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

RAFAEL DA CONCEIÇÃO SIMÕES

CARACTERIZAÇÃO DE LECTINAS DE LEGUMINOSAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSA.

FORTALEZA
2011

RAFAEL DA CONCEIÇÃO SIMÕES

CARACTERIZAÇÃO DE LECTINAS DE LEGUMINOSAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSA.

Dissertação de mestrado submetida à coordenação do Curso de Pós Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica

Área de concentração: Bioquímica Vegetal

Orientador: Dr. Benildo Sousa Cavada
Co-Orientador: Dr Celso Shiniti Nagano

FORTALEZA
2011

RAFAEL DA CONCEIÇÃO SIMÕES

CARACTERIZAÇÃO DE LECTINAS DE LEGUMINOSAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSA.

Dissertação de mestrado submetida à coordenação do Curso de Pós Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal

Aprovada em: _____/_____/_____

BANCA EXAMINADORA

_____

Prof. Dr Benildo Sousa Cavada (Orientador)
Universidade Federal do Ceará

_____

Prof. Dr. Celso Shiniti Nagano (Co-Orientador)
Universidade Federal do Ceará

_____

Prof. Dr. Rodrigo Maranguape Silva da Cunha
Universidade Estadual do Vale do Acaraú

Aos meus pais José e Nanci Simões, meus pilares, Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro a Deus, criador do nosso rico e biodiverso universo, autor de todas as coisas. Agradeço pela sua grande obra e pelo dom da minha vida;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada, que me acolheu em seu grupo e me deu grandes oportunidades. Agradeço também pela sua amizade, pelos conselhos e pelo exemplo de ser humano e de pesquisador;

Ao Prof. Celso Shiniti Nagano, por me aceitar como co-orientando e ter me ensinado muito sobre espectrometria de massa, organização do ambiente de trabalho e relacionamento com as pessoas;

Ao Prof. Dr Rodrigo Maranguape Silva da Cunha por aceitar fazer parte da banca avaliadora dessa dissertação;

Ao prof. Bruno Anderson Matias da Rocha, pelos ensinamentos diversos durante todo o mestrado, pela amizade e pelos bons conselhos;

Aos meus amigos de mestrado Eduardo, Francisco Júnior e Maria Júlia pelo companheirismo nesses dois anos de noites acordadas preparando seminários e escrevendo monografias e essa dissertação. Sem vocês seria muito menos divertido;

Aos grandes amigos que fiz no laboratório, Helton, Rômulo, Ito, Raquelzinha, Tales, Joana, Mayron, Bruno Lopes, Joana, Emmanuel e Márcia Marinho. Obrigado pelos muitos momentos sérios de troca de informação e crescimento juntos e obrigado pelos muitos momentos de desestresse, pelas palavras e pelos ouvidos emprestados quando precisei;

Aos colegas de laboratório Guilherme, Fernando, Kássia, Arthur, Alfa, Sâmia, Ana Claudia, Camila, Claudener, Alysson, Suzete e Batista pela colaboração desde que cheguei a Fortaleza;

A todos os professores do grupo BioMol – LAB, Prof. Alexandre, Profa Kyria, Profa Silvana e a todos os alunos do BioMol lab;

A todos os professores e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC;

Aos professores Luzimar Gonzaga Fernandez, Renato Delmondez de Castro, Marta Bruno Loureiro e Iara Sordi Joachim Bravo pela grande colaboração em minha vida acadêmica.

Aos meus amigos que me acompanharam durante a iniciação científica, Rafael Teixeira, Eduardo Gomes, Cimilli Gabrieli, Jailson Brito, Ivana Virgens, Wilson Nascimento, Saulo Aflitos, Nayra Negreiros e Paulo Teixeira.

Aos meus eternos amigos Diana, Tiga, Marnet, Joca Boêmio, Jorge Malungo, Gabriel, Laert, Tiago Brito, Marília, Fábio Sande. Obrigado pela amizade sempre, mesmo distante a presença de vocês é sempre constante em minha vida.

A minha namorada Aline Josino pela paciência e por toda compreensão e apoio principalmente nessa última fase de escrita da dissertação.

A minha família pela compreensão de que a minha vinda para Fortaleza era importante e por ter me dado apoio incondicional em todas as minhas decisões. Obrigado Karol, Ana, Dona Noca, Rebeca, Bruna e principalmente obrigado Seu Simões e Dona Nanci, por serem os pais perfeitos. Agradeço a Deus todos os dias por ter me colocado em tão boas mãos.

Por fim, agradeço a todos que de alguma maneira contribuíram para o sucesso desse trabalho.

“Tudo tem seu apogeu e seu declínio... É natural que seja assim, todavia, quando tudo parece convergir para o que supomos o nada, eis que a vida ressurge, triunfante e bela! Novas folhas, novas flores, na infinita benção do recomeço!” (Chico Xavier)

RESUMO

A espectrometria de massa é uma técnica amplamente utilizada em todos os setores produtivos. Desde o final dos anos 80 com o surgimento de técnicas de ionização brandas, a espectrometria de massa vem sendo amplamente difundida na análise de biopolímeros como ácidos graxos, ácidos nucléicos, oligossacarídeos e principalmente proteínas. Lectinas são proteínas de origem não imune que possuem pelo menos um domínio de ligação específica e reversível a carboidratos, sem a capacidade de modificá-los. Estas proteínas são amplamente distribuídas na natureza. As lectinas isoladas de sementes de leguminosas estão entre as mais estudadas e possuem alta homologia, sendo importantes marcadores moleculares da evolução dentro desta família vegetal. Este trabalho teve como objetivo caracterizar lectinas da família Leguminosae através de espectrometria de massa. As lectinas de Erythrina velutina (EVA) e *Luetzelburgia auriculata* (LAA) com 240 e 237 resíduos de aminoácidos respectivamente foram analisadas quanto a massa molecular nativa e foi determinada a sequencia de aminoácidos. As estruturas primárias mostraram alto grau de homologia com outras lectinas de leguminosas. A lectina ConGF, uma ConA-Like, foi analisada quanto ao conteúdo protéico do cristal. O cristal está composto da cadeia madura alfa e seus os fragmentos proteolíticos, o que indica não haver diferença entre a estrutura ligada covalentemente e as cadeias unidas por interações fracas. A sequência parcial demonstra que ConGF possui características estruturais da subtribo Diocleinae. Todos os resultados demonstram que a técnica de espectrometria de massa é uma ferramenta versátil e robusta para caracterização de proteínas e pode ser usada com sucesso para obtenção de informações estruturais de lectinas.

Palavras Chave: Espectrometria de massa, lectina, leguminosa, LAA, EVA, ConGF

ABSTRACT

Mass spectrometry is a technique widely used in all productive sectors. Since the late '80s with the emergence of soft ionization techniques, mass spectrometry has been widely disseminated in the analysis of biopolymers such as fatty acids, nucleic acids, oligosaccharides and especially proteins. Lectins are proteins of nonimmune origin that have at least one specific and reversible binding carbohydrate domain, without the ability to modify them. These proteins are widely distributed in nature. Lectins isolated from seeds of legumes are among the most studied and have high homology degree, being an important molecular marker of evolution in this clade. This study aimed to characterize some legume lectins by mass spectrometry. Lectin EVA and LAA with 240 and 237 amino acid residues respectively, were analyzed for native mass and sequence of amino acids determined, showing a high degree of homology with other legume lectins. Lectin ConGF, a ConA-like, was analyzed for protein content in the crystal. Was determined that both mature chain and proteolytic fragments are present to form crystal, which indicates no difference between the chains structure covalently linked together by weak interactions. The partial sequence shows that ConGF has several structural features within the subtribe Diocleinae. All results demonstrate that mass spectrometry is a versatile and robust tool for characterizing proteins and can be successfully used to obtain structural information of lectins.

Key Words: Mass spectrometry, Leguminoseae, Lectin, EVA, LAA, ConGF.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Classificação das lectinas de plantas quanto a sua capacidade de ligação a carboidratos. Proposta por Peumans e Van Damme (1995) e atualizada por Van Damme et. al. (1998) (Adaptação).....	**20**
Figura 02	Classificação das Lectinas Vegetais. (A) Lectinas de leguminosas, Canavaila brasiliensis (ConBr); (B) Lectina ligante à quitina compostas por domínios heveínicos, Heveína; (C) Lectinas de monocotiledôneas ligantes à manose Galanthus nivalis aglutinina (GNA); (D) RIP do tipo II, Ricina; (E) Lectinas relacionadas às Jacalinas, Parkia platycephala (PPL-1); (F) Lectina da família da amarantina, Amaranthus caudatus (ACA).....	**22**
Figura 03	Figura 03 – Processamento pós traducional (Permutação Circular) ocorrente nas lectinas ConA-Like. A) O Precursor é expresso no retículo endoplasmático e ainda não sofreu nenhum processamento. B) O Precursor perde o peptídeo N-Sinal e é direcionado para o aparelho de Golgi, onde é glicosilado na região do peptídeo de ligação. C) A enzima Asparaginil endopeptidase retira a glicosilação e o peptídeo de ligação e refaz a ligação das cadeias em ordem invertida. D) A proteína madura é então direcionada aos corpos protéicos nas sementes.....	**26**
Figura 05	Espectro de massa do metanol. A primeira série de íons representa a presença de um grupo metil e a diferença entre as duas séries é equivalente a perda de um grupo hidroxila. Fonte: Hoffman, 2007.....	**28**
Figura 06	Esquema básico de um espectrômetro de massa com seus principais componentes.....	**29**
Figura 07	Placa utilizada nas ionização das amostra através de MALDI	**31**
Figura 08	Ilustração esquemática da ionização por MALDI. Adaptado de Roffman, 2007.....	**32**
Figura 09	Ilustração esquemática da ionização por Eletrospray em uma fonte clássica. A Figura demonstra a diferença de pressão nas diferentes partes do equipamento. Adaptado de HOFFMAN, 2007.....	**33**
Figura 10	Processo de ionização por eletrospray. Adaptado de CANTU et.al, 2008.....	**34**
Figura 11	Espectro multicarregado da Mioglobina de cavalo demonstrando a distribuição de íons. A massa molecular calculada para essa proteína é de 16.952 Da	**35**
Figura 12	Figura 12 – Funcionamento de um analisador Tempo de Vôo linear. As moléculas que receberam energia cinética durante a ionização irão migrar numa região livre de campo elétrico e o tempo que levarão para percorrer será relativo a sua *m/z*. Os ions em verde são de menor *m/z* e os em laranja de maior m/z.....	**37**
Figura 13	Esquema de um espectrômetro de massa hibrido do tipo triplo quadrupolo. Q1 é o quadrupolo responsável por detectar o íon molecular ou ion Precursor. Q2, pode ser um quadrupolo ou hexapolo, e é responsável pela colisão das moléculas contra um gás inerte. Q3 é o analisador que separa o produto da fragmentação em Q2. Adaptado de Hoffman, 2007.....	**41**
Figura 14	Reação esquemática da química derivativa de Edman. A amina livre do primeiro aminoácdio da proteína (N-terminal) é induzida a reagir com o Fenil isotiocianato a fim de formar um PTH-Aminoácido. Esse então é clivado do restante da sequência protéica e identificado. Essa reação é feita ciclicamente a fim de identificar uma sequência de aminoácidos. Fonte: Adaptado de Nelson e Cox, 2005.....	**42**
Figura 15	Estrutura básica do polímero de galactomanana que compõe a Goma de Guar. Fonte: http://www.guargum.biz.....	**51**
Figura 16	A) Cromatograma de purificação da LAA em 10 mL de gel de Goma de Guar. O gel foi equilibrado com NaCl 0,15M e o PI lavado com a mesma solução. O pico retido foi eluído com 0,1M de Lactose em 0,15M de NaCl. As frações de 3mL foram coletadas e analisadas em espectrofotômetro num comprimento de onda de 280nm. Foram aplicadas 5 mg de proteínas. B) Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% em presença de SDS. 1 – Marcador de peso molecular composto por: Fosforilase b 97 kDa, BSA 66 kDa, Ovoalbumina 45 kDa, Anidrade Carbonica 29 kDa e α- lactoalbumina 14,4 kDa - ; 2-40µg de LAA.....	**55**
Figura 17	Cromatograma de purificação da EVA em 10 mL de gel de Goma de Guar. O gel foi equilibrado com NaCl 0,15M e o PI lavado com a mesma solução. O pico retido foi eluído com 0,1M de Lactose em 0,15M de NaCl. As frações de 3mL foram coletadas e analisadas em espectrofotômetro num comprimento de onda de 280nm. Foram aplicadas 5 mg de proteínas. B) Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% em presença de SDS. 1 – Marcador de peso molecular composto por: Fosforilase b 97 kDa, BSA 66 kDa, Ovoalbumina 45 kDa, Anidrade Carbonica 29 kDa e α- lactoalbumina 14,4 kDa - ; 2-	**56**

40µg de EVA.....
Figura 18 Espectro de massa deconvoluído da lectina de sementes de *L. auriculata*..... **58**
Figura 19 Espectro deconvoluído da lectina purificada de sementes de *E. velutina*..... **60**
Figura 20 Sequencia de aminoácidos da lectina LAA determinada por espectrometria de massa. A região marcada em cinza corresponde aos peptídeos sequenciados por Edman (N-terminal) disponíveis na literatura. Os peptídeos começados em T são oriundos de clivagem por tripsina e começados em Q de clivagem com quimiotripsina. O asterisco indica o sítio de glicosilação..... **61**
Figura 21 Figura 21 – Sequencia de aminoácidos da lectina EVA determinada por espectrometria de massa. A região marcada em cinza corresponde aos peptídeos sequenciados por Edman (N-terminal) disponíveis na literatura. Os peptídeos começados em T são oriundos de clivagem por tripsina e começados em Q de clivagem com quimiotripsina. O asterisco indica o sítio de glicosilação..... **61**
Figura 22 Estrutura do heptassacarídeo comum em proteínas vegetais. Fonte: CHOI & LAURSEN, 2000..... **65**
Figura 23 Alinhamento múltiplo de LAA com outras lectinas. Os resíduos marcados em um quadro correspondem a regiões conservadas em todas as sequências e os resíduos destacados em vermelho correspondem aos resíduos identicos em todas as sequências. Os códigos utilizados para cada lectina estão descritos na Tabela 7..... **66**
Figura 24 Alinhamento múltiplo de LAA com outras lectinas. Os resíduos marcados em um quadro correspondem a regiões conservadas em todas as sequências e os resíduos destacados em vermelho correspondem aos resíduos identicos em todas as sequências. EcorL corresponde a sequência da lectina de *E. corallodrendrum* (Código Swissprot: P16404); ECL à lectina de *E. cristagalli* (Código Swissprot: P83410); VML à lectina de *V. macrocarpa* (Código Swissprot: P81371)..... **68**
Figura 25 Lavagem dos cristais. A) Cristal após 6 lavagens com 2M de Acetato de Amônio, B) Cristal após 6 lavagens com 1M de Acetato de Amônio, C) Cristal após 6 lavagens com 0,5 M de Acetato de Amônio, D) Cristal após 6 lavagens com 0,1M de Acetato de Amônio. A escala de 1mm se aplcia às 4 imagens..... **76**
Figura 26 Espectro multicarregado de cristais de ConGF. As cadeias e o estado de carga estão identificadas no espectro. As Cadeia alfa beta e gama tiveram sua massa molecular calculada em 25.612 ± 2 Da; 12.962 ± 2 Da e 12.667 ± 2 Da respectivamente..... **77**
Figura 27 Sequencia parcial de aminoácidos de ConGF oriunda dos cristais. A sequência em preto corresponde a ConA e em cinza aos peptídeos de ConGF. Peptídeos iniciados em T são oriundos de clivagem por Tripsina, em C por clivagem em Quimiotripsina e em F por clivagem por Ácido Fórmico..... **78**
Figura 28 A) Alinhamento da sequência parcial de ConGF com as lectinas de Canavalia, Cratylias e Diocleas. Os resíduos marcados em um quadro correspondem a regiões conservadas em todas as sequências e os resíduos destacados em vermelho correspondem aos resíduos identicos em todas as sequências B) Cladrograma baseada no alinhamento dessas sequências..... **80**

LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Principais técnicas de ionização para espectrometria de massa e suas abreviaturas. Em destaque as técnicas brandas de ionização utilizadas com biomoléculas.....	**30**
Tabela 02	Algumas matrizes comuns na utilização de MALDI e suas abreviações.....	**30**
Tabela 03	Principais tipos de analisadores de massa disponíveis nos espectrômetros de massa comerciais.....	**36**
Tabele 04	Principais modificações pós traducionais ou modificações químicas encontradas em peptídeos e proteínas e a diferença de massa em Da.	**39**
Tabela 05	Lectinas do gênero Erythrina já isoladas.....	**48**
Tabela 06	Massas encontradas no espectro multicarregado de LAA nativa.....	**59**
Tabela 07	Massas calculadas (Teórica, experimental e diferença entre elas) para os peptídeos sequenciados da lectina de sementes de *L. auriculata*.....	**62**
Tabela 08	Massas calculadas (Teórica, experimental e diferença entre elas) para os peptídeos sequenciados da lectina de sementes de *E. velutina*.....	**63**
Tabela 09	Similaridade de algumas lectinas com LAA.....	**66**
Tabela 10	Massas calculadas (Teórica, experimental e diferença entre elas) para os peptídeos sequenciados da lectina de sementes de *C. grandiflora*.....	**79**

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

Ala – Alanina;
Arg – Arginina;
Asn – Asparagina;
Asp – Ácido Aspartico;
B-SJA-II – Segunda lectina extraída da casca de *Sophora japonica;*
$CaCl_2$ – Cloreto de Calcio;
CID – Dissociação induzida por colisão;
ConA – Lectina de *Canavalia ensiformes;*
ConA-Like - Lectinas semelhantes a ConA;
ConBr – Lectina de *Canavalia brasiliensis;*
Cys - Cisteína;
Da – Dalton;
DGL – Lectina de *Dioclea grandiflora;*
ECL - Lectina de *Erythrina cristagalli*;
EcorL - Lectina de *Erythrina corallodendron;*
ESI – Ionização por Eletrospray;
EVA – Lectina de *Erythrina velutina;*
Fuc – Fucose;
GalNac – N-Acetil-Galactosamina;
Gly – Glicina;
HCl – Ácido Clorídrico;
Ile – Isoleucina;
LAA – Lectina de *Luetzelburgia auriculata;*
Leu –Leucina;
LHC – Grande colisor de Hadron;
M – Molar;
MALDI – Ionização por Dessorção a laser assistida por matriz;
Man – Manose;
Met – Metionina;
$MnCl_2$ – Cloreto de Manganês;
MS – Espectrometria de massa;
MS/MS – Espectrometria de massa em sequencial;
NaCl – Cloreto de sódio;
Phe – Fenilalanina;
PPL – Lectina de *Parkia platycephala;*
PPL-2 – Segunda lectina de *Parkia platycephala;*
Q-ToF – Quadrupolo acoplado a Tempo de Vôo;
RE – Retículo endoplasmático;
RIP – Proteínas inativadoras de Ribossomos;
RPbAI – Isoforma AI da lectina extraída da casca de *Robinia pseudoacacia;*
SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de Dodecil sulfato de sódio;
Ser – Serina;
Thr – Treonina;
ToF – Tempo de Vôo;
Tyr – Tirosina;
Val – Valina;
VML – Lectina de *Vatairea macrocarpa;*
Xyl – Xilose.

SUMÁRIO

CAPITULO I – Fundamentação Teórica 16
1. INTRODUÇÃO 17
1.1 Considerações Iniciais 17
1.2 Lectinas 17
1.2.1 Breve histórico 17
1.2.2 Definição 19
1.2.3 Classificação 19
1.2.4 Aspectos Gerais e estruturais 22
1.2.5 Lectinas de Leguminosa 23
1.2.6 Processamento Pós traducional de Lectinas de Leguminosas 25
1.3 Fundamentos de espectrometria de Massa 27
1.4 - Fontes de Ionização 29
1.4.1 Ionização por MALDI 30
1.4.2 – Ionização por electrospray 33
1.5 – Analisadores 35
1.5.1 – Analisador Quadrupolo 36
1.5.2 – Analisador ToF 36
1.6 – Detectores 37
1.7 Espectrometria de massa na caracterização de proteínas 38
1.7.1 Análise de proteínas intactas 38
1.7.2 Espectrometria de Massa sequencial 40
1.7.3 Sequenciamento de Proteínas 41
1.7.4 Mobilidade Iônica acoplada a Espectrometria de massa no estudo de proteínas 43
2. CONCLUSÕES 45
CAPITULO II – Caracterização por espectrometria de massa das lectinas de *Erythrina velutina* e *Luetzelburgia auriculata* 46
1. INTRODUÇÃO 47
2. OBJETIVOS 50
2.1 Objetivo Geral 50
2.2 Objetivos Específicos 50
3. METODOLOGIA 51
3.1 Obtenção da farinha e extração de proteínas totais solúveis 51
3.2 Isolamento das lectinas por cromatografia de afinidade 51
3.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS 52

3.4 Determinação da massa molecular por espectrometria de massa 53
3.5 Digestão *in gel* e sequenciamento dos peptídeos por espectrometria de massa . 53
3.6 Análises da sequência primária por Bioinformática 54
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 55
4.1 Purificação da lectina de *Luetzelburgia auriculata* (LAA) e de *Erythrina velutina* (EVA) 55
4.2 Caracterização da massa nativa de EVA e LAA 57
4.3 Sequenciamento das lectinas de LAA e EVA 61
4.4 Análise das sequências por bioinformática 65
5. CONCLUSÃO 69
6. PERSPECTIVAS FUTURAS 69
Capitulo III – Análise do conteúdo protéico do cristal da lectina de sementes de *Canavalia grandiflora* através de Espectrometria de Massa 70
1. INTRODUÇÃO 71
2. OBJETIVOS 73
2.1 Hipótese 73
2.2 Objetivo Geral 73
2.3 Objetivos Específicos 73
3. METODOLOGIA 74
3.1 Purificação e Cristalização da lectina 74
3.2 Preparação dos cristais para análise por espectrometria de massa 74
3.3 Digestão das proteínas e sequenciamento dos peptídeos 75
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 76
5. CONCLUSÕES 82
REFERÊNCIAS 83

CAPITULO I – Fundamentação Teórica

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Iniciais

A ciência moderna do século XXI tem ganhado destaque não mais por grandes descobertas como as que aconteceram nos dois últimos séculos, mas sim pela capacidade de criação de tecnologias e aplicação dos conhecimentos teóricos em prol da qualidade de vida do ser humano.

A capacidade de testar teorias e aplicar o conhecimento adquirido vem sendo muito explorada e um grande exemplo é o LHC (Large Hadron Collider – Colisor gigante de hadron), uma das maiores iniciativas científicas e que trará respostas que poderão revolucionar o conhecimento moderno. De fato, já confirmou teorias que antes não podiam ser testadas experimentalmente.

