel de baixo).....	33
TABELA 5. Composição do gel de concentração (gel de cima).....	34
TABELA 6. Cálculo das massas moleculares dos peptídeos identificados no pico eluído em 28,84% de acetonitrila a partir de suas relações m/z e ionizações (Z).....	64
TABELA 7. Cálculo da massa molecular do peptídeo identificado no pico eluído em 37,0% de acetonitrila a partir de sua relação m/z e ionizações (Z).....	66
TABELA 8. Cálculos das massas moleculares dos peptídeos identificados no pico eluído em 37,6% de acetonitrila a partir de suas relações m/z e ionizações (Z).....	68

LISTA DE ABREVIATURAS

BIS	N,N', metileno-bis-acrilamida
CM	Carboximetil
DEAE	Dietilaminoetil
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
MES	Ácido 2-[N-morfolino]etanosulfônico
MM	Massa molecular
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonila
PVP	Polivinilpirrolidona
SDS	Dodecilsulfato de sódio
TFA	Ácido trifluoracético
TRICINA	N-Tris(Hidroximetil)metilglicina
TRIS	Tris(Hidroximetil)aminometano

RESUMO

NASCIMENTO, Danielle Gomes, M.S, Universidade Federal de Viçosa, março de 2003. **Purificação, caracterização bioquímica e atividade antimicrobiana de peptídeos de semente de soja (*Glycine max* [L.] Merrill).** Orientadora: Maria Cristina Baracat Pereira. Conselheiros: Elizabeth Pacheco Batista Fontes e Reginaldo da Silva Romeiro.

As doenças infecciosas estão entre as principais causas de morte da população humana. Esse fato é causado, em grande parte, pelo surgimento de microrganismos multi-resistentes aos antibióticos. Portanto, apesar da disponibilidade de um grande número de antibióticos de última geração, torna-se ainda fundamental buscar compostos que possam atuar como novas drogas a serem utilizadas no combate as doenças infecciosas. Em plantas, a atividade antimicrobiana pode ser demonstrada por vários tipos de moléculas, como as proteínas relacionadas com a patogenicidade, os componentes orgânicos das plantas, as famílias de peptídeos antimicrobianos e as espécies ativas de oxigênio e nitrogênio. Atualmente, peptídeos antimicrobianos de origem vegetal estão sendo utilizados como modelos para o desenho de novas drogas com aplicação nas áreas agrícolas e de saúde. Deste modo, nosso trabalho objetivou a determinação da metodologia mais eficaz para a purificação dos peptídeos catiônicos, presentes em sementes maduras de soja, com atividade antimicrobiana ou outras, e a caracterização bioquímica destes peptídeos visando à obtenção de informações de importância para a elucidação de suas funções biológicas. Os peptídeos de semente madura de soja foram extraídos, na proporção de 1:5 (gramas semente : mL tampão), em tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7,4, contendo KCl 100 mM, EDTA 2 mM, PVP 1,5% (p/v), tiouréia 2 mM, PMSF 1 mM e benzamidina 1 mM por homogeneização do extrato durante 2 h a 4 °C, em banho de gelo. O extrato obtido foi centrifugado a 20.300 x g a 4 °C e o sobrenadante obtido após o final da extração foi fracionado com sulfato de amônio sólido 35% sat. e centrifugado sob as mesmas condições. O sobrenadante foi aquecido a 80°C por 15 min e novamente centrifugado sob as mesmas condições. Após a diálise do extrato em membrana de exclusão de 1.000 Da, foram realizadas as cromatografias de troca aniônica, em coluna DEAE-Sepharose equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0; a de exclusão molecular, em coluna Superdex Peptide equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, contendo 150 mM de NaCl; e a de fase reversa, em coluna C₁₈ equilibrada com acetonitrila 80% e TFA 0,1%, para obtenção dos peptídeos catiônicos purificados. A análise em espectrômetro de massa das frações eluídas do HPLC indicou a presença de compostos de massas moleculares menores do que 500 Da, 678,61 Da e 700,60 Da, a presença de peptídeos com massas moleculares de 5.809,11 Da, 8.526,97 Da e 14.113,18 Da. A sequência de aminoácidos do peptídeo de 5.809,11 Da foi determinada e mostrou alta homologia com as cadeias B da pró-insulina humana e de vários outros organismos, da insulina bovina e da insulina de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformes*). Os compostos presentes em dois *pools* eluídos da cromatografia de exclusão molecular, *pool 2* e *pool 3*, inibiram o crescimento da bactéria Gram-negativa *Ralstonia solanacearum*, enquanto que, para a bactéria Gram-positiva *Clavibacter michiganensis*, somente o *pool 3* exerceu alguma ação, mas com a inibição do

crecimento muito menor do que a obtida para a *Ralstonia solanacearum*. Assim, estes compostos apresentam potencial antimicrobiano a ser explorado na indústria agrícola.

ABSTRACT

NASCIMENTO, Danielle Gomes, M.S, Universidade Federal de Viçosa, March of 2003. **Purification, biochemical characterization and antimicrobial activity of peptides from soybean seed (*Glycine max* [L.] Merrill)**. Adviser: Maria Cristina Baracat Pereira. Committee Members: Elizabeth Pacheco Batista Fontes and Reginaldo da Silva Romeiro.

The infectious diseases are among the main causes of death of the human population. That fact occurs, mainly, for the appearance of multi-resistant microorganisms to the antibiotics. Therefore, in spite of the readiness of a great number of antibiotics of last generation, it becomes still important to look to substances new that can act as new drugs it be used in the combat the infectious diseases. In plants, the antimicrobial activity can be demonstrated by several types of molecules, as the proteins related with the patogenicity, the organic components from the plants, the families of antimicrobial peptides and the active species of oxygen and nitrogen. Now, antimicrobial peptides of vegetable origin are being used as models for the drawing of new drugs with application in the agricultural areas and health. In this way, our work objectified the determination of the most effective methodology for the purification of the cationic peptides, presents in mature seeds of soybean, with antimicrobial activity or other, and the biochemical characterization of these peptides seeking to the obtaining importance information for the elucidation of its biological functions. The peptides of mature seed of soybean was extracted, in the proportion of 1:5 (grams seed: mL), in 25 mM buffer phosphate, pH 7.4, with 100 mM KCl, 2 mM EDTA, 1.5% (p/v) PVP, 2 mM thiourea, 1 mM PMSF and 1 mM benzamidine for stirring of the extract during 2 h at 4 °C and centrifuged (20,300 x g, 4 °C). As the first steps of purification, proteins were recovered from a 35% sat. ammonium sulfate precipitation (2h, 4°C) after centrifugation, incubated at 80 °C for 15min and centrifuged again. After the dialysis of the extract in membrane of 1,000 Da, they were accomplished the chromatography of anion exchangers, in DEAE-Sepharose column equilibrated in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0; the one of gel filtration, in Superdex Peptide column equilibrated in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, with 150 mM of NaCl; and the one RP-HPLC, in C18 column equilibrated with acetonitrile 80% and TFA 0,1%, for obtaining of the cationic peptides purified. The analysis in mass spectrometer of the fractions eluted from HPLC indicated the presence of composed of smaller molecular mass than 500 Da, 678.61 Da and 700.60 Da, the peptides presence with molecular mass of 5,809.11 Da, 8,526.97 Da and 14,113.18 Da. The sequence of amino acids of the peptide of 5,809.11 Da was determined and it showed high homology with the chain B of the human pro-insulin and of several other organisms, of the bovine insulin and of jack bean insulin (*Canavalia ensiformes*). The present compositions in two pools eluted of the chromatography of molecular exclusion, pool 2 and pool 3, inhibited the growth of the bacteria Gram-negative *Ralstonia solanacearum*, while, for the bacteria Gram-positive *Clavibacter michiganensis*, only the pool 3 exercised some action, but with the inhibition smaller growth than obtained it for the *Ralstonia solanacearum*. Thus, these matters own antimicrobial potential to be explored in the agricultural industry.

1. INTRODUÇÃO

As doenças infecciosas estão entre as principais causas de morte da população humana. Esse fato é causado, em grande parte, pelo surgimento de microrganismos multi-resistentes aos antibióticos. Portanto, apesar da disponibilidade de um grande número de antibióticos de última geração, torna-se ainda fundamental buscar compostos que possam atuar como novas drogas a serem utilizadas no combate as doenças infecciosas (Lohner & Staudegger, 2001).

O surgimento do grande número atual de cepas bacterianas resistentes pode ter várias origens, sendo uma delas decorrente do próprio tipo de vida do ser humano. O principal fator é, sem dúvida, o consumo excessivo e inapropriado de antibióticos por homens e outros animais, e a utilização de agentes de defesa na agricultura. A prescrição do antibiótico é geralmente empírica e sem a identificação prévia do agente patogênico através de exames laboratoriais. Além disso, a sua venda sem exigência de uma prescrição médica em alguns países, associada ao suprimento irregular desse medicamento, à baixa qualidade da medicação e ao seu mal uso pelos pacientes (que muitas vezes não completam o tratamento), contribuem para a seleção de novos microrganismos multi-resistentes (Lohner & Staudegger, 2001).

Associada a isso, uma grande quantidade de agentes antimicrobianos vem sendo usada na agropecuária para promover o controle microbiano e favorecer o crescimento de plantas e animais, o que ocasiona um aumento da resistência de microrganismos. Ao mesmo tempo, o aumento da migração da população e o transporte de animais ou de produtos de origem animal trazem doenças para áreas onde nunca haviam se instalado, resultando na dispersão de microrganismos patogênicos resistentes aos antibióticos ou agentes de defesa. Mudanças ambientais, tais como desmatamento e alterações climáticas também proporcionam contato mais íntimo dos homens com animais e insetos que transmitem doenças muitas vezes desconhecidas (Lohner & Staudegger, 2001).

O mesmo quadro pode ser verificado no que diz respeito aos fitopatógenos. O surgimento de resistência de fungos fitopatogênicos de importância agrônômica é considerado um fator limitante na eficácia e na vida útil das mais variadas estratégias de controle de doenças (Heaney *et al.*, 1994). Muitos gêneros tais

como *Aspergillus*, *Botrytis*, *Venturia*, *Ustilago*, *Marnaporte*, *Colletotrichum*, *Alternaria*, *Cercospora*, *Cladosporium* e *Penicillium* têm desenvolvido estratégias elegantes de resistência contra os fungicidas mais amplamente (Steffens *et al.*, 1996). Nos últimos anos, tem-se constatado que mesmo fungicidas de amplo espectro de ação como o Benomyl tornaram-se alvo de resistência (Tanaka *et al.*, 1997).

Conforme descrito anteriormente, o uso indiscriminado de drogas é o principal fator de indução à resistência. Contudo, a prevenção desse abuso não é garantia de que a susceptibilidade aos agentes antimicrobianos seja um fator reversível, uma vez que os efeitos provocados pelos antimicrobianos na fisiologia e ecologia dos microrganismos impossibilitam, cada vez mais, o retorno ao estado de susceptibilidade anterior. Dessa forma, o uso de novas tecnologias para o desenvolvimento de drogas mais eficazes constitui uma estratégia promissora no campo da biotecnologia, uma vez que possibilitará iniciativa de prospecção de novas classes de moléculas naturais e/ou sintéticas, capazes de neutralizar ou de danificar o patógeno-alvo, ao invés de inviabilizá-lo geneticamente, inibindo assim o desenvolvimento da resistência (Heinemann *et al.*, 2000).

Apesar do aumento de resistência aos antibióticos em uso para a terapia animal que vem ocorrendo, poucas novas classes estruturais de agentes antimicrobianos têm chegado às farmácias nas últimas décadas. Com a descoberta das diferentes classes estruturais de peptídeos antimicrobianos, em diversos tipos de organismos, cresce o otimismo de que alguns destes compostos possam ser empregados nas terapias em humanos (Ganz & Lehrer, 1999). Um exemplo dessa abordagem são os análogos sintéticos da magainina II, peptídeo proveniente da secreção da pele do anfíbio africano *Xenopus laevis* (Zasloff, 1987), que foram testados com sucesso na inibição da germinação de conídios de *Cryphonectria parasitica*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, e *Septoria musiva*, e que não provocaram nenhuma interferência detectável na germinação do pólen dos organismos hospedeiros, além de serem eficazes também contra as bactérias *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia amylovora* e *Pseudomonas syringae*. As diferenças significativas encontradas na sensibilidade entre os microrganismos e as células vegetais têm mostrado que tais peptídeos podem ser úteis como modelos para o desenho de genes de resistência (Powell *et al.*, 1995). O uso das magaininas na agricultura não se restringe a cultivares frutíferos ou

alimentícios de um modo geral, mas abrange também o ramo de plantas ornamentais geneticamente modificadas, as quais expressam genes de magaininas resistentes a fungos e outros patógenos causadores de lesões. Da mesma forma, a magainina II já vem sendo utilizada como princípio ativo na fabricação de drogas como o LOCILEXÔ, que é um creme de uso tópico com ação microbicida e empregado no tratamento da infecção de úlceras diabéticas. Além disso, derivados da magainina II têm sido amplamente aplicados nas terapias contra o câncer, no tratamento de conjuntivites, de acne, de doenças sexualmente transmissíveis, de micoses, além de serem drogas promissoras no tratamento da gripe (<http://www.magainin.com>).

Assim, sabe-se que atualmente peptídeos antimicrobianos de origem vegetal estão sendo utilizados como modelos para o desenho de novas drogas com aplicação nas áreas agrícolas e de saúde. Deste modo, nosso trabalho experimental objetivou a determinação da metodologia mais eficaz para a purificação dos peptídeos catiônicos presentes em sementes maduras de soja, com atividade antimicrobiana ou outras, e a caracterização bioquímica destes peptídeos, visando à obtenção de informações de importância para a elucidação de suas funções biológicas e futura aplicação no desenvolvimento de agentes antimicrobianos para a defesa animal e vegetal.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Os peptídeos são constituintes naturais dos sistemas vivos e podem ser encontrados como hormônios, inibidores bioquímicos, antígenos, fatores de crescimento, carreadores transmembrana, agentes antimicrobianos, dentre outros.

Em plantas, os peptídeos agem em diversos mecanismos importantes. Têm um papel crucial em seu crescimento e desenvolvimento, exemplificando o peptídeo CLAVATA 3 responsável pela regulação do crescimento meristemático (Matsubayashi, 2001, citando vários autores; Lindsey *et al.*, 2002, citando vários autores); no mecanismo de defesa em resposta ao ataque de patógenos, exemplificando os peptídeos com atividade antimicrobiana (Garcia-Olmedo *et al.*, 1998, Hancock & Lehrer, 1998, Hancock & Chapple, 1999); no mecanismo de ativação de genes de defesa por ação hormonal, exemplificando a sistemina, que interage com um receptor transmembrana para a liberação do ácido linolênico das membranas, possibilitando sua conversão em ácido jasmônico, responsável pela ativação de genes de defesa (Pearce *et al.*, 1991; Farmer & Ryan, 1992); no controle da divisão e expansão celular, exemplificando as fitossulfoquinas, responsáveis pela divisão celular, e os peptídeos da classe Polaris, responsáveis pela expansão celular (Lindsey *et al.*, 2002, citando vários autores); e na auto-incompatibilidade do pólen, exemplificando o peptídeo SCR constituinte do mecanismo genético de algumas plantas, responsável pela auto-incompatibilidade esporofítica (Brugiere *et al.*, 2000; Matsubayashi, 2001, citando vários autores).

Em função da importância funcional dos peptídeos para os organismos, associada à extensa gama de atividades e à falta de conhecimento dos mecanismos de ação por eles empregados, esforços têm sido direcionados no sentido de caracterizar peptídeos biologicamente ativos, especialmente aqueles com atividade antimicrobiana, visando identificar novos mecanismos de ação para desenvolver compostos de defesa para uso nas indústrias agrícola, farmacêutica e veterinária.

2.1. PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS COMO PARTE DA RESPOSTA IMUNE INATA

Mais de 700 peptídeos antimicrobianos já foram identificados em todas as espécies vivas, incluindo bactérias, fungos, insetos, moluscos, crustáceos, aracnídeos, plantas, pássaros, anfíbios, peixes, mamíferos, entre outros. Em geral, são moléculas pequenas de até 5 kDa que exibem um alto teor de aminoácidos básicos e, pelo menos, 50% de aminoácidos hidrofóbicos (Andreu & Rivas, 1998; Bulet *et al.*, 1999; Hancock & Diamond, 2000). Apresentam um amplo espectro de atividade contra bactérias, fungos, vírus e parasitas. O mecanismo de ação mais bem conhecido é através da sua inserção na membrana celular dos microrganismos, o que causa a destruição ou a permeabilização da mesma, levando o microrganismo à morte. Alternativamente, os peptídeos antimicrobianos podem se ligar a um receptor da membrana, levando a uma perda específica de sua função. Além disso, ao se translocarem através da membrana, essas moléculas podem atuar intracelularmente, impedindo a síntese de metabólitos importantes para o microrganismo. Por atuarem em diferentes compartimentos celulares, esses compostos tornam-se candidatos promissores para o desenvolvimento de drogas importantes no combate a patógenos resistentes aos antibióticos convencionais (Lohner, 2001).

Todos os peptídeos antimicrobianos são derivados de grandes precursores, incluindo uma seqüência sinal. Modificações pós-traducionais, incluindo processamento proteolítico e em alguns casos glicosilação (Bulet *et al.*, 1993), amidação carboxi-terminal, isomerização amino-acídica (Simmaco *et al.*, 1998) e halogenação são importantes para o rearranjo final dos peptídeos (Zasloff, 2002, citando vários autores). Um padrão complexo de modificações envolve a ciclização de dois pequenos peptídeos levando à formação de um peptídeo completamente circular, a α -defensina isolada de neutrófilos de macaco *Rhesus* (Tang *et al.*, 1999). Alguns peptídeos são originados por proteólise de grandes proteínas, como a buforina II, originada da histona 2A e a lactoferricina, originada da lactoferrina (Zasloff, 2002, citando vários autores).

Os peptídeos antimicrobianos podem ser agrupados de acordo com suas propriedades químicas e estruturais em 2 classes: lineares e cíclicos. Os lineares, não apresentam o aminoácido cisteína em sua composição, e podem formar uma

a-hélice anfipática após contato com a membrana celular. Eles se associam com os lipídeos da membrana das células alvo formando os canais iônicos. Esta classe é bem representada pelas cecropinas presentes nas hemolinfas de muitos invertebrados em respostas a injúrias ou infecções, e pelas megaininas secretadas por glândulas da pele de anfíbios (Broekaert *et al.*, 1997; Hara *et al.*, 2001). Os peptídeos lineares também podem ser ricos em um determinado tipo de aminoácido, tais como prolina, histidina e triptofano, tendo como exemplo, a indolicidina bovina, (Rozek *et al.*, 2000).

Os cíclicos são peptídeos ricos-em-cisteína, apresentando um padrão de estrutura tridimensional complexo estabilizado por cisteínas, predominando estruturas folhas β antiparalelas. Esta numerosa classe envolve peptídeos diferindo no comprimento, número de cisteínas, número de ligações dissulfeto ou padrão de enovelamento (Boman, 1995). Estes peptídeos podem ter as extremidades amino-terminal abertas, como por exemplo, a drosomicina da mosca *Drosophila melanogaster* (Landon *et al.*, 1997), ou as extremidades fechadas, como por exemplo, a teta-defensina de macaco (Trabi *et al.*, 2001).

Os peptídeos antimicrobianos apresentam tamanho pequeno e propriedades físico-químicas comuns, e podem ser divididos em quatro classes de acordo com o padrão de estrutura tridimensional. Os mais comuns são os peptídeos contendo folhas- β estabilizadas por 2 a 4 ligações dissulfeto (e ocasionalmente contendo um pequeno segmento de a-hélice), e os peptídeos não estruturados, que se enovelam em a-hélices anfipáticas quando em contato com membranas (Figuras 1a e 1b). Peptídeos estendidos com predominância de um ou dois aminoácidos do tipo prolina, triptofano ou histidina e peptídeos em forma de *loop* contendo uma única ligação dissulfeto, são os menos comuns (Figuras 1c e 1d) (Hancock & Diamond, 2000).

2.2. PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS EM MAMÍFEROS

Diariamente, os mamíferos são expostos a muitos patógenos em potencial por meio de ingestão, inalação e contato com superfícies infectadas. Como as respostas humoral e celular adaptativa requerem a expansão clonal dos linfócitos B e T, e levam até 7 dias para realmente estarem ativas contra as infecções, elas não são as responsáveis por impedir a instalação inicial desses organismos.

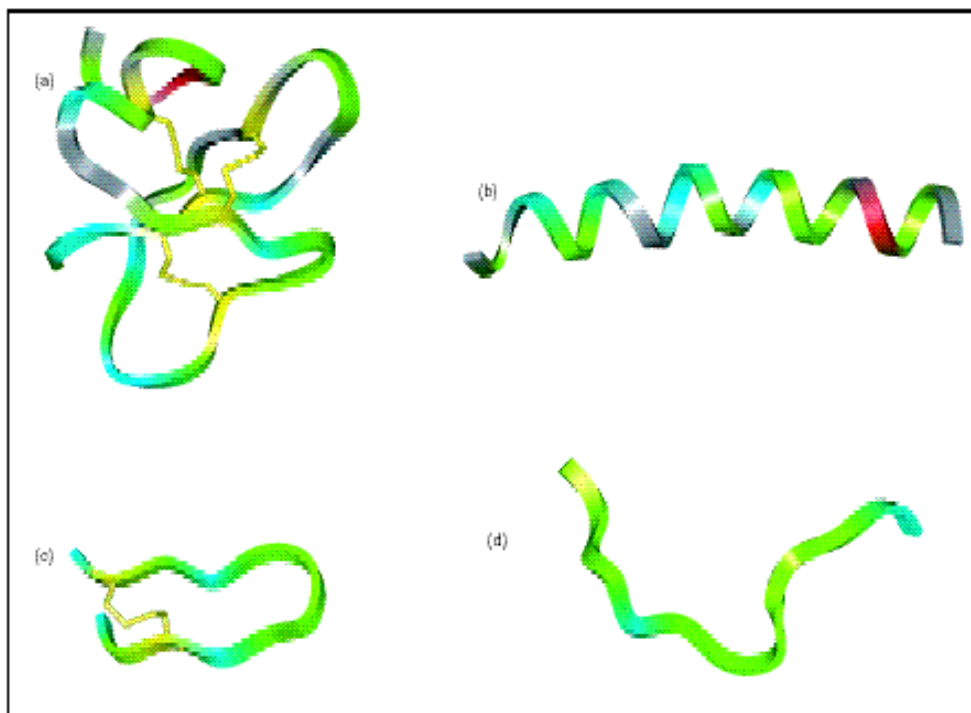


Figura 1 – Modelo molecular das diferentes classes de CAMPs. Esses modelos são baseados na espectroscopia de ressonância nuclear magnética bi-dimensional dos peptídeos em solução aquosa para a β -defensina-2 humana (HBD-2) ou em condições que imitam uma membrana (outros peptídeos). a) β -defensina-2 humana (HBD-2), formada por uma estrutura contendo três folhas- β e um pequeno segmento de α -hélice no N-terminal estabilizados por três ligações dissulfeto. b) magainina 2, formada por uma α -hélice anfipática (são ideais para manter contato com membranas de bactérias). c) bactenecina bovina, formada por uma estrutura do tipo *loop* volta β . d) endolicidina bovina, um peptídeo linear com estrutura estendida (Hancock, 2001).

Portanto, os mamíferos dependem da resposta imune inata para se defenderem de infecção (Janeway, 1998). Os efetores da resposta imune inata incluem as células fagocíticas, tais como neutrófilos e macrófagos, outros leucócitos, incluindo mastócitos, proteínas do soro, tais como as do sistema de complemento, e peptídeos antimicrobianos catiônicos (CAMPs) (Hancock & Diamond, 2000). Esses últimos são elementos primitivos da resposta imune de todas as espécies de ser vivo, cujas vias de indução são relativamente conservadas em vertebrados, insetos e plantas (Hoffmann *et al.*, 1999, Dangl & Jones, 2001). Recentemente, foi

demonstrada a participação deles na modulação do processo inflamatório de mamíferos (Hancock & Diamond, 2000). Os humanos produzem vários tipos de peptídeos antimicrobianos, sendo as defensinas, as catelicidinas e as trombocidinas os mais comuns (Peschel, 2002). Defensinas (Figura 02) são CAMPs de 3-5 kDa, distribuídas em duas subfamílias, as α -defensinas e as β -defensinas, organizadas em uma estrutura composta de três folhas β antiparalelas, estabilizadas por três ligações dissulfeto. São abundantes em grânulos de células fagocitárias do sangue. Estes grânulos se fundem com vesículas de fagocitose contendo os microrganismos, onde as defensinas podem atuar (via ativação de espécies de oxigênio) conjuntamente com outras proteínas antimicrobianas, provocando a morte do microrganismo encerrado na vesícula (Broekaert *et al.*, 1995; Schröder, 1999). As defensinas são também secretadas por células epiteliais dos intestinos, das vias aéreas e dos neutrófilos, onde podem ajudar a manter a flora microbiana normal em estado estacionário (Broekaert *et al.*, 1995). As catelicidinas são abundantes em mamíferos e são originadas de proteínas precursoras do domínio inibidor amino-terminal da catepsina L (catelina) (Lehrer & Ganz, 2002). Os humanos produzem somente uma catelicidina, a LL-37 (Figura 02), a qual é encontrada em vários epitélios e em neutrófilos na forma de uma estrutura α -hélice. As trombocidinas (Figura 02) são liberadas das plaquetas e originadas de deleções na região carboxi-terminal de citocinas CXC (Krijgsveld *et al.*, 2000).

Defensinas, catelicidinas e trombocidinas são constituintes importantes do sistema imune inato, que reconhece e inativa patógenos microbianos. O sistema de imunidade inata é independente dos anticorpos e das células T do sistema imune adaptativo e é baseado nos receptores pré-formados que reconhecem alvos moleculares bacterianos invariáveis e têm um amplo espectro de componentes antimicrobianos ativos. As defensinas e as catelicidinas também têm atividade semelhante a citocinas e recrutam leucócitos, e as trombocidinas são derivadas das citocinas por clivagem proteolítica. Assim, estes peptídeos têm como função unir as respostas dos sistemas imune inato e adaptativo, além de interagir com os microrganismos para inativá-los (Peschel, 2002).

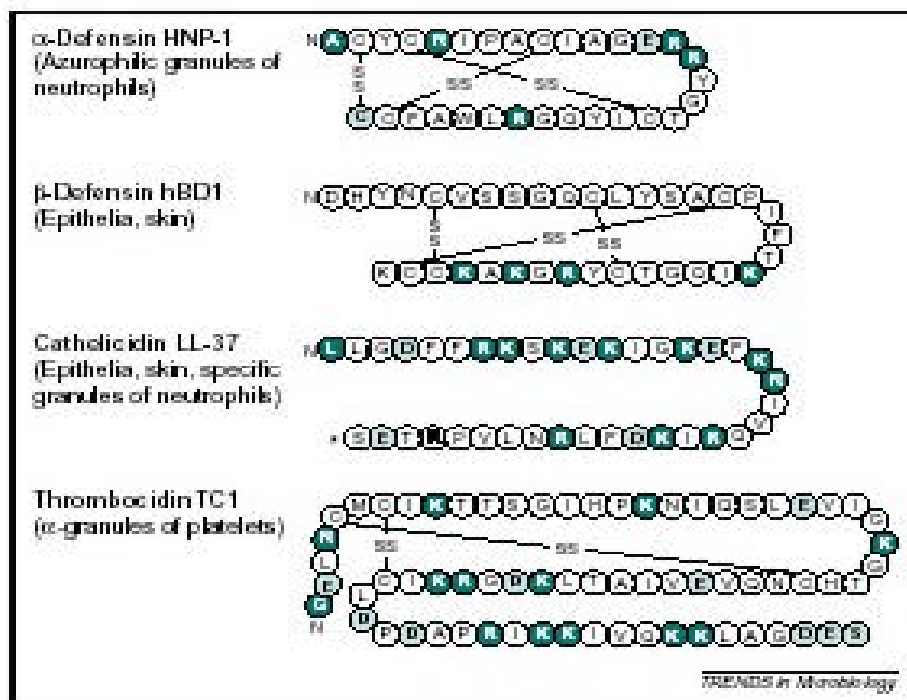


Figura 2 – Estrutura dos peptídeos antimicrobianos humanos. Resíduos de amoniácidos com carga positiva e negativa estão indicados em verde escuro e em verde claro, respectivamente. O amino-terminal está indicado com a letra N. O asterisco no final da LL-37 indica que o peptídeo é amidado na carboxila terminal. SS indica ligação dissulfeto (Peschel, 2002).

2.3. PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS DE INSETOS

Os insetos são particularmente resistentes a microorganismos. Seu sistema de defesa atua desencadeando um conjunto de reações, incluindo-se a produção de moléculas citotóxicas, a fagocitose de bactérias ou a encapsulação de parasitas grandes pelas células da hemolinfa, e ainda a síntese induzida de um conjunto de peptídeos ou proteínas secretadas na hemolinfa, onde atuam sinergisticamente, visando destruir os organismos invasores (Hoffmann, 1995).

O sistema de defesa dos insetos hospedeiros compartilha várias características básicas com o sistema de resposta da fase aguda de mamíferos infectados, especialmente em nível do controle de expressão gênica de proteínas e peptídeos envolvidos na defesa (Hoffmann, 1995). Os diversos peptídeos antimicrobianos de insetos estão distribuídos em quatro grupos identificados na Tabela 1 (Schröder, 1999).

Tabela 1 - Peptídeos antimicrobianos presentes em insetos

Grupos	Peptídeos antimicrobianos	Pontes S-S	Indutibilidade	Atividade contra ^a		
				Bactéria Gram +	Bactéria Gram -	Fungos
I	Cecropinas	Não	Sim	(+)	+++	(+)
II	Drosocina	Não	Sim	(+)	+++	-
	Apidaectina	Não	Sim	(+)	+++	-
	Diptericina	Não	Sim	(+)	+++	-
	Metchnikowina	Não	Sim	+++	+++	+++
	Thanatina	1	Sim	+++	+++	+++
III	Drosomicina	4	Sim	-	-	+++
IV	Defensina	3	Sim	+++	(+)	-

^a Escala crescente de atividade antimicrobiana: + a ++++. Os parênteses indicam possível efeito do peptídeo.