O que foi dito se aplica também na área da biociência. A capacidade tecnológica vem transformando trabalhos que antes eram demorados, caros e minuciosos, como a clonagem e expressão de uma proteína em sistema heterólogo, em uma situação rotineira. Nesse contexto a espectrometria de massa desempenha papel importante na caracterização de biomoléculas de interesse biotecnológico como as lectinas, que desde a sua descoberta são utilizadas como ferramenta.

Durante esse capítulo serão detalhados os princípios básicos de análises por espectrometria de massa e o conceito e principais aspectos das proteínas alvo do trabalho que são as lectinas.

1.2 Lectinas

1.2.1 Breve histórico

Por volta do final do século XIX, várias evidências se acumularam de que existiam proteínas na natureza com a capacidade de aglutinar eritrócitos. Essas proteínas eram chamadas de hemaglutininas ou fitohemaglutininas, pois eram em sua maioria encontradas em plantas. Acredita-se que o primeiro relato para tais proteínas foi feito por Peter Herrman Stillmark em sua tese de doutoramento na universidade de Dorpat na Estônia com o título “Über Ricin ein giftiges Ferment aus den Samen von *Ricinus communis* L. und einigen anderen Euphorbiaceen” (Sobre a Ricina: Um fermento tóxico de sementes de *Ricinus communis* L. e algumas outras

espécies de Euforbiacias). Ele havia isolado uma hemaglutinina altamente tóxica extraída de sementes de mamona (*Ricinus communis*) e a nomeado como ricina (STILLMARK, 1888). Subseqüentemente, H. Hellin isolou também uma hemaglutinina altamente tóxica de sementes de Jequirití (*Abrus precatorius*). Ambas se tornaram comercialmente disponíveis e foram utilizadas por Paul Ehrlich como antígenos modelos para estudos imunológicos, estabelecendo vários princípios fundamentais da imunologia através dessas proteínas (VAN DAMME *et. al,* 1998; SHARON & LIS, 2004)

Apenas em 1919 a primeira hemaglutinina foi purificada de sementes de feijão de porco (*Canavalia ensiformis*) por James B. Sumner na Universidade de Cornell (Estados Unidos). Este mesmo pesquisador recebeu o premio Nobel em 1942 pela descoberta de que enzimas são proteínas e podem ser cristalizadas. Em 1936 Sumner e Howell demonstraram que a Concanavalina A tem habilidade de aglutinar células como eritrócitos e fungos e precipitar glicoconjugados em solução. Eles também demonstraram que esta atividade pode ser inibida por sacarose, demonstrando pela primeira vez a especificidade por açúcar. (SHARON & LIS, 2004).

A idéia de que a toxicidade é uma propriedade intrínseca das lectinas foi abandonada no início do século XX, depois que Ladsteiner e Raubitscheck em 1907 relataram pela primeira vez a presença de uma lectina não tóxica nas leguminosas *Phaseolus vulgaris* (feijão), *Pisum sativum* (ervilha), *Lens culinaris* (lentilha) e *Vicia sativa*. Após o trabalho de Landsteiner e Raubitscheck, muitas outras hemaglutininas vegetais não tóxicas foram descobertas. Tornou-se, a partir de então, evidente que lectinas estão difundidas no reino vegetal e que a toxicidade atribuída às mesmas, é exceção, e não regra (VAN DAMME *et al.,* 1998).

O marco seguinte na história das lectinas vegetais foi a descoberta realizada por Renkonen, em 1948, e Boyd; Reguera, em 1949, de que algumas hemaglutininas exibem uma clara preferência por eritrócitos de um grupo particular de tipo sanguíneo dentro do sistema ABO. Começou-se a observar que algumas proteínas vegetais obtidas de sementes de plantas podiam reconhecer um grupo específico e aglutiná-lo, onde hemácias do sistema ABO respondiam ao contato com essas hemaglutininas de maneira distinta, umas aglutinando e outras não (VAN DAMME *et al.,* 1998).

A habilidade das aglutininas de plantas em distinguir eritrócitos de diferentes tipos sanguíneos levou Boyd e Shapleigh a propor em 1954 o termo “lectina” (do latim legere, que significa selecionar ou escolher) para nomear essas proteínas (SHARON & LIS, 2004).

Outro grande marco na história das lectinas ocorreu em 1960, quando Petter C. Nowell demonstrou que a lectina de *Phaseolus vulgaris* possui atividade mitogênica sobre linfócitos. Essa descoberta teve um impacto revolucionário sobre a imunologia, pois até aquele momento acreditava-se que os linfócitos eram células incapazes de se dividir ou de se diferenciar em outros tipos celulares (SHARON & LIS, 2004).

1.2.2 Definição

De acordo com a primeira proposta de definição de lectinas, que foi baseada em sua especificidade por açúcar e inibição da reação de aglutinação, lectinas seriam proteínas ou glicoproteínas ligantes a carboidratos de origem não imune que aglutinam células e/ou precipitam glicoconjugados (GOLDSTEIN *et. al,* 1980). Entretanto essa nomenclatura é excludente a algumas lectinas, pois só contempla aquelas com domínios múltiplos de ligação a carboidratos.

Em 1983, Kocourek e Horejsi propuseram a extensão da definição de lectinas de forma que as toxinas com baixa atividade hemaglutinante, porém com genuína cadeia lectinica fossem incluídas, porém com a observação de que as lectinas poderiam ter uma subunidade de função diferente, essa definição foi também considerada restrita.

Em 1988 Barondes propôs a definição de que lectinas seriam proteínas ligantes a carboidratos que não anticorpos ou enzimas, porém esta classificação também excluiria as RIPs Tipo II e as Quitinases de classe I que possuem domínios ligantes a carboidratos.

Observando todas essas nuances, Peumans e Van Damme propuseram em 1995 que as lectinas são proteínas de origem não imune que possuem pelo menos um domínio não catalítico ligante reversivelmente a um mono ou oligossacarídeo específico.

1.2.3 Classificação

As lectinas vegetais podem ser classificadas de acordo com a proposta de Van Damme e colaboradores (1998) que as divide em quatro grupos: Merolectinas, Hololectinas, Quimerolectinas e Superlectinas (Figura 01).

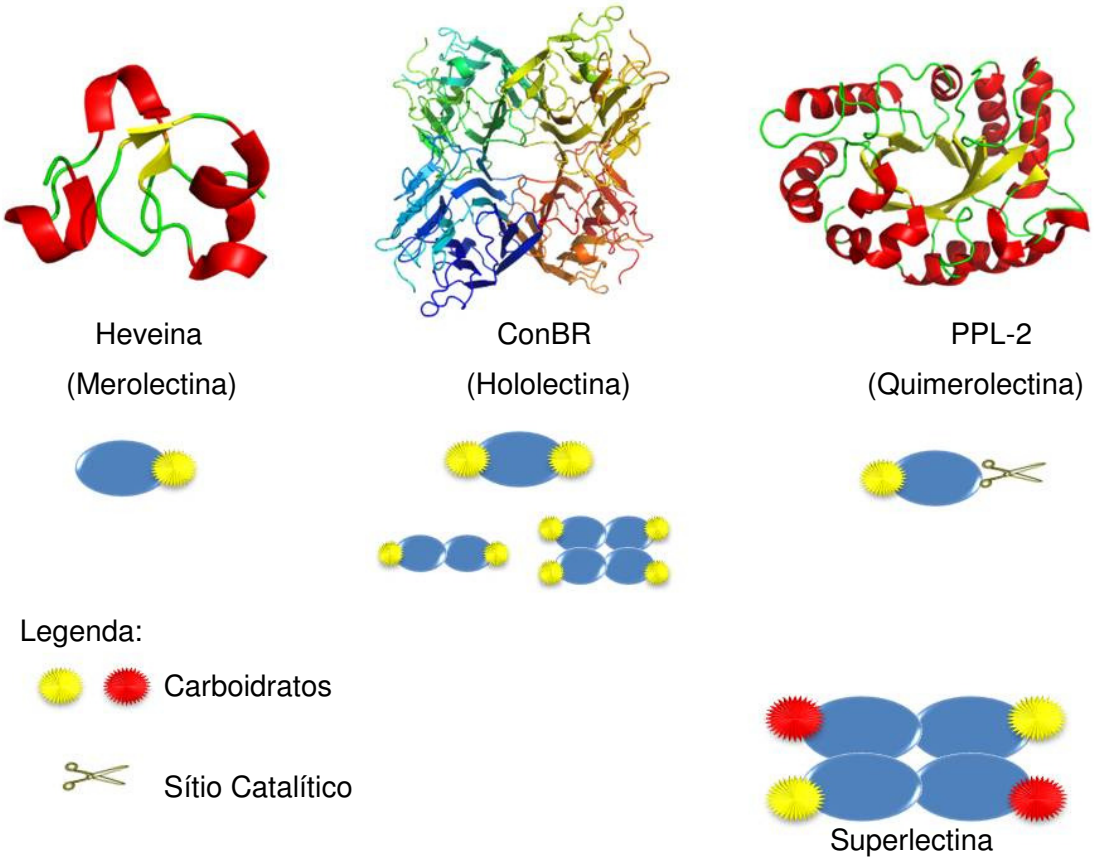

Figura 01 – Classificação das lectinas de plantas quanto a sua capacidade de ligação a carboidratos. Proposta por Peumans e Van Damme (1995) e atualizada por Van Damme et. al. (1998) (Adaptação).

Merolectinas são proteínas que possuem apenas um sítio de ligação a carboidratos e não possuem a capacidade de oligomerização, não sendo capazes de aglutinar células e nem precipitar glicoconjugados. Um exemplo clássico desse grupo de proteínas é a lectina extraída do látex da seringueira *Hevea brasiliensis* chamada de Heveina (VAN PARIJS *et al.,* 1991).

Hololectinas possuem mais de um sítio de ligação a carboidratos estruturalmente semelhantes e assim são capazes de aglutinar células e precipitar glicoconjugados. Nesta classificação estão contidas a maioria das lectinas extraídas de vegetais e um clássico exemplo são as lectinas da sub-tribo Diocleinae conhecidas como ConA-Like (CAVADA *et. al,* 2001).

Quimerolectinas possuem um domínio não relacionado à atividade lectínica além de um ou mais domínios de ligação a carboidrato. O principal exemplo desta classe de lectina é a Ricina, uma RIP do tipo II isolada de *Ricinus communis*, pioneira nos estudos da lectinologia (SHARON & LIS, 2004). Damos ênfase também à quimerolectina isolada de *Parkia platycephala* denominada PPL-2 que apresenta um domínio quitinásico além do domínio lectínico (CAVADA *et. al*, 2006).

Superlectinas, semelhantes às hololectinas, possuem mais de um domínio de ligação a carboidrato por molécula, porém esses domínios reconhecem carboidratos estruturalmente diferentes. Um exemplo é a lectina de Tulipa que possui domínios ligantes a Manose e a GalNac não relacionados (VAN DAMME *et al,* 1996).

As lectinas vegetais podem ainda ser classificadas em sete famílias acordo com Van Damme e colaboradores (1998). São elas: A) Lectinas de leguminosas; B) Lectinas de monocotiledôneas ligantes a manose; C) Lectinas ligantes a quitina; D) RIPs tipo 2; E) Lectinas relacionadas a jacalina; F) Lectinas relacionadas a amarantina e G) E lectinas de floema de Curcubitaceae. Esta classificação baseia-se em características estruturais e de afinidade a carboidratos apresentadas por essas proteínas(Figura 02).

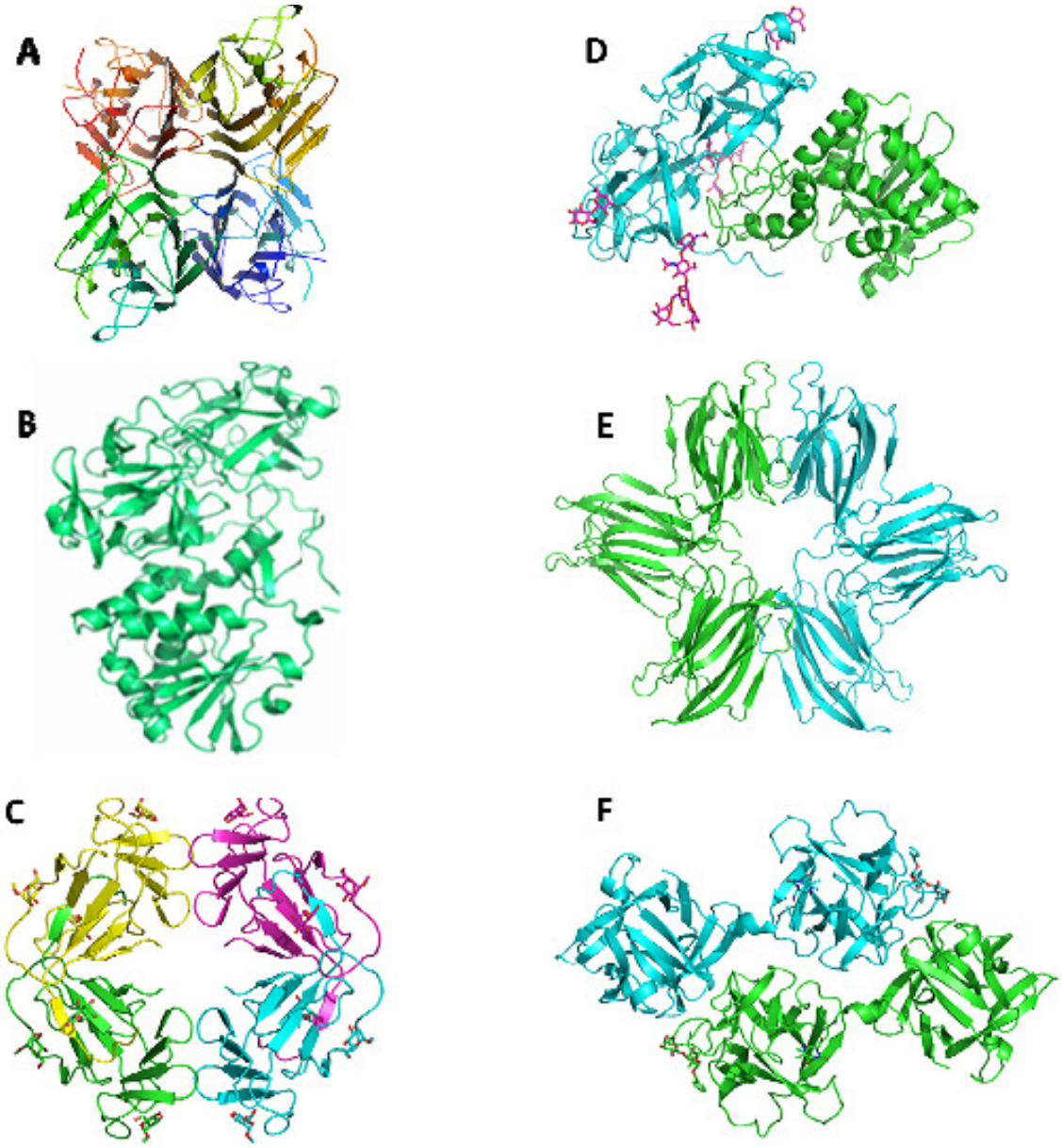

Figura 02. Classificação das Lectinas Vegetais. (A) Lectinas de leguminosas, *Canavaila brasiliensis* (ConBr); (B) Lectina ligante à quitina compostas por domínios heveínicos, Heveína; (C) Lectinas de monocotiledôneas ligantes à manose *Galanthus nivalis* aglutinina (GNA); (D) RIP do tipo II, Ricina; (E) Lectinas relacionadas às Jacalinas, *Parkia platycephala* (PPL-1); (F) Lectina da família da amarantina, *Amaranthus caudatus* (ACA).

1.2.4 Aspectos Gerais e estruturais

Lectinas vegetais apresentam-se distribuídas em muitos grupos botânicos, incluindo mono- e dicotiledôneas, musgos e líquens, mas são muito mais frequentemente encontradas em Leguminoseae e Euphorbiaceae (PUZTAI, 1991). Elas podem existir em vários tecidos da mesma planta e têm diferentes localizações celulares e propriedades moleculares. As lectinas são mais abundantes nas

sementes de plantas, porém podem facilmente ser encontradas em partes vegetativas. Em sementes de leguminosas estão prevalentemente nos tecidos cotiledonares (PUZTAI, 1991). Contudo, as lectinas também podem ser encontradas em outras partes das plantas, como folhas (RATANAPO *et al*, 2001), frutos (SAMPIETRO *et al*., 2001), raízes de algumas Convolvulaceae (PEUMANS *et al*, 1997) e tubérculos (SUSEELAN *et al*, 2002).

A interação de lectinas com carboidratos é bastante específica, tanto quanto a interação entre uma enzima e seu substrato, ou antígenos com anticorpos. As lectinas podem ligar-se a açúcares livres ou polissacarídeos, glicoproteínas ou glicolipídeos que podem estar livres ou associados a membranas (PUZTAI, 1991).

Muito do conhecimento da estrutura primária de lectinas vegetais foi obtido na ultima década através de extensivos estudos com lectinas purificadas de leguminosas. Aspectos comparativos, evolucionários e quimiotaxonômicos tiveram significativa importância para o entendimento do potencial funcional e das alterações genéticas durante a evolução das plantas (PEUMANS *et al,* 2001).

Muitas funções têm sido propostas para as lectinas, tais como: proteção contra patógenos e insetos, transporte e armazenamento de carboidratos, reconhecimento celular (dentro da célula, entre células ou entre organismos), proteínas de reserva ou reguladores de crescimento (PUSZTAI, 1991).

1.2.5 Lectinas de Leguminosa

Lectina é uma família de proteínas presente em todos os organismos, desde bactérias, vírus, até animais e plantas superiores (MOREIRA *et. al*, 1991). Dentre as lectinas de plantas, as mais estudadas pertencem a família Leguminoseae, particularmente a sub-família Papilionoideae (CAVADA *et. al*, 2001).

As lectinas de leguminosa não são apenas as mais conhecidas, mas também desempenharam um papel determinante no desenvolvimento da lectinologia por serem muito abundante nas sementes, além do processo de purificação da maioria ser simples. Adicionalmente, algumas lectinas de leguminosas se tornaram ferramentas indispensáveis na pesquisa biológica e biomédica além de serem amplamente utilizadas como proteínas bioativas tanto na pesquisa quanto na medicina (VAN DAMME *et. al,*1998).

Sabe-se que as lectinas de Leguminosas são sintetizadas no retículo endoplasmático na forma de pré-pro-lectinas. Essa proteína possui na sua extremidade N-terminal um peptídeo sinal, com 20 a 30 resíduos de aminoácidos, que é removido posteriormente durante o transporte da pré-pro-lectina para o lúmen do reticulo endoplasmático, originando uma pró-lectina. A pró-lectina passa então por uma série de modificações pós-traducionais, como glicosilação e clivagens proteolíticas, dando origem a lectina madura (SHARON & LIS, 1990).

As lectinas de leguminosas possuem entre 25 e 30 kDa e geralmente se associam como dímeros ou tetrâmeros. Estas proteínas apresentam uma grande conservação de sua estrutura monomérica, indicando extensiva similaridade seqüencial, ao mesmo tempo em que exibem uma notável variedade de associações quaternárias com importantes implicações funcionais (SRINIVAS *et. al*, 2001). As pequenas variações seqüenciais e de arranjo quaternário parecem significar diferenças importantes em testes de atividades biológicas com lectinas de leguminosas *in vitro* e *in vivo* (CAVADA *et. al,* 2001).

O sítio de ligação a carboidratos está localizado no lado côncavo do β-sanduíche, próximo ao sítio de ligação a metais. O sítio de reconhecimento a carboidratos consiste de diversos “loops” com diferentes graus de variabilidade (SHARMA & SUROLIA, 1997). As conformações destes loops são determinadas pela presença de íons de metais de transição, como o cálcio e o manganês, na estrutura (LORIS *et al*, 1998; BOUCKAERT *et al*, 2000). A ausência desses metais resulta em uma instabilidade local e na perda da capacidade de ligar-se a carboidratos (LORIS *et al*, 2004).

Além de um sítio de ligação a carboidratos, altamente conservado, juntamente com um sítio de ligação a metais, que é responsável pela estabilização do “loop” que compõe o sítio de ligação a carboidratos, estudos recentes mostraram a capacidade de essas proteínas interagirem com compostos hidrofóbicos. Algumas lectinas de leguminosas podem interagir com outras espécies de moléculas que não carbidratos tais como adenina (HAMELRYCK *et al*, 1999) e ácido aminobutírico (DELATORRE *et al*, 2007). A ligação a essas moléculas às lectinas se dá através de uma região estrutural hidrofóbica, altamente conservada em muitas lectinas de leguminosas e que, devido a esse alto grau de conservação, pode estar envolvida em algum papel biológico importante (DELATORRE *et al,* 2007).

Algumas lectinas de leguminosas, como as lectinas extraídas de espécies da subtribo Diocleinae, exibem uma oligomerização dependente de pH, onde a proporção entre proteínas no estado dimérico e no estado tetramérico pode ser alterada de acordo com pH do meio (CALVETE *et al*, 1999; NAGANO *et al*., 2008). A alteração desse equilíbrio dímero/tetrâmero dependente de pH pode influenciar diretamente nas atividades biológicas dessas lectinas, pelo fato dessas proteínas serem capazes de se ligar aos receptores 29 glicoconjugados da superfície das membranas com uma maior afinidade quando na forma tetramérica (DELATORRE *et. al*, 2006).

1.2.6 Processamento Pós traducional de Lectinas de Leguminosas

O processamento pós traducional mais complexo dentre as lectinas de leguminosas é aquele sofrido pelas lectinas da subtribo Diocleinae (Tribo Phaseolae), a qual faz parte a Concanavalina A. Essas proteínas são expressas como pré-pro-proteína e são direcionadas para o retículo endoplasmático. A pré pro proteína é composta por um peptídeo sinal N-terminal com cerca de 20 aminoácidos que é clivado ainda no RE, duas cadeias peptídicas denominadas γ e β ligadas por uma cadeia intermediária que será glicosilada no RE e um peptídeo sinal C-terminal. Essa pré-pro-proteína glicosilada sofre novo processamento, agora no complexo de Golgi, onde perderá o peptídeo intermediário glicosilado e a região sinal C-Terminal, sendo as cadeias γ e β religadas de forma invertida em relação ao gene formando a proteína madura, denominada cadeia α (composta pelas cadeias $\beta+\gamma$) (Figura 03) (CARRIGNTON *et. al*, 1985). Esse processamento pós traducional foi nomeado Permutação Circular, é mediado por uma Asn-endopeptidase. (MIN, & JONES, 1994) e ocorre em outros grupos de proteínas (ULIEL *et. al,* 2001). Mesmo a re-ligação das cadeias não sendo totalmente eficiente, elas podem interagir entre si de forma não covalente formando a cadeia madura da lectina e por isso são co-purificadas em cromatografia de afinidade, sendo visualizadas nas eletroforeses (CAVADA *et al*, 2001).