O primeiro grupo inclui as cecropinas, peptídeos catiônicos de 4 kDa, que atuam especialmente sobre bactérias Gram-negativas e possuem ação antibiótica ao nível de membranas dos microrganismos, pois apresentam propriedades formadoras de canais e podem permeabilizar a bicamada lipídica. O segundo grupo inclui os peptídeos catiônicos ricos-em-prolina, que são também primariamente ativos contra bactérias Gram-negativas, com alguns representantes efetivos contra bactérias Gram-positivas. O terceiro grupo são peptídeos de 5 kDa ricos-em-prolina, contendo 4 pontes dissulfeto e são primariamente ativos contra fungos. E o quarto grupo de peptídeos antimicrobianos de insetos compreende as defensinas, compostas de 38-43 resíduos de aminoácidos e três pontes dissulfeto. Essas moléculas são moderadamente catiônicas, afetam primariamente bactérias Gram-positivas e são expressas constitutivamente em níveis basais ou são induzidas pela adição da bactéria na larva do inseto (Schröder, 1999).

2.4. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA EM PLANTAS

As plantas apresentam um mecanismo de defesa complexo. Elas defendem-se de seus agressores por um conjunto de mecanismos que são disparados em resposta ao ataque, denominadas defesas induzidas, ou são defesas constitutivas, exercendo função no desenvolvimento normal da planta,

que são as defesas pré-formadas (Garcia-Olmedo *et al.*, 2001). Em plantas, diversos tipos de moléculas exibem atividade antimicrobiana, como:

- Proteínas relacionadas com a patogenicidade, exemplificando as hidrolases (quitinases e β -1,3 glicanases);
- Componentes orgânicos das plantas como as fitoanticipinas e fitoalexinas, exemplificando as saponinas, os glicosídeos cianogênicos, os glicosinolatos e os flavonóides ;
- Famílias de peptídeos antimicrobianos
- Espécies ativas de oxigênio e nitrogênio, exemplificando o peróxido de hidrogênio e o peróxido nítrico.

2.4.1. PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS EM PLANTAS

Evidências sugerem a participação ativa de peptídeos antimicrobianos na defesa de plantas, devido à ausência de um sistema imune adaptativo comparado ao dos vertebrados (Garcia-Olmedo *et al.*, 1998, citando vários autores; Schröder, 1999).

Dez famílias de peptídeos antimicrobianos, com massas moleculares variando de 2 a 9 kDa, foram identificadas em plantas. Estes peptídeos correspondem a Tioninas, Defensinas, Proteínas de Transferência de Lipídios, Peptídeos semelhantes-à-Haveína, Peptídeos semelhantes-a-nós, MBP1, Ib-AMP, Snakins, Sheferdinas e Peptídeos macrocíclicos. Os peptídeos antimicrobianos são considerados de grande importância na defesa de plantas como parte da barreira constitutiva pré-existente, e também como parte da defesa como resposta induzida por infecção (Garcia-Olmedo *et al.*, 1998; 2001).

As tioninas compreendem uma família de peptídeos antimicrobianos altamente básicos, ricos em cisteína, contendo 45-47 resíduos de aminoácidos, que ocorrem em diversas espécies de plantas. São encontradas em endospermas de sementes, caules, raízes, em folhas estressadas por patógenos ou em folhas de plantas estioladas (Thevissen *et al.*, 1996). Podem ser classificadas em 5 grupos, sendo os grupos I e II com quatro ligações dissulfeto, os grupos III e IV com três, e um grupo contendo duas das ligações dissulfeto que aparecem nos grupos anteriores mais uma terceira em posição diferente (Garcia-Olmedo *et al.*, 1998). As tioninas são tóxicas para bactérias Gram-positivas ou Gram-negativas,

fungos, leveduras ou diferentes tipos de células de mamíferos (Thevissen *et al.*, 1996; Schröder, 1999). A toxidez ocorre por interação eletrostática das tioninas com fosfolipídios de membrana carregados negativamente, seguindo-se à formação de poros, ou interações específicas com domínios nas membranas que medeiam a transdução de sinais celulares em eucariotos, gerando a liberação de compostos específicos e a ativação de enzimas específicas e de canais de cálcio (Thevissen *et al.*, 1996; Garcia-Olmedo *et al.*, 1998).

O termo defensina de plantas foi usado pela primeira vez por Terras *et al.* (1995) para designar a família de peptídeos de plantas que apresentou propriedades estruturais e funcionais semelhantes às das defensinas de insetos e de mamíferos. Mendez *et al.* (1990) isolaram os primeiros membros da família das defensinas de plantas. Estes peptídeos, obtidos a partir de grãos de trigo e cevada, foram inicialmente chamados γ -tioninas por apresentarem tamanho de 5 kDa e quatro ligações dissulfeto, assim como as α - e β -tioninas (Broekaert *et al.*, 1995). Entretanto, trabalhos posteriores mostraram que as defensinas foram erroneamente chamadas de γ -tioninas pois são moléculas não relacionadas estruturalmente às α - e β -tioninas (Terras *et al.*, 1992; Bruix *et al.*, 1993; Bohlmann, 1994). As defensinas que são peptídeos ricos em cisteína, com carga líquida positiva e massa molecular em torno de 5 kDa, apresentam propriedades estruturais e funcionais semelhantes às das defensinas de insetos e de mamíferos e um amplo espectro de ação contra fungos e/ou bactérias. São classificadas em quatro grupos de acordo com sua atividade antimicrobiana, atuam numa faixa de concentração micromolar e possuem baixa toxidez para células de animais e de plantas (Garcia-Olmedo *et al.*, 1998).

As proteínas de Transferência de Lipídios (LTPs) correspondem a uma família de peptídeos de 9 kDa contendo 90 a 95 resíduos de aminoácidos, e são encontrados em diversos tecidos de muitas espécies de mono- e dicotiledôneas. Estão envolvidas em defesa de plantas, mas a princípio foram erroneamente consideradas como transportadores de lipídios entre organelas (Terras *et al.*, 1992; Molina *et al.*, 1993; Segura *et al.*, 1993; Garcia-Olmedo *et al.*, 1998; Carvalho *et al.*, 2001).

A proteína Haveína, abundante no látex de seringueiras e possuindo 43 resíduos de aminoácidos, é um peptídeo rico em cisteína/glicina, homólogo ao domínio de ligação da quitina de muitas proteínas multidomínios de plantas, e

homólogo a outros peptídeos de domínio simples que têm atividade antimicrobiana em plantas (Broekaert *et al.*, 1992). Os peptídeos antimicrobianos semelhantes-à-haveína extraídos de pimenta doce contêm as mesmas oito ligações dissulfeto presentes na haveína, apresentando estrutura contendo três folhas β e uma α -hélice que se liga à segunda e à terceira folhas β (Garcia-Olmedo *et al.*, 1998).

Os peptídeos antimicrobianos com padrão de enovelamento semelhante-a-nós (knotinas) possuem de 36 a 37 resíduos de aminoácidos e seis ligações dissulfeto, e apresentam homologia com os peptídeos antimicrobianos semelhantes-à-haveína (Broekaert *et al.*, 1990). Ambas as famílias de peptídeos inibem o crescimento de uma ampla gama de fungos e bactérias Gram-positivas *in vitro* e suas atividades são revertidas por cátions bivalentes (Cammue *et al.*, 1992).

Duas outras famílias de peptídeos antimicrobianos contendo quatro ligações dissulfeto têm sido descritas: MBP-1, com 33 resíduos de aminoácidos e extraída do milho, e o grupo de peptídeos de 20 resíduos de aminoácidos, Ib-AMPs, isolados de sementes de *Impatiens balsamina* (Tailor *et al.*, 1997; Patel *et al.*, 1998).

Uma nova família de peptídeos antimicrobianos contendo 12 ligações dissulfeto foi denominada *snakins* (St-SN1) por Segura *et al.* (1999). Um peptídeo com 63 resíduos de aminoácidos e ativo contra fungos e bactérias Gram-positivas e Gram-negativas em concentrações inferiores a 10 μ M foi extraído de batatas e parece ter distribuição ubíqua, embora somente este membro da família tenha sido até então caracterizado.

Recentemente duas novas famílias de peptídeos antimicrobianos foram descritas. A primeira família corresponde às sheferdinas, que são peptídeos lineares ricos em glicina/histidina, foram isolados de raízes de uma planta conhecida como *Shepherd's purse* (*Capsella bursa-pastoris*), possuem de 28 a 38 resíduos de aminoácidos e são ativos contra bactérias e fungos (Park *et al.*, 2000). A segunda família compreende os peptídeos macrocíclicos, purificados de diferentes plantas da família Rubiaceae (café e outras plantas tropicais) durante pesquisas que buscavam componentes anti-HIV, que possuem de 29 a 31 resíduos de aminoácidos, duas ligações dissulfeto e são ativo contra bactérias Gram-positivas (Tam *et al.*, 1999).

2.4.2.MECANISMOS DE AÇÃO DOS PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS VEGETAIS

Os fatores determinantes dos mecanismos antimicrobianos desses peptídeos estão relacionados às características das membranas das células microbianas e à natureza físico-química do peptídeo. Acredita-se que a atividade antimicrobiana e a seletividade dos peptídeos sejam determinadas pelo modo de interação com as membranas celulares dos microrganismos (Liang & Kim, 1999). A maioria dos peptídeos possui carga líquida positiva e hidrofobicidade relativamente alta em pH fisiológico, o que facilita a ligação e a inserção a membranas das células microbianas. Em bactérias Gram-positivas, a interação ocorrerá com a única membrana citoplasmática que envolve a célula bacteriana, enquanto que em bactérias Gram-negativas, interações com a membrana externa (que funciona como parede celular) e com a membrana citoplasmática se fazem necessárias para a efetivação da atividade bactericida (Liang & Kim, 1999).

Os peptídeos catiônicos interagem possivelmente com os lipopolissacarídeos (LPS) encontrados na membrana externa das bactérias Gram-negativas e, subsequentemente, geram uma via de transporte rápida para o transporte do próprio peptídeo. Nessa via, a primeira etapa é a interação de policações (incluindo peptídeos catiônicos e aminoglicosídeos) com as moléculas de LPS da superfície celular. Esse fato aparentemente ocorre em função de os peptídeos possuírem uma afinidade três vezes maior pelas moléculas de LPS do que com os cátions divalentes nativos como Ca^{++} ou Mg^{++} . Assim, a propriedade de barreira seletiva da membrana é destruída e a célula bacteriana fica exposta à passagem de uma grande variedade de moléculas, incluindo compostos hidrofóbicos, pequenas proteínas e/ou compostos antimicrobianos, e, o mais importante, à importação do próprio peptídeo que causou o efeito perturbador no envoltório celular. Esse mecanismo explica como os peptídeos catiônicos ligam-se e inibem a endotoxemia (liberação de LPS) e como eles podem ser utilizados sinergisticamente aos antibióticos convencionais (Cristensen *et al.*, 1988; Tejada *et al.*, 1995). Os diferentes peptídeos diferem em sua eficácia. Certamente alguns deles são específicos para bactérias Gram-positivas porque não possuem a capacidade de criar um sistema de transporte próprio, necessário para a atividade

bactericida contra Gram-negativas (Cristensen *et al.*, 1988; Tejada *et al.*, 1995).

A morte de bactérias Gram-positivas ou Gram-negativas está ligada à formação de canais na membrana citoplasmática (Liang & Kim, 1999). Os agregados moleculares formam um aglomerado com sua face hidrofóbica voltada para o interior da membrana e sua face hidrofílica voltada para o meio extracelular e para o interior do citoplasma ou para o espaço interplasmático, formando um canal (Figura 3). Tendo a integridade da membrana destruída, a célula morre. A capacidade de formar canais é favorecida pelo grande potencial da membrana, pelo alto nível de lipídeos negativamente carregados, pela falta de lipídeos catiônicos e colesterol, que são características da célula bacteriana. As células eucarióticas, por outro lado, têm baixo potencial de membrana, altos níveis de colesterol e uma quantidade modesta de lipídeos aniônicos.

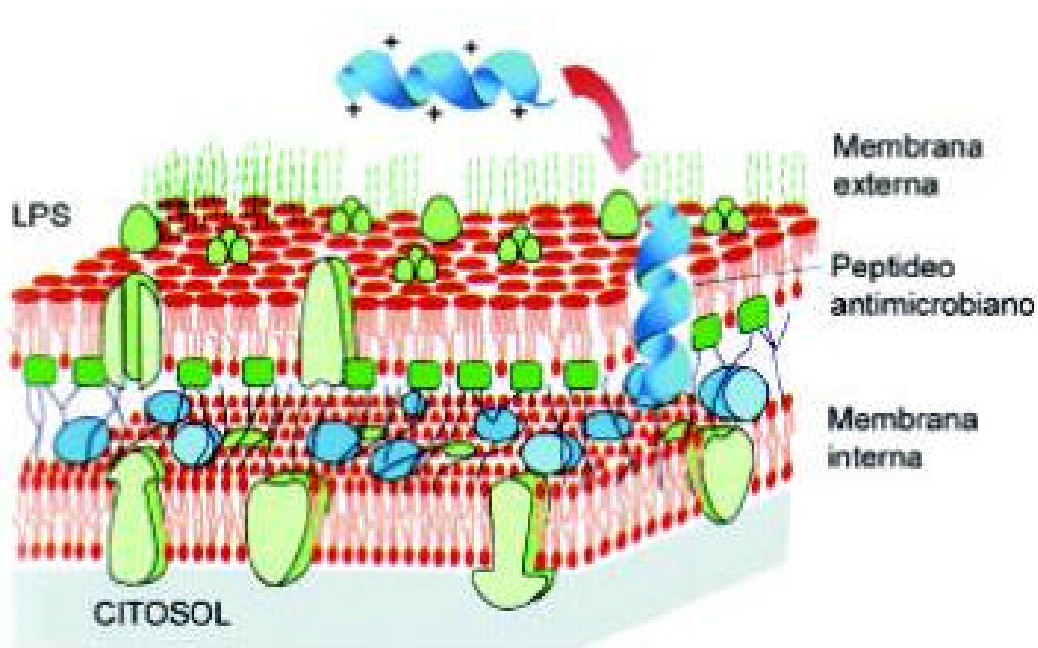


Figura 3- Representação da interação de um peptídeo catiônico com a membrana externa de uma bactéria Gram-negativa. As cargas positivas de um peptídeo catiônico interagem com as cargas negativas da superfície do LPS. O deslocamento de outros cátions, de menor afinidade, facilita a sua inserção através da membrana, formando um poro (Liang & Kim, 1999).

2.4.3.COMPOSTOS ORGÂNICOS ANTIMICROBIANOS DAS PLANTAS

Muitas plantas produzem metabólitos antimicrobianos secundários, ao lado dos peptídeos e proteínas de defesa, como parte de seu crescimento e desenvolvimento normal ou em resposta ao ataque de patógenos ou ao estresse. Componentes antifúngicos pré-formados presentes constitutivamente em plantas saudáveis, como as fitoanticipinas, representam barreiras químicas contra infecção e podem proteger a planta contra o ataque de uma grande variedade de patógenos. Em contraste, componentes induzidos, como as fitoalexinas, não estão presentes em plantas saudáveis mas são sintetizados em resposta ao ataque dos patógenos ou ao estresse como parte da resposta de defesa da plantas. Esses componentes permanecem restritos ao tecido colonizado pelos fungos e às células ao redor do local da infecção.

2.4.3.1. FITOANTICIPINAS

Alguns metabólitos secundários como os glicosídeos cianogênicos, os glicosinolatos e algumas saponinas são estocados nas células das plantas como precursores inativos, e são convertidos em antibióticos biologicamente ativos pelas enzimas das plantas em resposta ao ataque de patógenos (Morrissey & Osbourn, 1999, citando vários autores).

2.4.3.1.1. SAPONINAS

São moléculas glicosiladas, triterpenóides, esteróides ou alcalóides esteroidais que ocorrem constitutivamente em muitas espécies de plantas e geralmente têm atividade antifúngica (Figura 4). Essas moléculas têm uma cadeia oligossacarídica ligada no C-3, formada por cinco moléculas de açúcar, usualmente glicose, arabinose, ácido glicurônico, xilose ou ramnose (Morrissey & Osbourn, 1999, citando vários autores).

O mecanismo da atividade antifúngica das saponinas é dado pela sua habilidade de interagir com os esteróides nas membranas dos fungos e causar perda da integridade da membrana pela formação de poros transmembrana (Gogelein & Huby, 1984; Keukens *et al.*, 1995). A agregação dos complexos saponina-esteróides na membrana pode ser mediada por interações entre os resíduos de açúcar das moléculas de saponinas (Keukens *et al.*, 1995).

2.4.3.1.2. GLICOSÍDEOS CIANOGENÍCOS

Os glicosídeos cianogênicos (Figura 5A) são encontrados em mais de 200

espécies de plantas, incluindo gimnospermas, monocotiledôneas e dicotiledôneas. Eles são sintetizados por conversão de aminoácidos precursores para oximes, os quais são glicosilados. Em plantas saudáveis, os glicosídeos cianogênicos são separados das enzimas que catalisam sua degradação por compartimentalização. Em resposta ao ataque de patógenos, esses glicosídeos são quebrados gerando cianeto de hidrogênio e um aldeído ou uma cetona. A formação do cianeto de hidrogênio, um potente gás venenoso, pode representar um mecanismo de defesa que protege as plantas cianogênicas contra patógenos e herbívoros (Morrissey & Osbourn, 1999, citando vários autores).

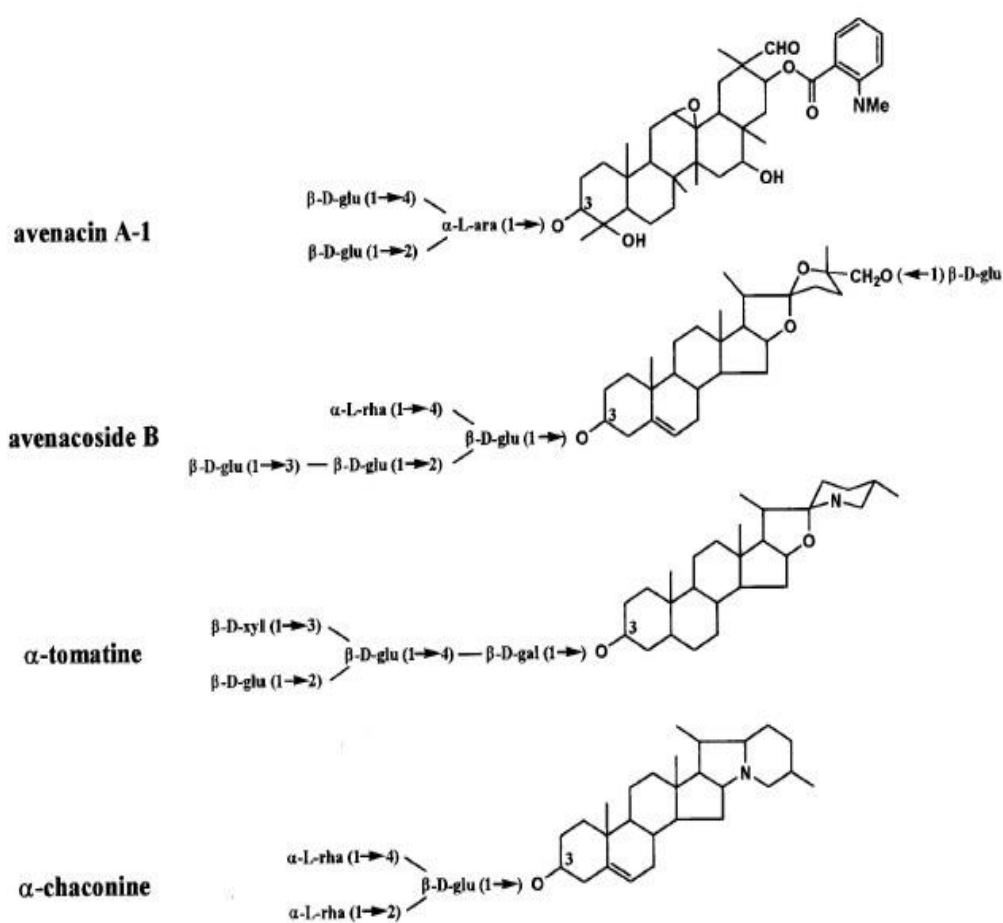


Figura 4 – Exemplos de saponinas antifúngicas de aveia e de plantas da família das solanáceas. As saponinas avenacina A-1 e os avenacosídeos B são extraídos da aveia. A α -tomatina e a α -chaconina são glicoalcalóides esteroidais encontrados em tomate e batata, respectivamente (Morrissey & Osbourn, 1999, citando vários autores).

2.4.3.1.3. GLICOSINOLATOS

Os glicosinolatos (Figura 5B) são glicosídeos contendo enxofre, encontrados em dicotiledôneas, incluindo os membros dos gêneros *Brassica genus* e *Arabidopsis thaliana*. Podem ser subdivididos em três grandes classes determinadas pela natureza de suas cadeias laterais, as quais podem ser derivadas dos grupos alifáticos, indolil ou α -aminoácidos aralquil (Morrissey & Osbourn, 1999, citando vários autores).

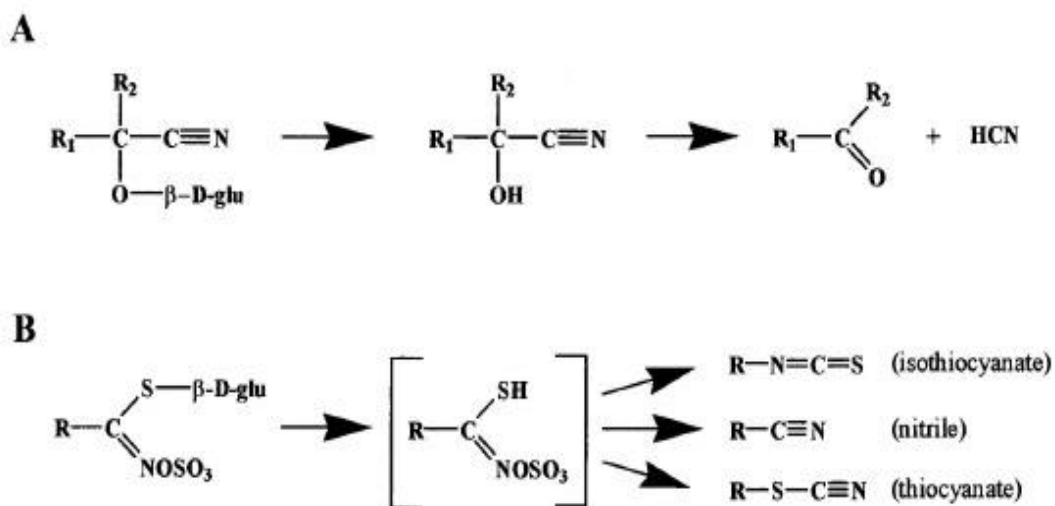


Figura 5 – Exemplos de glicosídeos cianogênicos, glicosinolatos e seus produtos de degradação. A quebra dos glicosídeos cianogênicos resulta na formação de cianeto de hidrogênio (A), enquanto que a quebra dos glicosinolatos gera os isotiocianatos, os nitritos e os tiocianatos (B) (Morrissey & Osbourn, 1999, citando vários autores).

2.4.3.2. FITOALEXINAS

As fitoalexinas são metabólitos secundários, antimicrobianos, de baixo peso molecular e produzidos pelas plantas em resposta a estresses físicos, químicos ou biológicos, sendo capazes de impedir ou reduzir a atividade de agentes patogênicos (Purkayastha, 1995). De modo geral, o modo de ação das fitoalexinas sobre fungos inclui granulação citoplasmática, desorganização dos conteúdos celulares, ruptura da membrana plasmática e inibição de enzimas fúngicas. Esses efeitos refletem-se na inibição da germinação e alongação do tubo germinativo e redução ou inibição do crescimento micelial (Lo *et al.*, 1996).

Diferente dos componentes antifúngicos pré-formados, as fitoalexinas não estão presentes nos tecidos das plantas saudáveis e são sintetizadas a partir de

precursores remotos em resposta ao ataque de patógenos ou ao estresse, provavelmente como resultado da síntese de novo de enzimas. O acúmulo de fitoalexinas representa uma das vias de respostas da defesa induzida associada às plantas resistentes a doenças (Dixon & Lamb, 1990).

Fitoalexinas de leguminosas: Em várias famílias de leguminosas tem sido identificada a presença de flavonóides como fitoalexinas em resposta ao ataque de patógenos (Figura 6). As ervilhas (*Pisum sativum*) produzem o flavonóide pisatim (Figura 6B), enquanto que o grão-de-bico produz maaquiaina (Figura 6C) e medicarpina (Morrissey & Osbourn, 1999, citando vários autores). Em soja, é conhecida a fitoalexina gliceolina (pterocarpanóide), mostrando-se importante na interação dessa leguminosa com fitopatógenos (Burden & Bailey, 1975).

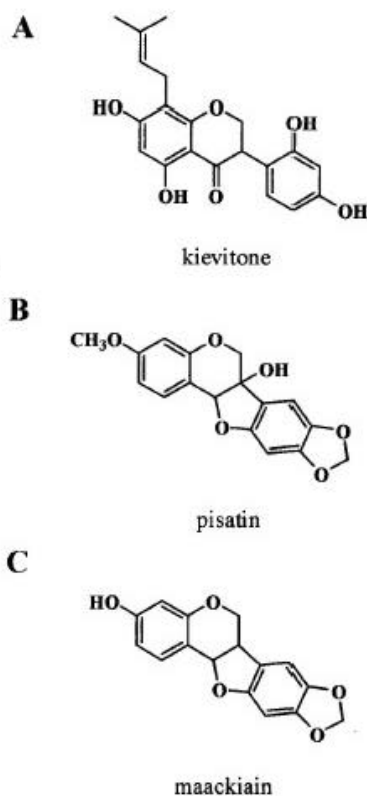


Figura 6 - Exemplos de fitoalexinas flavonóides de leguminosas. Queivitona, pisatina e maaquiaina são fitoalexinas flavonóides produzidas por feijão, ervilha e grão-de-bico, respectivamente (Morrissey & Osbourn, 1999, citando vários autores).

2.5. PEPTÍDEOS SEMELHANTES À INSULINA

Alguns peptídeos de origem vegetal vêm sendo relatados como similares à insulina de vertebrados, tanto estruturalmente quanto em relação à sua atividade biológica (Silva *et al.*, 2002).

O diabetes mellitus, caracterizado por elevados níveis de glicose no sangue e excesso de urina com sabor adocicado, é atualmente uma das doenças mais importantes que afetam a humanidade. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), existem 142 milhões de diabéticos no mundo. A estimativa é que, até 2005, o número alcance 300 milhões de pessoas doentes (<http://www.mre.gov.br/cdbrasil/itamaraty/web/port/relex/mre/nacun/agespec/oms/>). A doença é conhecida desde a antiguidade, há mais de 1500 anos A.C.

Em 1921, uma equipe liderada por Frederick Banting descobriu no Canadá que um peptídeo, a insulina, secretado pelas ilhotas de Langerhans do pâncreas de cães, causava o abaixamento dos níveis de açúcar do sangue. Em 1926, esse peptídeo foi cristalizado por J. J. Abel e, em 1955, Frederick Sanger determinou sua seqüência de aminoácidos (Turkenburg-van Diepen, 1996). Logo após a realização dos estudos que levaram à descoberta da insulina no pâncreas de cães, alguns dos cientistas envolvidos com a descoberta (Collip, 1923; Best *et al.*, 1924) apresentaram resultados nos quais sugeriram a presença de substâncias possivelmente similares à insulina em extratos das mais diversas plantas. Collip chegou a dar ao seu produto o nome de glucocinina, pois imaginou que um produto derivado de plantas não poderia ter o nome de insulina, pois esse nome havia se originado da palavra latina que significa ilhota, referência às ilhotas de Langerhans do pâncreas.

Em 1976, Khann e colaboradores forneceram indícios mais concretos sobre a presença de insulina em plantas. Eles isolaram de frutos e de sementes de *Momordica charantia* (melão-de-São Caetano) uma fração protéica com massa molecular de aproximadamente 6,0 kDa que reagia com anticorpo contra a insulina humana. Os estudos desse grupo foram baseados nas experiências da medicina popular indiana, que indica serem os frutos e sementes dessa cucurbitácea de grande valor no tratamento do diabetes.

Desde então, muitas pesquisas com os efeitos benéficos de substâncias originadas de plantas, relacionadas ao alívio dos sintomas do diabetes, continuaram a aparecer (Gray & Flatt, 1997). Porém somente a partir de 1974 que trabalhos com a possível presença de insulina em plantas foram publicados

(Khanna *et al.*, 1974). Collier e colaboradores (1987) isolaram de espinafre, centeio e *Lemna gibba* proteínas com massas moleculares, propriedades cromatográficas, características imunológicas e atividades biológicas idênticas às da insulina de vertebrados.

A insulina faz parte da via de sinalização envolvida na internalização de glicose em vários tipos de células de vertebrados (Baumann *et al.*, 2000; Brüning *et al.*, 2000). As possíveis atividades da insulina referem-se aos efeitos na síntese de proteínas e na transcrição dos genes (Alper, 2000). Além dos tecidos pancreáticos em vertebrados, a insulina tem sido detectada em diferentes tecidos dos membros de vários outros filos, sugerindo que a via na qual a insulina está envolvida tenha sido conservada na evolução (Silva *et al.*, 2002) (Tabela 2).