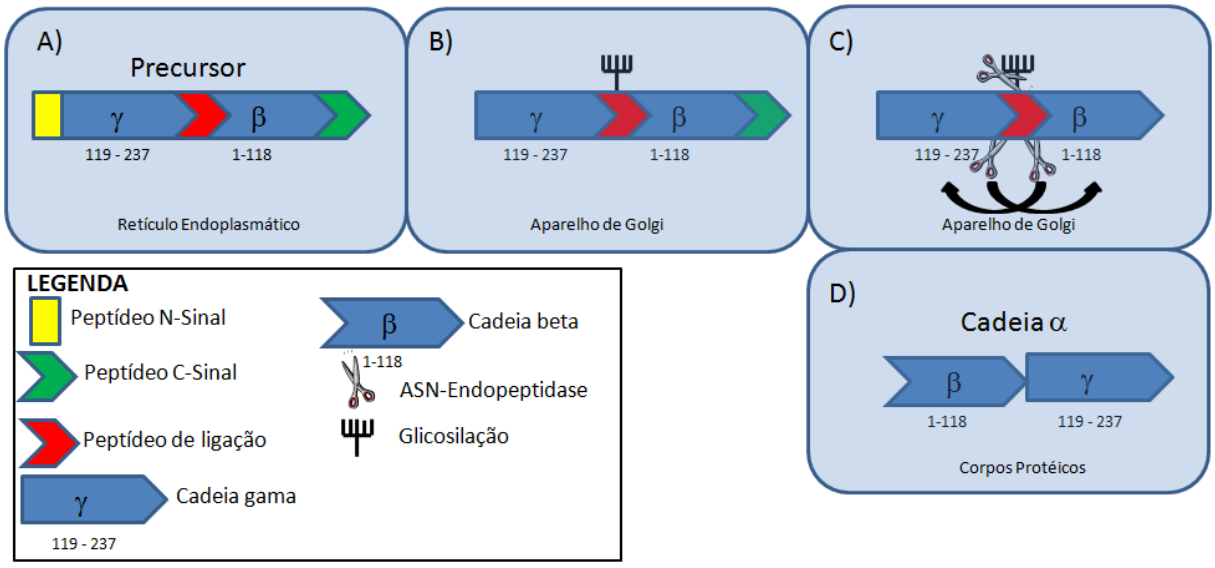

Figura 03 – Processamento pós traducional (Permutação Circular) ocorrente nas lectinas ConA-Like. A) O Precursor é expresso no retículo endoplasmático e ainda não sofreu processamento. B) O Precursor perde o peptídeo sinal e é direcionado para o aparelho de Golgi, onde é glicosilado na região do peptídeo de ligação. C) A enzima Asparaginil endopeptidase retira a glicosilação, o peptídeo de ligação e o peptídeo c-terminal. e refaz a ligação das cadeias em ordem invertida. D) A proteína madura é então direcionada aos corpos protéicos nas sementes.

Dentro da sub-família Papilionoideae, apenas a tribo Phaseolae, sub-tribo Diocleinae, apresenta lectinas circularmente permutadas, porém, dentro de outras tribos como Dalbergeae e Sophoreae, algumas lectinas apresentam um processamento por uma Asn-endopeptidase, gerando cadeias que não são religadas, mas que, da mesma forma que as cadeias das ConA-Like, interagem entre si e são co-purificadas por cromatografia de afinidade. Exemplos dessas lectinas são: VML, isolada de sementes de *Vatairea macrocarpa* e pertencente a tribo Dalbergeae (CALVETE *et. al,* 1998), LAA isolada de sementes de *Luetzelburgia auriculata* (OLIVEIRA *et, al,* 2002) e B-SJA-II isolada da casca de *Sophora japonica*, as últimas duas pertencente a tribo Sophoreae. Calvete e colaboradores (1998) sugeriram uma arvore filogenética para evolução das tribos da família Papilionoideae (Figura 04) e relatam que as tribos Sopohreae e Dalbergeae são as únicas entre as tribos mais primitivas que apresentam lectinas processadas em duas cadeias, indicando que esse evento surgiu nos primórdios da evolução de Papilionoideae.

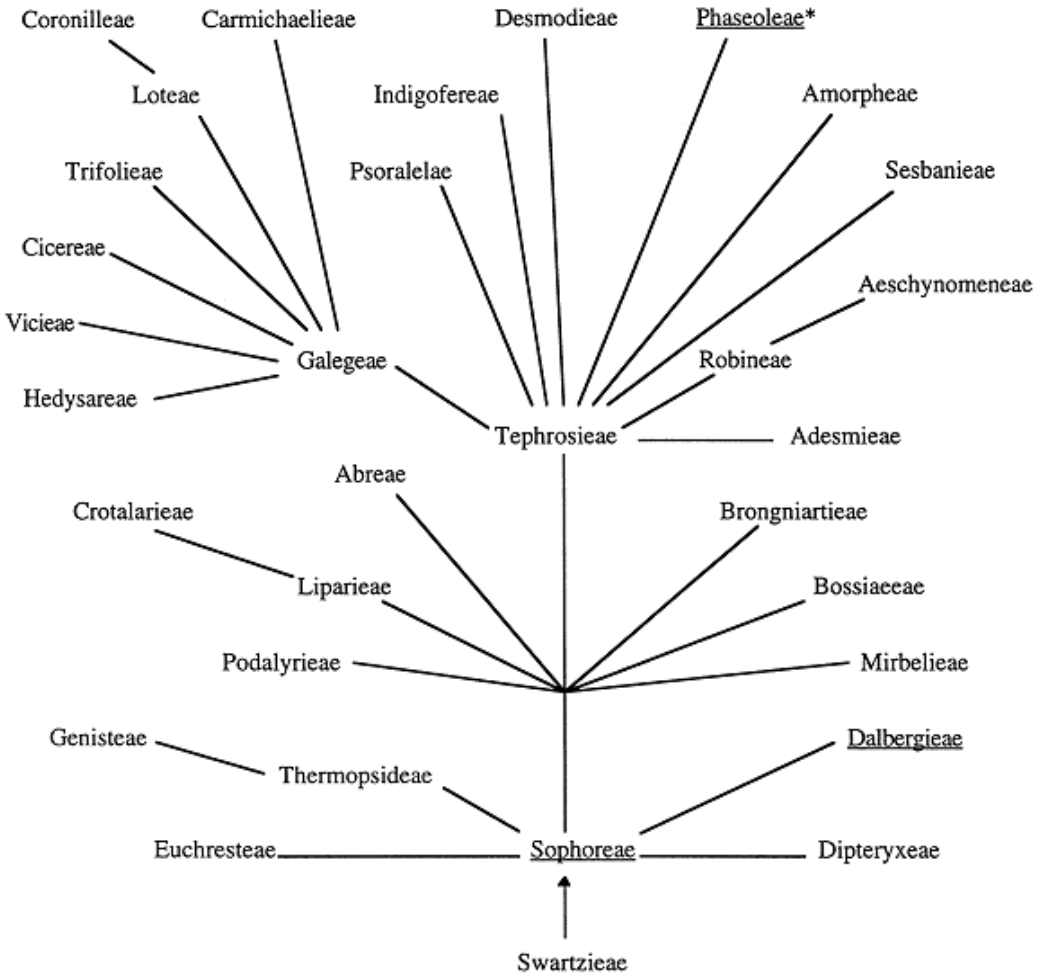

Figura 04 – Relação filogenética proposta para a tribo da sub-família Papilionoideae. As tribos que possuem lectinas compostas de duas cadeias resultantes de processamento pós-traducional estão sublinhadas e as que possuem processamento de Permutação Circular com asterisco. Fonte: Calvete *et. al,* 1998.

1.3 Fundamentos de espectrometria de Massa

A espectrometria de massa é uma técnica que foi idealizada juntamente com a descoberta do átomo em 1901 por Thomson. O primeiro espectrômetro de massa foi construído por Thomson em 1912, 6 anos após ter ganhado o Prêmio Nobel em física pela descoberta do átomo. Esta técnica consiste na análise da relação massa/carga de um íon em fase gasosa.

O processo de ionização de uma molécula de interesse pode se dar através de diversas técnicas, sendo sempre necessário que a molécula a ser analisada possua uma carga e esteja em fase gasosa. O espectrômetro de massa irá analisar a relação massa/carga desta molécula (*m/z*) trazendo de volta um espectro de

massa onde o eixo X corresponde a *m/z* e o eixo Y a abundância relativa das espécies presentes. Esta abundância relativa se dá devido à presença de diferentes isótopos na natureza. Na Figura 05 pode-se observar o espectro de massa do metanol.

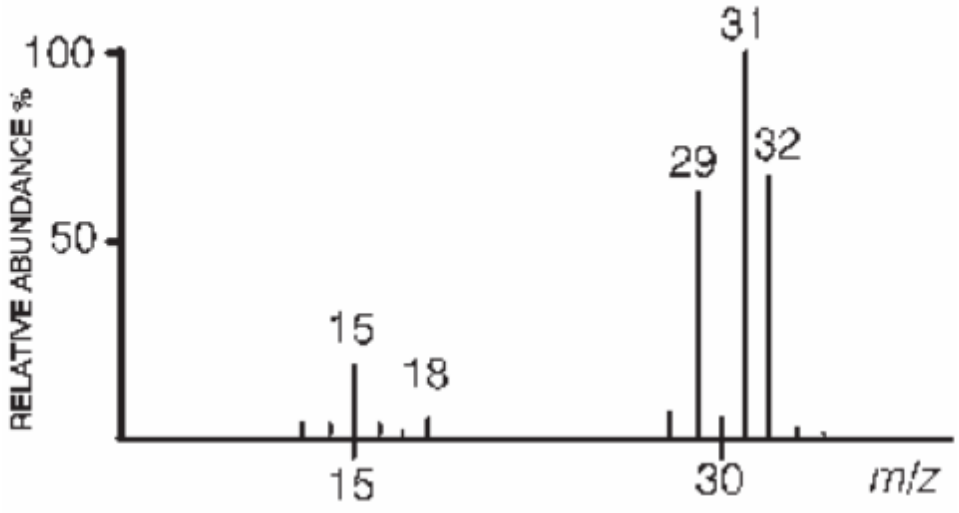

Figura 05 – Espectro de massa do metanol. A primeira série de íons representa a presença de um grupo metil e a diferença entre as duas séries é equivalente a perda de um grupo hidroxila. Fonte: Hoffman, 2007

A *m/z* = 31 representa o isótopo mais abundante na natureza e a intensidade dos outros isótopos é plotada graficamente em relação percentual a intensidade deste. A presença de um íon de *m/z* = 32 mostra a presença do ^{13}C neste composto. A existência natural de diferentes isótopos de um átomo e a sua abundância relativa foi postulada em 1913 também por J.J. Thomson e confirmada mais a diante por experimentos de espectrometria de massa (BUDZIKIEWICZ *et. al,* 2006). Devido a este evento, a massa de um composto pode ser dada de duas formas: a) massa monoisotópica, que corresponde a massa do isótopo mais abundante ou b) massa média, que corresponde a massa média dos isótopos mais comuns.

Um bom exemplo é o da insulina humana, um peptídeo que tem a formula molecular $C_{257}H_{383}N_{65}O_{77}S_6$. A massa da insulina é 5801, calculada utilizando a massa inteira do isótopo mais abundante para cada elemento como 12 u para o carbono, 1u para o hidrogênio, 14 u para o nitrogênio, 16 u para o oxigênio e 32 u para o enxofre. A massa monoisotópica desta molécula é de 5803.6375 u se calculada usando a massa exata de cada elemento como C=12.0000 u, H=1.0079 u,

N=14.0031 u, O=15.9949 u e S=31.9721 u. Finalmente, uma massa média de 5807.6559 Da é calculada usando a massa atômica de cada elemento como C=12.011Da, H=1.0078Da, N=14.0067Da, O=15.9994Da e S=32.066Da (HOFFMAN, 2007).

Um espectrômetro de massa consiste fundamentalmente de três partes. Uma fonte de ionização, que é fundamental para gerar os íons das moléculas de interesse a serem analisadas, um analisador, que separa as moléculas pela sua *m/z* e um detector que converte os íons em sinais eletrônicos capaz de serem interpretados por um computador (Figura 06). Além disso, os íons podem chegar à fonte de ionização através de *inlets* como um cromatógrafo gasoso ou líquido. Os três principais componentes do espectrômetro de massa (fonte, analisador e detector) geralmente estão sob vácuo com exceção para a fonte de ionização.

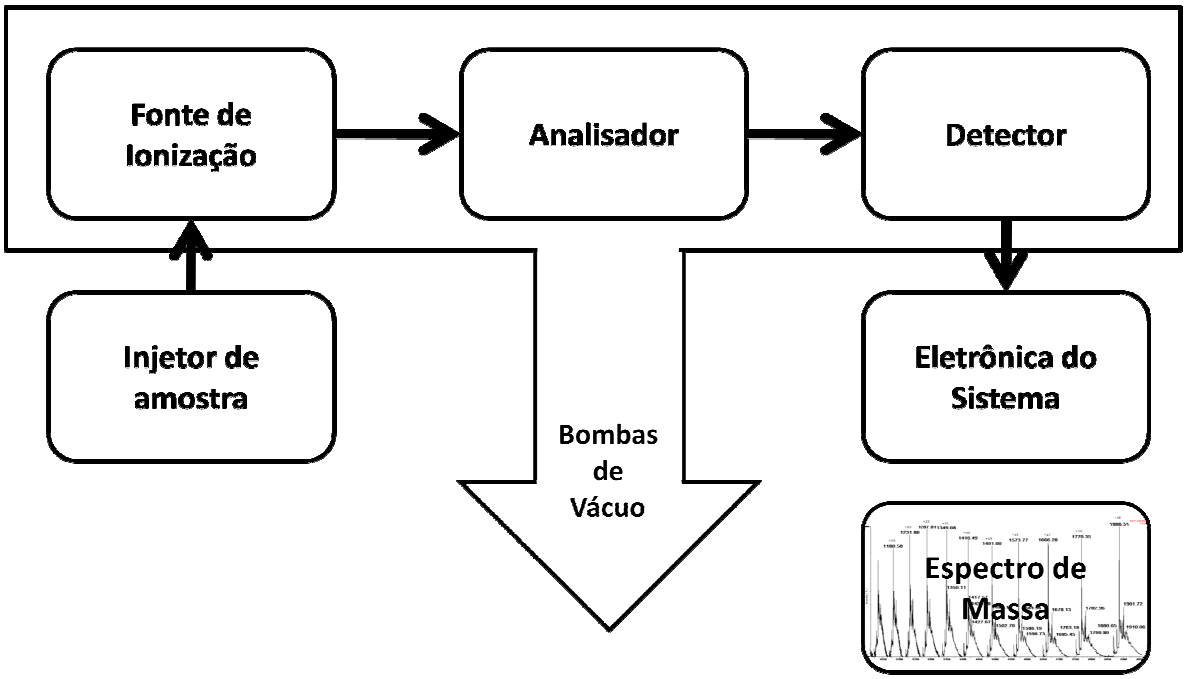

Figura 06 – Esquema básico de um espectrômetro de massa com seus principais componentes.

1.4 - Fontes de Ionização

A fonte de ionização é o ponto de entrada do espectrômetro de massa. É o local onde o analito deve ser convertido em um íon e transferido para a fase gasosa. Desde o surgimento da técnica até os dias de hoje, diversos métodos de ionização já foram desenvolvidos com finalidades e utilizações diferentes. Os principais métodos de ionização utilizados nas análises de biomoléculas estão destacados na Tabela 01 são o ESI e o MALDI.

Tabela 01 – Principais técnicas de ionização para espectrometria de massa e suas abreviaturas. Em destaque as técnicas brandas de ionização utilizadas com biomoléculas.

Técnica de Ionização	**Abreviaturas**
Ionização Química a Pressão Atmosférica	(APCI)
Ionização Química	(CI)
Impacto de Eletrons	(EI)
Ionização Electrospray	**(ESI)**
Bombardeamento rápido de Atmoos	(FAB)
Dessorção de Campo / Ionização de Campo	(FD/FI)
Ionização por Dessorção a laser assistida por Matriz	**(MALDI)**
Ionização por Termospray	(TSP)

1.4.1 Ionização por MALDI

A ionização por MALDI foi descrita por Tanaka em 1987 e desde então aplicada para macromoléculas, sendo principalmente utilizada por Karas e Hillenkamp (1988). O MALDI possui características muito importantes que o fazem uma fonte de ionização importante na caracterização de proteínas como a alta sensibilidade (amostras em baixíssima concentração e quantidade podem ser analisadas por esta técnica) e tolerância a contaminação das amostras com sais, tampões, detergentes etc (STUMP, 2002 e CHEN, 1998).

É de fundamental importância para a ionização por MALDI a escolha da matriz e a preparação da amostra. A matriz é caracterizada por ser uma pequena molécula orgânica que possui uma grande absorção de energia no comprimento de onda do laser utilizado (Tabela 02). O primeiro passo é a preparação de uma mistura de matriz e amostra em placas especiais (Figura 07) que, após completamente secas, serão inseridas no equipamento e mantidas sob vácuo.

Tabela 02 – Algumas matrizes comuns na utilização de MALDI e suas abreviações.

Molécula	**Matriz**	**Abreviação**
Proteínas e Peptídeos	Ácido α-Ciano-4-hidroxicinamico	CHCA
	Ácido 2,5-Dihidroxibenzoico	DHB
	Ácido 3,5-Dimetoxi-4-hidroxicinamico (sinapinico)	SA
Oligonucleotideos	Trihidroxiacetofenona	THAP
	Ácido 3-Hidroxipicolinico	HPA
Carboidratos	Ácido 2,5-Dihidroxibenzoico	DHB
	Ácido α-Ciano-4-hidroxicinamico	CHCA
	Trihidroxiacetofenona	THAP

	Ácido sintético Trans-3-indoleacrilico	IAA
	Polymeros de Ditranol	DIT
	Ácido 2,5-Dihidroxibenzoico	DHB
Moléculas Orgânicas	Ácido 2,5-Dihidroxibenzoico	DHB
Moléculas Inorgânicas	Trans-2-(3-(4-tert-Butilfenil)-2metil-2-propeniliedeno)malononitrila	DCTB
Lipidios	Ditranol	DIT

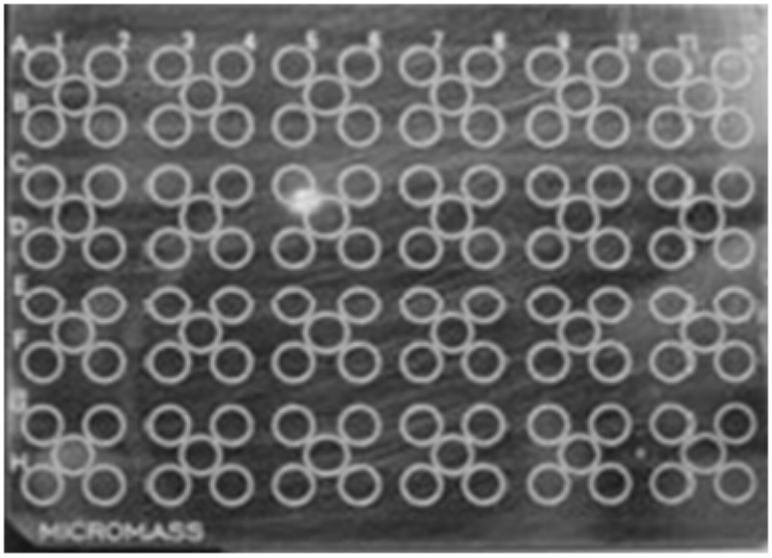

Figura 07 –Placa utilizada na ionização das amostra através de MALDI

A matriz quase sempre é colocada em proporções maiores do que a amostra, diminuindo a possibilidade de formação de clusters da amostra e aumentando a sensibilidade da técnica. Dentro da fonte e sob vácuo, a mistura de matriz e amostra será irradiada por um laser pulsado durante um determinado período de tempo. O mecanismo pelo qual os íons são formados no MALDI não é completamente elucidado, porém postula-se que a irradiação pelo laser induz um rápido aquecimento do cristal formado pela matriz pela acumulação de uma grande quantidade de energia na fase condensada pela excitação da matriz. Este rápido aquecimento causa a sublimação dos cristais da matriz, ablação de uma porção da superfície cristalina e expansão da matriz para a fase gasosa, levando o analito intacto na pluma em expansão (DREISEWERD, 2003).

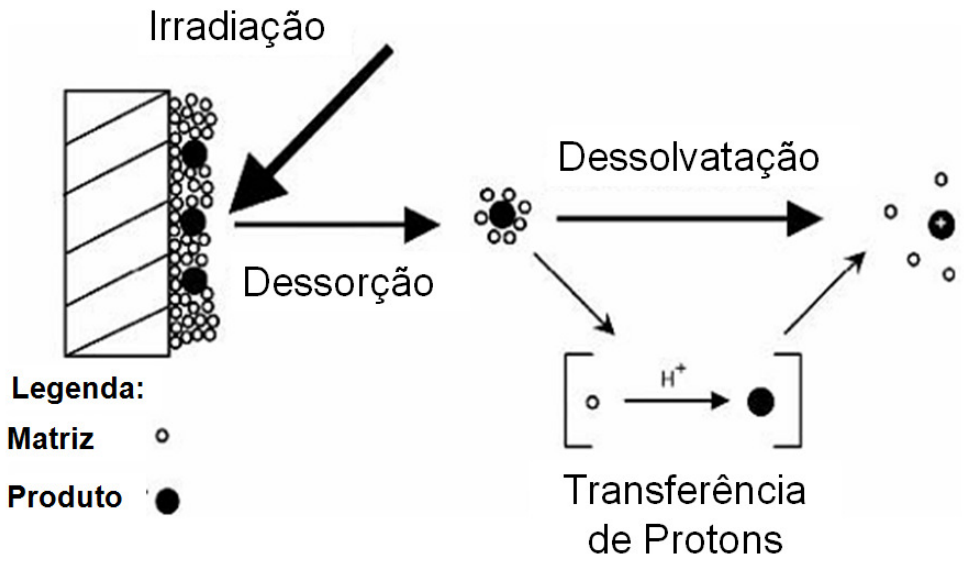

Figura 08 – Ilustração esquemática da ionização por MALDI. Adaptado de Roffman, 2007.

A ionização pode ocorrer durante qualquer momento, porém este processo também não é totalmente conhecido. A teoria mais aceita é de que o mecanismo de formação dos íons envolve a transferência de prótons na fase sólida antes da dessorção ou a transferência na fase gasosa na pluma em expansão a partir de moléculas da matriz fotoionizada. Os íons formados e na fase gasosa são então acelerados por um campo eletrostático para o analisador (ZENOBI & KNOCHENMUSS,1998 e KNOCHENMUSS & ZENOBI, 2003). (Figura 08)

A utilização de uma matriz que absorve energia no comprimento de onda do laser justifica o motivo desta técnica ser chamada de uma técnica de ionização branda. A partir do momento que a maior parte da energia do laser é absorvida pela matriz, a amostra poderá passar para a fase gasosa sem sofrer danos em sua estrutura covalente. E como o processo do MALDI independe da absorptividade e do tamanho do analito, amostras de alta massa molecular podem ser analisadas. O espectro gerado pelo MALDI geralmente mostra o analito com uma única carga (espectro monocarregado) devido às propriedades de ionização do método. (HOFFMAN, 2007).

1.4.2 – Ionização por electrospray

Ionizar amostras em pressão atmosférica para um espectrômetro de massa se apresentou inicialmente como um dilema, tendo em vista que o espectrômetro de massa trabalha em alto vácuo. Este problema foi solucionado adotando sistemas de bombeamento diferencial. Normalmente dois compartimentos com vácuo intermediário são utilizados. Os compartimentos estão conectados por aparatos, conhecidos como cones, que possuem orifícios muito pequenos. Estes orifícios devem ser grandes o suficiente para permitir a entrada de quantos íons for possível a fim de aumentar a sensibilidade, porém deve ser pequeno o suficiente para manter o vácuo intermediário e o vácuo do analisador. A amostra então passará por diferentes pressões até chegar ao detector (Figura 09) (HOFFMAN, 2007).

A ionização por electrospray (ESI), desenvolvida por Fenn em 1988, porém já teorizada desde 1968 por Denn é um método de ionização brando, muito utilizado para análise de proteínas e diversas moléculas polares e possui capacidade de análise de moléculas com menos de 100 Da até maiores de 1.000.000 Da.

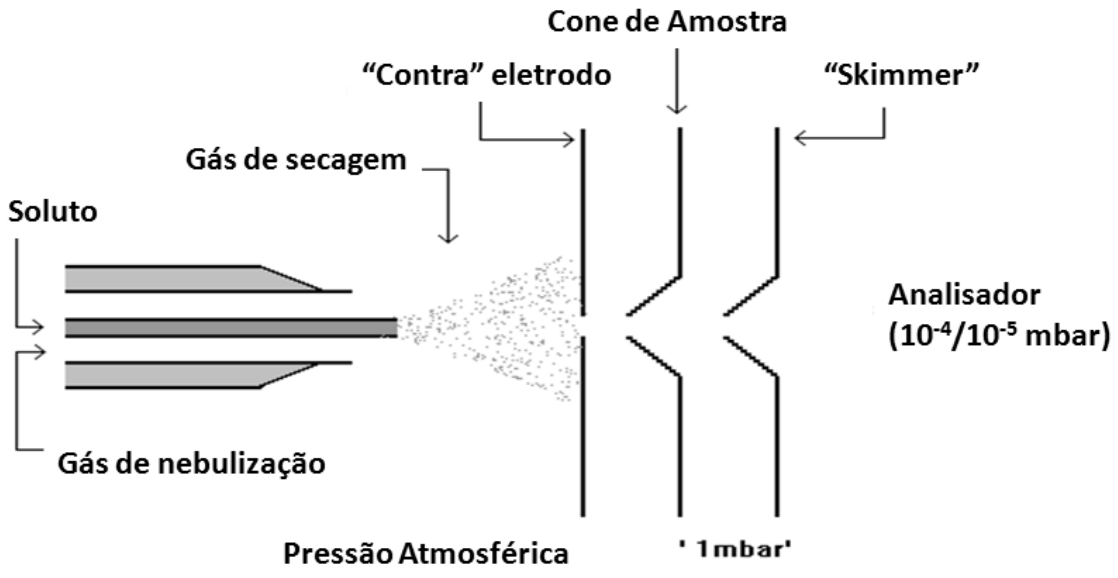

Figura 09 – Ilustração esquemática da ionização por Eletrospray em uma fonte clássica. A Figura demonstra a diferença de pressão nas diferentes partes do equipamento. Adaptado de HOFFMAN, 2007.

Na ionização por eletrospray, a amostra é dissolvida em um solvente polar e volátil e bombeada através de um capilar de aço inoxidável em um fluxo de 1µL/min a 1mL/min. Uma alta voltagem é aplicada a ponta do capilarar (3 a 4 kV) e como

consequência desse alto campo elétrico, a amostra sai da ponta do capilar dispersa em forma de aerossol com gotas altamente carregadas. Esse processo é auxiliado por um fluxo de gás nebulizador (geralmente nitrogênio) por fora do capilar. Este gás auxilia o direcionamento do spray para o espectrômetro de massa e a evaporação do solvente (HOFFMAN, 2007).

À medida que o solvente é evaporado e as gotas vão diminuindo de tamanho, a repulsão eletrostática entre as moléculas carregadas vai se tornando altíssima. Nesse mecanismo vão ocorrendo sucessivas explosões coulômbicas de modo que gotas contendo apenas um íon são formadas. Paralelo a isso a diminuição da gota também faz com que a tensão superficial não suporte tantas cargas (limite de Rayleigh) e induz a transferência dos íons para a fase gasosa (Figura 10) (CANTU *et.al,* 2008).

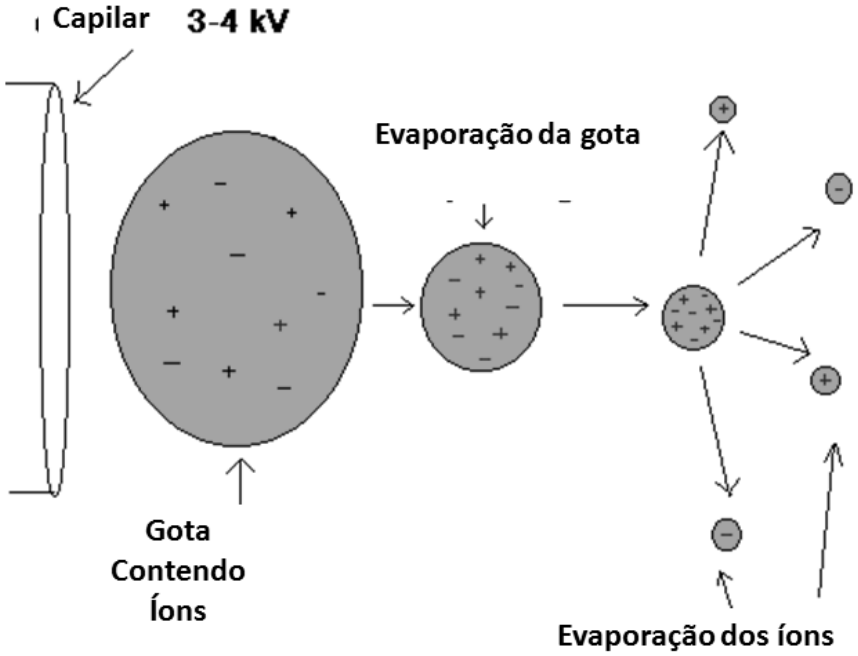

Figura 10 – Processo de ionização por eletrospray. Adaptado de CANTU et.al, 2008

Moléculas grandes com vários sítios de ionização irão produzir um espectro de íons multicarregados, como pode ser observado no espectro da mioglobina de cavalo, uma proteína de 16952 Da (Figura 11). A obtenção de um espectro de íons multicarregados é uma vantagem tendo em vista que há um ganho na sensibilidade do detector e possibilita a análise de moléculas com alta massa molecular usando analisadores com um limite baixo de massa nominal, tendo em vista que o valor

mensurado por um espectrômetro de massa não é a massa e sim a relação *m/z* (HOFFMAN, 2007).

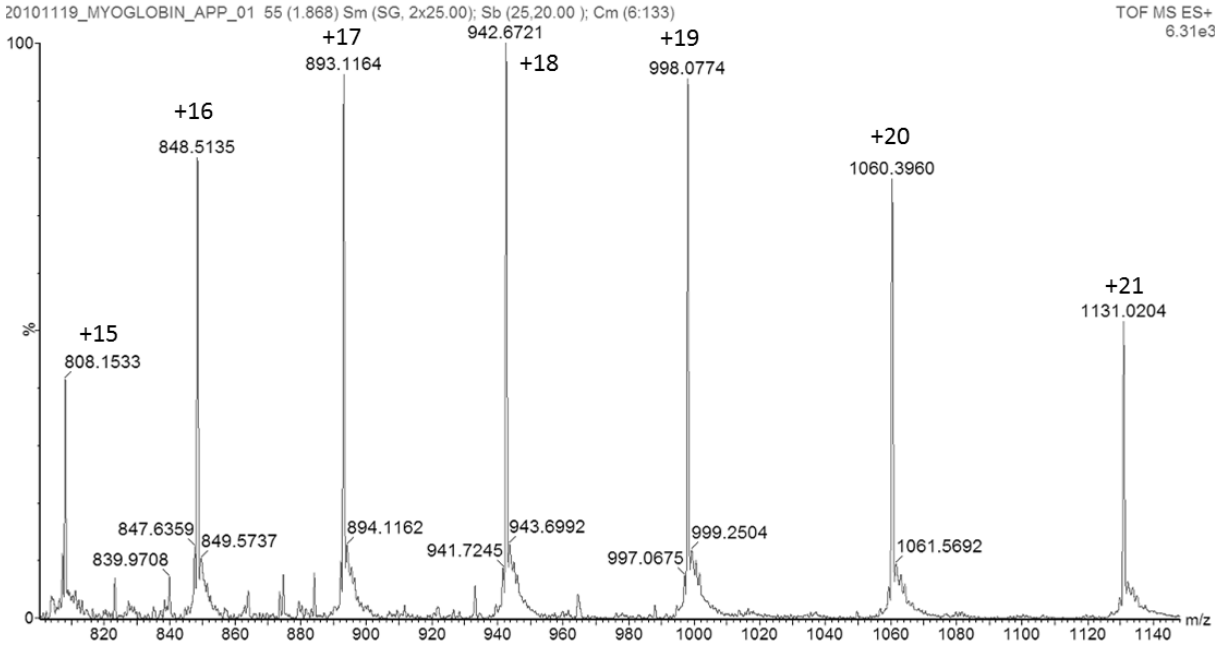

Figura 11 – Espectro multicarregado da Mioglobina de cavalo demonstrando a distribuição de íons. A massa molecular calculada para essa proteína é de 16.952 Da.

1.5– Analisadores

Após a produção de um íon na fase gasosa, estes precisam ser separados de acordo com suas massas, que deverá ser determinada. Na realidade, como dito antes, o que é mensurado na espectrometria de massa é a relação massa carga (*m/z*) para cada íon e esta é a função dos analisadores. Assim como há diversos tipos de fontes de ionização, há também diversos tipos de analisadores (Tabela 03). (HOFFMAN, 2007).

Cada analisador possui suas vantagens e limitações. Eles podem ser divididos em duas grandes classes baseados em suas propriedades. Analisadores tipo varredura que transmitem os íons de diferente *m/z* sucessivamente em uma escala de tempo. O analisador do tipo quadrupolo é um exemplo. Outro grupo é composto pelos analisadores que transmitem simultaneamente todos os íons como o analisador por tempo de vôo (Time of Flight – ToF) (HOFFMAN, 2007).

Tabela 03 – Principais tipos de analisadores de massa disponíveis nos espectrômetros de massa comerciais.

Tipo de Analisador	Símbolo	Princípio da Separação
Setor Elétrico	E ou ESA	Energia cinética
Setor magnético	B	*Momentum*
Quadrupolo	Q	*m/z* (Estabilidade da trajetória)
Ion Trap	IT	*m/z* (freqüência de ressonância)
Tempo de Vôo	ToF	Velocidade
Transformada de Fourier / ressonância de íons cyclotron	FTICR	*m/z* (freqüência de ressonância)
Transformada de Fourier Orbitrap	FT-OT	*m/z* (freqüência de ressonância)

1.5.1 – Analisador Quadrupolo

Um analisador quadrupolo é composto por quatro barras circulares ou preferencialmente, hiperbólicas colocadas perfeitamente paralelas (FERGUSON, 1965; KIENITZ, 1968). Um íon positivo que adentra no espaço entre as barras irá se dirigir em direção a uma barra carregada negativamente. Se o potencial da barra for alterado antes que o íon colida com a mesma, este terá sua direção alterada. Este é o princípio básico de funcionamento de um quadrupolo e foi descrito por Paul e Steinwegen em 1953.

1.5.2 – Analisador ToF

Apesar do conceito do analisador por tempo de vôo ter sido descrito por Stephens em 1946, este só foi desenvolvido em 1955 por Wiley e McLaren, responsáveis pelo primeiro espectrômetro de massa comercial com ToF. Basicamente, o analisador ToF consiste na separação de íons já acelerados a partir das suas velocidades em um tubo sob alto vácuo chamado tudo de vôo.

Os analisadores ToF podem existir de forma linear, onde os íons acelerados são detectados logo após percorrer o tubo de vôo. Essa técnica apresenta uma baixa resolução a partir do momento que íons da mesma espécie molecular com a mesma *m/z* podem adquirir energia cinética diferente ao serem acelerados e então serão detectados como íons diferentes. Para resolver este problema foi criado o Refletor, que consiste em “lentes magnéticas” que corrigem a trajetória dos íons (Figura 08). No refletor, os íons com mesma *m/z* e com energia cinética maior

percorrem um caminho maior enquanto os com menor energia cinética percorrem um caminho menor, corrigindo assim essa falha.

Devido a essa característica de análise por tempo de vôo, o pacote de íons deve ser enviado de modo pulsado para o analisador. Esta característica fez com que o analisador ToF tivesse sua ascensão juntamente com a fonte de ionização MALDI. Porém para explorar o potencial deste analisador juntamente com outras fontes de ionização que têm a formação contínua de íons como o Electrospray foi desenvolvido o mecanismo de Aceleração Ortogonal, onde o tubo de vôo é posicionado transversal ao feixe de íons e estes então são acelerados de forma pulsada com uma freqüência fixa para o tubo de vôo, possibilitando assim a utilização de fontes de ionização continuas com esse analisador.

Figura 12 – Funcionamento de um analisador Tempo de Vôo linear. As moléculas que receberam energia cinética durante a ionização irão migrar numa região livre de campo elétrico e o tempo que levarão para percorrer será relativo à sua *m/z.* Os íons em verde são de menor *m/z* e os em laranja de maior m/z.

1.6 – Detectores

O detector é o componente do espectrômetro de massa que transforma o íon que foi analisado em um sinal detectável. Os detectores são capazes de gerar a partir dos íons incidentes uma corrente elétrica que é proporcional a sua abundância. O primeiro detector utilizado foi uma placa fotográfica. A *m/z* era identificada pela localização dos pontos formados na fotografia e a abundância relativa detectada pela intensidade dos pontos. Hoje este método de detecção é obsoleto. O detector mais utilizado nos espectrômetros de massa comerciais é o multiplicador de elétrons (HOFFMAN, 2007).

1.7 Espectrometria de massa na caracterização de proteínas

Devido a rapidez e relativa simplicidade de análise, a necessidade de quantidades pequenas de amostra e a precisão dos dados obtidos, a espectrometria de massa se tornou uma ferramenta poderosa na caracterização de proteínas, sendo utilizada nesse sentido para determinação da massa molecular de uma proteína, estados oligoméricos, localização de pontes de sulfeto, caracterização de modificações pós traducionais (glicosilações e fosforilações), identificação de proteínas provenientes da separação de uma eletroforese bidimensional. Com o avanço de metodologia de ionização de complexos não covalentes e a utilizaçãode analisadores como ToF e analisadores de mobilidade iônica, é possível também obter informações de estrutura tridimensional de uma proteína por espectrometria de massa. Nos próximos tópicos serão descritos mais detalhadamente estes procedimentos.

1.7.1 Análise de proteínas intactas

A determinação da massa molecular de compostos foi uma das primeiras análises usadas para caracterizar biopolímeros. Até o final dos anos 70, as únicas técnicas disponíveis para essas análises eram métodos de eletroforese, cromatografia e ultracentrifugação. Essas técnicas não trazem resultados muito precisos pois dependem de outras variáveis além do peso molecular, como a conformação, o raio de Stokes e a hidrofobicidade da molécula. Diante disso, a única forma de saber o peso molecular exato de macromoléculas era baseando-se em cálculos a partir da sua estrutura química. Com o desenvolvimento de técnicas de ionização como ionização elétrica (EI) (BLEAKNEY, 1929) e ionização química (CI) (MUNSON, 1966) que necessitam de moléculas em fase gasosa foi um grande avanço para a análise de MS de moléculas voláteis ou moléculas que depois de derivatizadas se tornariam voláteis. O desenvolvimento de outras técnicas de ionização de moléculas não voláteis foi de fundamental importância para análise de biocompostos, porém muitas delas possuíam limitado valor de massa e requeriam um operador bastante experiente (BECKEY, 1963; MORRIS, 1980).

No início dos anos 90, o surgimento dos métodos de ionização por electrospray (ESI) e por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI) acoplada ao

analisador do tipo ToF revolucionou a espectrometria de massa no campo de pesquisa biológica, pois estes métodos possibilitaram análises de alta precisão de biomoléculas com alto peso molecular.

Proteínas e peptídeos são polímeros lineares compostos de uma combinação de 20 aminoácidos ligados por uma ligação amídica modificada denominada ligação peptídica. As proteínas produzidas pelos ribossomos podem sofrer modificações covalentes em seus resíduos de aminoácidos. Essas modificações são chamadas de modificações pós traducionais. Mais de 200 tipos de modificações já foram detectadas (KRIHNA, 1997 e WALSH, 2006) sendo as mais importantes as glicosilações (mais comum das modificações), formação de pontes dissulfeto, fosforilação, sulfatação, hidroxilação, caboxilação e acetilação do resíduo N-terminal (Tabela 04).

Table 4 Principais modificações pós traducionais ou modificações químicas encontradas em peptídeos e proteínas e a diferença de massa em Da

Modificação	**Diferença de Massa (Da)**
Metilação	14,03
Propilação	42,08
Sulfatação	80,06
Fosforilação	79,98
Glicosilação por:	
Desoxihexose(Fuc)	146,14
Hexosaminas (GlcN, GalN)	161,16
Hexoses (Glc, Gal, Man)	162,14
N-Acetilhexosaminas (GlcNAc, GalNAc)	203,19
Pentoses (Xyl, Ara)	132,12
Ácido Siálico (NeuNAc)	291,26
Reduçaõ de pontes-dissulfeto	2,02
Carbamidometilação	57,03
Carboximetilação	58,04
Cisteinilação	119,14
Etilpiridilação	105,12
Acetilação	42,04
Formilação	28,01
Biotinilação	226,29
Farnesilação	204,36
Miristoilação	210,36
Estearoliação	266,47
Palmitoilação	238,41
Lipoilação	188,30
Carboxilação de Asp ou Glu	44,01
Desaminação de Asn ou Gln	0,98
Hidroxilação	16,00

Oxidação de Metionina	16,00
Quebra de ligação peptídica	18,02
Desaminação de Gln para piroglutamico	–17,03

Desde o desenvolvimento das técnicas de ionização suaves (MALDI e ESI), a caracterização de proteínas e suas modificações por MS tem se tornado rotineira. Calvete e colaboradores (1998) utilizaram técnicas de MS para determinação da massa molecular da lectina e suas cadeias, na confirmação da massa dos peptídeos sequenciados por degradação derivativa de Edman, na caracterização dos glicanos N-ligados, na confirmação da sequência através da massa da proteína. De posse desses dados foi possível teorizar um processamento pós traducional para a lectina de sementes de *Vaitarea macrocarpa*. Em 2008, Chambery e colaboradores também utilizam a espectrometria de massa para determinar a massa molecular, localizar as ligações dissulfeto e determinar os possíveis motivos de glicanos existentes e confirmar a sequência de aminoácidos da proteína inativadora de ribossomos (RIP) presente em sementes de *Phitolacca dioica*.

1.7.2 Espectrometria de Massa sequencial

A possibilidade da criação de equipamentos que contem mais de um analisador de massa iguais ou diferentes foi outro grande marco da evolução das tecnologias em MS, dando início a geração de espectrômetros de massa híbridos. A análise de dados por mais de um analisador de massa é chamada de espectrometria de massa sequencial. O primeiro hibrido comercialmente disponível e mais popularmente utilizado foi o Tripo Quadrupolo, que é constituído de três analisadores quadrupolo em sequência, como é mostrado na Figura 13.

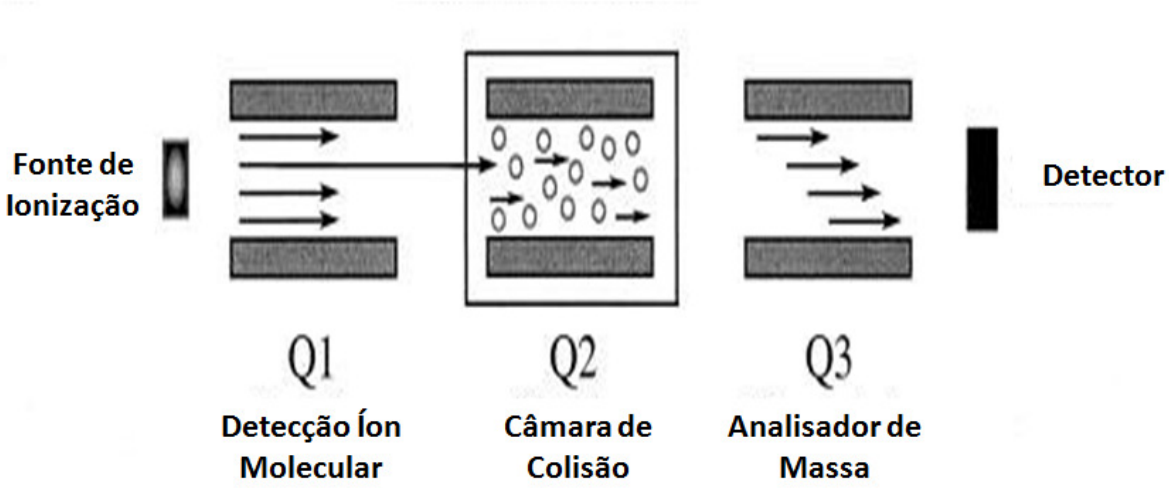

Figura 13 – Esquema de um espectrômetro de massa hibrido do tipo triplo quadrupolo. Q1 é o quadrupolo responsável por detectar o íon molecular ou filtrar o íon precursor. Q2, pode ser um quadrupolo ou hexapolo, e é responsável pela colisão das moléculas contra um gás inerte. Q3 é o analisador que separa o produto da fragmentação em Q2. Adaptado de Hoffman, 2007.