Tabela 2 – Relação de filos (Eubactéria, Fungi, Protista e Plantae) e espécies com antígenos semelhantes à insulina testados com anticorpos para insulina humana (Silva *et al.*, 2002)

Filos*	Divisão	Espécies	Nome comum
Eubactéria	Cianobactéria	<i>Spirulina maxima</i>	Spirulina
Fungi	Ascomiceta	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Levedura
	Basidiomiceta	<i>Lentinus edodes</i>	Shitake (cogumelo)
Protista	Rodofita (algas vermelhas)	<i>Gracilariopsis</i> sp	
Plantae	Briofita (musgos)	<i>Frullania kunzei</i>	?
		<i>Meteorium nigrescens</i>	?
		<i>Bryum denuplium</i>	?
		<i>Marchantia chenegada</i>	?
		<i>Psilotum</i> sp	
	Psilofita (Whisk ferns)		
	Licopodofita (licopódio)	<i>Selaginella</i> sp	Musgo espigão
	Esfenopsida (rabo de cavalo)	<i>Equisetum</i> sp	
	Gimnospermas-Coniferofita (coníferas)	<i>Pinus ponderosa</i>	Pinheiro poderoso
		<i>Copressus sempervirens</i>	Ciprestes
	Gimnospermas-Cicadofita (cicades)	<i>Cycas revoluta</i>	Sagueiro
	Gimnospermas-Ginkgofita (ginkgos)	<i>Ginkgo biloba</i>	Ginkgo
	Antofita Angiospermas-Monocotiledôneas	<i>Euterpe oleraceae</i>	Açaí de palmeira

Antofita-Angiospermas-Dicotilidôneas	<i>Bactris gasipaes</i>	Pupunha
	<i>Zea mays</i>	Milho
	<i>Saccharum officinarum</i>	Cana de açúcar
	<i>Persea americana</i>	Abacate
	<i>Annona muricata</i>	Graviola
	<i>Hevea brasiliensis</i>	Seringueira
	<i>Cissus cicyoides</i>	Cipó-puca
	<i>Peumus boldus</i>	Boldo
	<i>Spinacia oleraceae</i>	Espinafre
	<i>Licania rigida</i>	Árvore oticica
	<i>Coupeia canomensis</i>	Bajuru
	<i>Tamarindus indicus</i>	Tamarindo
	<i>Bauhinia forficata</i>	Pata-de-vaca
	<i>Canavalia ensiformis</i>	Jack bean
	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Feijão
	<i>Vigna unguiculata</i>	Feijão de corda
	<i>Averrhoa carambola</i>	Carambola
	<i>Brassica oleracea capitata</i>	Couve
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Thale cress
	<i>Adamsonia digitata</i>	Baoba
	<i>Ocimum sp</i>	Basil
	<i>Mentha arvensis</i>	Menta
	<i>Llex paraguariensis</i>	Mate
	<i>Pimpinella anisum</i>	Anise
	<i>Bacchris genistelloides</i>	Carqueja
	<i>Lippia alba</i>	Erva cidreira
	<i>Aspidosperma carapanauba</i>	Carapanauba
	<i>Sambucus sp</i>	Sabugueiro
	<i>Matricaria chamomilla</i>	Camomila
	<i>Eucalyptus</i>	Eucalipto

* A classificação das plantas e dos outros Filos é conforme Raven *et al.* (1992).

Pesquisas realizadas com extratos de plantas diversas têm indicado uma redução no nível de açúcar no sangue de animais diabéticos, evidenciando a presença de insulina e seu papel na mobilização e transporte de glicose. Outras

funções também têm sido sugeridas para insulina, como o aumento da germinação de algumas sementes e o aumento da atividade de enzimas glicoxissomais envolvidas na conversão de gorduras em carboidratos, em milho (Silva *et al.*, 2002).

2.6. PURIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS CATIÔNICOS

A definição do procedimento para a purificação de dada proteína ou peptídeo é empírica, sendo que técnicas menos refinadas e que aceitem maiores volumes de amostras e de contaminantes devem ser usadas inicialmente (Nelson & Cox, 2000). Essas técnicas devem garantir a retirada de ácidos nucleicos, polissacarídeos, lipídeos e outros contaminantes das preparações (Linn, 1990), facilitando o uso das técnicas mais refinadas de purificação.

Como etapas iniciais de purificação dos peptídeos antimicrobianos extraídos de sementes vegetais, Terras *et al.* (1992) utilizaram o fracionamento com sulfato de amônio entre 30-70% de saturação (sat.), seguido de aquecimento seletivo a 80°C por 15 min, enquanto que Almeida *et al.* (2000) utilizaram somente o fracionamento com sulfato de amônio entre 35, 65 e 85% sat., sem realizar o aquecimento seletivo.

Para os procedimentos mais refinados de purificação, foram utilizados por Terras *et al.* (1992) a cromatografia de troca aniônica, a cromatografia de troca catiônica e finalmente, com a fração já praticamente purificada, a cromatografia de fase reversa em coluna C₁₈. Almeida *et al.* (2000) e Carvalho *et al.* (2001) sugerem a substituição da cromatografia de troca catiônica pela cromatografia de exclusão molecular. A seguir, estes autores sugerem o uso da cromatografia de fase reversa, porém em colunas C₈ e C₄, respectivamente, como etapa final na purificação dos peptídeos antimicrobianos.

Observando-se a literatura sobre purificação de peptídeos antimicrobianos extraídos de sementes vegetais, verificou-se o uso de diferentes técnicas a serem selecionadas de acordo com as características da proteína de interesse. Nosso trabalho experimental objetivou a determinação da metodologia mais eficaz para a purificação dos peptídeos catiônicos com atividade antimicrobiana ou outras, e a caracterização bioquímica destes peptídeos visando à obtenção de informações de importância para a elucidação de suas funções biológicas.

3. OBJETIVOS

Desenvolver procedimento metodológico para extrair, purificar e caracterizar bioquimicamente os peptídeos catiônicos antimicrobianos presentes em sementes maduras de soja, e avaliar a ação desses peptídeos contra as bactérias *Ralstonia solanacearum* e *Clavibacter michiganensis*, visando à utilização desses peptídeos como compostos biologicamente ativos para o controle de doenças em humanos, outros animais e plantas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido prioritariamente no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas - BOAGRO, na Universidade Federal de Viçosa (UFV). Este laboratório é coordenado pela Prof^a. Elizabeth Pacheco Batista Fontes do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBB). As cromatografias de fase reversa foram realizadas no Laboratório de Enzimologia e Físico-Química de Proteínas, e as análises de espectrometria de massa e o seqüenciamento dos peptídeos foram realizados no Núcleo de Estrutura e Função de Biomoléculas, ambos no Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB/UFMG). Os microrganismos usados para os testes de inibição de patógenos foram fornecidos pelo Prof. Reginaldo da Silva Romeiro, coordenador do Laboratório de Bacteriologia de Plantas e de Controle Biológico do Departamento de Fitopatologia, na UFV.

Este trabalho foi realizado como um ajuste de metodologia com o intuito de determinar os melhores procedimentos necessários para a purificação de peptídeos com atividade biológica presentes em sementes madura de soja, o que justifica o detalhamento apresentado neste tópico.

4.1. MATERIAL VEGETAL

Sementes de soja (*Glycine max* [L.] Merryll) das variedades Uirapuru, Doko rc, Segurança, Monarca, CAC-1, Conquista, Engopa 313, Paiguás, DM-Nobre, S.5711-2001-A e UFV 16, utilizadas como fonte de peptídeos, foram obtidas do Programa de Melhoramento da Soja da UFV, sendo gentilmente cedidas pelo Prof. Maurílio Alves Moreira do DBB/UFV. Estas variedades foram selecionadas por apresentarem resistências a diversas doenças vegetais. A variedade S.5711-2001-A apresenta resistência a *Fusarium* sp. e as resistências das demais variedades estão citadas na Tabela 3 (Embrapa, 2002).

Tabela 3 - Variedades de soja e níveis de resistências a doenças (Embrapa, 2002)

Variedade	Doenças								
	C.H	M.O.R	M.A	O	S.M.V	C.b	M.J	M.I	N.C
Uirapuru	R	R	MR	R	-	-	S	S	S
Doko rc	R	R	MS	R	S	S	S	S	S
Segurança	R	R	MR	R	-	-	MT	S	S
Monarca	R	R	MR	-	-	-	-	-	-
UFV 16	R	R	MR	-	-	-	-	-	-
CAC-1	MR	R	MR	MR	S	R	-	-	-
Conquista	R	R	MR	R	S	-	T	T	S
Engopa 313	MR	R	MR	MR	S	S	S	S	S
Paiguás	R	R	MR	MR	S	S	S	-	S
DM-Nobre	R	R	R	-	R	S	-	-	-

Legenda das Doenças:

C.H: Cancro da Haste [*Phomopsis phaseoli* sp.meridionalis (anamórfica) e *Diaporthe phaseolorum* sp.meridionalis (Teleomórfica)]

M.O .R: Mancha olho de rã (*Cercospora sojina*)

M.A: Mancha alvo (*Corynespora cassiicola*)

O: Oídio (*Microsphaera diffusa*)

S.M.V: Mosaico comum da soja (VCMS – vírus do mosaico comum da soja)

C.b: Crestamento bacteriano (*Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*)

M.J e M.I: Nematóides de galhas (*Meloidogyne javanica* e *M. incognita*)

N.C: Nematóide de cisto da soja (*Heterodera glycines*)

Legenda da Escala de Resistência:

R: Resistente

MR: Moderadamente resistente

T: Tolerante

MT: Moderadamente tolerante

S: Susceptível

-: Sem informação

4.2. MICRORGANISMOS

As bactérias *Clavibacter michiganensis* e *Ralstonia solanacearum*, utilizadas nos ensaios de atividade antimicrobiana dos peptídeos, foram cultivadas em meio líquido no Laboratório de Bacteriologia de Plantas e de Controle Biológico do Departamento de Fitopatologia/UFV até o valor de absorvância a 560 nm de 1,33 para a bactéria *Ralstonia solanacearum* e de 1,45 para a *Clavibacter michiganensis*, e então usadas como inóculo para os ensaios.

4.3. REAGENTES

Os reagentes comumente utilizados em laboratórios, como sais, ácidos, bases, álcoois e similares, e alguns reagentes específicos, como EDTA, MES, PVP, AgNO₃ e sacarose, são de alta qualidade, tendo sido adquiridos de empresas como Sigma Chemical Co, MERCK, GIBCO BRL, VETEC, Grupo Química e outras similares. Reagentes para eletroforese foram obtidos de empresas como Amersham Pharmacia Biotec e BIO RAD.

4.4. MEMBRANAS

As membranas para filtração de 0,45 µm e de 0,22 µm de poro, respectivamente utilizadas para filtrar as soluções tampão para cromatografias e as amostras a serem aplicadas nas colunas cromatográficas, foram adquiridas da Millipore Corporation. A membrana de *nylon* usada para filtrar solvente orgânico foi adquirida da Supelco ACS Award. Membranas de diálise com volume de exclusão 1.000 Da foram adquiridas da Sigma Chemical Co e as com exclusão 12.000-14.000 Da, da SARDI. As colunas Sephadex G-25 (PD-10) foram adquiridas da Amersham-Pharmacia Biotec.

4.5. RESINAS CROMATOGRÁFICAS

As resinas de troca iônica DEAE-Sepharose CL-6B e CM-Sepharose foram adquiridas da Amersham Pharmacia Biotec e as colunas foram montadas no laboratório. As colunas para cromatografia de exclusão molecular Superose 12

HR 10/30 (10x30 cm) e Superdex Peptide HR 10/30 (10x30 cm) foram adquiridas pré-empacotadas da Amersham Pharmacia Biotec. A coluna C₁₈ usada para a cromatografia de fase reversa foi a CLC-ODS (M), da Shimadzu.

4.6. PADRÕES DE MASSA MOLECULAR

O padrão de massa molecular de ampla faixa para uso na SDS-Tricina-PAGE foi adquirido da BIO RAD e o padrão de peptídeos *ultra low color* foi adquirido da Sigma Chemical Co. O padrão para calibração da coluna de exclusão molecular Superose 12, Kit para calibração de massa molecular para gel filtração, foi adquirido da Amersham-Pharmacia Biotec. A insulina humana Humulin N (NPH), usada para calibrar a coluna Superdex Peptide HR 10/30, foi adquirida da Lilly.

4.7. EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS DE SEMENTE MADURA DE SOJA

4.7.1. TIPO E PROPORÇÃO DO TAMPÃO DE EXTRAÇÃO

Sementes maduras de soja, utilizadas como fontes de peptídeos, foram trituradas em moinho para grãos Ville e extraídas sob diferentes condições, conforme a Figura 7. Avaliou-se ainda a proporção *gramas semente:volume tampão* e o uso de aquecimento ou fervura da amostra a ser separada no gel.

4.7.2. EXTRAÇÃO DOS PEPTÍDEOS

A extração dos peptídeos de sementes de soja foi realizada segundo metodologia descrita por Terras *et al.* (1992), com algumas modificações. Sementes maduras de soja foram pulverizadas em moinho para alimentos até a formação de uma farinha de fina granulação. O tampão de extração pH 7,4 (NaH₂PO₄ 10 mM, Na₂HPO₄ 15 mM, KCl 0,1M, EDTA 2 mM, PVP 1,5% (p/v), tiouréia 2 mM, PMSF 1 mM e benzamidina 1 mM) foi adicionado a esta farinha na proporção de 1:5 (gramas semente :mL tampão). Os homogenatos obtidos foram agitados por 2 h a 4°C, filtrados e centrifugados, em centrífuga refrigerada Beckman Avanti 30, a 20.300 x g e 4 °C.

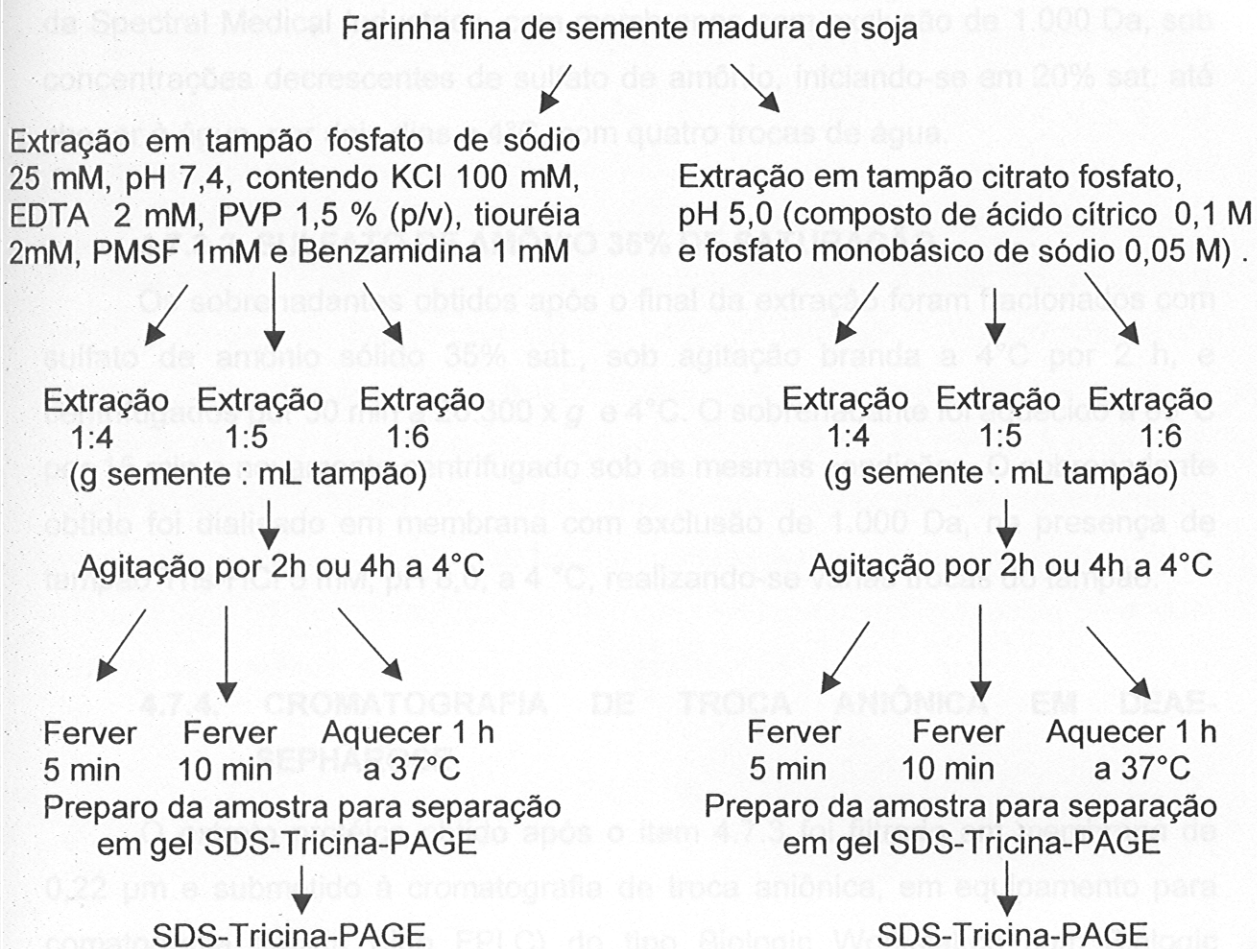


Figura 7 – Fluxogramas das condições de extração das sementes e de preparo das amostras ricas em peptídeos, submetidas à separação por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida com Tricina (SDS-Tricina-PAGE).

4.7.3. FRACIONAMENTO COM SULFATO DE AMÔNIO E AQUECIMENTO SELETIVO

4.7.3.1. SULFATO DE AMÔNIO ENTRE 35 E 65% DE SATURAÇÃO

Os sobrenadantes recuperados após o final da extração (item 4.7.2) foram inicialmente fracionados com sulfato de amônio sólido entre 35 e 65% de saturação (sat.) sob agitação branda a 4°C, por 3 h para 35% sat. e por 13 a 15 h para 65% sat., com centrifugações por 30 min a 20.300 x g e 4°C. O precipitado formado foi solubilizado em 1/10 do volume inicial em água Milli-Q, aquecido a 80°C por 15 min e novamente centrifugado sob as mesmas condições. O sobrenadante obtido foi dialisado em microdialisador do tipo Spectra/Por® 10-Well

Industries, com membranas com exclusão de 1.000 Da, sob concentrações decrescentes de sulfato de amônio, iniciando-se em 20% sat. até chegar à água, por dois dias a 4°C, com quatro trocas de água.

4.7.3.2. SULFATO DE AMÔNIO 35% DE SATURAÇÃO

Os sobrenadantes obtidos após o final da extração foram fracionados com sulfato de amônio sólido 35% sat., sob agitação branda a 4°C por 2 h, e centrifugados por 30 min a 20.300 x *g* e 4°C. O sobrenadante foi aquecido a 80°C por 15 min e novamente centrifugado sob as mesmas condições. O sobrenadante obtido foi dialisado em membrana com exclusão de 1.000 Da, na presença de tampão Tris-HCl 5 mM, pH 8,0, a 4 °C, realizando-se várias trocas do tampão.

4.7.4. CROMATOGRAFIA DE TROCA ANIÔNICA EM DEAE-SEPHAROSE

O extrato protéico obtido após o item 4.7.3 foi filtrado em membrana de 0,22 µm e submetido à cromatografia de troca aniônica, em equipamento para cromatografia líquida (tipo FPLC) do tipo Biologic Workstation com Biologic Controller da BIO RAD, utilizando a coluna DEAE-Sepharose HR 10/10 Pharmacia, equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0. As proteínas básicas, que representam a fração protéica não ligada à coluna, contendo os peptídeos catiônicos de interesse, foram eluídas inicialmente com o tampão de equilíbrio, a um fluxo constante de 1,0 mL.min⁻¹. As proteínas ligadas à coluna foram eluídas com NaCl 1 M, ao mesmo fluxo. Foram coletadas frações de 1,0 mL, em coletor de frações do tipo 2128 da BIO RAD. A presença das proteínas no eluato foi avaliada automaticamente pelo A₂₈₀ do equipamento. As frações protéicas não ligadas à coluna foram reunidas formando um *pool*, que foi liofilizado em equipamento modelo Super Modulyo 501, marca Edwards. O liofilizado foi ressuspensionado em tampões apropriados e submetidos a cromatografias alternativas de troca catiônica (item 4.7.5) ou exclusão molecular (itens 4.7.6 e 4.7.7).

4.7.5. CROMATOGRAFIA DE TROCA CATIÔNICA EM CM-SEPHAROSE

O *pool* obtido da cromatografia de troca aniônica (item 4.7.4) foi ressuspenso em 2,5 mL de tampão MES 5 mM, pH 6,0, e dessalinizado em coluna PD-10 com o mesmo tampão. O extrato protéico obtido foi filtrado em membrana de 0,22 µm e submetido à cromatografia de troca catiônica, em coluna CM-Sepharose, equilibrada com tampão MES 50 mM, pH 6,0. As proteínas de interesse, que representam a fração ligada à coluna, foram eluídas ao fluxo constante de 2,0 mL.min⁻¹ em um gradiente linear crescente de NaCl (0 a 1 M). Foram coletadas frações de 1,5 mL, que foram monitoradas automaticamente pelos valores de A₂₈₀. Todas as frações obtidas foram dialisadas, liofilizadas e avaliadas por SDS-Tricina-PAGE, com o gel revelado com *Coomassie Blue*, com o intuito de identificar as frações peptídicas.

4.7.6. CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR EM SUPEROSE 12 HR 10/30

O *pool* liofilizado obtido da cromatografia de troca aniônica (item 4.7.4) foi ressuspenso em água Milli-Q, centrifugado a 20.300xg por 30 min. O sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,22 µm e aplicado na coluna de exclusão molecular Superose 12 (HR 10/30 Pharmacia), calibrada com os marcadores de massas moleculares (Da) conhecidas (Blue dextran, 2x10⁶; BSA, 67.000; Ovoalbumina, 43.000; Quimotripsinogênio A, 25.000; e Ribonuclease A, 13.700), presentes no kit para calibração de massa molecular por gel filtração, e equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0. As proteínas foram eluídas com o mesmo tampão, ao fluxo constante de 0,5 mL.min⁻¹. Frações de 300 µL foram coletadas e monitoradas automaticamente pelos valores de A₂₈₀. Todos os picos foram dialisados, liofilizados e analisados por eletroforese SDS-Tricina-PAGE, com o intuito de identificar as frações peptídicas.

4.7.7. CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR EM SUPERDEX PEPTIDE HR 10/30

O *pool* liofilizado obtido do item 4.7.4 foi solubilizado em 2,0 mL de água Milli-Q, centrifugado a 20.300xg por 30 min e o sobrenadante filtrado em

membrana de 0,22 μm para ser utilizado como amostra. Para cada corrida cromatográfica, 250 μL desta amostra foram aplicados na coluna de exclusão molecular Superdex Peptide (HR 10/30 Pharmacia), calibrada com marcadores de massas moleculares (Da) conhecidas (Blue dextran, 2×10^6 ; Ribonuclease A, 13.700; e Insulina Recombinante Humana, 5.808), e equilibrada com tampão fosfato 20 mM, pH 6,5, contendo 250 mM de NaCl. As proteínas foram eluídas com o mesmo tampão, ao fluxo constante de 0,5 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Frações de 300 μL foram coletadas, e acompanhadas automaticamente pelos valores de A_{280} . Todos os picos foram dialisados, liofilizados e avaliados por SDS-Tricina-PAGE com o intuito de identificar as frações peptídicas. Em ajuste posterior, a concentração de NaCl presente no tampão de equilíbrio e eluição foi reduzida para 150 mM.

4.7.8. CROMATOGRAFIA DE FASE REVERSA EM COLUNA C_{18}

As cromatografias de Fase Reversa foram realizadas no Laboratório de Enzimologia e Físico-Química de Proteínas, no ICB/UFMG, coordenado pelo Professor Marcelo Matos Santoro.

O pico formado pelas frações ricas em peptídeos, eluídas da cromatografia de exclusão molecular (item 4.7.7) e com atividade biológica, foi aplicado em uma coluna de fase reversa C_{18} (Shim-pack CLC-ODS-M, Shimadzu) equilibrada com 0,1% de TFA, ao fluxo constante de 1,0 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ e à temperatura de 35°C, em HPLC da Shimadzu, contendo detector espectrofotométrico SPD-10AV-UV-VIS, controlador do sistema SCL-10A, injetor de amostras automático SIL-10A, forno para as colunas CTO-10A, bombas de cromatografia líquida LC-10AD e registrador Chromatopac C-R4A. As proteínas foram separadas em gradiente descontínuo de acetonitrila, sendo a solução A formada por TFA 0,1% e a B, por TFA 0,1% e acetonitrila 80%. O gradiente de eluição foi: 0-10 min, 0% de B; 10-70 min, 0 a 60% de B; 70-80 min, 100% de B e 80-90 min 0% de B. A eluição dos peptídeos na coluna foi acompanhada automaticamente pelos valores de A_{214} .

4.7.9. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

A proteína total nas frações eluídas da cromatografia de exclusão molecular foi determinada pelo método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951), utilizando BSA como padrão. A proteína foi também estimada espectrofotometricamente

pela relação A280/A260, conforme descrito por Warburg & Christian (Layne, 1957).

4.8. CARACTERIZAÇÃO DOS PEPTÍDEOS

4.8.1. ELETROFORESE DESNATURANTE EM GEL DE POLIACRILAMIDA EM PRESENÇA DE TRICINA (SDS-TRICINA-PAGE)

A eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida em presença de Tricina (SDS-Tricina-PAGE) foi desenvolvida segundo método de Schägger e von Jagow (1987). A solução estoque de acrilamida/bis foi preparada na concentração de 49,5% T e 3% C. O gel de separação foi preparado na concentração de 16,5% T e 3% C, e o gel de concentração, 4% T e 3% C, em que T corresponde à somatória das percentagens de acrilamida e Bis em relação ao volume do gel, e C, à relação em peso entre a concentração de Bis e a soma das concentrações (%) de ambos os monômeros (Alfenas, 1998):

$$T = \frac{\% \text{ acrilamida} + \% \text{ Bis}}{\text{Volume}} \times 100 \quad C = \frac{\% \text{ Bis}}{\% \text{ acrilamida} + \% \text{ Bis}} \times 100$$

As composições dos géis de separação e concentração são dadas nas tabelas 4 e 5, respectivamente.

Tabela 4 - Composição do gel de separação

	Gel de 1mm	Gel de 0,75mm
Acrilamida-bis-acrilamida	2,0 mL	1,5 mL
Tampão gel	2,0 mL	1,5 mL
Glicerol	0,64 mL	0,48 mL
Água destilada	1,328 mL	1,0 mL
Persulfato de amônio	30 µL	22,5 µL
TEMED	4,8 µL	3,6 µL
total	6,0028 mL	4,5061 mL

Tabela 5 - Composição do gel de concentração

	Gel de 1mm	Gel de 0,75mm
Acrilamida-bis-acrilamida	188 µL	140,6 µL
Tampão gel	585 µL	438,8 µL
Água destilada	1,55 mL	1,16 mL
Persulfato de amônio	12,0 µL	9,6 µL
TEMED	3,8 µL	3,0 µL
total	2,3388 mL	1,752 mL

Os géis foram desenvolvidos em equipamento modelo MiniProtean II Cell (BIO RAD), utilizando-se placas de vidro de 8 x 10 cm e 7 x 10 cm e espaçadores de 0,75 ou 1,0 mm. As frações protéicas obtidas nas cromatografias foram liofilizadas, solubilizadas em 20 µL de tampão de amostra contendo 20% de β -mercaptoetanol sob agitação contínua no vortex por 1 min, aquecidas por 10 min a 100 °C. Após este procedimento, as amostras foram aplicadas no gel e a corrida eletroforética foi desenvolvida a uma voltagem constante da 60 V por aproximadamente 6 horas. Os seguintes marcadores de massa molecular foram usados para auxiliar na identificação das bandas peptídicas: o padrão de ampla faixa, composto de (Da) albumina sérica (66.200), ovoalbumina (45.000), anidrase carbônica (31.000), inibidor de tripsina (21.500), lisozima (14.400) e aprotinina (6.500), e o padrão de peptídeos pré-corado contendo triose fosfato isomerase (26.600), mioglobina (17.000), α -lactoalbumina (14.200), aprotinina (6.500), cadeia β da insulina (3.496) e bradicinina (1.060).

4.8.2. REVELAÇÃO DAS PROTEÍNAS EM SDS-TRICINA-PAGE

Após o término da corrida, os géis foram revelados pelo método da prata, baseado na metodologia descrita por Heukeshoven & Dernick (1985), ou pelo método do Coomassie Blue (Meyer & Lamberts, 1965), dependendo da quantidade de proteína presente no gel.

4.8.3. DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR POR ESPECTROMETRIA DE MASSA

As análises de espectrometria de massa foram realizadas no Núcleo de Estrutura e Função de Biomoléculas, no ICB/UFMG, sob coordenação do Prof Marcelo Matos Santoro e do Pesquisador Adriano Monteiro de Castro Pimenta.

Os picos obtidos da cromatografia de fase reversa foram concentrados, ressuspendidos em 50 µL de TFA 0,1% e 50 µL de acetonitrila e aplicados via *loop* em um espectrômetro de massa do tipo eletro-spray, Quadripole-TOF (Q-TOF) da Micromass®.

As amostras foram analisadas sob as seguintes condições:

ES + source (Eletro-spray, modo positivo)

Voltagem do capilar: 3000,0 V

Voltagem do cone demonstrador: 60,0 V

Duração da varredura: 2,88 seg

Faixa m/z: 50 a 4000 Da

Para calcular as cargas (valores de z) dos picos m/z usou-se as seguintes fórmulas: $n_2 = (m_1 - 1) / (m_2 - m_1)$ e $n_1 = n_2 + 1$, em que

n_1 e n_2 = valores de z (cargas)

m_1 e m_2 = valores de m/z

Para calcular a massa molecular da molécula analisada usou-se a seguinte fórmula: $M = n_2 (m_2 - 1,007)$.

M = massa molecular em Daltons

n_2 = carga z do pico m_2

1,007 = massa do próton H^+ adicionada à molécula.

A fragmentação tem sido realizada em espectrometria de massa para a análise da seqüência de aminoácidos da substância em questão. Esta técnica inicia-se com a seleção do pico de m/z de interesse e sua focalização na célula de colisão. Um gás inerte é introduzido na célula e uma voltagem é selecionada propiciando a colisão do íon precursor. Durante essas colisões, a energia translacional do íon precursor é convertida em energia interna ocorrendo então a dissociação dos íons precursores gerando os fragmentos que serão analisados baseando-se em suas massas moleculares comparadas com as massas moleculares dos aminoácidos. Os fragmentos obtidos podem ser formados pela clivagem no lado N-terminal (íons B) ou no lado C-terminal (íons Y) (Figura 8) (Jonsson, A.P., 2001).