A utilização de analisadores de massa em sequência possibilita utilizá-los para desvendar a estrutura química de diversos compostos como peptídeos e proteínas. Diversas técnicas são utilizadas nestes equipamentos, porém a mais popular e de melhor resposta é a dissociação induzida por colisão (CID). Essa técnica consiste em selecionar o íon a ser fragmentado utilizando o primeiro analisador de massa e em seguida enviá-lo a uma célula de colisão, onde este íon irá colidir com um gás inerte. Em seguida, a energia cinética irá ser transferida parcialmente em energia vibracional e os fragmentos resultantes serão analisados por um segundo analisador de massa (HOFFMAN, 2007).

A inserção de reflectrons nos analisadores ToF foi um incremento significativo à resolução desse analisador. O acoplamento de um analisador quadrupolo como filtro de íons e um analisador do tipo ToF com reflectron (gerando os equipamentos do tipo Q-ToF) foi um saldo de qualidade nas análises de estrutura de peptídeos, possibilitando diferenciar aminoácidos que possuem diferenças de milidaltons em sua massa monoisotópica (HOFFMAN, 2007).

1.7.3 Sequenciamento de Proteínas

Desde que foi descoberto que as proteínas são formadas por aminoácidos, existe o interesse de desvendar a sequência das proteínas relacionadas a diversas funções. Existem diversas técnicas para desvendar a sequência de uma cadeia

peptídica, porém a mais difundida foi a degradação de Edman, desenvolvida por Pehr Edman (EDMAN, 1950). Esta técnica consiste na reação do Fenilisotiocianato em condições alcalinas com a região N-terminal de uma cadeia peptídica para formar um feniltiocarbamil cíclico derivativo em condições alcalinas. Em condições ácidas, esse aminoácido N-terminal derivatizado é clivado como uma tiazolinona. Este é então extraído seletivamente em um solvente orgânico e tratado com ácido para a forma mais estável chamada de aminoácido derivatizado de feniltiohidationa ou PHT aminoácido, que pode ser identificado por cromatografia ou eletroforese (Figura 14). Esse procedimento pode ser repetido novamente para determinar o próximo aminoácido da sequência, porém não é possível determinar mais do que 50 a 60 resíduos (na prática, geralmente o máximo são 30 resíduos). Essa limitação é devido ao fato de que a derivatização cíclica não é 100% eficiente. (NIAL, 1973). Para obter então a sequência completa de aminoácido de uma proteína é necessário que esta seja digerida utilizando diversas endoproteinases a fim de gerar fragmentos com quantidades suficientes de aminoácidos que possa ser analisado pela técnica.

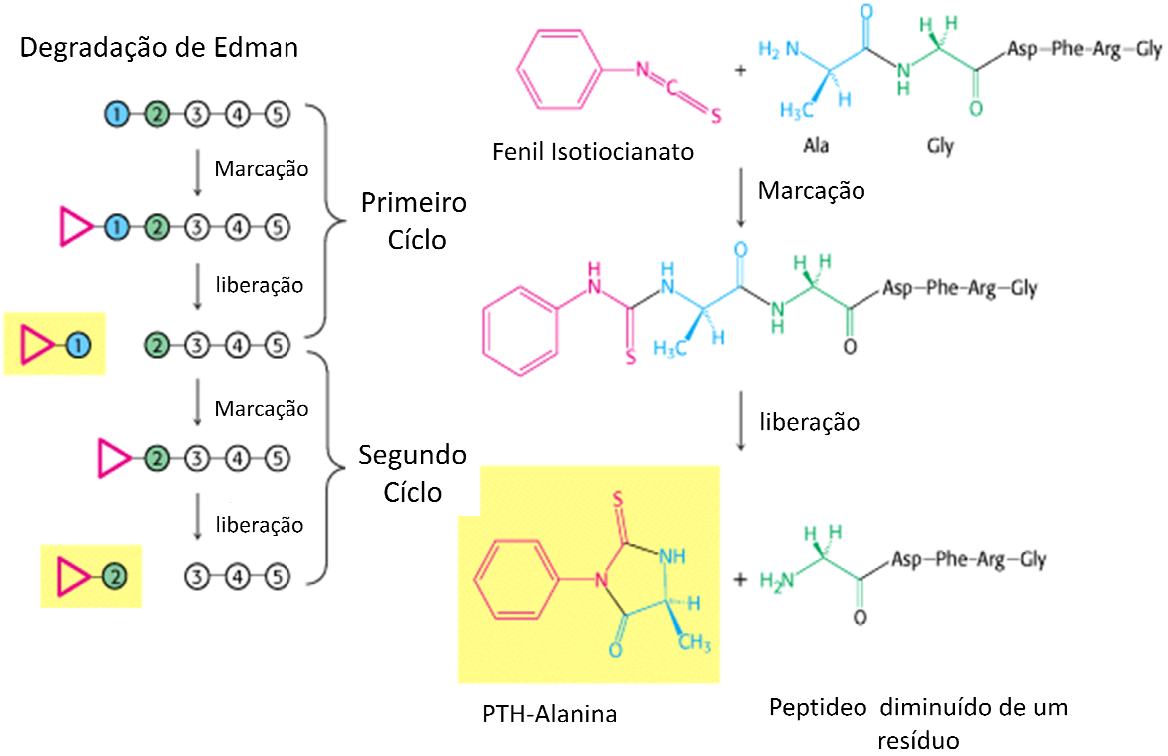

Figura 14 – Reação esquemática da química derivativa de Edman. A amina livre do primeiro aminoácdio da proteína (N-terminal) é induzida a reagir com o Fenil isotiocianato a fim de formar um PTH-Aminoácido. Esse então é clivado do restante da sequência protéica e identificado. Essa reação é feita ciclicamente a fim de identificar uma sequência de aminoácidos. Fonte: Adaptado de Nelson e Cox, 2005

A técnica de degradação de Edman foi amplamente difundida e até hoje é utilizada nos seqüenciadores automatizados de proteínas. Por se tratar de uma técnica baseada em características químicas, é muito eficiente para determinação de aminoácidos com composição atômica idêntica como leucina e isoleucina, porém por precisar de um alto grau de pureza da amostra e uma grande quantidade de amostra, nem sempre a aplicação desta técnica é possível.

A espectrometria de massa sequencial surge então como ferramenta viável para a análise de sequência de peptídeos, porém não descartando as outras. Calvete e colaboradores (1998) utilizaram a espectrometria de massa para avaliar a massa dos peptídeos oriundos da digestão da proteína VML com diversas endoproteinases e confirmar a sequência de aminoácidos. Nagano e colaboradores (2005) utilizaram MS para confirmação da sequencia dos peptídeos, na quantificação de cisteínas e na determinação da sequencia n-terminal (bloqueado) das lectinas das algas marinhas *Hypnea cervicornis* e *H. musciformis*. Já Chambery e colaboradores (2008) utilizaram a espectrometria de massa sequencial para confirmar a sequencia de aminoácidos e desvendar a sequência de glicanos ligados.

1.7.4 Mobilidade Iônica acoplada a Espectrometria de massa no estudo de proteínas

A mobilidade iônica é uma eletroforese em fase gasosa que permite distinguir analitos com base em sua massa, carga e sessão eficaz de colisão. Esta técnica permite a separação das moléculas baseando-se nas diferentes velocidades de difusão destas em um gás inerte sob ação de um campo elétrico externo. Esta técnica vem sendo relatada como uma importante ferramenta analítica desde a década de 70. Também conhecida como Cromatografia iônica, Cromatografia de plasma ou eletroforese iônica, esta técnica é bastante utilizada como ferramenta para a indústria militar e de segurança na detecção de compostos explosivos. (FERNANDEZ-LIMA *et. al,* 2005 CREASER *et. al,* 2004).

Com o desenvolvimento das técnicas de ionização brandas já citadas, foi possível aplicar a técnica de mobilidade iônica à biomoléculas mais complexas como proteínas e ácidos nucléicos, criando assim uma potente ferramenta para estudos conformacionais destas biomoléculas. O primeiro equipamento disponível

comercialmente que acopla a espectrometria de massa a mobilidade iônica é o sistema Synapt HDMS desenvolvido e comercializado pela empresa Waters. Este equipamento dispõe de uma célula de mobilidade iônica diferenciada baseada na tecnologia desenvolvida por esta empresa e chama de Traveling Wave. A célula de mobilidade iônica baseada nesta tecnologia foi então batizada de TWIMS (Traveling Wave Ion Mobility Spectrometry).

De todas as aplicações do TWIMS, uma das mais inovadoras é a determinação de características biofísicas e estruturais de grandes complexos protéicos. Muitas publicações vêm surgindo demonstrando que a estrutura de complexos protéicos pode ser parcialmente mantida na fase gasosa, porém esta afirmação ainda não é conclusiva. (BENESCH *et. al,* 2006; SYNOWSKY *et. al,* 2006; DUIJN *et. al,* 2005; DUIJN *et. al,* 2006). Em 2005, Robinson e colaboradores usaram mobilidade iônica acoplada a espectrometria de massa para estudar um grande oligômero protéico funcional, provendo assim o início das evidências que a estrutura de complexos protéicos podem manter-se similar a estrutura nativa dentro do alto vácuo de um espectrômetro de massa. Além disso, os resultados demonstram que a topologia quaternária de complexos protéicos pode ser mantida na ausência de solvente (ROUTOLO *et. al,* 2005).

A repulsão coulombica geralmente possui menos influência em íons protéicos com um menor número de cargas em comparação com íons mais carregados. Nos estudos de mobilidade iônica de proteínas, é verificado que a maioria das estruturas nativas ou “compactas” possui baixo estado de carga, enquanto as proteínas com um estado de carga maior geralmente se apresentam com uma conformação mais extendida (CATALINA *et. al,* 2005; SUN *et. al,* 2007; RUOTOLO *et. al*, 2007; KALTASHOV & ABZALIMOV, 2008).

A maior estrutura já analisada por TWIMS até então é a estrutura do capsídio do vírus da Hepatite B (HBV). HBV pode formar tanto *in vitro* como *in vivo* capsídeos contendo 90 (T = 3) ou 120 (T = 4) dímeros com uma massa total de 3 ou 4 MDa respectivamente. A forma do capsídeo do HBV foi estudada por TWIMS e revelou que ambos os capsídeos possuem pelo menos duas populações distintas de conformeros que não são alteradas pela alteração da voltagem ou pelo estado de carga, o que sugere que são formados durante o processo de ionização. Uetrecht e colaboradores hipotetizaram que estes capsideos provavelmente adotam estados isoenergéticos antes da ionização e ficam presos a eles após a dessolvatação,

apresentando então duas conformações diferentes para cada capsídeo. Este resultado também demonstra que a tecnologia do TWIMS é capaz de transmitir dados de complexos com até alguns Mega-Daltons. (UETRECHT *et. al,* 2008)

2. CONCLUSÕES

Desde a descoberta do átomo e da existência dos isótopos a espectrometria de massa tem se mostrado uma técnica fundamental no estudo de compostos orgânicos. Com a criação de técnicas de ionização capazes de levar à fase gasosa moléculas de alta massa sem degradá-las, como o ESI e o MALDI, foi possível estender essas análises aos biocompostos poliméricos como ácidos nucléicos, oligossacarídeos e principalmente as proteínas.

A análise de proteínas por espectrometria de massa veio como um grande avanço nos estudos da estrutura primária e de modificações pós traducionais das mais diversas que podem ser encontradas. Podemos destacar a utilização da espectrometria de massa como um método mais rápido de sequenciamento de proteínas que apresentam alta identidade de sequência e alta homologia como é o caso das lectinas.

As lectinas são um grupo de proteínas com uma grande importância biotecnológica desde a sua descoberta, sendo de fundamental importância para o estabelecimento das bases da imunologia e nos estudos dos grupos sanguíneos e até hoje sendo usadas como ferramentas biotecnológicas no estudo de interação entre glicanos e proteínas.

Devido a alta homologia dessas proteínas dentro do táxon das leguminosas, tanto de estrutura primaria e principalmente de estrutura secundária, a sua utilização como marcador evolutivo é altamente interessante e informativo, porém muitas das sequências até hoje determinadas pertencem a tribo Phaseoleae. Estratégias de espectrometria de massa voltadas para análise dessas proteínas, como proposto nesse trabalho, são de grande importância na caracterização geral e na determinação da sequência primária de lectinas.

CAPITULO II – Caracterização por espectrometria de massa das lectinas de *Erythrina velutina* e *Luetzelburgia auriculata*

.

1. INTRODUÇÃO

Apesar de apresentarem alto grau de identidade, as lectinas são moléculas que possuem uma variedade de afinidade por açúcares e também uma variedade de efeitos biológicos diferentes ou com potencialidades diferentes (CAVADA *et. al,* 2001). Essas diferenças de especificidade a carboidratos e de potencialidade das atividades biológicas se devem as pequenas modificações em sua estrutura primária, que leva a modificações no reconhecimento dos carboidratos, sendo então o conhecimento da sequência primária um prrrequisito para o entendimento dessas variações (SHARON *et. al,* 1993; GABIUS *et. al,* 1998).

As lectinas de leguminosas mais estudadas estão as da tribo Phaseolae. O gênero Erythrina, pertencente a essa tribo, possui cerca de 100 espécies relatadas e entre elas, 18 já tiveram suas lectinas isoladas, 7 possuem a sequência primária estabelecida e apenas duas possuem a estrutura tridimensional resolvida (Tabela 05). As lectinas mais bem estudadas pertencente a esse gênero são as isolada de sementes de *E. corallodendron* (EcorL) e *E. cristagalli* (ECL). Essas lectinas compartilham características comuns como a presença de glicanos N-ligados em sua estrutura, a especificidade por D-galactose e seus derivados, principalmente por Lactose e N-Acetil Lactosamina, ausência de cisteína na composição de aminoácidos, dependência pelos íons divalentes Ca^{++} e Mn^{++}, apresentam-se como dímero em pH 7,5 e possuem atividade mitogênica em células de linfócitos T humanos. Além disso, os contatos entre monômeros dessas lectinas para a formação do dímero são da forma “aperto de mão” e não como dímeros canônicos encontrados em diversas outras lectinas. (TURTON *et. al,* 2004; SVENSSON *et. al,* 2002; IGLESIAS *et. al,* 1981; ADAR, *et. al,* 1989).

Tabela 05 – Lectinas do gênero Erythrina já isoladas.

Espécie	Lectina	Sequência	Estrutura	Referência*
Erythrina corallodendron	EcorL	Sim	Sim	Adar, *et. al,* 1989
Erythrina indica	EiLL	Não	Não	Bhattacharyya *et. al,* 1981
Erythrina costaricensis		Não	Não	Nanne-Echandi, C. I. & Aragón-Ortiz, 1991
Erythrina cristagalli	ECL	Sim	Sim	Iglesias *et. al,* 1981
Erythrina velutina	EVA	Não	Não	Stojanovic *et. al,* 1994
Erythrina speciosa	EspecL	Não	Não	Konozy *et. al,* 2003
Erythrina fusca e E. globocaliz		Não	Não	Aragon-Ortiz *et. al,* 1994
Erythrina rubrinervia, E. caffra, E. flabelliformis, E. lysistemon		Sim	Não	Lis *et. al,* 1985
Erythrina americana		Não	Não	Ortega *et. al,* 1990
Erythrina Edulis		Não	Não	Gerardo, 1984
Erythrina arborescens, E.suberosa E.lithosperma		Não	Não	Bhattacharyya *et. al,* 1981

*A referência apresentada nessa tabela se refere à primeira publicação contendo a lectina.

A lectina de *E. velutina* foi isolada por Stojanovic e colaboradores em 1994 e, em 1996, Moraes e Colaboradores isolaram a mesma lectina em uma variedade diferente da espécie. Essa lectina foi isolada em um passo cromatográfico de afinidade em gel de goma de guar e suas principais características são: apresentarem-se como dímeros em pH 7,5 porém também aparecendo formações de tetrâmero, é uma glicoproteína com cerca de 7,3% de carboidratos, tem um pI de 4,5 e um alto grau de resíduos ácidos, além de apresentar uma atividade de migração de neutrófilos na cavidade intraperitoneal ou nos bolsões de ar em ratos.

Poucos são os relatos de lectinas isoladas de plantas da tribo Sophoreae, sendo relatadas principalmente as lectinas de *Maackia amurensis*, *Sophora japonica* e *Cladrastis lutea,* sendo essas isoladas tanto de sementes como de outros tecidos como casca, folha e flores. A lectina de *Luetzelburgia auriculata* foi isolada por Oliveira e colaboradores (2002) por cromatografia de afinidade em coluna de GalNac e se apresenta como um homotetrâmero em pH 7,6. Essa lectina é uma glicoproteína com cerca de 3,2% de carboidratos ligados, perde a atividade hemaglutinante após aquecida a 80ºC e como a lectina de *Vatairea macrocarpa* (pertencente a tribo Dalbergiea, derivada de Sophoreae), apresenta processamento em cadeias, sendo composta por uma cadeia alfa madura de 29kDa e duas de 15kDa (calculadas por eletroforese). Essa lectina também apresenta a capacidade de inibir o crescimento dos fungos *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium solani* e *Aspergillus niger* além de prejudicar a acidificação estimulada por glicose do meio de incubação de células de *Saccharomyces cerevisiae* (MELO *et. al,* 2005).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar por espectrometria de massa duas lectinas ligantes a galactose, isoladas de sementes de *Erythrina velutina* e *Luetzelburgia auriculata,* decifrando sua estrutura primária e relacionando com possíveis alterações na estrutura terciária.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Analisar as lectinas quanto a sua massa molecular, identificando possíveis modificações pós traducionais
- ✓ Realizar digestões enzimáticas das lectinas em questão, separar e sequenciar os peptídeos oriundos dessas digestões
- ✓ Montar um mapa de peptídeos sequenciados e determinar a sequencia primária das proteínas em estudo
- ✓ Determinar relações filogenéticas com as lectinas seqüenciadas e outras lectinas da família das leguminosas.

3. METODOLOGIA

3.1 Obtenção da farinha e extração de proteínas totais solúveis

As sementes de *Erythrina velutina* e *Luetzelburgia auriculata* tiveram seu tegumento removido, descartado e os órgãos restantes (cotilédones e eixo embrionário) macerados manualmente a grãos, sendo em seguida submetidos a trituração em moinho de café para obtenção de uma farinha fina. Devido a presença de lipídios que poderiam interferir no processo de purificação da lectina, a farinha foi submetida a extração de lipídeos utilizando-se o solvente hexano a frio. A extração de proteínas foi realizada em NaCl 0,15M na proporção de 1:10 (peso/volume) durante 4h a temperatura ambiente. Esta suspensão foi submetida a centrifugação a 10.000 x g por 30 minutos a 4ºC sendo o precipitado descartado e o sobrenadante, denominado extrato total, separado para as análises.

3.2 Isolamento das lectinas por cromatografia de afinidade

O extrato total foi submetido a precipitação por sulfato de amônio em frações de saturação deste sal variando em 30%. A fração 30-90% de saturação para *E. velutina* e a fração 30-60% de saturação para *L. auriculata* foram utilizadas para realizar a cromatografia de afinidade em gel de goma de guar conforme descrito na literatura (MORAES *et. al,* 1996 e OLIVEIRA *et. al,* 2002). A goma de guar é interligada por uma reação química dos resíduos de açúcar com epicloridrina em pH básico, formando um gel e possibilitando a sua utilização como uma matriz cromatográfica de afinidade. Essa matriz é composta por galactomanana que consiste em uma estrutura linear de manose β1-4 ligadas tendo uma galactose β1−6 ligada a cada segunda manose (Figura 15).

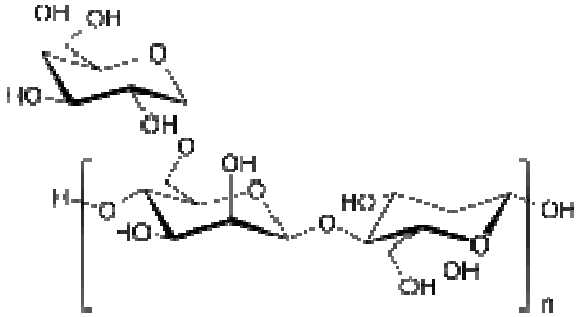

Figura 15 – Estrutura básica do polímero de galactomanana que compõe a Goma de Guar. Fonte: http://www.guargum.biz

O gel de afinidade foi equilibrado com uma solução de NaCl 0,15M. As proteínas que não interagiram com a coluna foram lavadas com NaCl 0,15M e a lectina purificada foi eluída com 0,2 M de Lactose. As frações coletadas foram analisadas por espectrofotometria no comprimento de onda de 280 nm. As frações que se referem ao pico eluído foram reunidas, exaustivamente dialisadas contra água destilada e liofilizadas. A lectina purificada das sementes de *E. velutina* foi nomeada de EVA e a purificada das sementes de *L. auriculata* de LAA

3.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS

O acompanhamento do processo de purificação foi feito através de eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS (SDS-PAGE), realizada segundo uma adaptação ao método descrito por Laemmli (1970).

O gel superior ou gel de empilhamento foi preparado usando acrilamida/bisacrilamida 4% em tampão Tris/HCl 0,2 M pH 6,8, SDS 4%, persulfato de amônio (100mg/ml) e TEMED concentrado. O gel de separação da amostra (main gel) foi preparado usando acrilamida/bisacrilamida 12% em tampão Tris/HCl 0,33 M, pH 8,8 contendo SDS 1%, TEMED (concentrado) e persulfato de amônio (100mg/ml).

As amostras foram solubilizadas a uma concentração de 4 mg/mL em tampão de amostra contendo Tris/HCl 0,0625 M pH 6,8, 10 % de glicerol, 0,02 % de azul de bromofenol e 1 % de SDS.

A eletroforese SDS-PAGE foi realizada em um sistema Mini-Protean II mini-gel (Bio-Rad; Milão, Itália) com a voltagem variando até 200V, potência até 5W, e amperagem constante de 35mA. O tampão de corrida utilizado continha Tris 0,025

M, Glicina 0,192 M e SDS 0,1% pH 8,8. Proteínas de massa molecular conhecidas foram utilizadas como padrão.

Após a corrida eletroforética, o gel de separação foi corado em Coomassie R-250 a 0,05%, dissolvido em metanol, ácido acético e água a uma proporção 1:3,5:8 (v/v/v). A retirada do excesso do corante (descoramento) utilizando a mesma solução desprovida do corante.

3.4 Determinação da massa molecular por espectrometria de massa

A massa molecular das proteínas em estudo foi determinada por ionização do tipo electrospray acoplada a um espectrômetro de massa hibrido (Synapt HDMS system – Waters Corp). Foi preparada uma solução da proteína a ser analisada na concentração de 10 ρmol/μL em 50% de acetonitrila contendo 0,2% de ácido fórmico. Esta solução foi infundida no sistema num fluxo de 10 μL/min. A voltagem do capilar e do cone foram ajustadas para 3kV e 40V respectivamente. A temperatura da fonte foi mantida a 90 ºC e o fluxo de nitrogênio ajustado para 150 L/h. A aquisição de dados foi realizada pelo software MassLynx v4.1 (Waters Corp) e o espectro multicarregado foi deconvoluído utilizando técnicas de maximização de entropia (FERRIGE *et. al,* 1992).

3.5 Digestão *in gel* e sequenciamento dos peptídeos por espectrometria de massa

As proteínas a serem analisadas foram aplicadas a um gel de 12% de poliacrilamida (SDS-PAGE). A banda referente à proteína foi retirada do gel e recortada com auxilio de uma ponteira plástica. O gel contendo a proteína de interesse foi descorado em uma solução de 50% de acetonitrila contendo 25 mM de bicarbonato de amônio, desidratado em 100% de acetonitrila e seco em Speedvac (LabConco). O gel foi então reidratado em uma solução de 50 mM de Bicarbonato de amônio contendo a enzima tripsina (Promega) ou quimiotripsina (Sigma) na proporção de 1:50 (peso / peso; enzima:substrato). Para digestão da amostra com a enzima termolisina, o gel foi reidratado numa solução de 50mM de Tris –HCl pH 7,5 com NaCl 5mM e $CaCl_2$ 5mM nas mesmas proporções que as demais enzimas. A

reação de digestão permaneceu overnight a 37ºC, sendo interrompida com a adição de ácido fórmico a 2%.

Os peptídeos oriundos da digestão foram extraídos do gel em utilizando uma solução de 5% de ácido fórmico em 50% de acetonitrila sob agitação durante 15 minutos. Este procedimento foi repetido 3 vezes, o sobrenadante contendo os peptídeos extraídos foram unidos e concentrados em Speedvac e ressuspensos com 25µL com ácido fórmico 0,1%. Estes peptídeos foram injetados em um sistema nanoAcquity (Waters Corp) conectado a uma fonte de nano electrospray de um espectrômetro de massa (SYNAPT HDMS – Waters Corp). A amostra foi aplicada a uma coluna de fase reversa C18 (75 µm x 100 mm) e eluída com um gradiente partindo de de 10% a 85% de acetonitrila contendo 0,1% de ácido fórmico.

O espectrômetro de massa operou em modo positivo, com a temperatura da fonte de 90 ºC e a voltagem do capilar de 3.0 kV. Os experimentos de LC-MS/MS foram realizados de acordo com a função DDA (Direct Data Analysis – Análise Direta de Dados) os íons precurssores com carga entre +2 e +4 foram selecionados para análise de MS/MS sendo fragmentados através de CID (Collision Induced Decomposition – Decomposição induzida por colisão). Os dados foram coletados, processados e analisados utilizando o programa MassLynx v4.1 (Waters Corp) e ProteinLynx v2.4 (Waters Corp). Os peptídeos com sequência de aminoácidos comuns a outras proteínas foram identificados por buscas em banco de dados utilizando ferramenta de pesquisa por padrão de fragmentação dos peptídeos. Foram utilizados os programas ProteinLynx 2.4 (Waters Corp) e MASCOT (Matrix Science). Os demais peptídeos tiveram suas sequências determinadas através da interpretação manual dos espectros de fragmentação (sequenciamento *De novo)*.

3.6 Análises da sequência primária por Bioinformática

A partir da obtenção da sequência primária, os informações de pI teórico, composição de aminoácidos, formula molecular e coeficiente de absorção foram computados pelo programa ProtParam (GASTEIGER *et. al,* 2005). Os alinhamentos de sequência primária foram feitos através do programa ESPript 2.2 (GOUET *et. al,* 1999). Os dados filogenéticos foram gerados no programa ClustalW e o modelo 3D para as proteínas foram feitos utilizando o programa Swissmodel (ARNOLD *et. al,* 2006).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Purificação da lectina de *Luetzelburgia auriculata* (LAA) e de *Erythrina velutina* (EVA)

A lectina LAA foi purificada conforme protocolo já estabelecido por Oliveira e colaboradores (2002). A Figura 16A mostra o cromatograma em gel de Goma de Guar e B a eletroforese em presença de SDS realizada com a amostra purificada neste trabalho, demonstrando que a proteína purificada possui o mesmo padrão eletroforético. Para confirmar a purificação da lectina, foi realizada uma cromatografia de exclusão molecular em TSK XL 3000 e o resultado corrobora com os encontrados por Oliveira e colabroadores (2002).

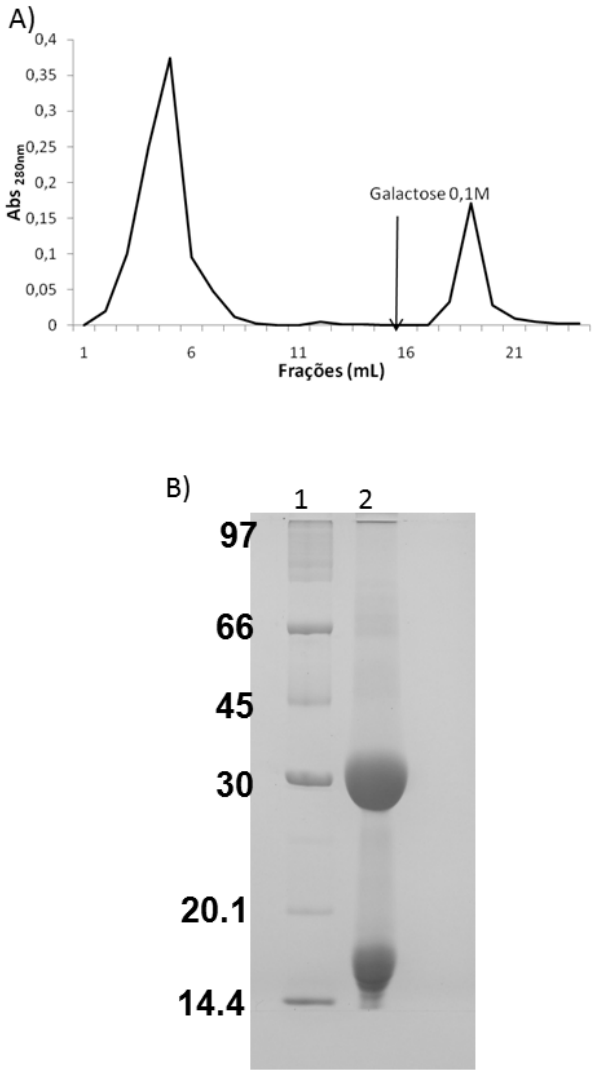

Figura 16 – A) Cromatograma de purificação da LAA em 10 mL de gel de Goma de Guar. O gel foi equilibrado com NaCl 0,15M e o PI lavado com a mesma solução. O pico retido foi eluído com 0,1M de Lactose em 0,15M de NaCl. As frações de 3mL foram coletadas e analisadas em espectrofotômetro num comprimento de onda de 280nm. Foram aplicadas 5 mg de proteínas. B)

Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% em presença de SDS. Poço 1 – Marcador de peso molecular composto por: Fosforilase b 97 kDa, BSA 66 kDa, Ovoalbumina 45 kDa, Anidrade Carbonica 29 kDa e α- lactoalbumina 14,4 kDa - ; Poço 2- 40µg de LAA.

A lectina de *Erythrina velutina* foi purificada a partir de protocolo pré-estabelecido por Moraes e colaboradores (1996). A Figura 17A demonstra o perfil cromatográfico da lectina de *E. velutina* e a Figura 17B demonstra o perfil eletroforético da lectina purificada.

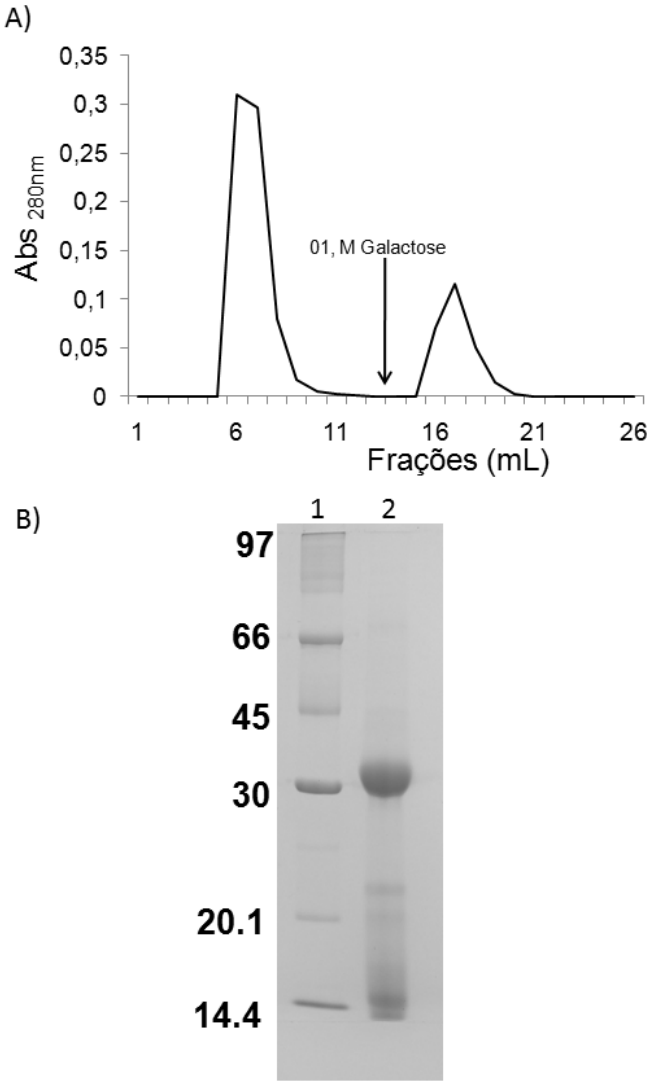

Figura 17 – A) Cromatograma de purificação da EVA em 10 mL de gel de Goma de Guar. O gel foi equilibrado com NaCl 0,15M e o PI lavado com a mesma solução. O pico retido foi eluído com 0,1M de Lactose em 0,15M de NaCl. As frações de 3mL foram coletadas e analisadas em espectrofotômetro num comprimento de onda de 280nm. Foram aplicadas 5 mg de proteínas. B) Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% em presença de SDS. Poço 1 – Marcador de peso molecular composto por: Fosforilase b 97 kDa, BSA 66 kDa, Ovoalbumina 45 kDa, Anidrade Carbonica 29 kDa e α- lactoalbumina 14,4 kDa - ; poço 2- 40µg de EVA.

4.2 Caracterização da massa nativa de EVA e LAA

Conforme descrito por Oliveira e colaboradores (2002), LAA é composta por uma cadeia madura denominada cadeia alfa que sofre proteólise originando duas cadeias denominadas gama e beta. Essas cadeias não sofrem qualquer tipo de reorganização e provavelmente interagem formando uma cadeia alfa funcional. Este seria o motivo de serem co purificadas por cromatografia de afinidade e por não aparecerem separadas na cromatografia de exclusão molecular, sendo identificada apenas na eletroforese desnaturante (SDS-PAGE).

O espectro de massa da proteína nativa (Figura 18) demonstra a existência de diversas massas que correspondem às cadeias alfa, beta e gama. Pode-se verificar na Tabela 06 as possíveis combinações de massas das cadeias beta e gama e a correspondência com as cadeias alfa.

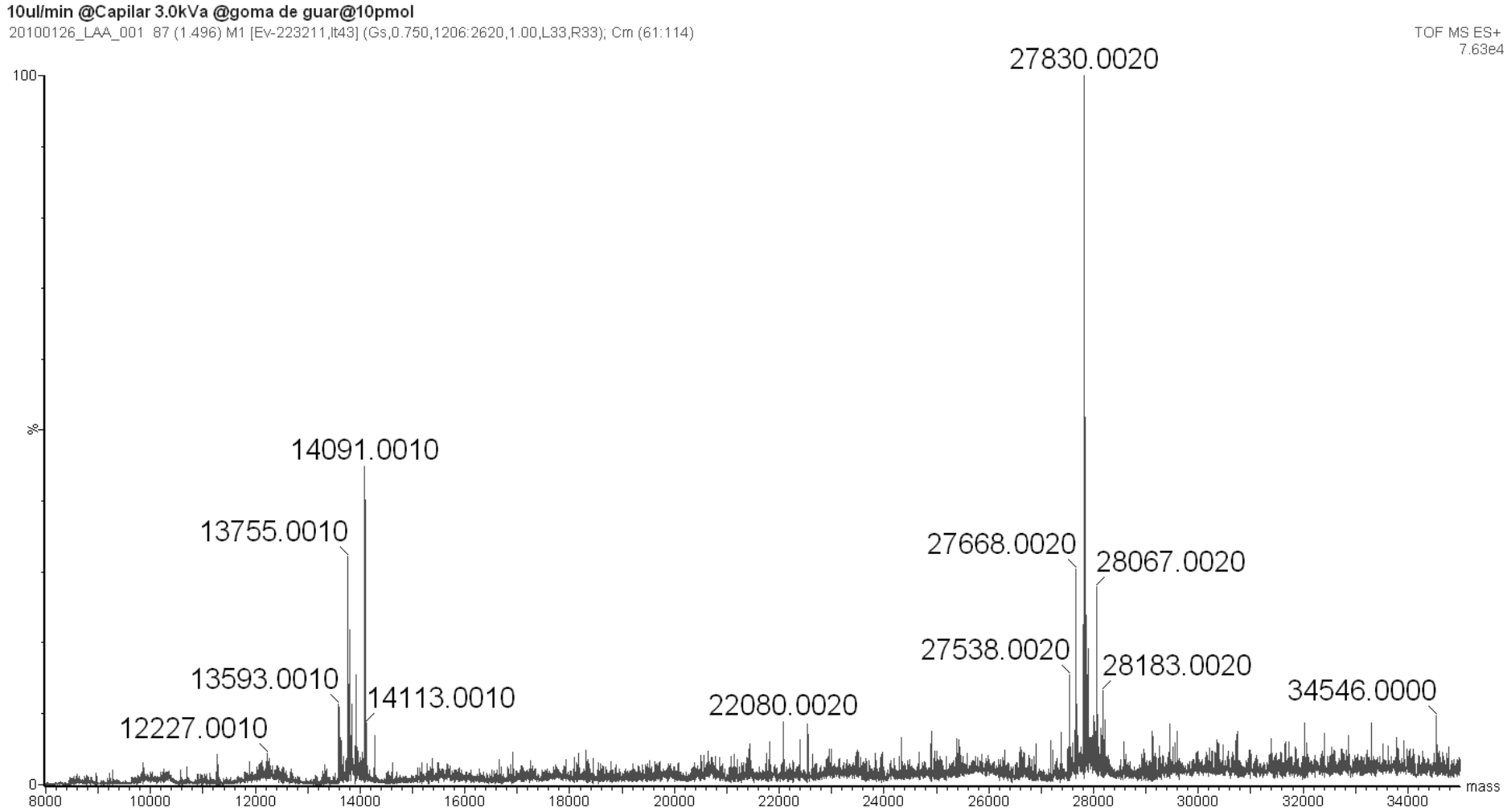

Figura 18 – Espectro de massa deconvoluído da lectina de sementes de *L. auriculata*.

A diferença de massa entre γ1 e γ2 é compatível com a oxidação de metionina ou com hidroxilação e a diferença entre γ2 e γ3 a um aducto de sódio. A diferença entre β1e β2 corresponde a adição de um resíduo de hexose, assim como β2 e β4.

Tabela 06 – Massas encontradas no espectro multicarregado de LAA nativa.

Cadeia	Massa (Da)	Diferença de Massa (Da)
β1	13593	
β2	13755	$\Delta_{\beta2-\beta1}$: 162
β3	13800	$\Delta_{\beta3-\beta2}$: 45
β4	13915	$\Delta_{\beta4-\beta3}$: 115
β5	13952	$\Delta_{\beta5-\beta4}$: 37
γ1	14075	
γ2	14091	$\Delta_{\gamma2-\gamma1}$: 16
γ3	14113	$\Delta_{\gamma3-\gamma2}$: 22
γ4	14129	$\Delta_{\gamma4-\gamma3}$: 16
γ5	14288	$\Delta_{\gamma5-\gamma4}$: 159
α1	27187	
α2	27376	$\Delta_{\alpha2-\alpha1}$:189
α3	27538	$\Delta_{\alpha3-\alpha2}$:162
α4= β1+ γ1	27668	$\Delta_{\alpha4-\alpha3}$:130
α5= β2 + γ1 Ou α5= β1+ γ2- H_2O	27830	$\Delta_{\alpha5-\alpha4}$:162
α6= β5+ γ3	28067	$\Delta_{\alpha6-\alpha5}$:237
α7= β4+ γ5- H_2O	28183	$\Delta_{\alpha7-\alpha6}$:116
α8	28575	$\Delta_{\alpha8-\alpha7}$:392

A lectina EVA teve sua massa nativa determinada por espectrometria de massa (Figura 19) e foi possível identificar três massas diferentes: 28608 ± 2 Da; 28753 ± 2 Da e 28898 ± 2 Da cada uma com um incremento de 145 ± 2 Da. Levando em consideração o erro experimental, esse incremento de massa pode ser relativo a adição de uma unidade de desoxihexose.

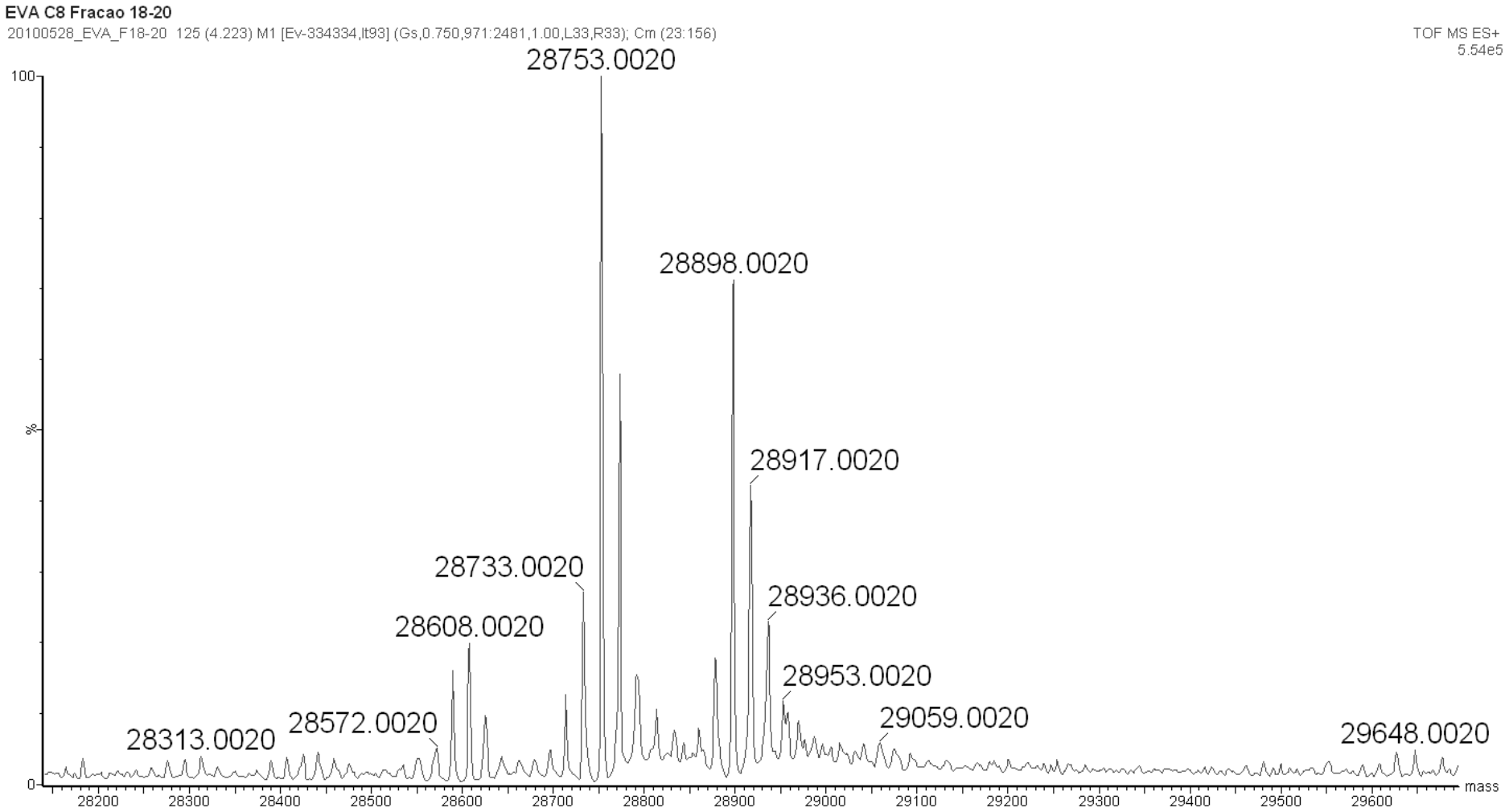

Figura 19 – Espectro deconvoluído da lectina purificada de sementes de *E. velutina*.

4.3 Sequenciamento das lectinas de LAA e EVA

Através da digestão enzimática *in gel* das proteínas purificadas, foi possível realizar o sequenciamento de diversos peptídeos e a montagem de um mapa peptídico para a lectina LAA (Figura 20) e EVA (Figura 21). Através da informação da massa nativa, foi possível determinar a sequencia completa de aminoácido para as duas proteínas.