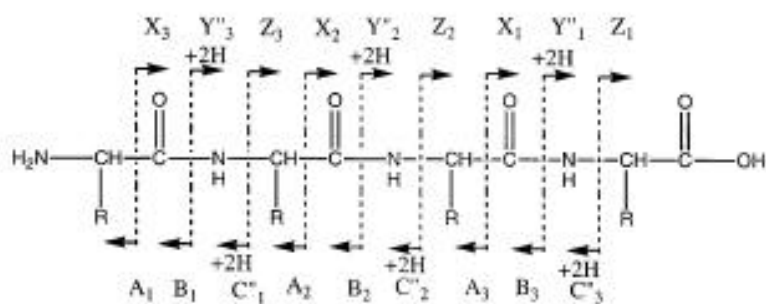


Figura 8 – Representação esquemática da clivagem da ligação peptídica.

4.8.4. SEQUENCIAMENTO DOS PEPTÍDEOS ISOLADOS

A determinação da seqüência de aminoácidos foi realizada no Núcleo de Estrutura e Função de Biomoléculas, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, sob coordenação do Prof Marcelo Porto Bemquerer.

Para o sequenciamento, foi utilizada a metodologia desenvolvida por Edman (1950), automatizado. Uma fração contendo 2.000 pmol do peptídeo de 5809,09 Da foi liofilizada, ressuspendida em 30 µL de TFA 0,1% e aplicada diretamente em membrana de fibra de vidro, a ser utilizada no sequenciador automático de proteínas do tipo PPSQ-21A Protein Sequencer da Shimadzu. Para o peptídeo de 8526,97 Da, foi liofilizada uma fração contendo 1372,91 pmol e ressuspendida em 30 µL de TFA 0,1% para ser também aplicada diretamente em membrana de fibra de vidro, a ser utilizada no sequenciador automático de proteínas. Uma seqüência de 30 ou 35 ciclos foi programada para uma perfeita determinação da seqüência de aminoácidos dos peptídeos.

4.9. TESTE DE INIBIÇÃO DE PATÓGENOS

A inibição dos patógenos pela presença dos peptídios parcialmente purificados foi realizada pelo Teste de Leitura de Microplacas, proposto por Broekaert *et al.* (1990) e desenvolvido por Terras *et al.* (1992), utilizando microespectrometria. As bactérias fitopatogênicas testadas foram *Clavibacter michiganensis*, Gram-positiva, e *Ralstonia solanacearum*, Gram-negativa. Ambas foram cultivadas em meio 523 de Kado (1970), em tubos de ensaio, de acordo com as necessidades nutricionais e ambientais de cada espécie. Para os ensaios,

foram utilizadas placas com 96 micropoços, estéreis, com tampa e de fundo chato. Cada poço apresenta capacidade para 300 μ L. A cada reservatório, foram adicionados 150 μ L do meio líquido de cultivo, 15 μ L do inóculo da bactéria e 125 μ L da solução diluída de peptídeos a serem testados, e a leitura da absorvância, em leitor de Elisa do tipo Titertek Multiskan Plus MKII da Uniscience do Brasil, a 560 nm, foi feita no tempo zero e em períodos de incubação definidos (até 36 h ou 12 h, respectivamente, para as duas bactérias). A inibição foi determinada pelas diferenças dos valores de absorvância das culturas em presença e em ausência dos peptídios.

4.10. PURIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS DAS SEMENTES MADURAS DE SOJA

Diferentes procedimentos foram avaliados com o objetivo de identificar a melhor metodologia para a purificação dos peptídeos com atividade biológica.

4.10.1. PROTOCOLO 01: Fracionamento com sulfato de amônio 35-65% sat., aquecimento seletivo, cromatografia de troca aniônica e cromatografia de exclusão molecular em Superose 12

Neste protocolo (Figura 9), foram utilizadas sementes maduras de soja da variedade DM-Nobre como fonte de peptídeos com atividade biológica. Os peptídeos foram extraídos segundo a metodologia descrita no item 4.7.2. Como etapas iniciais de purificação, foram utilizados procedimentos pouco sofisticados, porém importantes para clarear o extrato preparando-o para as técnicas mais refinadas de purificação. Estes procedimentos foram o fracionamento com sulfato de amônio e o aquecimento seletivo, descritos no item 4.7.3.1 com modificações no processo de dessalinização do extrato protéico (Figura 9). Neste protocolo a dessalinização foi em coluna PD-10 com tampão Tris-HCl 5 mM, pH 8,0. As etapas mais refinadas de purificação, cromatografia de troca iônica e cromatografia de exclusão molecular, foram realizadas conforme descrito nos itens 4.7.4 e 4.7.6. Os eluatos das cromatografias foram liofilizados e preparados

para a SDS-Tricina-PAGE, revelada pela técnica do Coomassie Blue, segundo os itens 4.8.1 e 4.8.2.

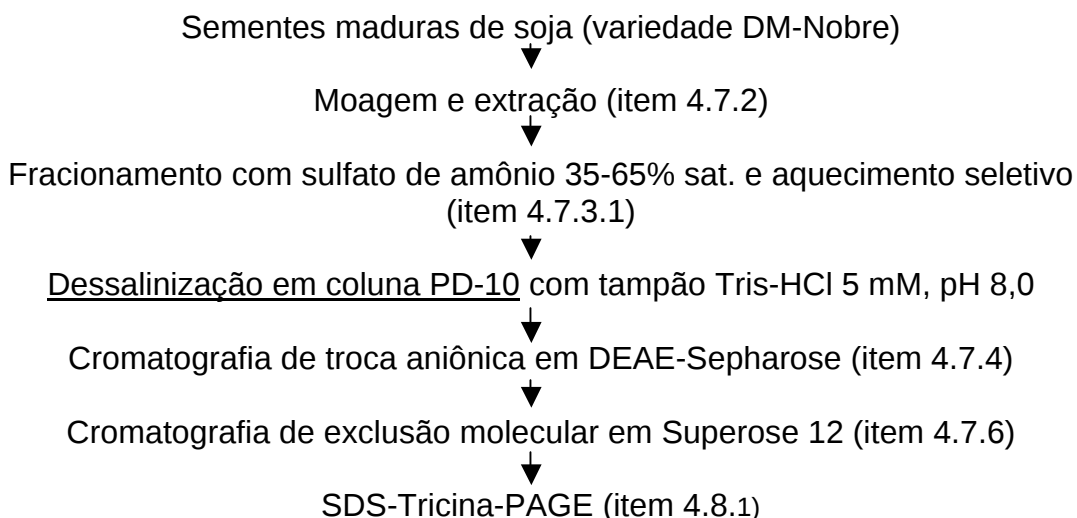


Figura 9 - Fluxograma dos procedimentos utilizados no Protocolo 01 para a purificação dos peptídeos presentes nas sementes de soja. O sublinhado indica as modificações testadas neste protocolo.

4.10.2. PROTOCOLO 02: Fracionamento com sulfato de amônio 35-65% sat., aquecimento seletivo, cromatografia de troca aniônica e cromatografia de troca catiônica

Neste protocolo (Figura 10), foram utilizadas sementes maduras de soja da variedade UFV-16 como fonte de peptídeos com atividade biológica. A variedade DM-Nobre foi substituída pela UFV-16, estando a última disponível em maior quantidade. Salienta-se que existe a necessidade de grande quantidade de sementes para extração e obtenção de quantidades expressivas de peptídeos, já que estes estão presentes em muito baixas concentrações no material vegetal. Ambas as variedades possuem níveis de resistências semelhantes a um conjunto de doenças, conforme a Tabela 4. A extração, o fracionamento com sulfato de amônio, o aquecimento seletivo, a dessalinização e a troca aniônica foram realizadas conforme anteriormente descrito no item 4.10.1 (Protocolo 1). A cromatografia de troca catiônica foi realizada segundo a metodologia descrita no item 4.7.5. Os eluatos das cromatografias foram liofilizados e preparados para a SDS-Tricina-PAGE, revelada pela técnica do Coomassie Blue, segundo os itens 4.8.1 e 4.8.2.

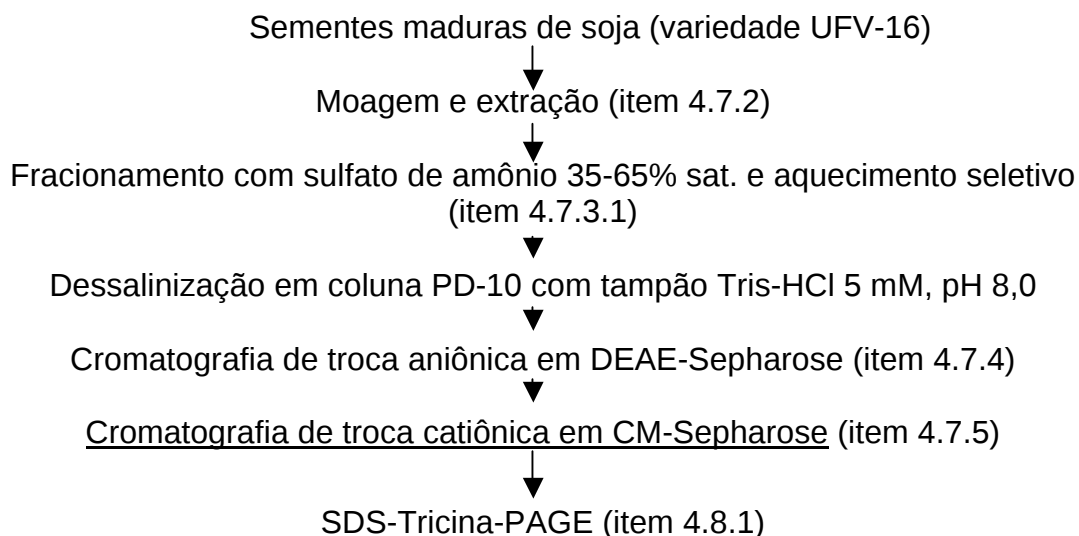


Figura 10 - Fluxograma dos procedimentos utilizados no Protocolo 02 para a purificação dos peptídeos presentes nas sementes de soja. O sublinhado indica as modificações realizadas neste protocolo.

4.10.3. PROTOCOLO 03: Aquecimento seletivo, diálise em membrana de 12.000 Da, cromatografia de troca aniônica e cromatografia de exclusão molecular em Superose 12

Neste protocolo (Figura 11), foram utilizadas sementes maduras de soja da variedade UFV-16 como fonte de peptídeos com atividade biológica. Os peptídeos foram extraídos conforme o item 4.7.2, com alteração no tempo de homogeneização do extrato protéico para 4 h, em substituição às 2 h utilizadas no procedimento do item 4.7.2. O sobrenadante obtido da extração foi aquecido a 80°C por 15 min e novamente centrifugado sob as mesmas condições. O extrato protéico obtido foi liofilizado para redução do volume e dialisado em membrana com volume de exclusão 12.000-14.000 Da, com recuperação da fração externa. Foram realizadas três trocas de água e o material que passou pelos poros da membrana, incluindo-se os peptídeos de interesse, foi concentrado em rotavapor a 40°C e dessalinizado em coluna PD-10 com tampão Tris-HCl 30 mM, pH 8,0. O material recuperado foi a seguir separado em coluna de troca aniônica, segundo o item 4.7.4. O extrato protéico que permaneceu retido na membrana, contendo as proteínas com massas moleculares superiores a 12.000-14.000 Da, foi descartado. O pool obtido da cromatografia de troca aniônica foi submetido a uma cromatografia de exclusão molecular em coluna Superose 12, conforme o

procedimento descrito no item 4.7.6. Os eluatos das cromatografias foram liofilizados e preparados para a SDS-Tricina-PAGE revelada pela técnica da prata, segundo os itens 4.8.1 e 4.8.2.

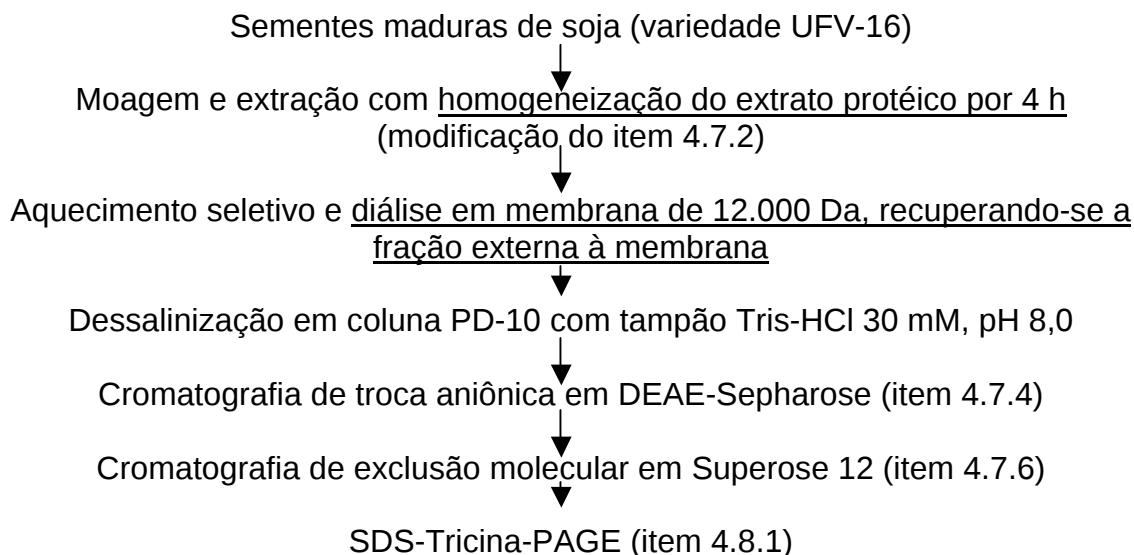


Figura 11 - Fluxograma dos procedimentos utilizados no Protocolo 03 para a purificação dos peptídeos presentes nas sementes de soja. O sublinhado indica as modificações realizadas neste protocolo.

4.10.4. PROTOCOLO 04: Precipitação com sulfato de amônio 35% sat., aquecimento seletivo, cromatografia de troca aniônica e cromatografia de exclusão molecular em Superdex Peptide

Neste protocolo (Figura 12), foram utilizadas sementes maduras de soja da variedade UFV-16 como fonte de peptídeos com atividade biológica. Os peptídeos foram extraídos segundo a metodologia descrita no item 4.10.3 (Protocolo 03). A precipitação com sulfato de amônio 35% sat. e o aquecimento seletivo foram realizados segundo a metodologia descrita no item 4.7.3.2. A partir deste protocolo, as dessalinizações foram realizadas em membrana de diálise com exclusão de 1.000 Da (Sigma Chemical Co). A cromatografia de troca aniônica e a cromatografia de exclusão molecular foram conduzidas conforme os itens 4.7.4 e 4.7.7. Os eluatos das cromatografias foram liofilizados e preparados para a SDS-Tricina-PAGE, revelado pela técnica da prata segundo os itens 4.8.1 e 4.8.2.

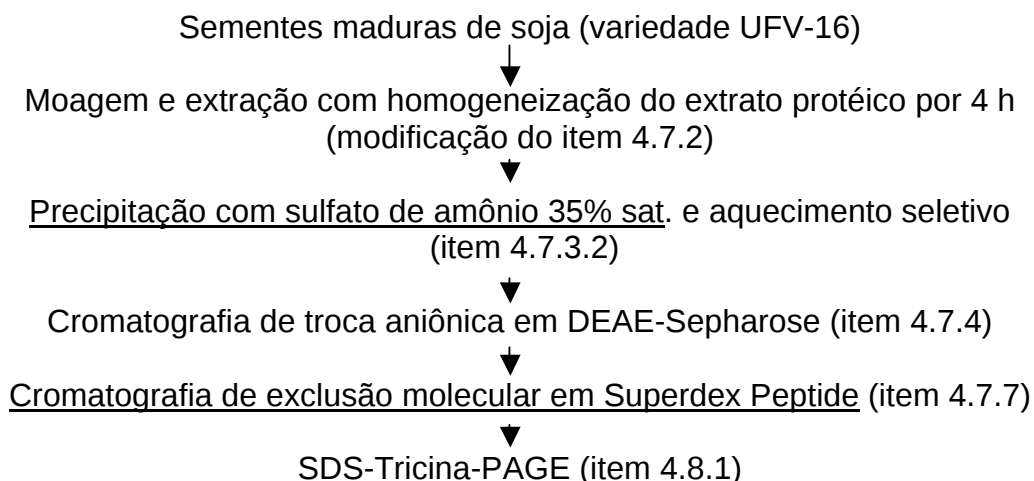


Figura 12 - Fluxograma dos procedimentos utilizados no Protocolo 04 para a purificação dos peptídeos presentes nas sementes de soja. O sublinhado indica as modificações realizadas neste protocolo.

4.10.5. PROTOCOLO 05: Precipitação com sulfato de amônio 35% sat., aquecimento seletivo, cromatografia de troca aniônica e cromatografia de exclusão molecular em Superdex Peptide

Neste protocolo (Figura 13), foram utilizadas sementes maduras de soja da variedade UFV-16 como fonte de peptídeos com atividade biológica. As etapas de extração, precipitação com sulfato de amônio 35% sat., o aquecimento seletivo e a cromatografia de troca iônica foram realizados conforme o item 4.10.4 (Protocolo 04). A cromatografia de exclusão molecular foi realizada segundo a metodologia descrita no item 4.7.7, com substituição do tampão de corrida. O tampão fosfato 20 mM, pH 6,5, contendo 250 mM de NaCl, foi substituído pelo tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, contendo 250 mM de NaCl. Os eluatos das cromatografias foram liofilizados e preparados para a SDS-Tricina-PAGE, revelada pela técnica da prata segundo os itens 4.8.1 e 4.8.2.

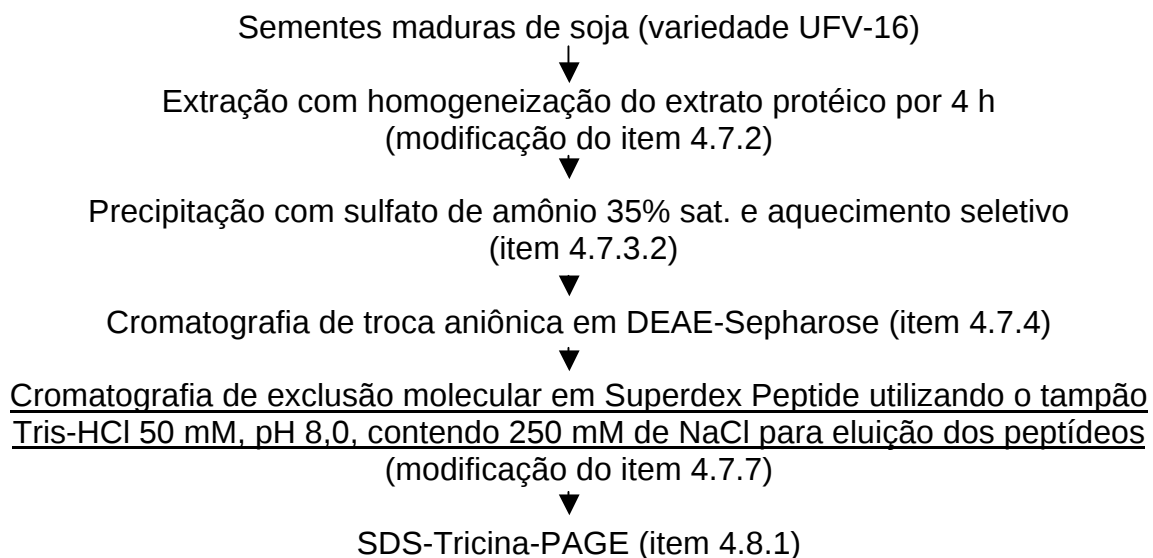


Figura 13 - Fluxograma dos procedimentos utilizados no Protocolo 05 para a purificação dos peptídeos presentes nas sementes de soja. O sublinhado indica as modificações realizadas neste protocolo.

4.10.6. PROTOCOLO FINAL: Precipitação com sulfato de amônio 35% sat., aquecimento seletivo, cromatografia de troca aniônica, cromatografia de exclusão molecular em Superdex Peptide e cromatografia de fase reversa, seguindo-se espectrometria de massa e seqüenciamento do peptídeo.

Neste protocolo (Figura 14), foram utilizadas sementes maduras de soja da variedade UFV-16 como fonte de peptídeos com atividade biológica. As etapas de extração, precipitação com sulfato de amônio 35% sat. seguido por aquecimento seletivo e a cromatografia de troca iônica foram realizadas conforme os itens 4.7.2, 4.7.3.2 e 4.7.4, respectivamente. Observa-se que o tempo de homogeneização do extrato foi como inicialmente usado, de 2h. A cromatografia de exclusão molecular foi realizada segundo a metodologia descrita no item 4.10.5 (Protocolo 05), substituindo-se o tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, contendo 250 mM de NaCl, pelo mesmo tampão, contendo 150 mM de NaCl. Os picos obtidos foram divididos em três *pools*, chamados *pool 1*, *pool 2* e *pool 3*, que de acordo com a calibração da coluna contêm as proteínas com massas moleculares elevadas, os peptídeos e os compostos orgânicos com massas moleculares baixas, respectivamente. Os *pools* foram separadamente dialisados contra água em membrana de 1.000 Da e liofilizados para o teste de inibição (item 4.9). O *pool 2*, contendo os peptídeos de interesse, foi liofilizado e submetido a uma

cromatografia de fase reversa (item 4.7.8), e os picos eluídos foram analisados no espectrômetro de massa para determinar as massas moleculares dos peptídeos presentes (item 4.8.3). Dois peptídeos com massas moleculares definidas foram submetidos ao seqüenciamento de aminoácidos (item 4.8.4) para determinação de sua seqüência primária e comparação no banco de dados com as seqüências já conhecidas.

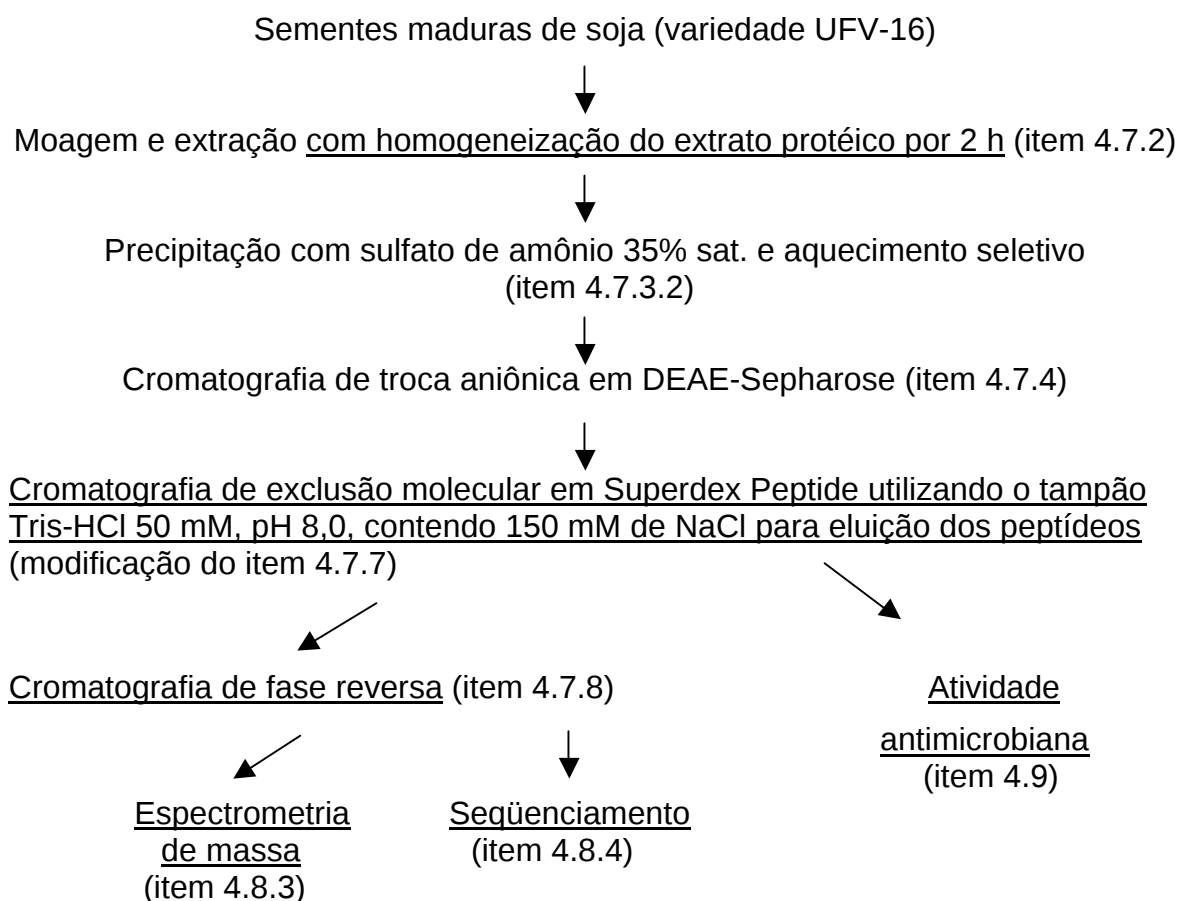


Figura 14 - Fluxograma dos procedimentos utilizados no Protocolo Final para a purificação dos peptídeos presentes nas sementes de soja. O sublinhado indica as modificações realizadas neste protocolo.

Este protocolo apresentou-se altamente reprodutível e está sendo exaustivamente repetido para a obtenção dos peptídeos purificados, visando obter quantidades suficientes do material para as caracterizações bioquímicas, estruturais e microbiológicas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. TIPO E PROPORÇÃO DO TAMPÃO DE EXTRAÇÃO

O tampão fosfato de sódio 25 mM, contendo 100 mM KCl, 2 mM EDTA, 1,5 % (p/v) PVP, 2 mM tiouréia, 1mM PMSF e 1 mM Benzamidina (Terras *et al.*, 1992) foi selecionado para a extração das proteínas das sementes de soja pois este apresentou uma maior eficiência na obtenção dos peptídeos em comparação com o tampão citrato de sódio, observados por separação em SDS-Tricina-PAGE (dados não mostrados).

A extração das proteínas presentes nas sementes de soja com 5 volumes de tampão (1 g de soja : 5 mL de tampão) (Almeida *et al.*, 2000; Carvalho *et al.*, 2001) foi escolhida pois o uso de 4 volumes (Terras *et al.*, 1993) não permitiu boa homogeneização pela alta quantidade de material em suspensão. Volumes maiores de tampão (extração 1:6) geraram grandes volumes de extrato, dificultando as etapas seguintes da purificação, como o fracionamento por sulfato de amônio e liofilização das amostras com alta concentração de sal.

A extração dos peptídeos, por homogeneização do extrato durante 2 h a 4°C, em banho de gelo (Terras *et al.*, 1992) (Protocolos 1, 2, e final) foi utilizada já que não observou-se diferença no perfil eletroforético ou no desenvolvimento da purificação quando comparada com a homogeneização por 4 h (Almeida *et al.*, 2000) (Protocolos 3, 4 e 5). Deve-se salientar que as plantas apresentam um conjunto de proteases com diferentes modos de ação (Shutov & Vaintraub, 1987) que poderiam atuar degradando os peptídeos de interesse. Assim, um tempo de extração menor favorece a manutenção da integridade das moléculas protéicas. Salienta-se que apenas os inibidores EDTA, tiouréia, PMSF e benzamidina foram utilizados, possivelmente não sendo suficientes para controlar a atividade proteolítica total no extrato.

5.2. SELEÇÃO DE VARIEDADES DE SOJA RESISTENTES A PATÓGENOS COMO FONTE DE PEPTÍDEOS

Das 21 variedades de soja disponíveis para uso como fonte de peptídeos, (CAC-1, CD-204, Conquista, Cristalina, DM-Nobre, Doko re, Elite, Engopa, IAC-

12, Liderança, Monarca, MS-Br19-Pequi, Paiguás, Pintado, Segurança, S.5711-2001-A, Tucano, UFV 16, Uirapuru, Vencedora e Xingu) obtidas do Programa de Melhoramento da Soja da UFV, foram selecionadas onze (Tabela 3), baseadas em seus graus de resistência a doenças. Por análise eletroforética, observou-se que existe variação no padrão de bandas de massas moleculares entre 4.000 a 13.000 Da dentre as variedades Conquista, Engopa 313, Paiguás, DM Nobre, S 5.711-2001 A, Doko re e UFV 16 (Figura 15), o que possivelmente contribui para o amplo espectro de resistências às diversas doenças da cultura da soja, presentes nestas variedades. A variedade UFV 16 foi selecionada para desenvolver nossos experimentos com base nos resultados obtidos neste *screening* e na disponibilidade de material vegetal. A variedade DM-Nobre, selecionada pelo mesmo motivo e utilizada inicialmente, foi substituída pela UFV-16, estando a última disponível em maior quantidade. Salienta-se que existe a necessidade de grande quantidade de sementes para a extração e a obtenção de quantidades expressivas de peptídeos, já que estes estão presentes em muito baixas concentrações no material vegetal.