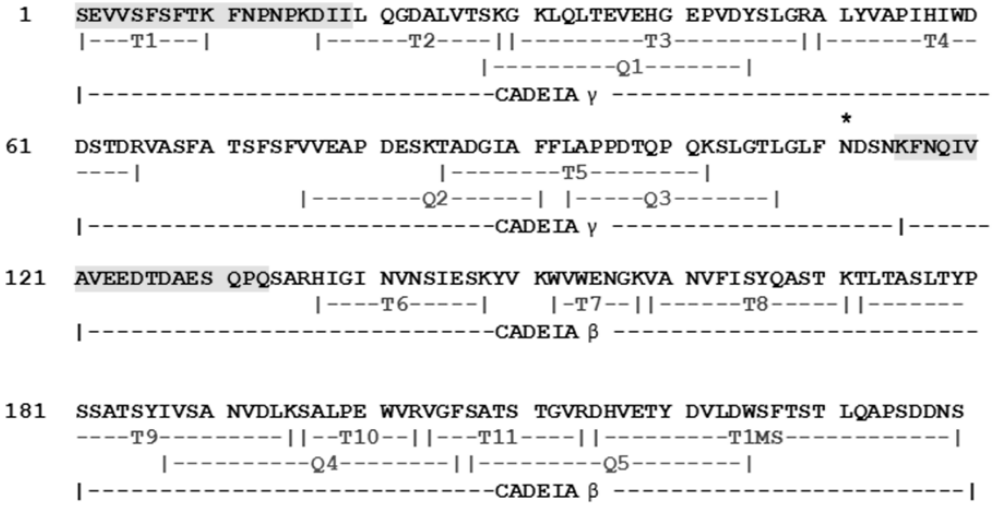

Figura 20 – Sequencia de aminoácidos da lectina LAA determinada por espectrometria de massa. A região marcada em cinza corresponde aos peptídeos sequenciados por Edman (N-terminal) disponíveis na literatura. Os peptídeos começados em T são oriundos de clivagem por tripsina e começados em Q de clivagem com quimiotripsina. O asterisco indica o sítio de glicosilação.

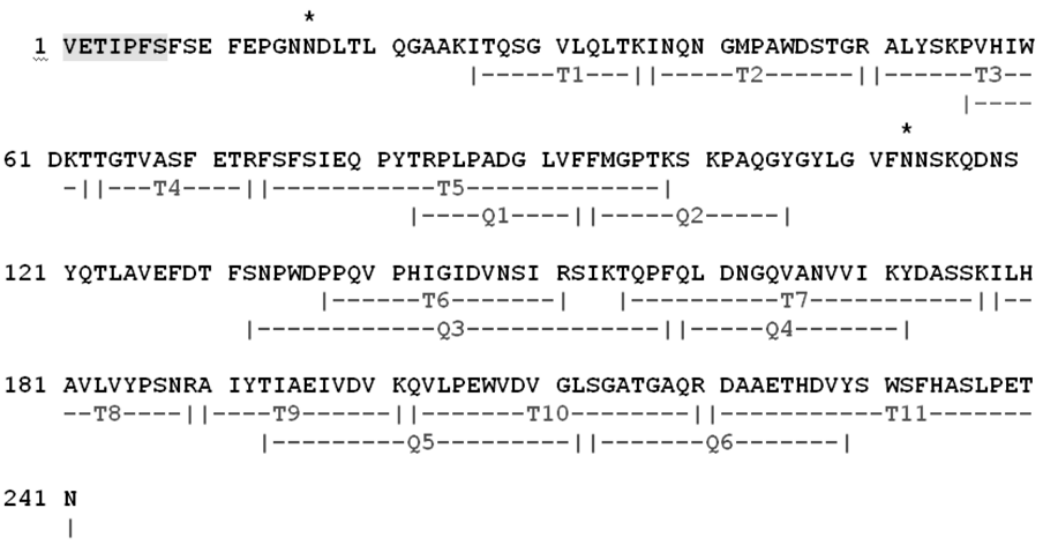

Figura 21 – Sequencia de aminoácidos da lectina EVA determinada por espectrometria de massa. A região marcada em cinza corresponde aos peptídeos sequenciados por Edman (N-terminal) disponíveis na literatura. Os peptídeos começados em T são oriundos de clivagem por tripsina e começados em Q de clivagem com quimiotripsina. O asterisco indica o sítio de glicosilação.

Todos os peptídeos de EVA encontrados foram sequenciados manualmente por sequenciamento *De Novo*. Os peptídeos de LAA também foram sequenciados manualmente por sequenciamento *de novo* com exceção do T1-MS. (Tabelas 7 e 8)

Tabela 7 – Massas calculadas (Teórica, experimental e diferença entre elas) para os peptídeos sequenciados da lectina de sementes de *L. auriculata*.

Peptídeo	Massa Teórica (Da)	Massa Experimental (Da)	Diferença (Da)	Sequência
T1	1129,5656	1129,4644	0,10	SEVVSFSFTK
T2	1371,7609	1371,7844	-0,02	DIILQGDALVTSK
T3	2226,1279	2226,1465	-0,02	GKLQLTEVEHGEPVDYSLGR
T4	1780,9214	1870,8444	0,08	ALYVAPLHLWDDSTDR
T5	1915,6979	1916,8444	-0,88	TADGIAFFLAPPDTQPQK
T6	1309,6990	1609,5643	0,13	HIGINVNSLESK
T7	917,4395	917,3644	0,08	WVWENGK
T8	1426,7456	1426,6644	0,08	VANVFLSYQASTK
T9	2501,2900	2501,1443	0,15	TLTASLTYPSSATSYLVSANVDLK
T10	956,5079	956,4644	0,04	SALPEWVR
T11	1080,5564	1080,4844	0,07	VGFSATSTGVR
T1MS	2842,2326	2842,2226	0,01	DHVETYDVLDWSFTSTLQAPSDDNS
Q1	2005,9488	2005,8751	0,11	SKGKLQLTEVEDGEPVDY
Q2	1647,7992	1647,8237	-0,02	VVEAPDESKTADGIAF
Q3	1451,7620	1451,6244	0,14	LAPPDTQPKQSLGT
Q4	2199,2051	2199,1443	0,06	IVSANDVLKSALPEWVRVGF
Q5	2149,9917	2149,8843	0,11	IVSANDVLKSALPEWVRVGF

Tabela 8 – Massas calculadas (Teórica, experimental e diferença entre elas) para os peptídeos sequenciados da lectina de sementes de *E. velutina*.

Peptídeo	Massa Teórica (Da)	Massa Calculada (Da)	Diferença (Da)	Sequência
T1	1186,6921	1186,6721	0,02	ITQSGVLQLTK
T2	1545,6995	1545,6895	0,01	INQNGMPAWDSTGR
T3	1456,7947	1456,7647	0,03	ALYSKPVHIWDK
T4	1168,5724	1168,5162	0,06	TTGTVASFETR
T5	1373,6615	1373,5144	0,15	FSFSIEQPYTR
T6	1640,8746	1640,7635	0,11	PNHVAHLGLDVNSLR
T7	2522,2885	2522,2385	0,05	TQPFQLDNGQVANVVIKYDASS Kv
T8	1380,7877	1380,7477	0,04	LLHAVLVYPSNR
T9	1333,7493	1333,5643	0,18	AIYTIAEIVDVK
T10	1982,0221	1982,0244	0,00	QVLPEWVDVGLSGATGAQR
T11	2376,0295	2376,0139	0,02	DAAETHDVYSWSFHASLPETN
Q1	1184,6553	1184,5587	0,1	TRPLPADGLVF
Q2	1410,6925	1410,5837	0,11	FMGPTKSKPAQGY
Q3	3041,5723	3041,4993	0,07	SNPWDPPQVPHIGIDVNSIRSIK TQPF
Q4	1559,8307	1559,7545	0,08	QLDNGQVANVVIKY
Q5	2222,2197	2222,2070	0,01	TIAEIVDVKQVLPEWVDVGL
Q6	1747,7761	1747,7261	0,05	SGATGAQRDAAETHDVY

LAA é uma lectina composta por 237 aminoácidos, principalmente Ser, Thr e Asp e não apresenta resíduos de aminoácidos sulfatados como Met ou Cys. EVA é composta por 241 aminoácidos sendo os mais abundantes Ser, Val, Thr e Ala

LAA é uma lectina com processamento pós traducional semelhante a VML onde a cadeia alfa é composta por duas cadeias

A sequência de aminoácidos determinadas para LAA mostra que essa não possui o sítio de N-glicosilação na cadeia beta, como ocorre em VML (CALVETE *et. al,* 1998). Ramos e colaboradores (1996) relatam que algumas lectinas da tribo Sophoreae e Dalbergiae apresentam glicanos N quanto O ligados em suas estruturas. O incremento de massa nas cadeias que não apresentam sítio de N-glicosilação em LAA pode ser decorrente de glicanos ligados a resíduos de Ser ou Thr, porém com a ligação de poucos resíduos de monossacarídeos, tendo em vista que a massa da cadeia $\beta 1$ apresenta apenas 28 Da a mais do que a sequência determinada, sendo que esses podem ser equivalentes a formilação de um resíduo durante a análise da proteína nativa.

Os sítios de N-glicosilação possuem o arranjo Asn(X)Ser/Thr sendo X um aminoácido qualquer que não prolina. LAA apresenta apenas um sítio de N-

glicosilação na posição Asn_{111} bem próxima ao final da cadeia γ. Essa glicosilação pode ser um sinal de clivagem para a Asn-Endopeptidase como ocorre em VML (CALVETTI *et. al,* 1998). EVA possui dois sítios de glicosilação nas posições Asn16 e Asn 113, bastante conservados nas lectinas do gênero (BONNEIL et. al, 2004).

As principais funções da glicosilação de proteína são: modificar a sua solubilidade, carga elétrica, massa, tamanho e viscosidade em solução; controlar, modificar e estabilizar a conformação estrutural da proteína, conferir maior proteção contra proteólise, regular o tráfego e a localização dessas glicoproteinas, determinar o tempo de vida destas em circulação, participar de interações célula-celula etc. (LIS e SHARON, 1993).

A estrutura de glicano N-ligado mais comum em lectinas vegetais é um heptasacarídeo composto por Man3XylFucGlcNAc2 (Figura 22). Esse glicano, com massa de 1171 Da quando ligado a Asn, pode ser encontrado em outras proteínas que não lectinas, como é o caso da Serino-Protease de rizomas de *Zingiber officinale* (CHOI & LAURSEN, 2000).

Nas lectinas de *R. pseudoacacia*, *S. japonica*, *V. macrocarpa*, *E. coralodrendon* e *E.cristagalli* esse glicano também está presente sendo encontrado na estrutura cristalográfica das duas Erythrinas (SHAANAN *et al*., 1991; BONNEIL *et. al,* 2004; TURTON *et. al,* 2004; YAMAGUCHI *et. al,* 1993 E WANTYGHEM *et. al,* 1992)

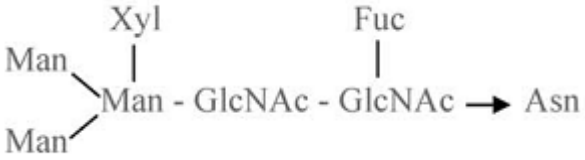

Figura 22 – Estrutura do heptassacarídeo comum em proteínas vegetais. Fonte: CHOI & LAURSEN, 2000

Turton e colaboradores (2004) relatam também que a presença desse oligossacarídeo N-ligado aos resíduos de ECL não influencia que esta assuma uma estrutura dimérica do tipo “aperto de mão” diferente do dímero canônico comum nas lectinas de leguminosas, sendo essa característica intrínseca da sequência primária. O glicano parece influenciar na interação com oligossacarídeos complexos, tendo em vista que, segundo o autor, este estabelece interações com moléculas de água importantes na estabilização do segundo anel da lactose no sítio de ligação de ECL.

4.4 Análise das sequências por bioinformática

A sequência da lectina LAA foi comparada pela ferramenta BLAST contra o banco de dados de proteínas Swissprot. O resultado mostrou que essa sequência apresenta 3 dos 5 aminoácidos presentes em sítios de ligação a metais das lectinas,um sítio de glicosilação, aminoácidos relacionados a sítios de interação entre homodimeros e homotetrameros.

As proteínas com melhor e-value no BLAST foram selecionadas para um alinhamento múltiplo de sequência incluindo LAA. As lectinas de diversas tribos da sub-família Papilionoideae foram selecionadas, conforme pode ser verificado na Figura 23. LAA apresenta um maior grau de similaridade de sequência com a VML, seguida por lectinas de tribos supostamente derivadas de Sophoreae. Esses resultados estão de acordo com a árvore filogenética proposta por Calvete e colaboradores (1998) (Figura 14) em relação às tribos aqui comparadas com LAA.

Tabela 09 – Similaridade de algumas lectinas com LAA.

Lectina | Código SwissProt	Tribo	Espécie	Similaridade (%)
VML|P81371	Dalbergiae	*Vatairea macrocarpa*	88
CLALU|Q39527	Sophoreae	*Cladrastis kentukea*	64
ROBPS|Q41159	Robinieae	*Robinia pseudoacacia*	60
SBA_Prec|P05046	Phaseoleae	*Glycine max*	57
CYTSC|P29257	Genisteae	*Cytisus scoparius*	56
ULEEU|P22973	Genisteae	*Ulex europaeus*	54
ConA_Precursor|P02866	Phaseoleae	*Canavalia ensiformis*	41

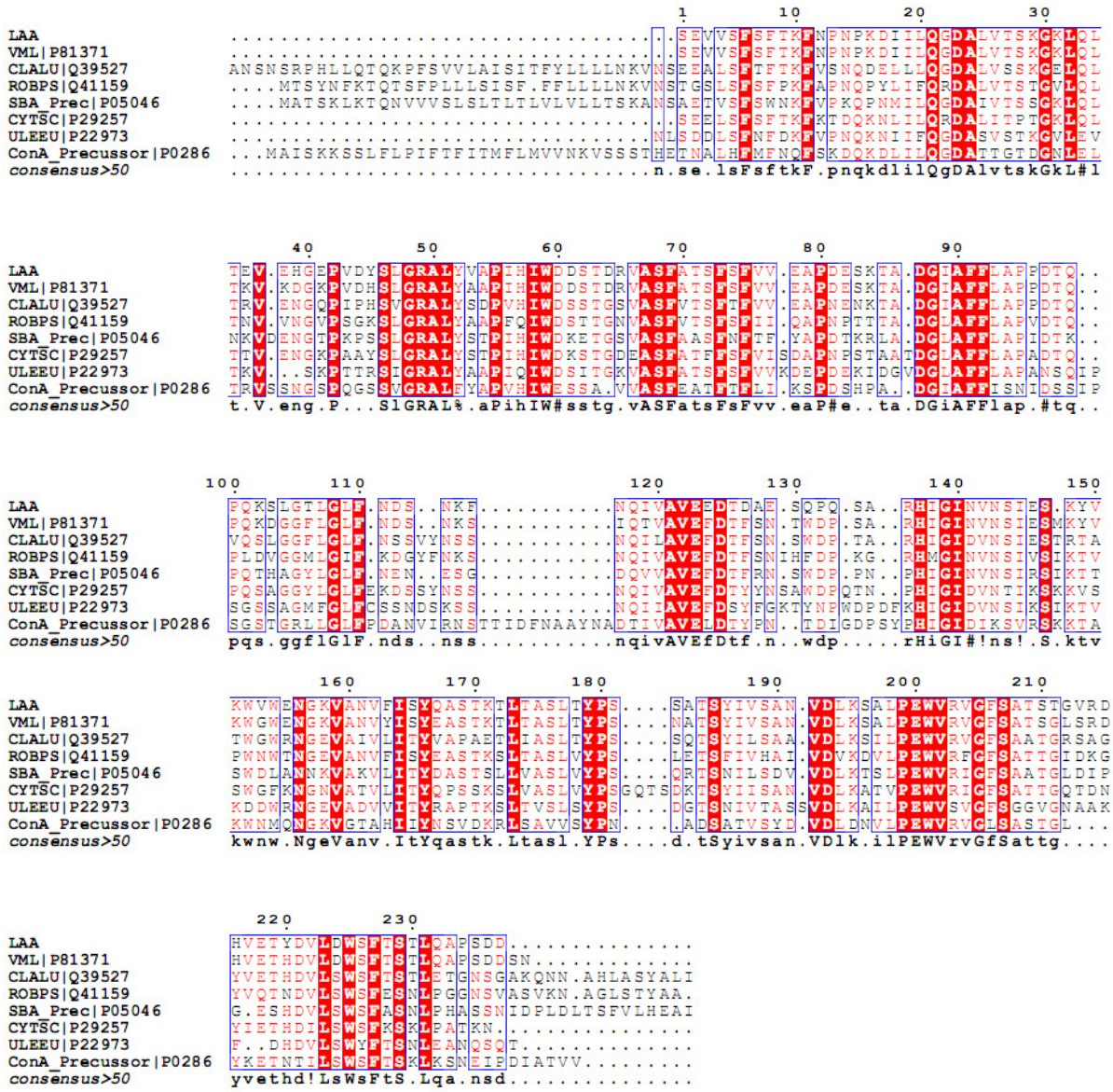

Figura 23 – Alinhamento múltiplo de LAA com outras lectinas. Os resíduos marcados em um quadro correspondem a regiões conservadas em todas as sequências e os resíduos destacados em vermelho correspondem aos resíduos idênticos em todas as sequências. Os códigos utilizados para cada lectina estão descritos na Tabela 9.

Foi possível modelar por homologia a estrutura de LAA no programa SwissModel. O modelo gerado equivaleu ao monômero assumindo o modelo conformacional do monômero das lectinas de leguminosa, descrito no capitulo I dessa dissertação.

O melhor molde encontrado pelo programa foi a isoforma A_4 da lectina da casca do tronco de *Robinia pseudoacacia* (RPbAI) (Código PDB 1FNY). Essa lectina possui características em comum com LAA, como a oligomerização em tetrâmeros em pH 7,5 e a especificidade por galactose e seus derivados. RPbAI possui o sítio de ligação a carboidratos composto por Asp87, Gly105, Asn131, Ile216 e Asp271 (RABIJNS *et. al,* 2001). LAA apresenta os resíduos Asp87 e Gly105 conservados e pode indicar que esses também façam parte do sítio de ligação a carboidratos nessa lectina.

A sequência determinada para EVA também foi submetida a uma busca utilizando a ferramenta BLAST. Foram identificados os sítios de glicosilação da proteína, aminoácidos presentes em sítios de ligação a metais das lectinas, aminoácidos relacionados a sítios de interação entre homodímeros e homotetrameros.

EVA foi alinhada às sequências de ECL, EcorL, VML e LAA (Figura 24) e é possível verificar que essas lectinas pertencentes a diferentes tribos possuem diversas regiões de sequência preservada, justificando assim a similaridade na estrutura terciária.

EVA possui 95% e 94% de similaridade com ECL e EcorL respectivamente. ELC e EcorL possuem 96% de similaridade entre si. O sítio de ligação a carboidratos em ECL e EcorL foi determinado em diversas estruturas cristalográficas e se encontra conservado em EVA. Esse sítio é composto pelos resíduos Leu86, Asp89, Tyr106, Gly107, Phe131, Asn133, Ala218, Gln219 (TURTON *et. al,* 2004). Todos esses resíduos encontram-se conservados na sequência de EVA, indicando que não há alteração nos aminoácidos que compõem esse sítio.

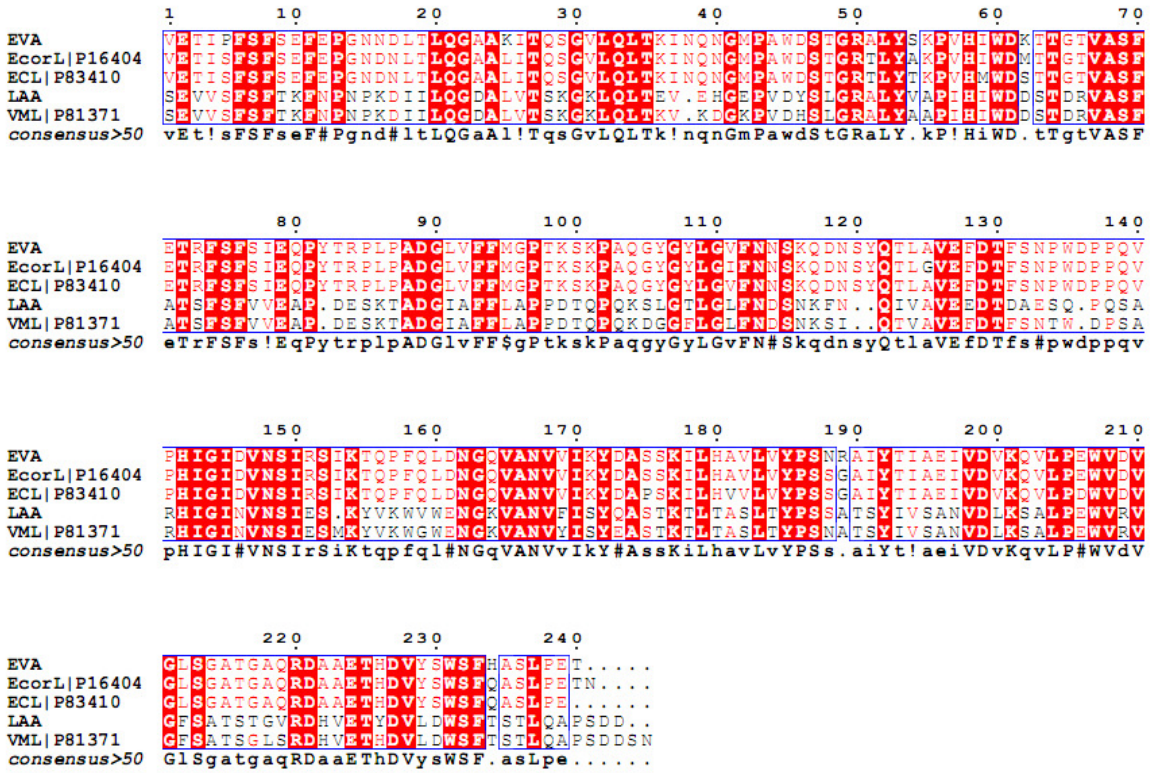

Figura 24 – Alinhamento múltiplo de LAA com outras lectinas. Os resíduos marcados em um quadro correspondem a regiões conservadas em todas as sequências e os resíduos destacados em vermelho correspondem aos resíduos identicos em todas as sequências. EcorL corresponde a sequência da lectina de *E. corallodrendrum* (Código Swissprot: P16404); ECL à lectina de *E. cristagalli* (Código Swissprot: P83410); VML à lectina de *V. macrocarpa* (Código Swissprot: P81371)

5. CONCLUSÃO

As lectinas de LAA e EVA foram caracterizadas por espectrometria de massa. Ambas são glicoproteínas N-ligadas por um oligossacarídeo comumente encontrados em proteínas vegetais. LAA pode apresentar também carboidratos O-ligados. As duas lectinas tiveram a sequência de aminoácidos determinada por espectrometria de massa e por ferramentas de bioinformática foi possível verificar que essas lectinas possuem alta similaridade de sequência com outras de leguminosa, preservando regiões importantes como sítios de glicosilação, contatos de oligomerização e ligação a carboidrato, mantendo assim as principais características das lectinas de leguminosas.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

De posse de informações da estrutura primária, essas lectinas serão submetidas a experimentos de cristalização por difusão de vapor para posterior resolução da estrutura tridimensional a fim de confirmar e corroborar os dados aqui descritos. De fato, a LAA já foi cristalizada e está em processo de otimização das condições de cristalização. EVA está em testes iniciais.