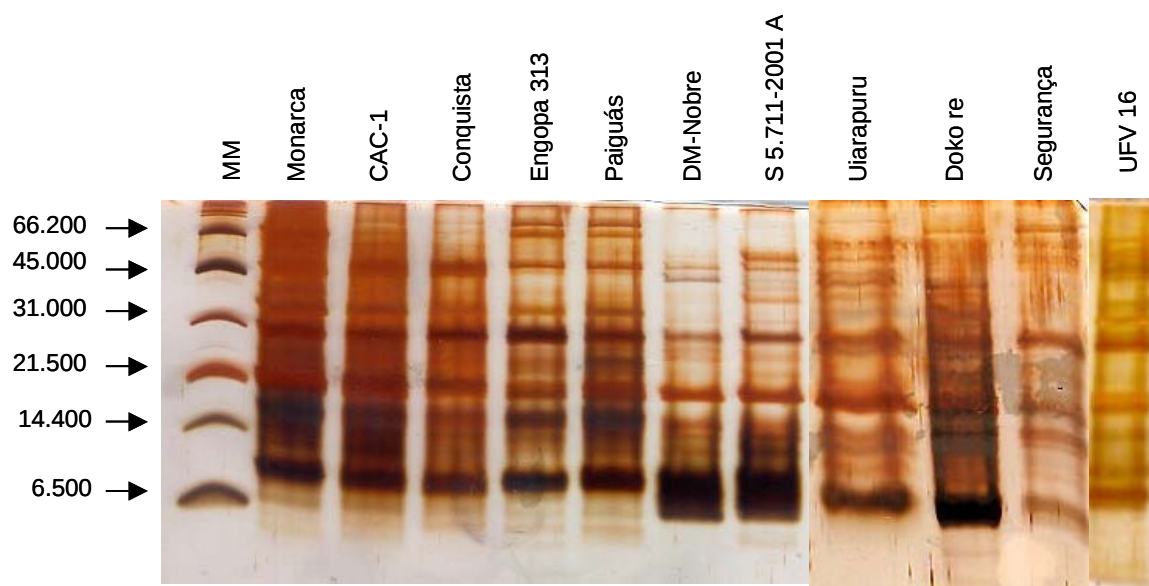


Figura 15 - Eletroforese desnatante em gel de poliacrilamida (16,5%) com tricina, de extratos de diferentes variedades de soja resistentes a patógenos, fracionados com sulfato de amônio (35-65% de sat.) e aquecidos a 80 °C / 15 min. O padrão de massa molecular ampla faixa (MM) é composto de (Da): albumina sérica (66.200), ovoalbumina (45.000), anidrase carbônica (31.000), inibidor de tripsina (21.500), lisozima (14.400) e aprotinina (6.500) e a revelação foi feita pelo método da prata.

A variedade de soja UFV-16 apresenta características agrônômicas desejáveis, como maturação precoce / média, adaptável em MG, GO e MT, boa qualidade visual da semente, hábito de crescimento determinado, floração em 52 dias e maturação em 116 dias em média, teor de proteínas 37,19%, resistência à pústula bacteriana, ao cancro-da-haste e ao oídio, e resistência moderada à mancha do olho-da-rã, adaptabilidade à fertilidade do solo média / alta, dentre outras (Sediyama *et al.*, 2001).

5.3. PURIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS

O processo de purificação dos peptídeos antimicrobianos foi baseado inicialmente na metodologia descrita por Terras *et al.* (1992) e vários métodos cromatográficos foram testados até a obtenção do procedimento mais eficiente.

5.3.1. ETAPAS INICIAIS NÃO-CROMATOGRÁFICAS DA PURIFICAÇÃO

Os extratos protéicos das variedades DM-Nobre e UFV-16 foram fracionados inicialmente com sulfato de amônio entre 35 e 65% de sat. (Almeida *et al.*, 2000) (Protocolos 1 e 2) visando eliminar proteínas contaminantes pela solubilidade diferencial no sal. A etapa inicial do processo gerava grande quantidade de amostra com alta concentração de sal, dificultando a concentração da amostra por liofilização.

Posteriormente, utilizou-se o sulfato de amônio apenas na concentração de 35% sat. (Protocolos 4, 5 e final), que apresentou também resultados favoráveis com a vantagem de reduzir a quantidade de sal do extrato e favorecer a liofilização. O fracionamento por sulfato de amônio corresponde a uma etapa preliminar importante para clarear o extrato, preparando-o para as técnicas cromatográficas. Seguindo-se o procedimento de purificação, os extratos foram submetidos ao aquecimento seletivo e à liofilização para a redução do volume. A etapa de aquecimento permitiu a remoção por precipitação de diversas proteínas de massas moleculares elevadas, como as proteínas de reserva presentes em grandes quantidades nas sementes de soja, e algumas enzimas proteolíticas sensíveis ao aquecimento a 80 °C por 15 min.

Em substituição ao fracionamento por sulfato de amônio, a diálise contra água em membrana de 12.000 a 14.000 Da foi testada como etapa de purificação

(Protocolo 3). Entretanto, esta metodologia também não foi adequada em função da grande quantidade de material a ser concentrado, despendendo um longo tempo no liofilizador. Já no rotavapor, este extrato foi concentrado num período de tempo um pouco menor, porém a 40 °C, temperatura que favorece a desnaturação de proteínas e a ação de proteases. Salienta-se que a temperatura de 40 °C por curto período não deve interferir significativamente na estrutura tridimensional dos peptídeos de interesse, que são resistentes a temperaturas de 80 °C por 15 min, um dos passos utilizados na purificação. Entretanto, o tempo que o extrato permanece a 40 °C é longo, podendo chegar a 3h.

Após a etapa inicial de fracionamento do extrato bruto (com sulfato de amônio ou por diálise), o material seco foi ressuscitado em 1/10 do volume inicial e dessalinizado por gel filtração em coluna PD-10 ou em membrana de diálise de limite de exclusão de 1000 Da e submetido à cromatografia de troca aniônica. Inicialmente, foi utilizada a coluna PD-10, entretanto observou-se que a região peptídica observada por SDS-Tricina-PAGE após a dessalinização nesta coluna (Figura 16A) era proporcionalmente menos intensa do que a observada após a diálise em membrana de 1.000 Da (Figura 16B). Assim, sugeriu-se que durante a dessalinização em coluna PD-10 alguns peptídeos de interesse poderiam estar sendo eliminados junto com o sal. Para compreender a perda de peptídeos, recorreu-se às informações do fabricante sobre o volume de exclusão da coluna, que elimina os compostos com massa molecular média abaixo de 5.000 Da, volume de exclusão muito próximo à massa molecular de alguns peptídeos de interesse. Assim, optou-se pela aquisição e uso da membrana de 1.000 Da para a diálise do extrato protéico.

5.3.2. ETAPAS CROMATOGRÁFICAS DO PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS CATIÔNICOS UTILIZADAS NOS DIFERENTES PROTOCOLOS

Para um melhor acompanhamento, sugere-se consultar os fluxogramas de cada Protocolo avaliado, apresentados no item MATERIAL E MÉTODOS.

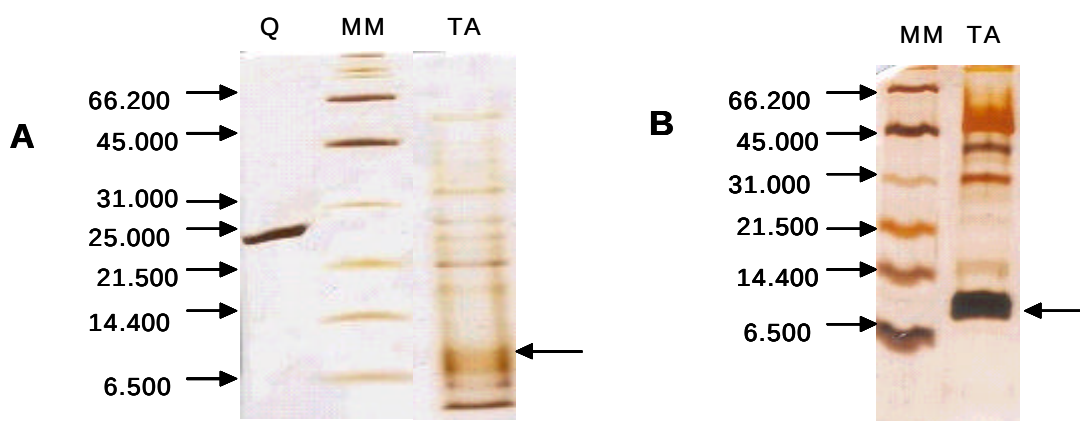


Figura 16 – Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (16,5%) em presença de tricina, das cromatografias de troca aniônica (TA) da variedade UFV 16, após fracionamento com sulfato de amônio 35-65% sat. e dessalinizadas em coluna PD-10 (A) ou após precipitação com sulfato de amônio 35% sat. e dialisadas em membrana de 1.000 Da (B). As amostras utilizadas foram 1 μ L do padrão de massa molecular e 4 μ L do *pool* da troca aniônica. O padrão de massa molecular de ampla faixa (MM) é composto de (Da): albumina sérica (66.200), ovoalbumina (45.000), anidrase carbônica (31.000), inibidor de tripsina (21.500), lisozima (14.400) e aprotinina (6.500) e a revelação foi feita pelo método da prata.

5.3.2.1. CROMATOGRAFIA DE TROCA ANIÔNICA EM DEAE-SEPHAROSE

Os dialisados obtidos após as etapas iniciais não-cromatográficas da purificação, para todos os Protocolos apresentados, foram submetidos a cromatografias de troca aniônica em coluna DEAE-Sepharose a um fluxo de 1,0 mL.min⁻¹, para a recuperação da fração de proteínas básicas. Esta etapa apresentou resultados bastante semelhantes para todos os Protocolos propostos. Assim, apresentou-se somente um perfil neste item já que todas estas foram realizadas seguindo-se a mesma metodologia (item 4.7.4). Na troca iônica realizada com o Protocolo Final, as frações 34 a 64 (Figura 17), que não se ligaram na coluna e correspondem às proteínas de caráter básico, foram reunidas formando um *pool*.

Cada *pool* obtido das cromatografias de troca aniônica foi liofilizado e utilizado como amostra em cromatografias de exclusão molecular ou de troca catiônica como próxima etapa de purificação dos peptídeos catiônicos.

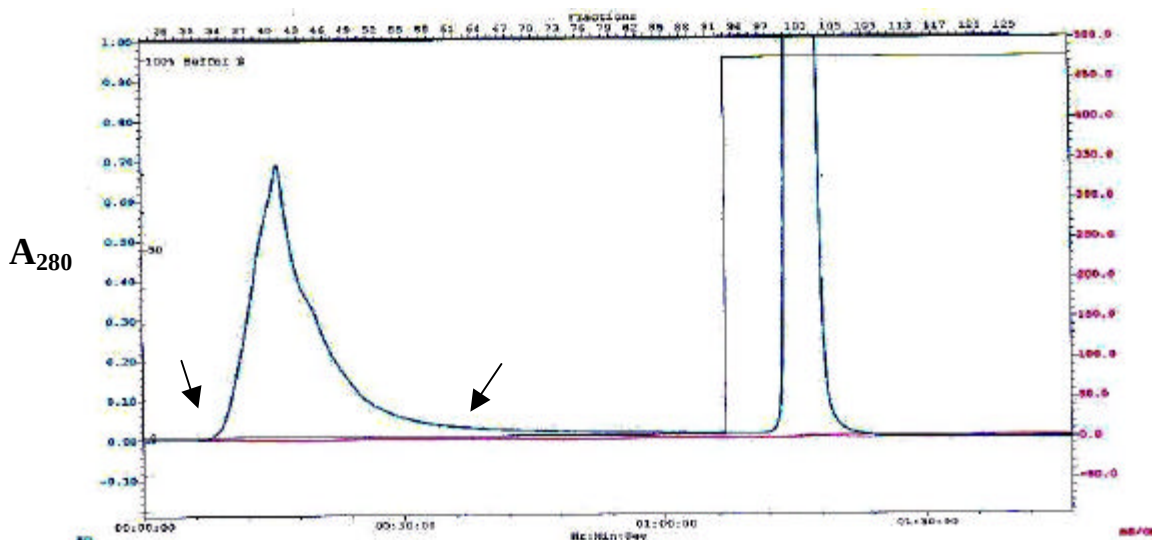


Figura 17 – Cromatografia de troca aniônica (tipo FPLC) em coluna DEAE-Sephacrose (8,0 mL) dos extratos de sementes maduras de soja da variedade UFV 16 precipitados com sulfato de amônio (35% sat.) e aquecidos a 80 °C / 15 min (Protocolo Final). A coluna foi equilibrada no tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, e as proteínas foram eluídas no mesmo tampão em ausência e em presença de 1 M de NaCl. Foram coletadas frações de 1,0 mL a um fluxo de 1,0 mL min⁻¹. As frações entre as setas (34 a 64) formaram um *pool*.

Sugere-se que as etapas utilizadas até o momento tenham favorecido a recuperação de peptídeos catiônicos, já que estes são resistentes ao aquecimento seletivo a 80°C por 15 min e são eluídos na fase catiônica de uma coluna de troca aniônica.

5.3.2.2. PROTOCOLO 1:

O *pool* das frações catiônicas obtido da cromatografia de troca aniônica foi submetido a uma cromatografia de exclusão molecular em coluna Superose 12 (item 4.7.6) (Figura 18). As frações 15 a 21 (Protocolo 1) foram liofilizadas e submetida à SDS-Tricina-PAGE (item 4.8.1) (Figura 19). As frações 22, 25 e 26 também foram submetidas a SDS-Tricina-PAGE (dados não mostrados) não sendo possível a visualização de nenhuma banda nestas frações. Os resultados indicam a presença de peptídeos não purificados na faixa de 5.000 Da nas frações 17 e 18 da cromatografia de exclusão.

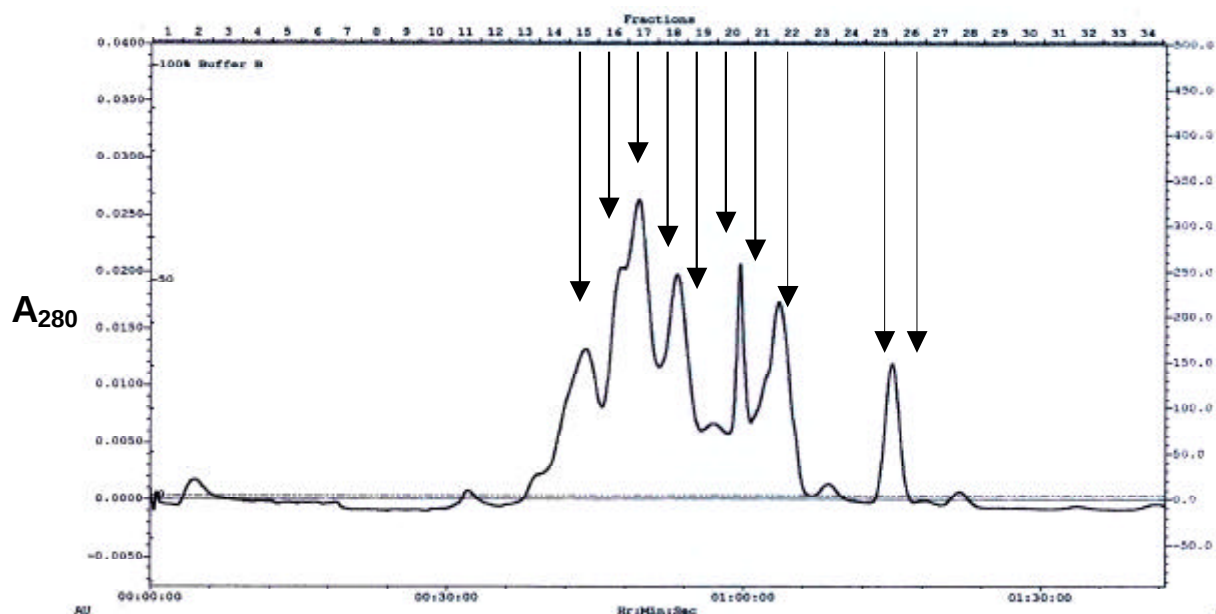


Figura 18 - Cromatografia de exclusão molecular (tipo FPLC) em coluna Superose-12 da fração catiônica eluída da cromatografia de troca aniônica (Protocolo 1). Extratos de sementes maduras de soja da variedade DM-Nobre foram fracionados com sulfato de amônio (35-65% sat.), aquecidos a 80°C/15min e dessalinizados em coluna PD10. A coluna foi equilibrada em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, e as proteínas foram eluídas no mesmo tampão. Foram coletadas frações de 1,5 mL a um fluxo de 0,5 mLmin⁻¹. As frações indicadas pelas setas foram analisadas em SDS-Tricina-PAGE

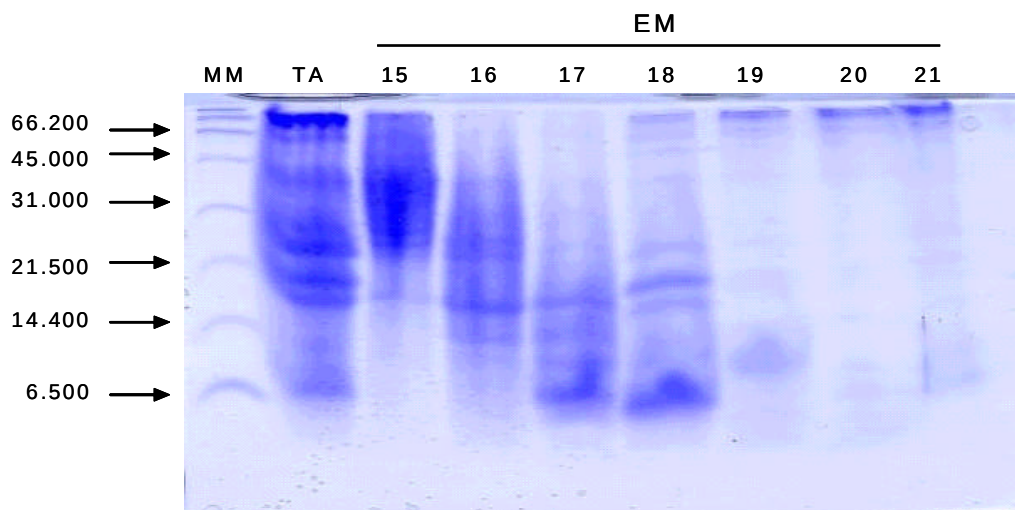


Figura 19 – Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (16,5%) em presença de Tricina das frações eluídas da cromatografia de troca aniônica (TA) e das frações 15 a 21 eluídas da cromatografia de exclusão molecular (EM). O gel foi revelado pela técnica do Coomassie-Blue. O padrão de massa molecular de ampla faixa (MM) é composto de (Da): albumina sérica (66.200), ovoalbumina (45.000), anidrase carbônica (31.000), inibidor de tripsina (21.500), lisozima (14.400) e aprotinina (6.500). As amostras correspondem a 5 μ L do MM, 80 μ L da TA e 1,5 mL da EM. As amostras da TA e da EM foram previamente dialisadas e liofilizadas.

5.3.2.3. PROTOCOLO 2: CROMATOGRAPHIA DE TROCA CATIÔNICA

O *pool* das frações catiônicas obtidas da cromatografia de troca aniônica foi dessalinizado em coluna PD10 e submetido a uma cromatografia de troca catiônica em coluna CM-Sepharose (item 4.7.5) (Figura 20). As frações 46, 49, 52, 55, 58 e 80 eluídas desta troca catiônica foram dialisadas em membrana de 1.000 Da, liofilizadas e submetidas à SDS-Tricina-PAGE (Figura 21). Sob as condições analisadas, esta coluna de troca catiônica não foi suficiente para uma boa separação das proteínas com diferentes cargas positivas.

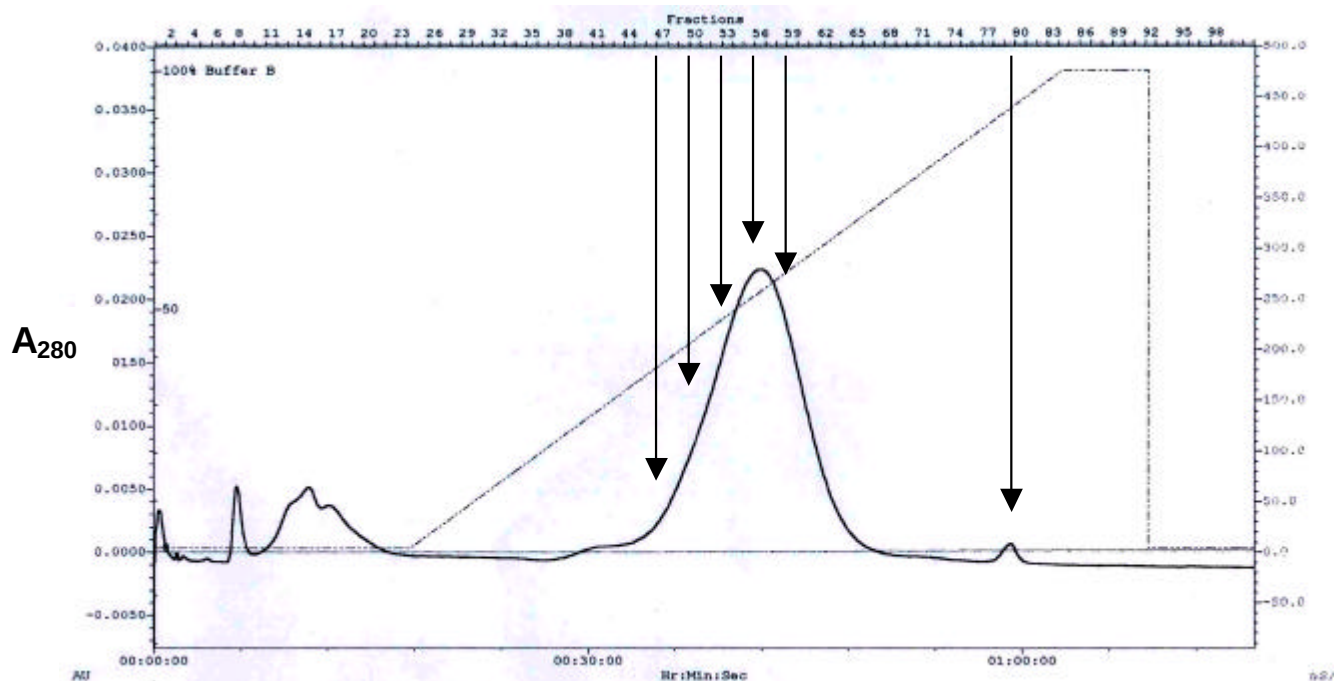


Figura 20 – Cromatografia de troca catiônica (tipo FPLC) em coluna CM-Sepharose (15,0 mL) da fração catiônica eluída da cromatografia de troca aniônica, dessalinizada em coluna PD10 (Protocolo 2). A coluna foi equilibrada em tampão MES 50 mM, pH 6,0, e as proteínas ligadas à resina foram eluídas em um gradiente linear crescente de NaCl (0 a 1 M). Foram coletadas frações de 1,5 mL a um fluxo de $2,0 \text{ mL min}^{-1}$. As frações indicadas pelas setas foram analisadas em SDS-Tricina-PAGE.

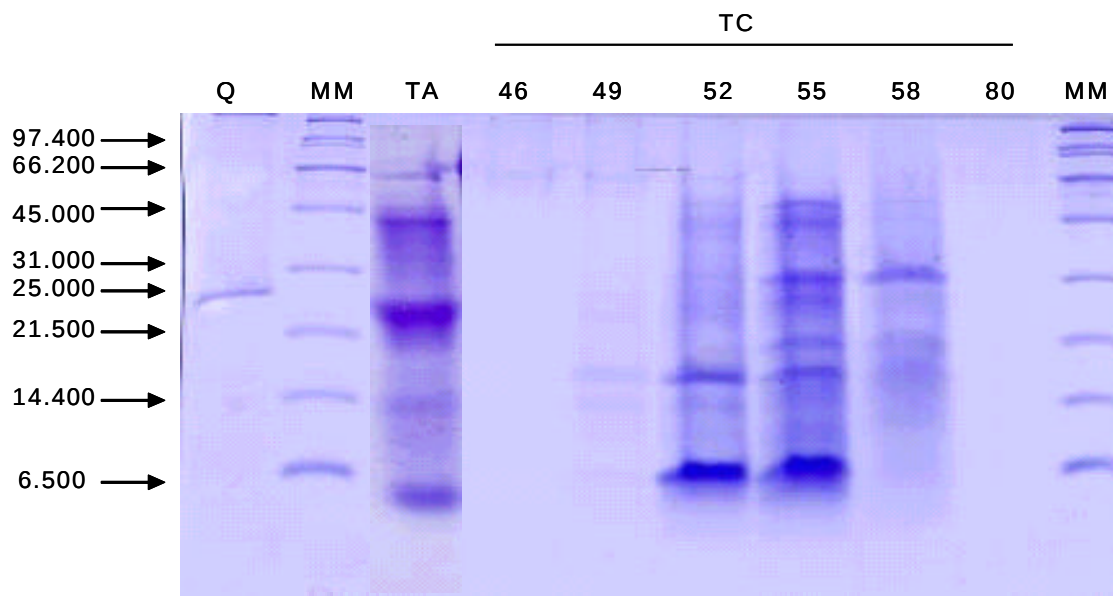


Figura 21 – Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (16,5%) em presença de Tricina do *pool* formado pelas frações eluídas da cromatografia de troca aniônica (TA) e das frações 46, 49, 52, 55, 58 e 80 eluídas da cromatografia de troca catiônica (TC). O gel foi revelado pela técnica do Coomassie-Blue. Quimotripsinogênio (Q, 25.000). O padrão de massa molecular de ampla faixa (MM) é composto de (Da): albumina sérica (66.200), ovoalbumina (45.000), anidrase carbônica (31.000), inibidor de tripsina (21.500), lisozima (14.400) e aprotinina (6.500). As amostras utilizadas foram 1,5 μ L de Q, 5 μ L do MM, 80 μ L da TA e 500 μ L das frações da TC. As amostras da TA e da TC foram previamente dialisadas e liofilizadas.

5.3.2.4. PROTOCOLO 3: CROMATOGRAFIAS DE EXCLUSÃO MOLECULAR EM SUPEROSE 12

A fração externa da diálise em membrana de 12.000-14.000 foi submetida a uma cromatografia de troca aniônica em DEAE-Sepharose obtendo-se um resultado semelhante ao da Figura 17. O *pool* das frações catiônicas eluídas da troca aniônica foi usado para uma cromatografia de exclusão molecular em coluna Superose 12 (Figura 22). Observou-se que o perfil de eluição das proteínas foi diferente do apresentado na Figura 18, entretanto, repetiu-se posteriormente sempre que a coluna foi utilizada.

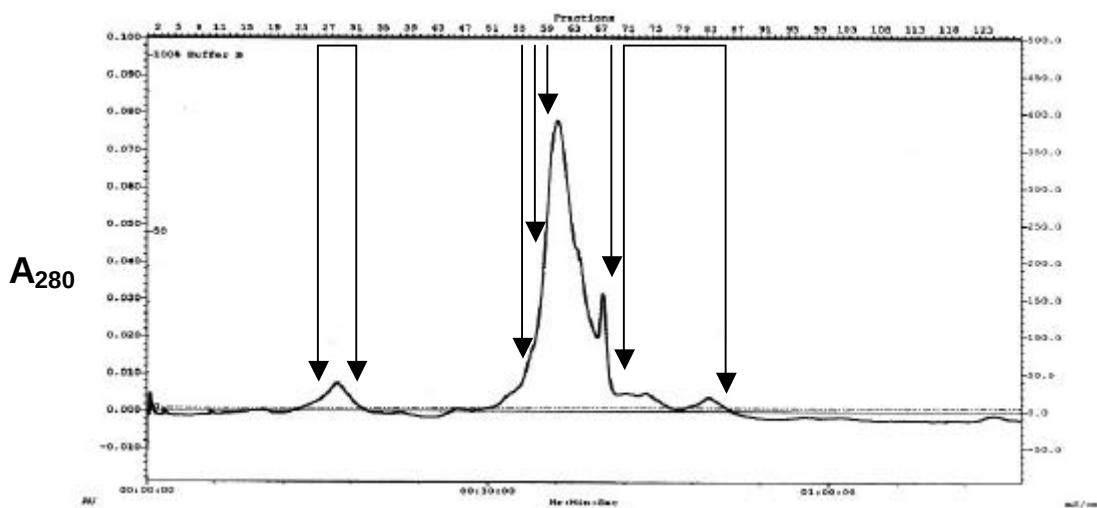


Figura 22 - Cromatografia de exclusão molecular (tipo FPLC) em coluna Superose-12 da fração catiônica eluída da cromatografia de troca aniônica (Protocolo 3). Extratos de sementes maduras de soja da variedade UFV 16 após aquecimento a 80 °C / 15 min e diálise em membrana com limite de exclusão de 12.000 Da. A coluna foi equilibrada em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, e as proteínas foram eluídas no mesmo tampão. Foram coletas frações de 1,5 mL a um fluxo de 0,5 mLmin⁻¹. As frações ou *pools* indicados pelas setas foram analisados por SDS-Tricina-PAGE.

As frações 26-29, 55-56, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67 e 71-83 eluídas da Superose 12 foram liofilizadas, dessalinizadas e submetidas à SDS-Tricina-PAGE para a caracterização da massa molecular das proteínas (Figura 23). Nos géis, observou-se a presença de bandas de massa molecular baixa distribuídas ao longo das frações 55 a 65. Considerando-se que a coluna havia sido calibrada apenas com a Ribonuclease A (MM 13.700), em função da falta de um padrão de massa molecular menor, houve dificuldades em analisar estes resultados. Um dos problemas da purificação destes peptídeos catiônicos é a falta de um teste específico. O enriquecimento deles nas frações é acompanhado apenas pela MM, por análise em SDS-Tricina-PAGE ou por técnicas mais sofisticadas como espectrometria de massa. A separação de proteínas e peptídeos em colunas de purificação por massa molecular também pode apresentar distorções em função de interações destas moléculas com as resinas, dificultando conclusões. Assim, com base nos resultados e dificuldades encontradas, a coluna Superdex Peptide foi adquirida e testada visando obter

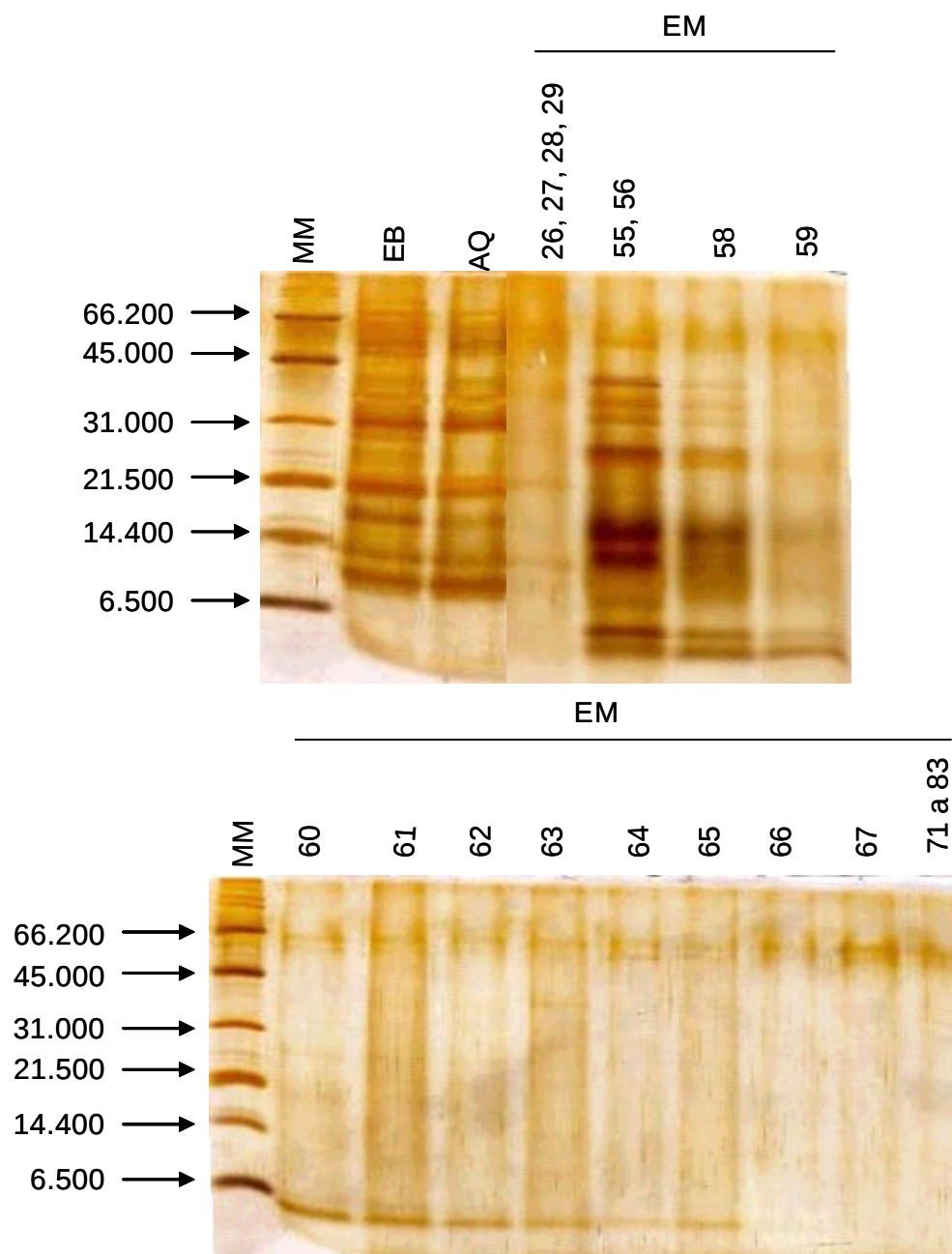


Figura 23 – Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (16,5%) em presença de Tricina do extrato bruto (EB) de sementes maduras de soja da variedade UFV 16, após aquecimento a 80 °C / 15 min (AQ), cromatografia de troca aniônica e de exclusão molecular em coluna Superose 12. Os *pools* ou frações 26-29, 55-56, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67 e 71-83 foram eluídos da cromatografia de exclusão molecular (EM). O gel foi revelado pela técnica da Prata. O padrão de massa molecular de ampla faixa (MM) é composto de (Da): albumina sérica (66.200), ovoalbumina (45.000), anidrase carbônica (31.000), inibidor de tripsina (21.500), lisozima (14.400) e aprotinina (6.500).

maior resolução na separação destes peptídeos e facilitar a análise dos resultados.

5.3.2.5. PROTOCOLOS 4, 5 E FINAL: CROMATOGRAFIAS DE EXCLUSÃO MOLECULAR EM SUPERDEX PEPTIDE

O *pool* das frações catiônicas da variedade UFV 16 foi separado em uma cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex Peptide calibrada com Ribonuclease A (13.700) e Insulina Recombinante Humana (5.808) a um fluxo de $0,5 \text{ mLmin}^{-1}$ do tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, em presença de 150 ou 250 mM de NaCl. A coluna foi equilibrada e as proteínas separadas no mesmo tampão.

Para a separação dos peptídeos, foram testados os seguintes tampões de eluição: fosfato de sódio 50 mM, pH 6,5, contendo 250 mM de NaCl (Figura 24); tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, contendo 250 mM de NaCl (Figura 26) e tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, contendo 150 mM de NaCl (Figura 29).

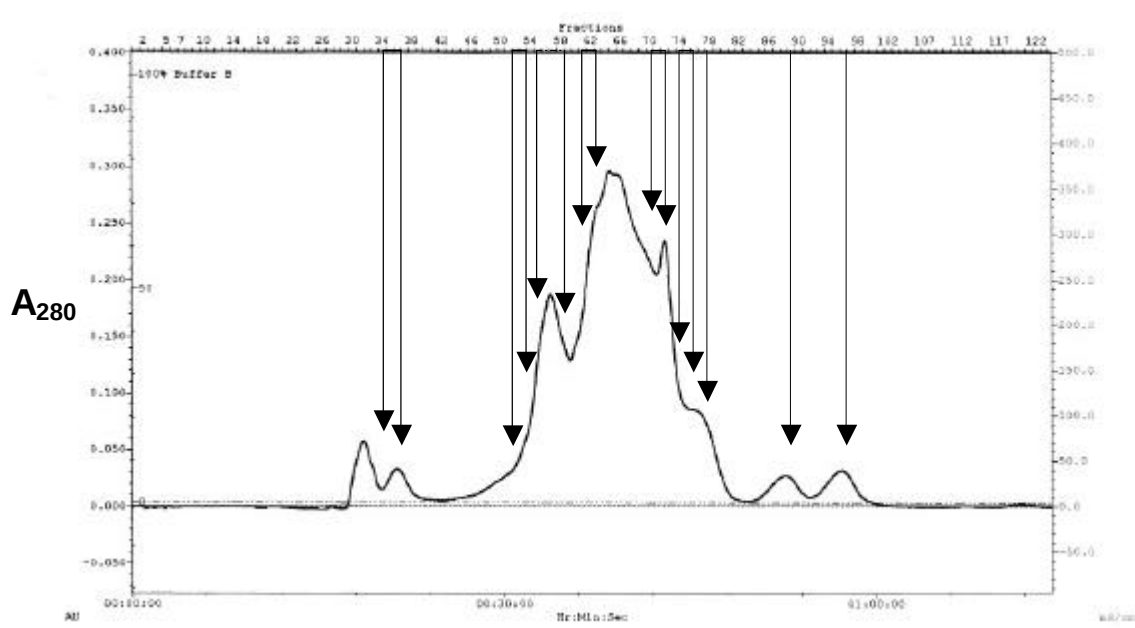


Figura 24 – Cromatografia de exclusão molecular (tipo FPLC) em coluna Superdex Peptide da fração catiônica eluída da cromatografia de troca aniônica (Protocolo 4). A coluna foi equilibrada e as proteínas eluídas em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,5, contendo 250 mM de NaCl. Foram coletadas frações de 0,3 mL a um fluxo de $0,5 \text{ mLmin}^{-1}$. As frações ou *pools* indicados pelas setas foram analisados por SDS-Tricina-PAGE.

As frações eluídas em presença de tampão fosfato, pH 6,5, contendo 250 mM de NaCl foram dialisadas, liofilizadas e separadas por SDS-Tricina-PAGE (Figura 25), e o perfil de bandas observado sugere uma possível agregação dos peptídeos de massa molecular reduzida, nas frações 56, 57, 58, 59, 61-62, 64-66 e 71-72. A agregação destes peptídeos também foi observada por Terras *et al.* (1993), que relata que esta reduzia-se quando os peptídeos eram tratados com agentes redutores (DTT). As mesmas frações peptídicas foram posteriormente tratadas com agentes redutores (20% de 2-mercaptoetanol) e aquecidas a 100 °C por 10 min, conforme sugestão da Profa. Valdirene Moreira Gomes do Laboratório de Bioquímica Microbiana da Universidade Estadual do Norte Fluminense/RJ (informação pessoal), porém não observou-se a redução da agregação peptídica em novas análises por SDS-Tricina-PAGE (dados não apresentados).

Em função deste fato, o tampão foi modificado para o Tris-HCl, pH 8,0, em presença de NaCl, pois o fosfato poderia estar interagindo com as cargas positivas dos peptídeos selecionados.

As frações eluídas em presença de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, contendo 250 mM de NaCl foram avaliadas em espectrofotômetro com leituras de absorvâncias manuais a 214 e a 280 nm, e a proteína total de cada fração foi determinada pelo método de Lowry (dados não apresentados, mostrando-se diretamente proporcional às leituras de A_{214}). Estas análises foram repetidas, com exceção da determinação da proteína total, apresentando resultados semelhantes (Figuras 26 e 27).

Quando os peptídeos foram eluídos em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, contendo 250 mM de NaCl, observou-se uma possível diminuição na agregação dos peptídeos separados por SDS-Tricina-PAGE (Figura 28). A presença de peptídeos nas frações 39 a 49 só foi detectada quando analisada pelo A_{214} lido manualmente no espectrofotômetro (Figura 27), não tendo sido identificados no perfil cromatográfico do equipamento de cromatografia tipo FPLC que faz leitura apenas a 280 nm (Figura 26). Em SDS-Tricina-PAGE confirmou-se a presença de peptídeos com massas moleculares reduzidas (aproximadamente 5 a 8 kDa) nas frações 39 a 49 (Figura 28).

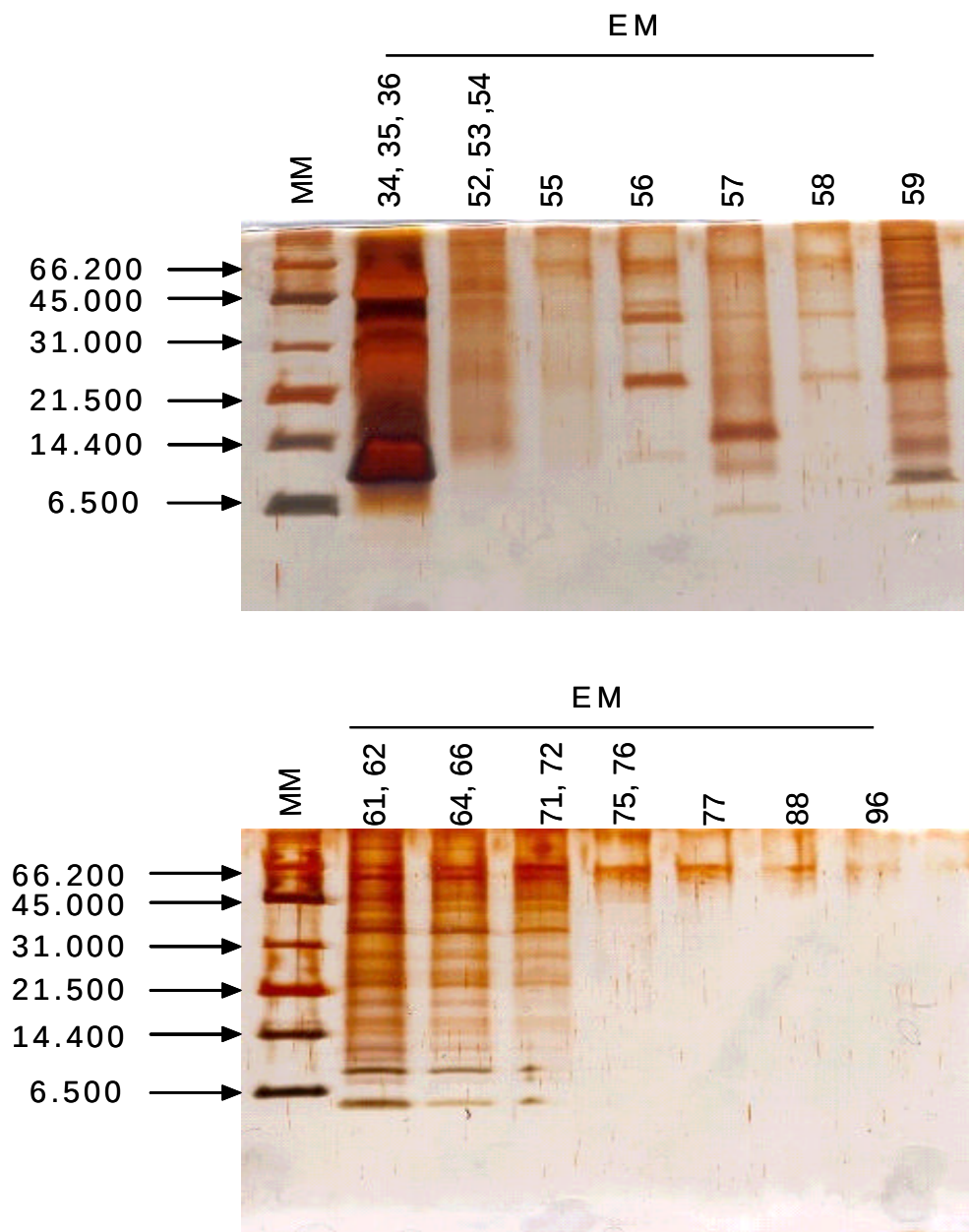


Figura 25 - Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (16,5%) em presença de Tricina das frações 34-36, 52-54, 55, 56, 57, 58, 59, 61-62, 64-66, 71-72, 75-76, 77, 88 e 96 eluídas da cromatografia de exclusão molecular (EM) (Protocolo 4). O gel foi revelado pela técnica da prata. O padrão de massa molecular de ampla faixa (MM) é composto de (Da): albumina sérica (66.200), ovoalbumina (45.000), anidrase carbônica (31.000), inibidor de tripsina (21.500), lisozima (14.400) e aprotinina (6.500).

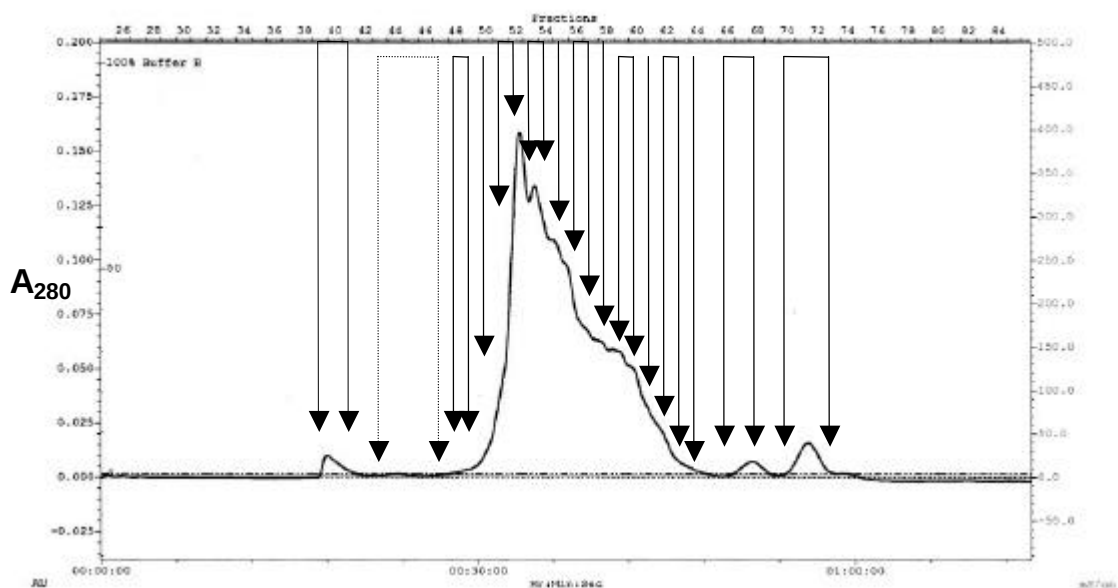


Figura 26 - Cromatografia de exclusão molecular (tipo FPLC) em coluna Superdex Peptide da fração catiônica concentrada eluída da cromatografia de troca aniônica (Protocolo 5). A coluna foi equilibrada e eluída em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, contendo 250 mM de NaCl. Foram coletadas frações de 0,6 mL a um fluxo de 0,5 mLmin⁻¹. As setas indicam as frações ou *pools* analisados por SDS-Tricina-PAGE.

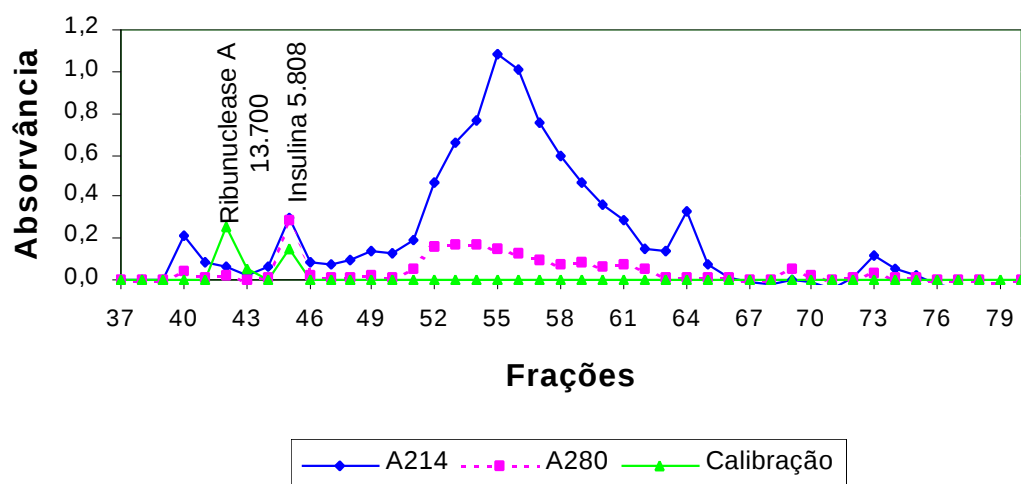


Figura 27 - Valores de absorvância a 214 e 280 nm das frações separadas em coluna Superdex Peptide (Protocolo 5), conforme descrito na Figura 25.

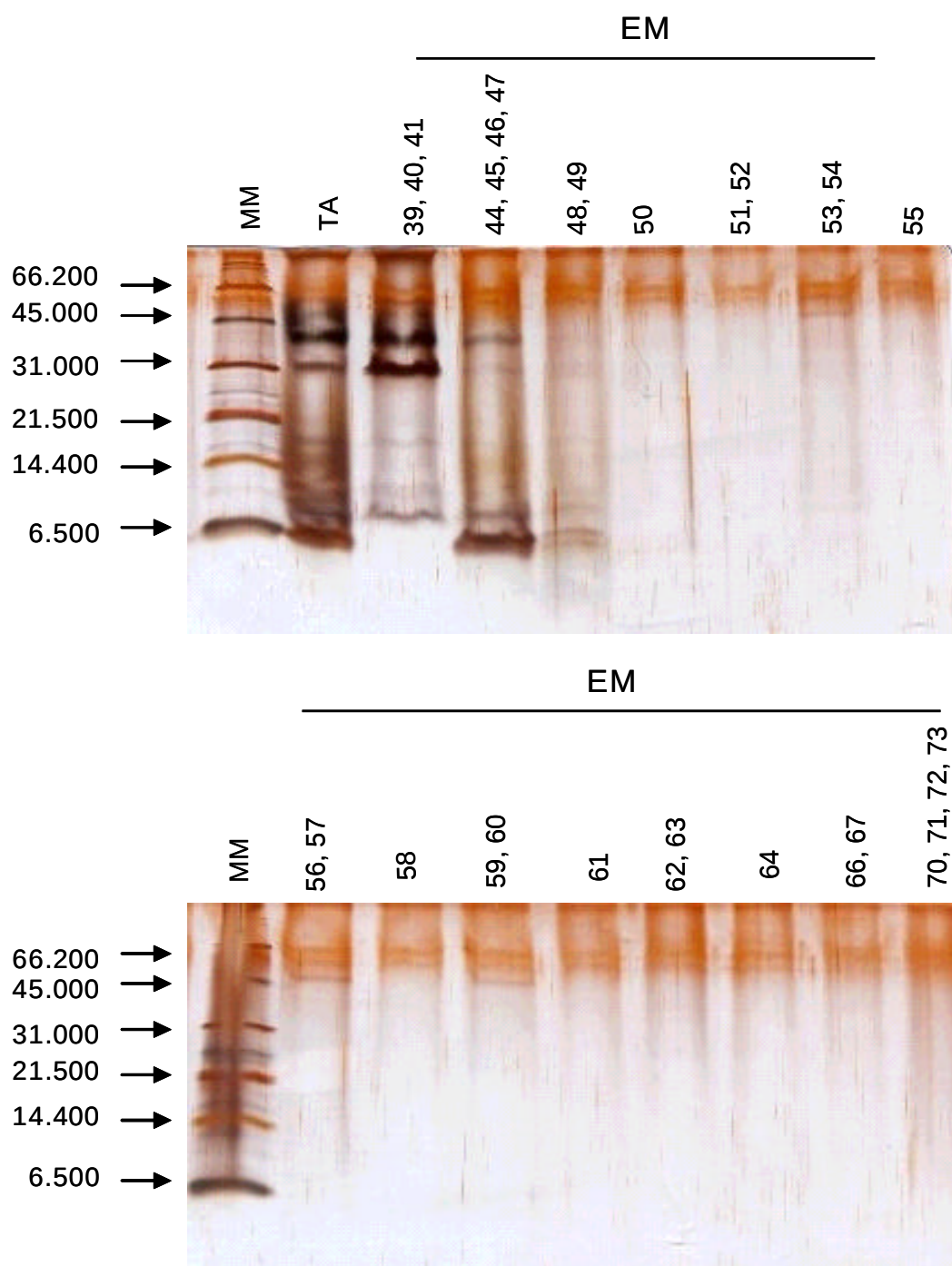


Figura 28 - Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (16,5%) em presença de Tricina do *pool* formado pelas frações eluídas da cromatografia de troca aniônica (TA) e cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex Peptide (Protocolo 5). Os *pools* ou frações 39-41, 44-47, 48-49, 50, 51-52, 53-54, 55, 56-57, 58, 59-60, 61, 62-63, 64, 66-67 e 70-73 foram eluídos da cromatografia de exclusão molecular (EM). O gel foi revelado pela técnica da prata. O padrão de massa molecular de ampla faixa (MM) é composto de (Da): albumina sérica (66.200), ovoalbumina (45.000), anidrase carbônica (31.000), inibidor de tripsina (21.500), lisozima (14.400) e aprotinina (6.500).

Ao comparar os resultados das eletroforeses em gel de tricina das Figuras 25 e 28, verificou-se que com o tampão Tris-HCl obteve-se redução da agregação e uma melhor separação das proteínas de massa molecular reduzida. Estes resultados estão também de acordo com a calibração da coluna que aponta a região entre as frações 39 a 49 como a região peptídica de interesse. Baseado nestes resultados decidiu-se por continuar as purificações usando o tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0.

Considerando-se que a alta concentração de NaCl eluída nesta etapa estava interferindo na liofilização das proteínas para a cromatografia de fase reversa, e que a concentração de 150 mM de NaCl parece ser suficiente para manter alta a força iônica do tampão, evitando interação das proteínas presentes no eluato com a resina usada na cromatografia de exclusão molecular, procedeu-se à redução da concentração de NaCl presente neste tampão para 150 mM em uma cromatografia de exclusão molecular (Figura 29). Neste tampão, pôde-se observar o aparecimento de um pico que aparentemente contém os peptídeos, formado pelas frações 42 e 43, presentes no *pool* 2 (P2 na Figura 29) fato que não ocorria quando o tampão Tris-HCl com 250 mM de NaCl era usado. Este fato poderia ser explicado pela grande quantidade de aminoácidos hidrofóbicos presentes nestes peptídeos, quando a presença de altas concentrações de sal poderia estar retirando a água de solvatação que circunda as proteínas, facilitando a agregação destes peptídeos, que seriam então eluídos anteriormente na coluna como um agregado de massa molecular maior.

As frações eluídas (600 µL) da cromatografia de exclusão molecular usando tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, contendo 150 mM de NaCl (Figura 29), foram separadas em três *pools*, *Pool* 1 (P1), *Pool* 2 (P2) e *Pool* 3 (P3), que foram dialisados, liofilizados e utilizados separadamente para os testes de atividade antimicrobiana. O *pool* 2, que continha as proteínas com massa molecular aproximada de 3.000 a 13.000 Da, definidas pela calibração da coluna (Figura 27) e por observação das bandas no SDS-Tricina-PAGE (Figura 28), também foi submetido à cromatografia de fase reversa em HPLC. O P3 foi subdividido em *Pool* 3a (P3a), *Pool* 3b (P3b), *Pool* 3c (P3c) e *Pool* 3d (P3d), e estes também separados em coluna de fase reversa (C18) ou utilizados para ensaios de atividade antimicrobiana.

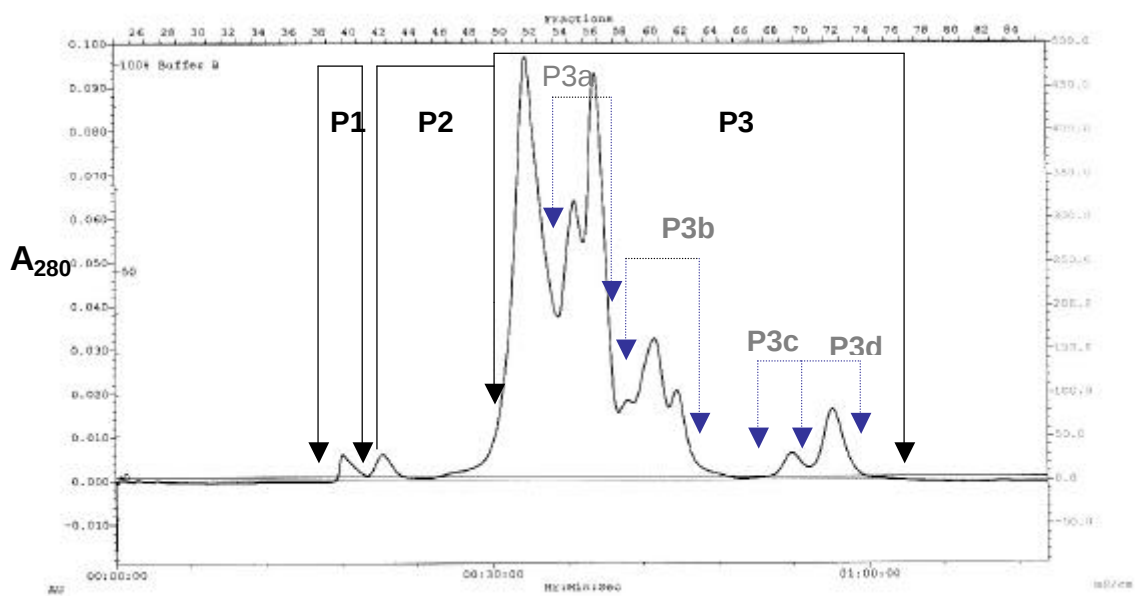


Figura 29 -Cromatografia de exclusão molecular (tipo FPLC) em coluna Superdex Peptide da fração catiônica eluída da cromatografia de troca aniônica (Protocolo Final). A coluna foi equilibrada e as proteínas eluídas em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, contendo 150 mM de NaCl. Foram coletadas frações de 0,6 mL a um fluxo de $0,5 \text{ mLmin}^{-1}$. Os *pools* indicados pelas setas foram separados por cromatografia de fase reversa e analisados por espectrometria de massa ou por testes de atividade antimicrobiana.

5.4. CROMATOGRAFIA DE FASE REVERSA

O *pool* 2 eluído da cromatografia de exclusão molecular, submetido à cromatografia de fase reversa em coluna C_{18} , foi fracionado em cinco picos que foram eluídos em 28,8; 30,2; 32,9; 37,0 e 37,6 % de acetonitrila (Figura 30). A concentração de eluente, na qual os peptídeos presentes nos picos fracionados do *pool* 2 foram eluídos, está na faixa esperada da concentração de acetonitrila para a eluição dos peptídeos catiônicos, 25 a 40% de acetonitrila. Isto se deve ao grande caráter hidrofóbico destes peptídeos, conforme descrito por vários autores (Terras *et al.*, 1992; Terras *et al.*, 1993; Almeida *et al.*, 2000; Carvalho *et al.*, 2001). Esses picos foram analisados no espectrômetro de massa para determinar a massa molecular dos peptídeos presentes.

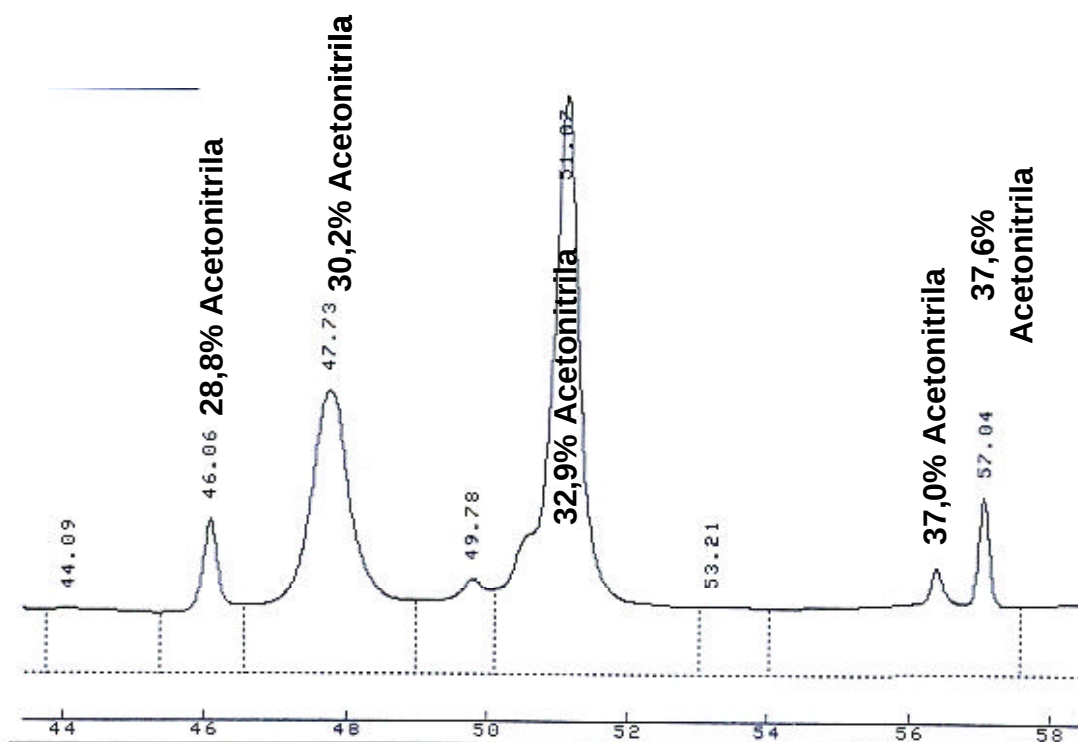


Figura 30 - Cromatografia de fase reversa em HPLC em coluna C18 do *pool 2* eluído da cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex Peptide (Protocolo Final). A coluna foi equilibrada em 0,1% de TFA e os peptídeos eluídos em presença de TFA 0,1% em um gradiente crescente de acetonitrila (0 a 80% acetonitrila), a um fluxo de 1,0 mL min⁻¹. A eluição dos peptídeos foi monitorada a 214 nm. Cada pico foi submetido à espectrometria de massa.

Os *pools* 3a, 3b, 3c e 3d obtidos da divisão do *pool 3* também foram submetidos à cromatografia de fase reversa em coluna C₁₈, em HPLC. O *pool 3a* foi fracionado em cinco picos de maior importância, que foram eluídos em 10,1; 12,4; 14,4; 17,0 e 19,8% de acetonitrila. O *pool 3b* gerou um único pico significativo, que foi eluído em 18,4% de acetonitrila. O *pool 3c* também gerou um único pico significativo, que foi eluído em 6,1% de acetonitrila. O *pool 3d* foi fracionado em dois picos mais significativos, que foram eluídos em 3,2 e 19,3% de acetonitrila (dados não mostrados). Os compostos obtidos do *pool 3* foram eluídos numa concentração de acetonitrila baixa, sugerindo apresentarem característica pouco hidrofóbica, o que não é esperado para os peptídeos catiônicos de interesse.

5.5. ESPECTROMETRIA DE MASSA E SEQUENCIAMENTO DE PEPTÍDEOS PURIFICADOS

No primeiro pico obtido do *pool* 2, eluído em 28,8% de acetonitrila (Figura 30), foram identificados dois peptídeos com massas moleculares de $678,61 \pm 0,01$ Da e de $701,11 \pm 0,71$ Da, calculada a partir da fórmula citada no item 4.8.3 e usando os valores citados de m/z e carga z (Tabela 6 e Figura 31B).

Tabela 6 - Cálculo das massas moleculares dos peptídeos identificados no pico eluído em 28,8% de acetonitrila a partir de suas relações m/z e ionizações (Z)

Z	m/z	MM (daltons)	Z	m/z	MM (daltons)
+1	679,63	678,62	+1	701,62	700,61
+2	340,31	678,61	+2	351,31	700,60
	média $\pm$ SD	$678,61 \pm 0,01$ Da		média $\pm$ SD	$700,60 \pm 0,71$ Da

Os picos eluídos da fase reversa em 30,2 e 32,9% de acetonitrila (Figura 30) apresentaram resultados bastante semelhantes no espectrômetro de massa (Figuras 31 A e 32 C), respectivamente. Ambos apresentaram os picos m/z 288,32 e 316,37 Da que quando fragmentados apresentaram os mesmos m/z moleculares, 57,14; 70,13; 71,15; 85,16; 88,13 e 106,14 (Figura 32 A e B), parecendo ser substâncias estruturalmente relacionadas. Os fragmentos obtidos a partir dos picos de m/z 288,35 e 316,38 apresentam diferenças de 18,0 Da, que devem corresponder a moléculas de água, sugerindo-se que estes compostos possam corresponder a carboidratos. O pico de fase reversa eluído em 32,9% de acetonitrila, além destes dois picos, apresentou também um outro com massa molecular de $14.113,18 \pm 0,2$ Da (Figura 32D). Devido à alta intensidade dos picos de 288,32 e 316,37 em relação ao pico 1.765,18 (+8) e ao 2.017,14 (+7), que definiriam a massa correta da substância de 14.113,18, não foi possível confirmar o valor da referida massa molecular.

pico 4

Pesquisadores: Marcelo Santoro/Adriano

YA086

11:44:22, 18-Feb-2003

DANIELLE04 19 (0.944) AM (Cen:5, 80.00, Ar:0.0,0.00,0.00); Sm (SG, 3x9.00); Sb (5.40.00); Cm (1.21)

TOF MS ES+ 8.90e3

A: 8526.96±0.02

B: 8548.73±0.35

Mass spectrum plot showing relative intensity (%) versus mass-to-charge ratio (m/z). The x-axis ranges from 750 to 1600 m/z. The y-axis ranges from 0 to 100%. The base peak is at m/z 948.45. Other significant peaks are labeled with their m/z values.

m/z	Relative Intensity (%)
729.64	~5
773.66	~5
776.19	~40
817.71	~5
810	~15
853.70	~95
855.84	~10
859.75	~10
861.77	~5
865.08	~5
905.89	~5
948.45	100
952.80	~20
955.07	~10
956.97	~5
959.18	~5
970.03	~5
1064.05	~5
1066.88	~40
1069.60	~10
1074.35	~5
1077.08	~5
1081.86	~5
1112.18	~5
1219.14	~35
1222.26	~10
1227.78	~10
1233.27	~5
1236.17	~5
1274.10	~5
1325.29	~5
1420.18	~5
1422.17	~40
1425.81	~15
1428.45	~10
1432.19	~10
1435.76	~5
1439.22	~5
1444.81	~5
1480.14	~5

Tabela 7 - Cálculo da massa molecular do peptídeo identificado no pico eluído em 37,0% de acetonitrila a partir de sua relação m/z e ionizações (Z)

66

No pico eluído da fase reversa em 37,6% de acetonitrila (Figura 30) também identificou-se a presença dos picos 288,32 e 316,37. Além destes dois picos, verificou-se a presença dos picos com m/z de 1.937,35 (A3), 1.453,28 (A4), 1.162,83 (A5), 1.957,06 (C3), 1.463,00 (C4), 1.957,49 (D3) e 1.468,42 (D4) (Figura 34). Estes picos relacionam-se com as massas moleculares de: A, $5.809,09 \pm 0,03$ Da; B, $5.831,24$ Da; C, $5.847,57 \pm 0,42$ Da; e D, $5.869,54 \pm 0,10$ Da; calculadas a partir da fórmula citada no item 4.8.3 (Tabela 8). Os peptídeos com massas moleculares de $5.831,24 \pm 0,00$ Da; $5.847,57 \pm 0,42$ e de $5.869,54 \pm 0,10$ Da devem representar aductos de Na^+ , K^+ e $\text{Na}^+ + \text{K}^+$, respectivamente, inseridos no peptídeo de massa molecular $5.809,09 \pm 0,03$ Da.

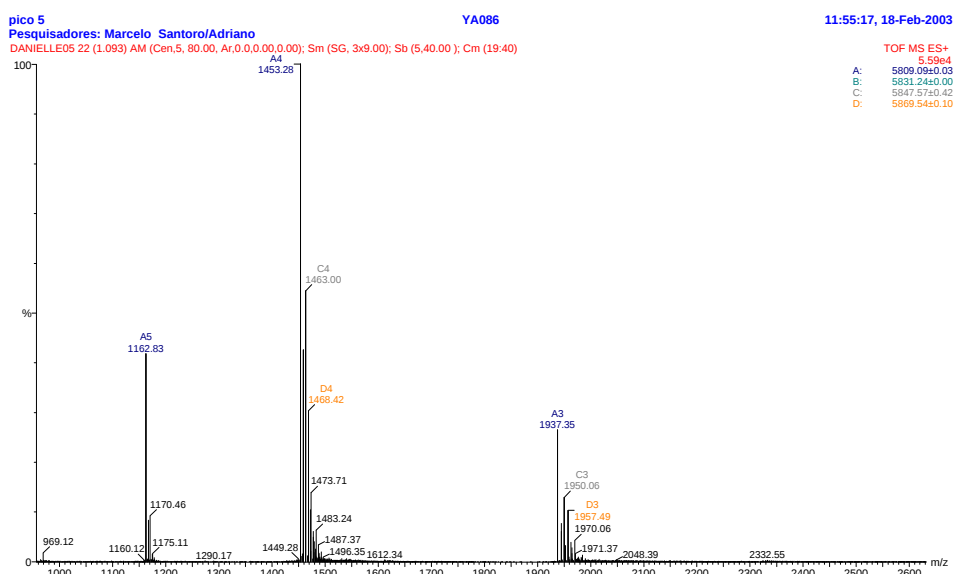


Figura 34 - Espectrometria de massa do pico eluído da fase reversa em 37,6% de acetonitrila na cromatografia de fase reversa do P2 eluído da cromatografia de exclusão molecular (Protocolo 5).

Tabela 8 - Cálculos das massas moleculares dos peptídeos identificados no pico eluído em 37,6% de acetonitrila a partir de suas m/z e ionizações (Z)

Z	m/z	MM (daltons)	Z	m/z	MM (daltons)
A+3	1.937,35	5.809,03	B+3	1.945,39	5.831,15
A+4	1.453,28	5.809,09	B+4	1.458,82	5.831,25
A+5	1.162,83	5.809,11	B+5	1.167,29	5.831,41
	média±SD	5.809,08±0,03 Da		média±SD	5.831,0±0,00 Da

Z	m/z	MM (daltons)	Z	m/z	MM (daltons)
C+3	1.950,06	5.847,16	D+3	1.957,49	5.869,45
C+4	1.463,00	5.847,97	D+4	1.468,42	5.869,65
	média±SD	5.847,57±0,02 Da		média±SD	5.869,55±0,10 Da

A análise no espectrômetro de massa dos compostos eluídos nos *pools* 3a, 3b, 3c e 3d da cromatografia de exclusão molecular (Figura 29) indicou a presença dos picos moleculares de m/z 136,10; 311,14 e outros. Estas amostras foram fragmentadas para verificar se estes picos moleculares são peptídeos. Entretanto, não verificou-se a presença de aminoácidos na composição destes *pools*, indicando porém a presença de substâncias não protéicas de baixas massas moleculares, sugerindo-se que possam corresponder a compostos orgânicos de plantas, como as fitoanticipinas e outras (Morrissey & Osbourn, 1999), que poderão ser posteriormente avaliados individualmente para a detecção de atividade biológica e caracterização.

O peptídeo purificado, de massa molecular 5.809,09±0,03 Da, foi submetido ao seqüenciamento parcial do N-terminal pela técnica de degradação de Edman automatizada. Foi obtida uma seqüência de 32 resíduos de aminoácidos e a comparação desta seqüência em banco de dados (NCBI BLAST2 com buscas no Swiss-Prot/TrEMBL, <http://ca.expasy.org/tools/blast/>) mostrou que o peptídeo seqüenciado apresenta uma alta homologia de seqüência com as cadeias B da pró-insulina humana, da insulina bovina e da insulina de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformes*) (Oliveira *et al.*, 1999) (Figura 35). Entretanto a seqüência da leg insulina de soja não apresentou homologia com as

seqüências do peptídeo isolado, de insulinas animais e de plantas e do fator de crescimento tipo insulina. A seqüência de leg insulina possui 65% de similaridade com o peptídeo PA1b da albumina 2S PA1 de semente de ervilha (Watanabe *et al.*, 1994). Higgins *et al.*, (1986) observou que o peptídeo PA1a de ervilha está associado com o retículo endoplasmático sendo depositado em corpos protéicos, sugerindo sua função no armazenamento de proteínas. Em contraste, o sítio subcelular de acumulação do PA1b ainda não é conhecido. É possível que ambos PA1b e leg insulina, envolvidos na transdução de sinal celular, não sejam armazenados em corpos protéicos mas que estejam envolvidos no mecanismo de crescimento ou regulação metabólica em plantas, similarmente à insulina e aos fatores de crescimento tipo insulina em animais. Isto possivelmente ocorre pelo fato de a leg insulina ser capaz de se ligar à insulina e ao fator de crescimento tipo insulina (Watanabe *et al.*, 1994). A identificação de peptídeos semelhantes à insulina em plantas de soja não é um fato único, já que vários outros autores identificaram a presença deste peptídeo em plantas (Collip, 1923; Best *et al.*, 1924; Khanna *et al.*, 1974; Gray & Flatt, 1997; Silva *et al.*, 2002) e em organismos de diferentes Filos (Silva *et al.*, 2002) (Tabela 2). Além da homologia com a seqüência da pró-insulina de vários seres vivos, também foram identificadas homologias deste peptídeo com o fator de crescimento 1 do tipo Insulina, dentre outras.

O peptídeo de $8.526,97 \pm 0,04$ Da foi também submetido ao seqüenciamento dos 20 aminoácidos da extremidade amino-terminal pela técnica de degradação de Edman automatizada, e a comparação desta seqüência em banco de dados (NCBI BLAST2 com buscas no Swiss-Prot/TrEMBL, <http://ca.expasy.org/tools/blast/>) mostrou que o peptídeo apresentou pouca homologia de seqüência com compostos com atividade biológica (Figura 36). Exemplificando, foi observada pequena homologia com a integrina β -4-humana, com uma proteína hipotética de camundongo e com uma proteína hipotética de *Arabidopsis thaliana*, identificadas pelas seqüências dos genes e com funções ainda não determinadas. Estas análises deverão ser repetidas após a obtenção de nova fração purificada, sendo os resultados obtidos até o momento não conclusivos para este peptídeo.

Pept. isolado -FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTP**QNK**.....

Pró-insul.Hu. -FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTP**KR**EAEDLQVGQVELGGPGAGSLQPLALEGSLQ**KR**GIVEQCCTSI**CSLYQ**LENYCN

Leginsulina - ADCNGACSPFEVPPCRSRDCRCVPIGLFVFGIHPTG

Insl Bov cad A- GIVEQCASVCSLYQ**LENYCN**

Insl Bov cad B- FVNOHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTP**KA**

Insl Plnt cad A- GIVEQCASVCSLYQ**LENYCN**

Insl Plnt cad B- FVNOHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTP**KA**

Tipo	Do....até	Comprimento	Descrição
CADEIA B	<u>1 30</u>	30	CADEIA B DA INSULINA
PEPTÍDEO C	<u>33 63</u>	31	PEPTÍDEO C
CADEIA A	<u>66 76</u>	21	CADEIA A DA INSULINA
PEPTÍDEO ISOLADO		32	N-TERMINAL DO PEPTÍDEO ISOLADO
DISSULFETO	<u>7 72</u>		INTERCADEIA.
DISSULFETO	<u>19 85</u>		INTERCADEIA.
DISSULFETO	<u>71 76</u>		INTRACADEIA.

Figura 35 – Comparação da seqüência de aminoácidos do peptídeo isolado (Pept. Isolado) com as seqüências da pró-insulina humana (Pró-insul.Hu), da leg insulina de soja (*Glycine max*), da insulina bovina (Insl. Bov) e da insulina de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*) (Insl. Plnt

10	20	30	40	50	60
MGPIKTIKKK	KRAEKKVDRN	VLLAATAAAT	SASAAAALNN	NDDDDSSSQ	SLDWWDGFSR
70	80	90	100	110	120
RIYGGSTDPK	TFESVFKISR	KTFDYICSLV	KADFTAKPAN	FSDSNGNPLS	LNDRVAVALR
130	140	150	160	170	180
RLGSGESLSV	IGETFGMNQS	TVSQITWRFV	ESMEERAIHH	LSWPSKLDEI	KSKFEKISGL
190	200	210	220	230	240
PNCCGAIDIT	HIVMNLPAVE	PSNKVWLDGE	KNFSMTLQAV	VDPDMRFLDV	IAGWPGSLND
250	260	270	280	290	300
DVVLKNSGFY	KLVEKGKRLN	GEKLPLSERT	ELREYIVGDS	GFPLLPWLLT	PYQGKPTSLP
310	320	330	340	350	360
QTEFNKRHSE	ATKAAQMALS	KLKDRWRIIN	GVMWMPDRNR	LPRIIFVCCL	LHNI I I DMED
				GQIFVCCLPG	QCICLEVW
				10	
370	380	390	400		
QTLDDQPLSQ	QHDMNYRQRS	CKLADEASSV	LRDELSQQLC	GKNSSA	
SW					
20					

Figura 36 – Seqüência de aminoácidos do peptídeo de $8.526,97 \pm 0,04$ Da (negrito) comparada com a seqüência de aminoácidos da proteína hipotética de *Arabidopsis thaliana*. O sublinhado indica os aminoácidos que apresentaram identidade.

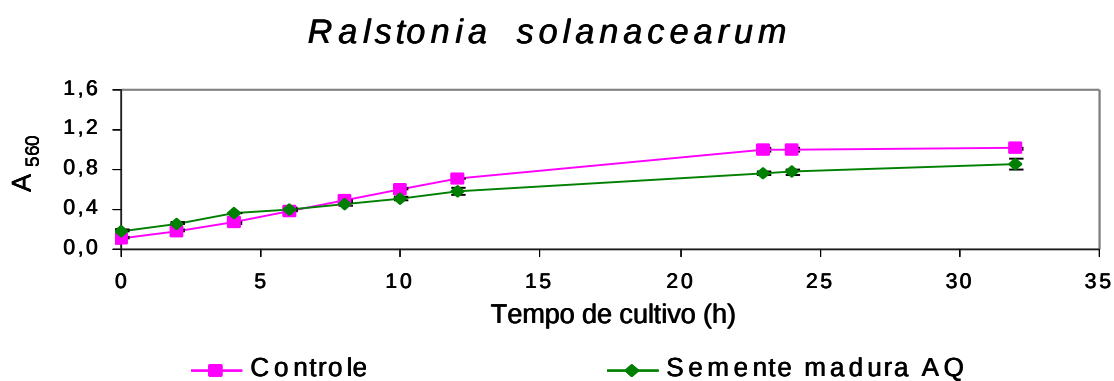
5.6. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Foram realizados testes preliminares de atividade antimicrobiana das frações obtidas após o aquecimento seletivo (AQ) das proteínas da semente madura de soja (Figura 37). Comparando-se os crescimentos em presença e em ausência da fração peptídica analisada, observou-se que ocorreu uma inibição do crescimento das bactérias *Ralstonia solanacearum* (A) e *Clavibacter michiganensis* (B) de cerca de 20-25 % após as 12 h iniciais de cultivo, inibição que persistiu por 32 h (Figura 37A) ou por 64 h (Figura 37B), respectivamente para as bactérias. Deve-se salientar que o grau de inibição parece ser dependente da concentração de peptídeos presentes na amostra. Assim, uma maior concentração destes peptídeos purificados seria necessária para desenvolver curvas de dose-resposta para determinar a concentração de peptídeos necessária à inibição de 50% do crescimento destes e de outros microrganismos patogênicos.

Com os *pools* 1, 2 e 3 eluídos da cromatografia de exclusão molecular (Figura 29), também foram realizados testes da atividade antimicrobiana dos compostos sobre as bactérias *Ralstonia solanacearum* e *Clavibacter michiganensis* (Figura 38). Os compostos presentes nos *pools* 2 e 3 inibiram parcialmente o crescimento da bactéria *Ralstonia solanacearum* (Figura 38 A), ao longo das 26 h de cultivo analisadas, enquanto que para a bactéria *Clavibacter michiganensis* (Figura 38 B), somente o *pool* 3 exerceu alguma ação, mas com a inibição do crescimento menor do que a obtida para a *Ralstonia solanacearum* e mais efetiva no início do cultivo.

Salienta-se que a bactéria que teve seu crescimento inibido pelos *pools* 2 e 3 é classificada como Gram-negativa, enquanto que a não inibida pelo *pool* 2 é Gram-positiva. Este conjunto de resultados sugere a presença de peptídeos com atividade antimicrobiana no *pool* 2, que serão melhor caracterizados posteriormente. Deve-se observar que por análise de espectrometria de massa, o *pool* 2 evidenciou a presença de 2 peptídeos de massas moleculares 5.809,09 e 8.526,97. Observa-se que uma pequena proteína de massa molecular 14.113,18 também foi detectada no *pool* 2, sendo necessária a obtenção de maior quantidade desta fração purificada para realizar nova análise de espectrometria de massa e seqüenciamento dos aminoácidos da cadeia protéica.

A



B

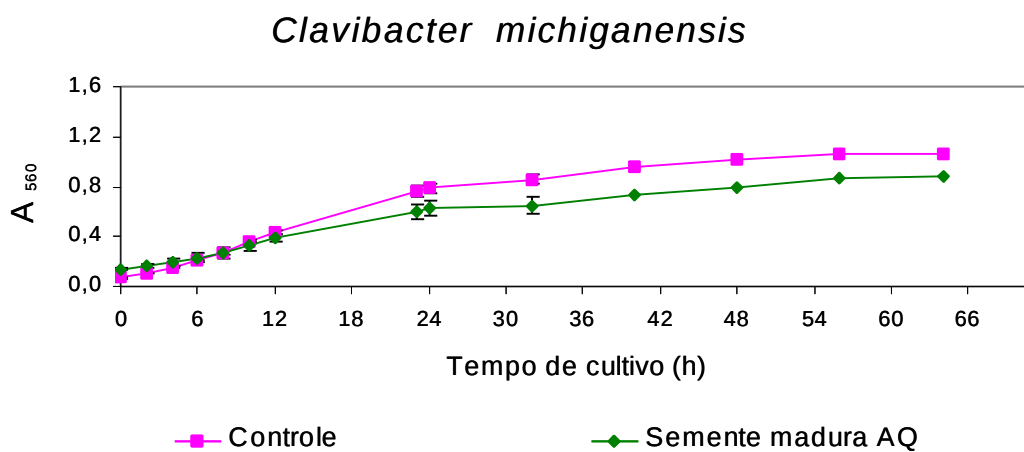


Figura 37 - Testes de inibição do crescimento das bactérias A) *Ralstonia solanacearum* e B) *Clavibacter michiganensis* pela fração de peptídeos parcialmente purificada por fracionamento por sulfato de amônio 35-65 % sat. e aquecimento seletivo (AQ) de sementes maduras de soja. O controle corresponde ao cultivo dos microrganismos em ausência da fração peptídica. O desvio padrão está representado pelas barras e corresponde à média de três repetições.

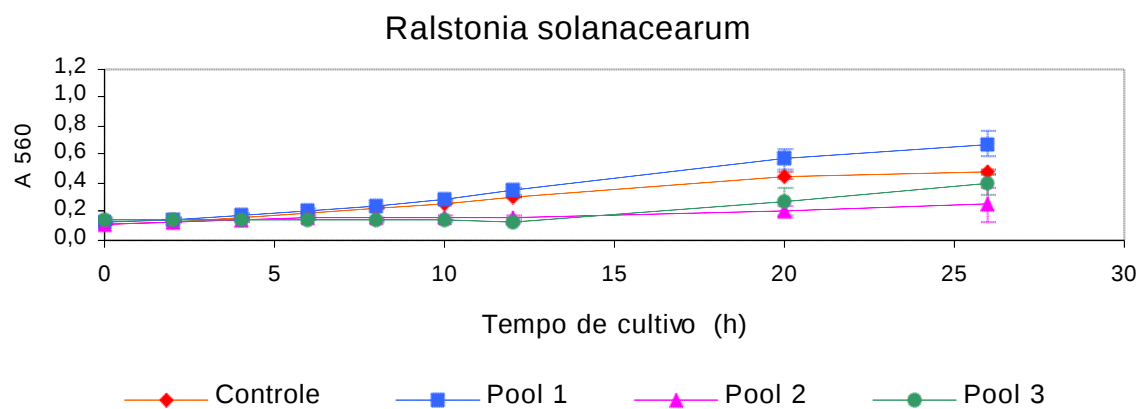
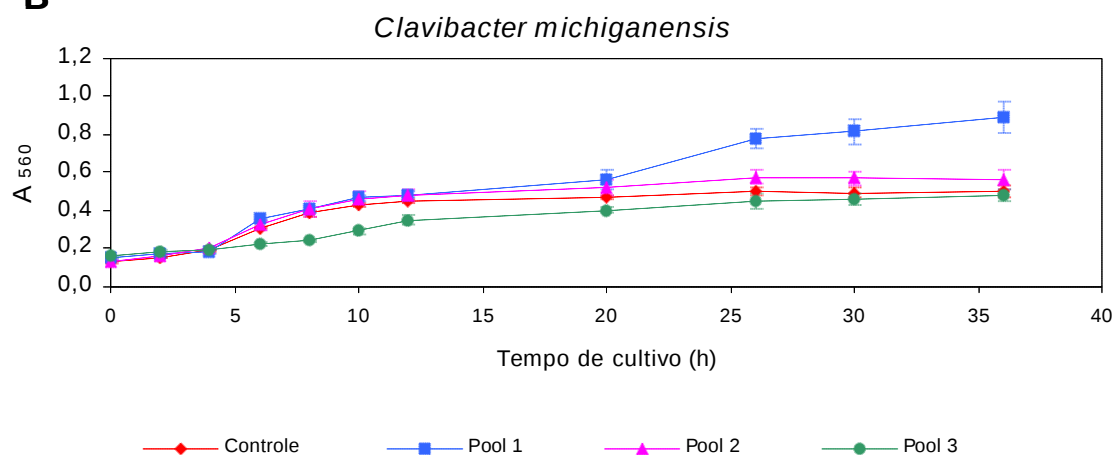
A**B**

Figura 38 - Testes de inibição do crescimento das bactérias A) *Ralstonia solanacearum* e B) *Clavibacter michiganensis*, para os *pools* 1, 2 e 3 eluídos da cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex Peptide, parcialmente purificados de semente maduras de soja. O controle corresponde ao cultivo dos microrganismos em ausência da fração peptídica. O desvio padrão está representado pelas barras e corresponde à média de quatro repetições.

Baseando-se nos resultados obtidos da espectrometria de massa do *pool* 3, que indicam a presença de compostos não protéicos de baixa massa molecular, e em sua atividade antimicrobiana, sugere-se a possível presença de compostos orgânicos de plantas, como as fitoanticipinas ou outros, presentes nestas frações. Testes de atividade antimicrobiana foram então realizados com os *pools* 3a, 3b, 3c e 3d fracionados do *pool* 3 obtido da cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex Peptide, contra a bactéria *Ralstonia solanacearum* (Figuras 39 e 40) para avaliar a presença de compostos com atividade antimicrobiana nestes diferentes *pools*. Nos *pools* 3a, 3b, 3c e 3d, o crescimento da bactéria testada foi parcialmente inibido, principalmente nas frações de maior concentração dos compostos testados. Deve-se observar que a quantidade de proteínas presentes em cada *pool* avaliado não foi a mesma, não sendo possível comparar o efeito antimicrobiano dentre os *pools*. Sugere-se que essas substâncias poderiam ser compostos orgânicos com ação antimicrobiana, sendo que alguns foram já bem caracterizados e descritos, como as fitoanticipinas presentes nas plantas (Morrissey & Osbourn, 1999), que apresentam atividade antimicrobiana, principalmente contra fungos fitopatogênicos. Salienta-se que massas moleculares reduzidas foram identificadas nos experimentos de espectrometria de massa para estas frações. Segundo Morrissey & Osbourn (1999), citando vários autores, muitas plantas produzem metabólitos antimicrobianos secundários, ao lado dos peptídeos e proteínas de defesa, como parte de seu crescimento e desenvolvimento normal ou em resposta ao ataque de fitopatógenos ou ao estresse, protegendo as plantas do ataque microbiano.

Em função da baixa quantidade de material que é possível recuperar de cada fração em uma purificação a partir de 100 g de sementes maduras de soja, testes de atividade antimicrobiana contra fungos fitopatogênicos não foram realizados para nenhuma fração purificada, sendo objetivo desenvolvê-los tão logo seja possível obter quantidades suficientes de material parcial ou totalmente purificado.

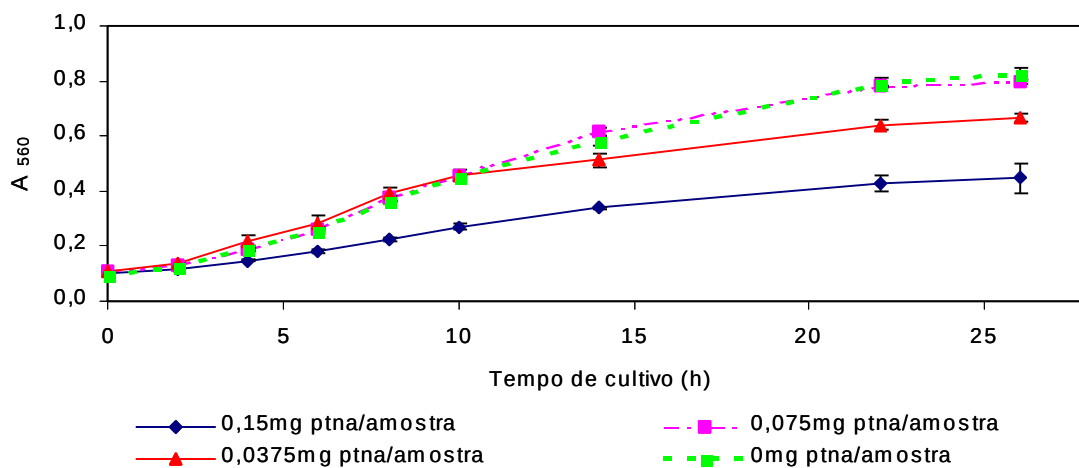
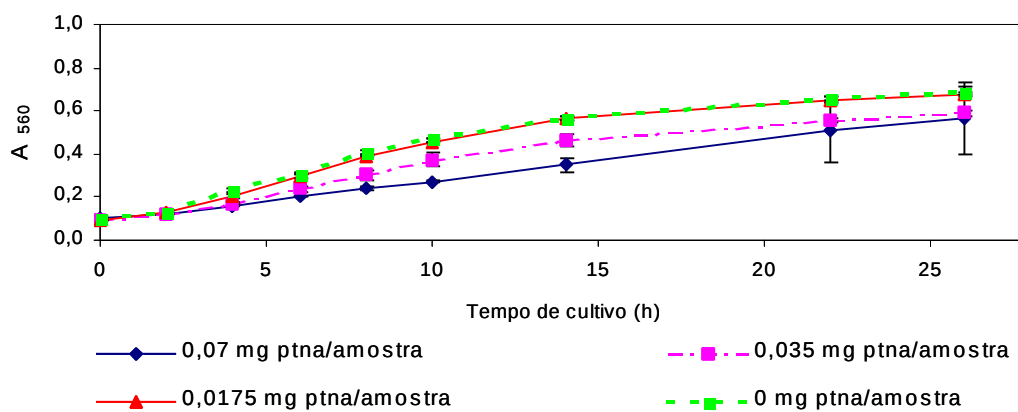
A*Ralstonia Solanacearum* - Pool 3a**B***Ralstonia solanacearum* - Pool 3b

Figura 39 - Testes de inibição do crescimento da bactéria *Ralstonia solanacearum* nas diferentes concentrações das frações peptídicas eluídas da cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex Peptide parcialmente purificadas de sementes maduras de soja. A) Pool a B) Pool b. O controle corresponde ao cultivo dos microrganismos em ausência da fração peptídica. O desvio padrão está representado pelas barras e corresponde à média de três repetições.

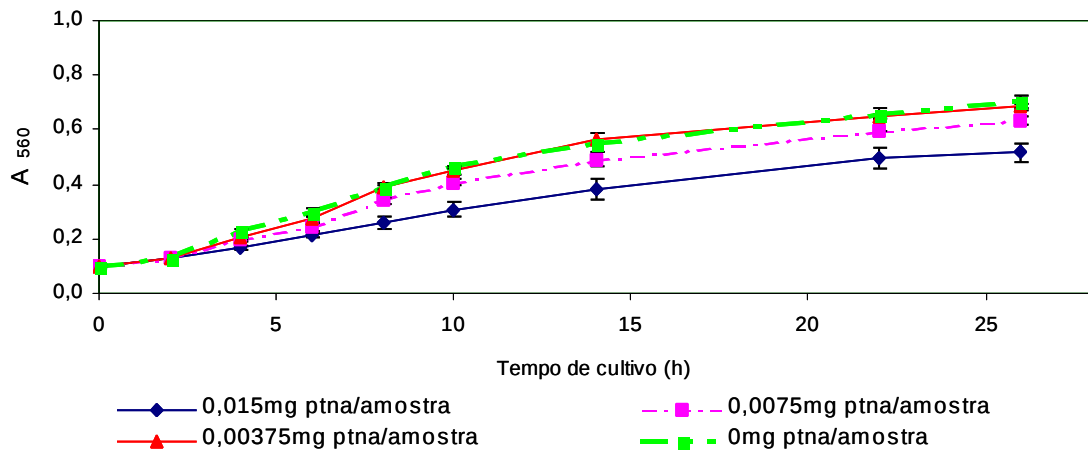
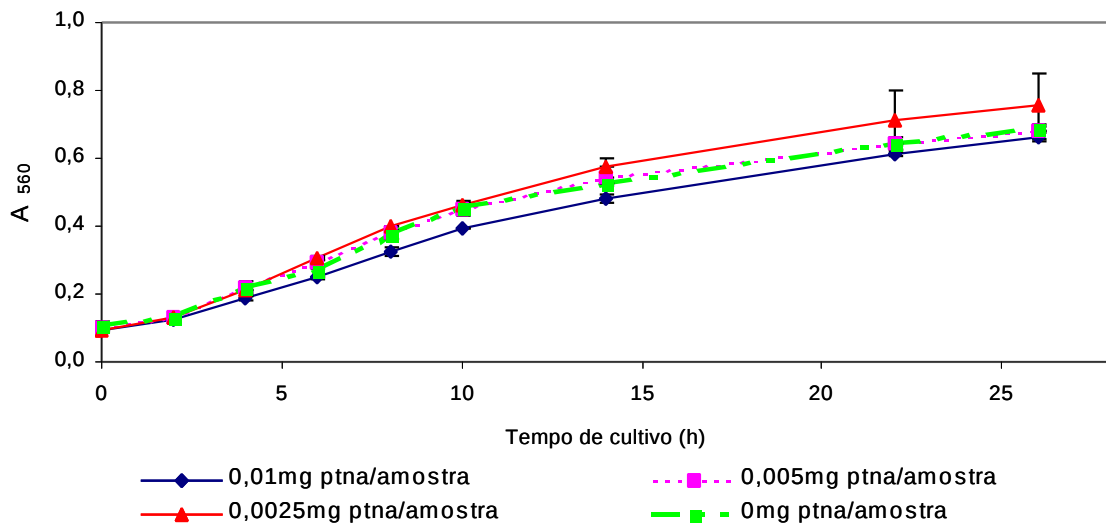
A*Ralstonia Solanacearum* - Pool 3c**B***Ralstonia Solanacearum* - Pool 3d

Figura 40 - Testes de inibição do crescimento da bactéria *Ralstonia solanacearum* nas diferentes concentrações das frações peptídicas eluídas da cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex Peptide parcialmente purificadas de sementes maduras de soja. A) *Pool c* ; B) *Pool d*. O controle corresponde ao cultivo dos microrganismos em ausência da fração peptídica. O desvio padrão está representado pelas barras e corresponde à média de três repetições.

6. CONCLUSÕES

- A purificação dos peptídeos catiônicos de sementes maduras de soja foi realizada pelo uso de precipitação com sulfato de amônio, aquecimento seletivo e cromatografias de troca iônica em coluna DEAE-Sepharose, de exclusão molecular em coluna Superdex Peptide e de fase reversa em coluna C₁₈.
- Foram identificados no *pool* 2, da cromatografia de exclusão molecular, por análise de espectrometria de massa, peptídeos com massas moleculares de 5.809,11; 8.526,97 e 14.113,18 Da e compostos com 678,61 e 700,60 Da. E no *pool* 3 foram identificada compostos de massas moleculares inferiores a 500 Da.
- A sequência de aminoácidos do peptídeo de 5.809,11 Da mostrou alta homologia de sequência com as cadeias B da pró-insulina humana e de vários outros organismos, da insulina bovina e da insulina de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformes*).
- Os peptídeos presentes no *pool* 2 e no *pool* 3 inibiram parcialmente o crescimento da bactéria Gram-negativa *Ralstonia solanacearum* na concentração avaliada, enquanto que para a bactéria Gram-positiva *Clavibacter michiganensis*, somente o *pool* 3 exerceu alguma ação, mas com a inibição do crescimento menor que a obtida para a *Ralstonia solanacearum* e mais efetiva no início do cultivo.
- A metodologia para purificação dos peptídeos catiônicos vegetais foi determinada com sucesso, e vem sendo utilizada no laboratório para a identificação e o estudo destes peptídeos em outras espécies vegetais.

7. PERSPECTIVAS

Em continuidade ao trabalho de purificação e caracterização bioquímica de peptídeos de semente madura de soja, aqui iniciado, objetiva-se a obtenção de maiores quantidades dos peptídeos purificados identificados pelo espectrômetro de massa para a realização dos testes da atividade biológica para outros fitopatógenos e outros testes de caracterização.

Com o pico de massa molecular de 5.809,11 Da, além do teste para avaliar a redução da taxa de glicose no sangue de camundongos diabéticos e sadios, também será realizada a fragmentação deste peptídeo, com proteases específicas, para a realização do seqüenciamento destes fragmentos, obtendo-se então a sua seqüência completa de aminoácidos.

Um novo seqüenciamento, com quantidades maiores do peptídeo de 8.526,97 Da, será realizado, após fragmentação com enzimas proteolíticas, para a determinação da seqüência completa deste peptídeo, e obtenção de melhores resultados da homologia deste peptídeo com proteínas conhecidas. Testes das atividades antimicrobianas deste peptídeo purificado também serão realizados para caracterização de sua atividade biológica.

Grandes quantidades da proteína de massa molecular 14.113,18 Da, detectada no *pool* 2, serão necessárias para realizar nova análise de espectrometria de massa e seqüenciamento dos aminoácidos desta proteína. Testes das atividades antimicrobianas desta pequena proteína também serão realizados para avaliar sua atividade biológica.

Após obtenção de grandes quantidades das frações purificadas no HPLC, testes da atividade destes compostos contra fungos fitopatogênicos, serão realizados.

É o objetivo futuro a caracterização estrutural dos peptídeos identificados por técnicas diversas como dicróismo circular, determinação do número e posição das pontes dissulfeto e outras.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alfenas, A.C. Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins. Fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa: UV, 1998, 574p.
- Almeida, M. S.; Cabral, K. M. S.; Zingali, R. B. and Kurtenbach, E. Characterization of Two novel defense peptides from pea (*Pisum sativum*) seeds. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **378** (2): 278-286, 2000.
- Alper, J. New insights into type 2 diabetes. *Sciences*, **289**: 37-39, 2000.
- Andreu, D.; Rivas, L. Animal antimicrobial peptides: an overview. *Biopolimers* **47**: 415-433, 1998.
- Aumelas, A.; Mangoni, M.; Roumestand, C.; Chiche, L.; Despaux, E.; Grassy, G.; Calas, B.; Chavanieu, A. Synthesis and solution structure of the antimicrobial peptide protegrin-1. *Eur J Biochem* , **237**: 575-583, 1996.
- Baumann, C. A.; Ribon, V.; Kanzaki, M.; Thurmond, D. C.; Mora, S.; Shigematsu, S.; Bickel, P. E.; Pessin, J. E. and Saltiel, A. R. CAP defines a second signalling pathway required for insulin-stimulated glucose transport. *Nature*, **407**: 202-207, 2000.
- Best , C.H. Recent work on insulin. *Endocrinology*, **8**: 617-629, 1924.
- Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, Peptídeos antibióticos
- Bohlmann, H. The role of thionins in plant protection. *Crit. Ver. Plant Sci.*, **13**: 1-16, 1994.
- Boman, H. G. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu. Rev. Immunol.*, **13**: 61-92, 1995.
- Broekaert, W. F.; Terras, F. R. G.; Cammue, B. P. A. and Vanderleyden, J. An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. *FEMS Microbiol Lett.*, **69**: 55-60, 1990.
- Broekaert, W. F.; Mariën, W.; Terras, F. R. G.; De Bolle, M. F. C.; Proost, P.; Damme, J. V.; Dillen, L.; Claeys, M.; Rees, S. B.; Vanderleyden, J. and Cammue, B. P. A. Antimicrobial peptides from *Amaranthus caudatus* seeds with sequence homology to the cysteine/glycine-rich domain of chitin-binding proteins. *Biochemistry*, **31**: 4308-4314, 1992.
- Broekaert, W. F.; Terras, F. R. G.; Cammue, B. P. A. and Osborn, R. W. Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant Physiol.*, **108**: 1353-1358, 1995.
- Broekaert, W. F.; Cammue, B. P. A.; De Bolle, M. F. C.; Thevissen, K.; De Samblanx, G. W. and Osborn, R. W. Antimicrobial peptides from plants. *Crit. Rev. Plant Sc.*, **16**: 297-323, 1997.
- Brugiere, N.; Rothstein SJ and Cui Y. Molecular mechanisms of self-recognition in *Brassica* self-incompatibility. *Trends Plant Sci.*, **5**: 432-438, 2000.

- Bruix, M.; Jiménez, M. A.; Santoro, J.; González, C.; Colilla, F. J.; Méndez, E. and Rico, M. Solution structure of gamma 1-P thionins from barley and wheat endosperm determined by $^1\text{H-NMR}$: a structural motif common to toxic arthropod proteins. *Biochemistry*, **132**: 715-724, 1993.
- Brüning, J. C.; Gautman, D.; Burks, D. J.; Gillette, J.; Schubert, M.; Orban, P. C. Klein, R.; Krone, W.; Müller-Wieland, D. and Kahan, C. R. Role of brain insulin redeptor in control of body weight and reproduction. *Science*, **289**: 2122-2125, 2000.
- Bulet, P.; Dimarcq, J.L.; Hetru, C.; Lagueux, M.; Charlet, M.; Hegy, G.; Van Dorsselaer, A. and Hoffmann, J.A. A novel inducible antibacterial peptide produced of *Drosophila* carries an O-glycosylated substitution. *J. Biol. Chem.*, **268**: 14893-14897, 1993.
- Bulet, P.; C. Hetru; J. L. Dimarcq; D. Hoffmann. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Dev Comp Immunol.* **23**: 329-44, 1999.
- Burden, R. J. and Bailey, J. A. Structure of the phytoalexin from soybean. *Phytochemistry*, **14**: 1389-1390, 1975.
- Cammue, B. P. A.; De Bolle, M. F. C.; Terras, F. R. G.; Proost, P.; Damme, J. V.; Rees, S. B.; Vanderleyden, J. and Borekaert, W. F. Isolation and characterization of a novel class of plant antimicrobial peptides from *Mirabilis jalapa* L. seeds. *J. Biol. Chem.*, **267**: 2228-2233, 1992.
- Carvalho, A. O.; Machado, O. L. T.; Cunha, M. D.; Santos, I. S. and Gomes, V. M. Antimicrobial peptides and immunocalization of a LTP in *Vigna unguiculata* seeds. *Plant Physiol. Biochem*, **39**: 137-146, 2001.
- Collier, E.; Watkinson, A.; Cleland, C. F. and Roth, J. Partial purification and characterization of a insulin-like material from spinach and Lemma gibba G3, *J. Biol. Chem*, **262**: 6238-6247, 1987.
- Collip, J. B. Glucokinin. A new hormone present in plant tissue. Preliminary paper. *J. Biol. Chem*, **56**: 513-543, 1923
- Christensen B, F. J., Merrifield R. B. and Mauzerall, D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 5072-5076, 1988.
- Dangl, J.L.; Jones, J.D.G. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, **411**: 826-833, 2001.
- Dixon, R. A., and Lamb, C. J. Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **41**: 339-367, 1990.
- Embrapa. Tecnologias de Produção de soja Região Central do Brasil 2003 (Sistema de Produção), 1677-8499, 2002.
- Edman, P. Method for determination of the amino acid sequence in peptides. *Acta Chem. Scand.*, **4**: 283-293, 1950.
- Farmer, E. E. and Ryan, C. A. Octadecanoid jasmonate precursors active the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant. Cell*, **4**: 129-134, 1992.
- Ganz, T. and Lehrer, R. I. Antibiotic peptides from higher eukaryotes: Biology and applications. *Molec. Medicine Today*, **5**: 292-297, 1999.

- Garcia-Olmedo, F.; Molina, A.; Alamillo, J. M. and Rodríguez-Palenzuela, P. Plant defense peptides. *Biopolymers*, **47**: 479-491, 1998.
- García-Olmedo, F.; Rodríguez-Palenzuela, P.; Molina, A.; Alamillo, J. M.; López-Solanilla, E.; Berrocal-Lobo, M. and Poza-Carrión, C. Antibiotic activities, hydrogen peroxide and peroxynitrite in plant defense. *FEBS Lett.*, **498**: 219-222, 2001.
- Gogelein, H. and Huby, A. Interaction os saponin and digitonin with black lipid membranes and lipid monolayers. *Biochim. Biophys. Acta*, **773**: 32-38, 1984.
- Gray, A. M. and Flatt, P. R. Nature's own pharmacy: The diabetes perspective. *Proc. Nutr. Society*, **56**: 507-517, 1997.
- Hancock, R.E.W. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *The Lancet Infectious Diseases*, **1**: 156-164, 2001.
- Hancock, R.E.W. and Diamond, G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defense. *Trends in Microbiology*. **8**: 402-410, 2000.
- Hancock, R.E.W. and Scott, M.G. The role pf antimicrobial peptides in animal defenses. *PNAS*. **97**: 8856-8861, 2000.
- Hancock, R. E. W. and Chapple, D. S. Peptide antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother*, **43**: 1317-1323, 1999.
- Hancock, R. E. W. and Lehrer, R. Cationic peptides; a new source of antibiotics. *Trends Biotechnol.*, **16**: 82-88, 1998.
- Hara T.; Kodama, H.; Kondo; M.; Wakamatsu, K.; Takeda, A.; Tachi T. and Matsuzaki, K. Efects of peptide dimerization on pore formation: Antiparallel disulfide-dimerized magainin 2 analogue. *Biopolymers*, 58:437-446, 2001.
- Heaney, S; Slawson, D.; Hollomon, D. W.; Smith, M.; Russell,P. E. and Parry, D. W.,.Fungicide Resistance. *Thornton Heath: British Crop Protection Council.*, 1994.
- Heinemann, J. A.; Ankenbauer,R. G. and Amibile-Cuevas, C. F. Do antibiotics maintain antibiotic resistance?. *DDT*, **5**:195-204, 2000.
- Heukeshoven, J. And Dernick, R. Characterization of a solvent system for separation of water-insoluble poliovirus proteins by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Electrophoresis*, **6**: 103, 1985.
- Higgins, T. J. V.; Chandler, P. M.; Randall, P. J. Spencer, D.; Beach, L. R.; Blagrove, R. J.; Kortt, A. A. and Inglis, A. S. Gene structure, protein structure, and regulation of the synthesis of a sulfur-rich protein in pea seeds. *J. Biol. Chem.*, **261**: 11124-11130, 1986.
- Hoffmann, J. A. Innate immunity of insects. *Curr. Opinion in Immunol.*, **7**: 4-10, 1995.
- Hoffmann, J. A.; Kafatos, F.C.; Janeway, C.A. and Ezekowitz, R.A. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science*, **284**: 1313-1318, 1999.

<http://www.magainin.com>

<http://ca.expasy.org/tools/blast/>)

- Janeway, C.A.Jr. Presidential address to the American Association of Immunologists. The road less traveled by: the role of innate immunity in the adaptative immune response. *J. Immunol.*, **61**: 539-544, 1998.
- Jonsson, A.P. Mass spectrometry for protein and peptide characterization. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* **58**: 868-884, 2001.
- Kado, C. I. and Heskett, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xantomonas*. *Phytopatology*, **60**: 969-979, 1970.
- Keubens, E. A. J.; Vrije, T. de; van den Boom, C.; Waard, P. de; Plasmma, H. H.; Thiel, F., Chupin, V.; Jongen, W. M. F. and Kruijff, B. de. Molecular basis of glycosalkaloid induced membrane disruption. *Biochim. Biophys. Acta*, **1240**: 216-228, 1995.
- Khanna, P.; Nag, T. N.; Chardrajai, S.. and Mohan, S. Process for isolation of insulin from plant source. *Granted United States Patent*, **3**: 945-988, 1976.
- Knight, S. C.; Anthony, V. M.; Brady, A. M.; Greenland, A. J.; Heaney, S. P.; Murray, D. C.; Powell, K. A.; Schulz, M. A.; Spinks, C. A.; Worthington, P. A. and Youle, D. Rationale and perspectives on the development of fungicides. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **35**: 349-372, 1997.
- Krijgsveld, J.; Zaat, S.A.; Meeldijk, J.; van Veelen, P.A.; Fang, G.; Poolman, B.; Brandt, E.; Ehlert, J.E.; Kuijpers, A.J.; Engbers, G.H.; Feijen, J. and Dankert, J. Thrombocidins, microbicidal proteins from human blood platelets, are C-terminal deletion products os CXC chemokines. *J. Biol. Chem.*, **275**: 20374-20381, 2000.
- Landon, C.; Sodano, P.; Hetru, C.; Hoffmann, J. and Ptak M. Solution structure of drosomycin, the first inducible antifungal protein from insects. *Protein Science*, **6**: 1878-1884, 1997.
- Layne, E. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins . In: Colowick, S. P. & Kaplan, N. O. (eds) *Methods in Enzimology*, **3**: Academic Press, New York, 1957.
- Lehrer, R. L. and Ganz, T. Cathelicidins: a family of endogenous antimicrobial peptides. *Curr. Opin. Hematol.*, **9**: 18-22, 2002.
- Liang, J.F. and Kim, S. C J. Not only the nature of peptide but also the characteristics of cell membrane determine the antimicrobial mechanism of a peptide. *Peptide Res.*, **53**: 518-522. 1999.
- Linn, S. Strategies and consideration for protein purification. In: DEUTSCHER, M. P. (ed). *Methods in Enzymology – Guide to protein purification*, vol. 182, Academic Press, San Diego, 1990. pp. 9-15.
- Lindsey, K.; Casson, S. and Chilley, P. Peptides: new signalling molecules in plants. *TRENDS in Plant Science*, **7**: 78-83, 2002.
- Lohner, K. The role of membrane lipid composition in cell targeting of antimicrobial peptides. In "Development of novel antimicrobial agents: Emerging strategies. Lohner, K. (ed), Horizon Scientific Press, England, 2001. pp. 149-165.
- Lo, SCC. and Nicholson, RL. Reduction of light-induced anthocyanin accumulation in inoculated sorghum mesocotyls. *Plant Physiol.*, **116**: 979-989, 1998.

- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L. and Randall, R. J. *J. Biol. Chem.* **193**: 265, 1951.
- Matsubayashi, Y.; Yang, H. and Sakagami, Y. Peptide signals and their receptors in higher plants. *Trends in Plant Sci.*, **6**: 573-577, 2001.
- Mendez, E.; Moreno, A.; Collila, F.; Pelaez, F.; Limas, G. G.; Mendez, R.; Soriano, F.; Salinas, M. and DeHaro, C. Primary structure and inhibition of protein synthesis in eukaryotic cell-free system of a novel thionin, gamma-hordothionin, from barley endosperm. *Eur. J. Biochem.*, **194**: 533-539, 1990.
- Meyer, T.S. and Lamberts, B.L. Use of coomassie brilliant blue R 250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips. *Biochim. Biophys. Acta*, **107**: 144, 1965.
- Molina, A.; Segura, A. and Garcia-Olmedo, F. Lipid transfer proteins (nsLTPs) from barley and maize leaves are potent inhibitors of bacterial and fungal plant pathogens. *FEBS Lett.*, **316**: 119-122, 1993.
- Morrissey, J. P. and Osbourn, A. E. Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **63**: 708-724, 1999.
- Nelson, D.L. and Cox, M.M. *Lehninger - Principles of Biochemistry*. 3rd ed. Worth Publisher, New York, 2000. 1152p
- Oliveira, A. E. A.; Machado, O. L. T.; Gomes, V. M.; Xavier Neto, J.; Pereira, A. C.; Vieira, J. G. H.; Fernandes, K. V. S. and Xavier-Filho, J. Jack bean seed coat contains a protein with complete sequence homology to bovine insulin. *Protein and Peptide Lett.*, **6**: 15-21, 1999.
- Organização Mundial da Saúde (OMS) - Obesidade está associada a 80% dos casos de diabetes. O Globo, Rio de Janeiro (6/12/1998).
www.mre.gov.br/cdbrasil/itamaraty/web/port/relext/mre/nacun/agespec/oms/
- Patel, S. U.; Osbourn, R.; Rees, S. and Thornton, J. M. Structural studies on *Impatiens balsamina* antimicrobial protein (Ib-AMPI). *Biochemistry*, **37**: 983-990, 1998.
- Park, C. J.; Park, C. B.; Hong, S. S.; Lee, H. S.; Lee, S. Y. and Kim, C. Characterization and cDNA cloning of two glycine- and histidine-rich antimicrobial peptides from the roots of shepherd's purse, *Capsella bursa-pastoris*. *Plant. Mol. Biol.*, **44**: 187-197, 2000.
- Pearce, G.; Strydom, D.; Johnson, S. and Ryan, C. A. A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. *Science*, **253**: 895-898, 1991.
- Peschel, A. How do bacteria resist human antimicrobial peptides? *Trends in Microbiology*, **10**: 179-186, 2002.
- Powell, W. A.; Catranis, C. M. and Maynard, C. A.. Synthetic antimicrobial peptide design. *Mol Plant Microbe Interact.*, **8(5)**: 792-4, 1995.
- Purkayastha, R. P. Progress in phytoalexin research during the past 50 years. In: Daniel, M.; Purkayastha, R. P. (Ed.). *Handbook of Phytoalexin Metabolism and Action*. New York: Marcel Dekker, 1995, pp. 1-39.

- Raven, P. H.; Evert, R. F. and Eichhorn, S. E. Biology of Plants. 5th edn. Worth Publishers, New York, NY, USA, 1992.
- Rozek A.; Friedrich, C.L. and Hancock, R.E. Structure of the bovine antimicrobial peptide indolicidin bound to dodecylphosphocholine and sodium dodecyl sulfate micelles. *Biochemistry*, **39**:15765-15774, 2000.
- Sediyama, T.; Teixeira, R.C.; Andrade, M.A.S.; Dutra, J.H.; Gomes, J.L.L. and Reis, MS. Caracterização de oito cultivares de soja da UFV. *Prospecto CEPET Editora da UFV*, Viçosa, 2001.
- Segura, A.; Moreno, M. and Garcia-Olmedo, F. Purification and antipathogenic activity of lipid transfer proteins (LTPs) from the leaves of *Arabidopsis* and spinach. *FEBS Lett.*, **332**: 243-246, 1993.
- Segura, A.; Moreno, M.; Madueño, F.; Molina, A. and Garcia-Olmedo, F. Snakin-1 a peptide from potato that is active against plant pathogens. *Molec. Plant-Microbe Int.*, **12**: 16-23, 1999.
- Schagger, H. and Von Jagow, G. Tricine-sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Ann. Biochem.*, **166**: 368-379, 1987.
- Schöder, J-M. Epithelial peptide antibiotics. *Biochemical Pharmacol.*, **57**: 121-134, 1999.
- Shutov, A.D. and Vaintraub, I.A. Degradation of storage proteins in germinating seeds. *Phytochemistry*, **26**: 1557–1566, 1987.
- Silva, J. B.; Santos, S. S. S.; Azevedo, C. R.; Cruz, M. A. L.; Venâncio, T. M.; Cavalcante, C. P.; Uchôa, A. F.; Astolfi Filho, S.; Oliveira, A. I. A.; Fernandes, R. V. S. and Xavier-Folho, J. The leaves of green plants as well as a cyanobacterium, a red alga, and fungi contain insulin-like antigens. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **35**: 297-303, 2002.
- Simmaco, M.; Mignogna, G. and Barra, D. Antimicrobial peptides from amphibian skin: What do they tell us? *Biopolymers*, **47**: 435-450, 1998.
- Steffens, J. J.; Pell, E. J. and Tien, M. Mechanisms of fungicide resistance in phytopathogenic fungi. *Curr. Opinion in Biotech.*, **7**:348-355, 1996.
- Taylor, R. H.; Acland, D. P.; Attenborough, S.; Cammue, B. P. A.; Evans, I. J.; Osborn, R. W.; Ray, J. A.; Rees, S. B. and Broekaert, W. F. A novel family of small cysteine-rich antimicrobial peptides from seed of *Impatiens balsamina* is derived from a single precursor protein. *J. Biol. Chem.*, **272**: 24480-24487, 1997.
- Tam, J. P.; Yi-An, L.; Jin-Long, Y. and Koiu-Wei, C. An unusual structural motif of antimicrobial peptides containing end-to-end macrocycle and cystine-knot disulfides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**: 8913-8918, 1999.
- Tanaka, M. A. S., Passos, F. A. and Betti, J. A. *Sci. Agric.*, **54 (3)**: 9003-9016, 1997.
- Tang, Y. Q.; Yuan, J.; Osapay, G.; Osapay, K.; Tran, D.; Miller, C.J.; Ouellette, A.J. and Selsted, M.E. A cyclic antimicrobial peptide produced in primate

- leukocytes by the ligation of two truncated α -defensin. *Science*, **286**: 498-502, 1999.
- Tejada, G. M.; Pizzaro-Cerda, J.; Moreno, E. and Moriyon, I. The outer membranes of *Brucella* spp. are resistant to bactericidal cationic peptides. *Infect. Immun.*, **63**: 3054-3061, 1995.
- Terras, F. R. G.; Schoofs, H. M. E.; De Bolle, M. F. C.; Leuven, F. V.; Rees, S. B.; Vanderleyden, J.; Cammue, P. A. and Broekaert, W. F. Analysis two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *J. Biol. Chem.*, **267**: 15301-15309, 1992.
- Terras, F. R. G.; Torrekens, S.; Van, Leuven, F.; Osborn, R. W.; Vanderleyden, J.; Cammue, B. P. A. and Broekaert, W. F. A new family of basic cysteine-rich plant antifungal proteins from Brassicaceae species. *FEBS Lett.*, **316**: 233-240, 1993.
- Terras, F. R. G.; Eggermont, K.; Kovaleva, V.; Raikhel, N. V.; Osborn, R. W.; Kester, A.; Rees, S. B.; Torrekens, S.; Leuven, F. V.; Vanderleyden, J.; Cammue, P. A. and Broekaert, W. F. Small cysteine-rich antifungal proteins from Radish: Their role in host defense. *Plant Cell*, **7**: 573-588, 1995.
- Thevissen, K.; Ghazi, A.; De Samblanx, G. W.; Brownlee, C.; Osborn, R. W. and Broekaert, W. F. Fungal membrane responses induced by plant defensins and thionins. *J. Biol. Chem.*, **271**: 15018-15025, 1996.
- Trabi, M.; Schirra, H.J. and Craik, D.J.T. Three-dimensional structure of RTD-1, a cyclic antimicrobial defensin from Rhesus macaque leukocytes. *Biochemistry*, **2001**: 4211-4221, 2001.
- Turkenburg-van Diepen M. G. W. - Crystallographic studies of modified insulin (A Thesis Submitted to the University of York for the Degree of Doctor of Philosophy Department of Chemistry) <http://www.yorvic.york.ac.uk/~mgwt/thesis-th/chapter1.html> ,1996.
- VanEtten, H. D., Mansfield, J. W., Bailey, J. A. and Farmer, E. E. Two classes of plant antibiotics: phytoalexins versus "phytoanticipins". *Plant Cell*, **6**: 1191-1192, 1994.
- Zasloff, M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **84**: 5449-5453, 1987.
- Zasloff, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, **415**: 389-395, 2002.
- Watanabe, Y.; Barbashow, S. F.; Komatsu, S.; Hemmings, A. M.; Miyagi, M.; Tsunasawa, S. and Hirano, H. A peptide that stimulates phosphorylation of the plant insulin-binding protein isolation, primary structure and cDNA cloning. *Eur. J. Biochem.*, **224**: 167-172, 1994.