Capitulo III – Análise do conteúdo protéico do cristal da lectina de sementes de *Canavalia grandiflora* através de Espectrometria de Massa

1. INTRODUÇÃO

A lectina de planta mais estudada, denominada Concanavalina A (ConA) e foi isolada de sementes de *Canavalia ensiformis.* As lectinas da mesma sub-tribo que apresentam especificidade semelhante por carboidratos simples, grande homologia e identidade de sequência com ConA são conhecidas como ConA-Like. Essas proteínas apresentam também um processamento pós traducional já discutido no capitulo I, conhecido como Permutação Circular.

As lectinas pertencentes a sub-tribo Diocleinae, mesmo apresentando semelhança na especificidade por carboidratos e de características físico-químicas, ainda demonstram diferenças nas suas atividades biológicas como a capacidade de induzir e prevenir inflamações (anti e pro inflamatória), migração de neutrófilos, liberação de óxido nítrico entre outras (BARRAL-NETTO et al. 1992; BENTO et al. 1993; ANDRADE et al. 1999; CAVADA et al. 2001; GADELHA et al. 2005, ASSREUY et al., 2009).

Ceccato e colaboradores (2001) realizou a caracterização bioquímica parcial da lectina *Canavalia grandiflora* Benth. A lectina foi isolada em Sephadex G-50, eluída com glicose 0,1M, e apresentou perfil eletroforético com lectinas do mesmo gênero, como a ConBr, possui cadeia α e fragmentos β e γ. Apresentou atividade hemaglutinante por eritrócitos de coelhos nativos e sangue humano tipo A tratado com tripsina. A atividade hemaglutinante em eritrócitos de coelho foi inibida por manose, α-D-metil-manopiranosídeo, 1-o-metil-α-D-glicopiranosídeo e glicoproteínas: mucina suína e bovina e lactotransferina bovina. A composição de aminoácidos revelou alto teor de ácido aspártico, serina e leucina, e não se detectou metionina e cisteína. E a seqüencia parcial de aminoácidos e nucleotídeos mostrou alta homologia estrutural com as outras seqüencias de aminoácidos de Diocleinae.

Algumas aplicações biológicas foram atribuídas à lectina desta espécie, como seu efeito modulador de eventos chaves da inflamação. A lectina de Canavalia grandiflora (ConGr), possui efeitos antiinflamatório e analgésicos, mediados por IL-1, TNF-α, provoca redução do rolamento e adesão de leucócitos, e, conseqüentemente, redução do tráfico de neutrófilos. Os resultados tornam a ConGr importante alvo para novas terapias antiinflamatórias e analgésicas (NUNES *et. al,* 2009).

Muitos autores já publicaram informações de cristalização e de espectrometria de massa de diversas ConA-like nativas e complexadas com mono ou oligossacarídeos e com outros ligantes não glicídicos como fitohormonios e seus Precursores (YANG *et. al,* 1974; ROBERTS & GOLDSTEIN, 1983; BHANU *et. al*, 1997; DELATORRE *et. al,* 2007; BEZERRA *et. al,* 2007) porém até agora nenhum relatou o conteúdo protéico do cristal em relação a presença de cadeias não re-ligadas covalentemente após a permutação circular.

2. OBJETIVOS

2.1 Hipótese

O cristal da proteína ConGF e de outras ConA-like são formados tanto pela presença da cadeia madura quanto dos fragmentos gerados pela permutação circular.

2.2 Objetivo Geral

Determinar por espectrometria de massa o conteúdo protéico de um cristal da lectina isolada de sementes de *Canavalia grandiflora* e seqüenciar parcialmente esta lectina proveniente do cristal.

2.3 Objetivos Específicos

- ✓ Elaborar protocolo para lavagem dos cristais sem desfazer a estrutura cristalográfica;
- ✓ Analisar o conteúdo protéico dos cristais por espectrometria de massa;
- ✓ Relacionar a sequência primária parcial com os dados biológicos obtidos para essa lectina.

3. METODOLOGIA

3.1 Purificação e Cristalização da lectina

As sementes de *C. grandiflora* tiveram seu tegumento separado dos cotilédones e eixo embrionário que foram triturados em um moinho de café até a produção de uma farinha fina. Esta farinha foi submetida a uma extração protéica em uma solução de NaCl 0,15M na proporção de 1:10 (p:v) durante 4h a temperatura ambiente. A extração foi submetida a centrifugação a 9000 xg durante 30 minutos a 4ºC e o sobrenadante foi aplicado em uma coluna Sephadex G-50 (Pharmacia) previamente equilibrada com NaCl 0,15M. As proteínas que não interagiram com a matriz foram lavadas com a mesma solução de equilíbrio e o pico retido equivalente a lectina purificada foi eluído com uma solução de glicose a 0,1M. As frações coletadas foram monitoradas por espectrofotometria a 280 nm e aquelas referentes ao pico foram reunidas, exaustivamente dialisada contra água destilada e liofilizadas. Foram realizados testes de atividade hemaglutinante e eletroforese para confirmar a pureza da lectina utilizando metodologia já descrita no capítulo 1 desta dissertação. A proteína foi submetida a cristalização por difusão de vapor na condição 34 do Crystal Screen II (Hampton) conforme descrito por Barroso-Neto (2010).

3.2 Preparação dos cristais para análise por espectrometria de massa

A fim de eliminar interferências de sais presentes na análise por ESI-MS, os cristais foram coletados com auxílio de uma alça, lavados 3x na condição de cristalização para eliminar resíduos de proteínas precipitadas que poderiam estar presentes na superfície do cristal ou nos canais de solvente destes e em seguida foram lavados de 3 a 6 vezes em solução de acetato de amônio a 0,1; 0,5 e 1M a fim de eliminar os sais contidos na solução de cristalização (POTIER *et. al,* 2000). O sal acetato de amônio foi selecionado para substituir os sais da condição de cristalização a fim de manter a osmolaridade do cristal por não apresentar incompatibilidade com a técnica de ionização utilizada nos experimentos de espectrometria de massa. A quantidade de proteína de cada cristal foi determinada

pela equação 1, onde m é a quantidade de proteína presente no cristal em gramas, v o volume do cristal em Å3, V_M o volume de Mattews e N_A a constante de avogrado (POTIER *et. al,* 2000).

$$m = \frac{v}{V_m} x\ N_A \qquad (1)$$

Após a lavagem, os cristais íntegros foram dissolvidos em uma solução de 50% de acetonitrila contendo 0,2% de ácido fórmico para determinação do conteúdo protéico por espectrometria de massa (ESI-MS) ou em tampão de amostra de SDS-PAGE para serem submetidos a digestão enzimática e sequenciamento por MS/MS.

3.3 Digestão das proteínas e sequenciamento dos peptídeos

Alguns cristais foram separados e dissolvidos em tampão de amostra de SDS-PAGE, submetidos a eletroforese, preparados para digestão, sequenciados e analisados conforme descrito no tópico 3.X do capítulo I dessa dissertação. Além das digestões por Tripsina e Quimiotripsina, alguns cristais foram submetidos diretamente a digestão em ácido fórmico a 2% durante 2h a 108 ºC sem passar por SDS-PAGE.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os procedimentos de purificação da lectina foram realizados conforme metodologia já estabelecida por Cecatto (2001). Os cristais cresceram pelo método de difusão de vapor em uma semana e então foram submetidos ao experimento de lavagem. Como mostra Figura 25, as concentrações testadas neste experimento mantiveram a estrutura cristalográfica, sendo possível utilizá-la em qualquer concentração para efetuar a lavagem desses cristais, entretanto só foi possível adquirir espectros de massa com cristais lavados 6 vezes. Potier e colaboradores (2000) demonstraram que cristais de lisozima crescidos em 2M de NaCl começavam a rachar quando lavados em solução de acetato de amônio menor do que 1M.

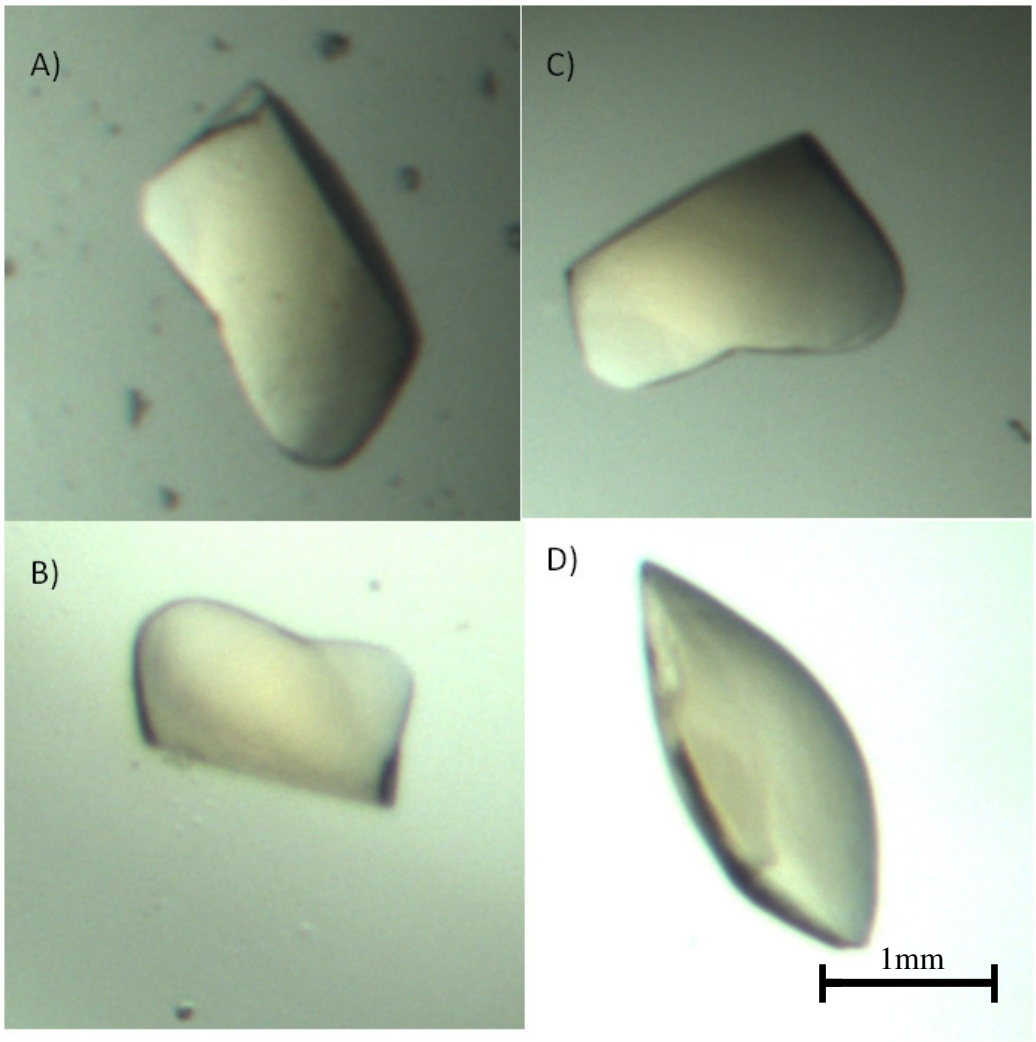

Figura 25 – Lavagem dos cristais. A) Cristal após 6 lavagens com 2M de Acetato de Amônio, B) Cristal após 6 lavagens com 1M de Acetato de Amônio, C) Cristal após 6 lavagens com 0,5 M de Acetato de Amônio, D) Cristal após 6 lavagens com 0,1M de Acetato de Amônio. A escala de 1mm se aplica às 4 imagens.

Para o calculo da quantidade de proteína do cristal, foi utilizado os dados de difração de raios-X obtidos por Barroso-Neto (2010) que determinou o valor do coeficiente de Mattews em 2,18 Å3 Da^{-1} sendo então presente em cada cristal 2,5 μg de proteína ou 100 ρMol de proteína, quantidade suficiente para prosseguir com as análises por espectrometria de massa.

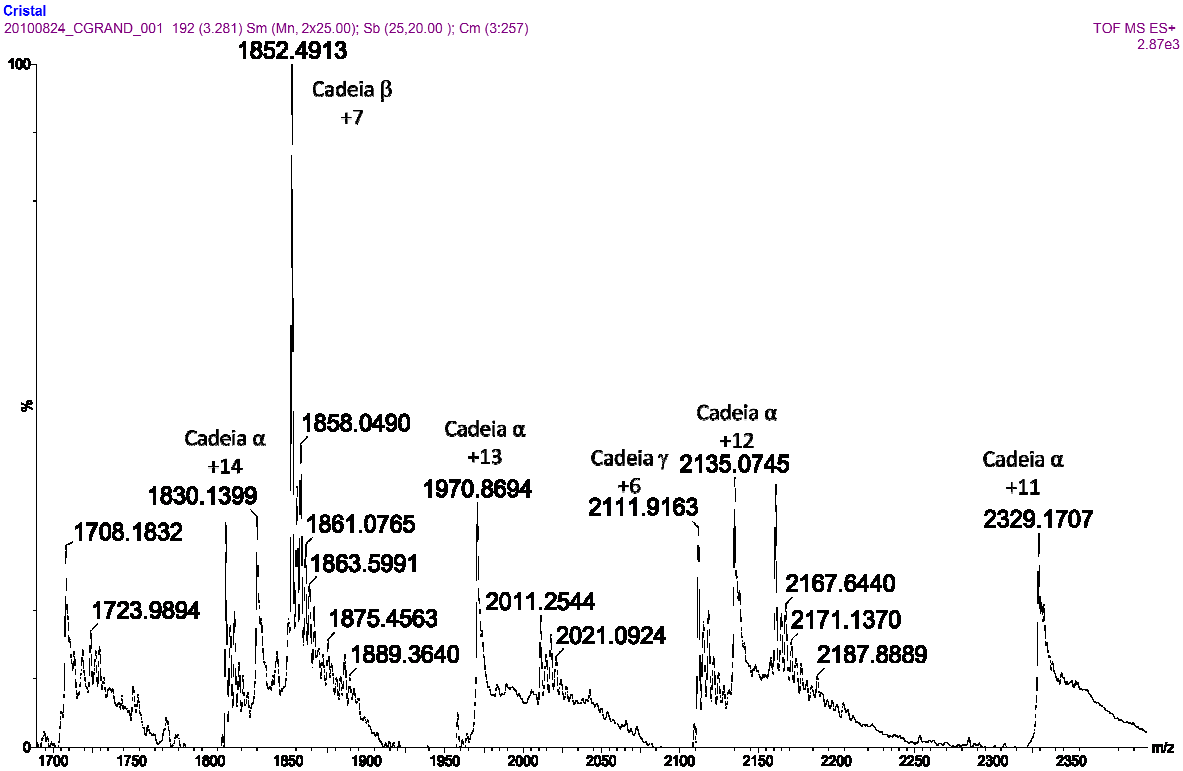

Figura 26 – Espectro multicarregado de cristais de ConGF. As cadeias e o estado de carga estão identificadas no espectro. As Cadeia alfa, beta e gama tiveram sua massa molecular calculada em 25.612 ± 2 Da; 12.962 ± 2 Da e 12.667 ± 2 Da respectivamente.

A fim de minimizar possíveis interferências da alta concentração de sal, utilizamos a solução de acetato de amônio a 0,1 M para lavagem dos cristais. Após as 6 lavagens, os cristais foram dissolvidos em acetonitrila 50% com 0,1% de ácido fórmico numa solução a 10 ρMol/μL e submetidos a ionização por eletrospray e análise por espectrometria de massa. O espectro multicarregado pode ser verificado na Figura 26 e é composto pela cadeia principal de aminoácidos (alfa) e pelas subunidades beta e gama. A cadeia alfa apresentando 25.612 ± 2 Da e os fragmentos beta e gama com 12.962 ± 2 Da e 12.667 ± 2 Da respectivamente, corroborando com os dados de massa intacta a partir da lectina liofilizada, conforme descrito por Barroso-Neto (2010).

Sendo o cristal composto tanto pela cadeia madura quanto pelas subunidades unidas não covalentemente, podemos afirmar que a conformação tridimensional das cadeias unidas não covalentemente é similar o suficiente para a cristalização de ambas as formas aconteçam no mesmo cristal.

A partir dos cristais foi possível determinar a sequência parcial de ConGF (65%) (Figura 27 e Tabela 10). Essa lectina apresenta 13 resíduos de aminoácidos diferentes da lectina ConA, porém apenas uma dessas modificações 58(Gly/Ala) é uma modificação inédita dentro das ConA-Like. Todas as outras modificações já foram encontradas em alguma lectina do gênero Canavalia, Cratylia ou Dioclea.

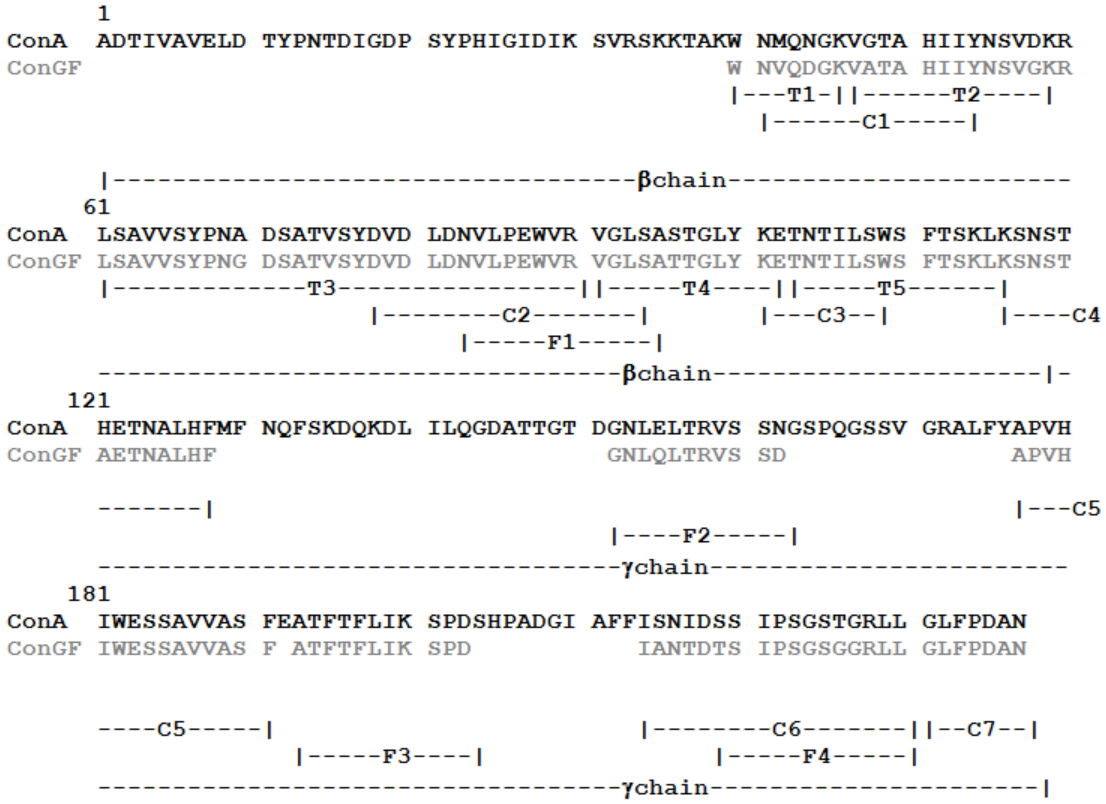

Figura 27 –Sequencia parcial de aminoácidos de ConGF oriunda dos cristais. A sequência em preto corresponde a ConA e em cinza aos peptídeos de ConGF. Peptídeos iniciados em T são oriundos de clivagem por Tripsina, em C por clivagem em Quimiotripsina e em F por clivagem por Ácido Fórmico.

Tabela 10 - Massas calculadas (Teórica, experimental e diferença entre elas) para os peptídeos sequenciados da lectina de sementes de *C. grandiflora*.

Peptídeo	Massa Teórica (Da)	Massa Experimental (Da)	Diferença (Da)	Sequencia
T1	845,4031	845,4080	0,00	WNVQDGK
T2	1371,7510	1371,7266	0,02	VATAHLLYNSVGK
T3	3293,6091	3293,6045	0,00	LSAVVSYPNADSATVSYDVDLD NVLPEWVR
T4	1108,6128	1108,5844	0,02	VGLSATTGLYK
T5	1512,7460	1512,7460	0,00	ETNTLLSWSFTSK
C1	1527,8046	1527,7366	0,06	NVQDGKVATAHIIY
C2	1837,9571	1837,9664	0,01	DVDLDNVLPEWVR VGL
C3	1090,5659	1090,4891	0,07	KETNTILSW
C4	1290,5840	1290,5552	0,03	SNSTAETNALHF
C5	1598,8092	1598,7844	0,03	APVHIWESSAVVASF
C6	1657,8635	1657,8844	-0,02	IANTDTSIPSGSGGRLL
C7	732,3442	732,3412	0,00	GLFPDAN
F1	1367,7561	1367,7072	0,05	NVLPEWVR VGLS
F2	1188,6099	1188,6044	0,00	GNLQLTRVSSD
F3	1238,6547	1238,6244	0,03	ATFTFLIK SPD
F4	1143,6248	1143,5040	0,12	TS IPSGSGGRLL

É possível verificar na Figura 28 A e B que ConGF ocupa uma posição intermediária entre as lectinas do gênero Canavalia e Cratylia e está mais próxima das lectinas Dvir, Dgui e DRL entre as lectinas do gênero Dioclea.

Os aminoácidos que compõem o sítio de ligação a carboidratos nas ConA like são bem conservados e estabelecidos. São eles Tyr12, Asn14, Leu99 Tyr100 Asp208 Arg228 (LORIS *et. al,* 1998; CAVADA *et. al,* 2001). Foi possível determinar os resíduos Leu99, Tyr100, Arg228 nessa sequência parcial de ConGF.

Além desses resíduos, Moothoo e colaboradores (1999) e Bezerra e Colaboradores (2007) relatam a importância dos resíduos Gly98, Ser168 e Tyr226, que interagem com o segundo anel do dimanosídeo Man α1–2 Man α-OMe. Esses autores sugerem que esses sítios expandidos de ligação a oligossacarídeos são importantes na determinação da especificidade e na intensidade da ligação dessas lectinas a diversos oligossacarídeos, modulando assim a sua atividade biológica.

ConA possui uma afinidade 30 vezes maior do que DGL a carboidratos complexos biantenários (GUPTHA *et. al,* 1996) sendo que em DGL existe uma Asn168 e Gly226 na sequência primária. No presente trabalho relatamos apenas uma sequência parcial oriunda das proteínas cristalizadas, onde não foi possível

determinar a presença do resíduo 168, importante no contexto da ligação ao dimanosídeo que compõe o complexo biantenário.

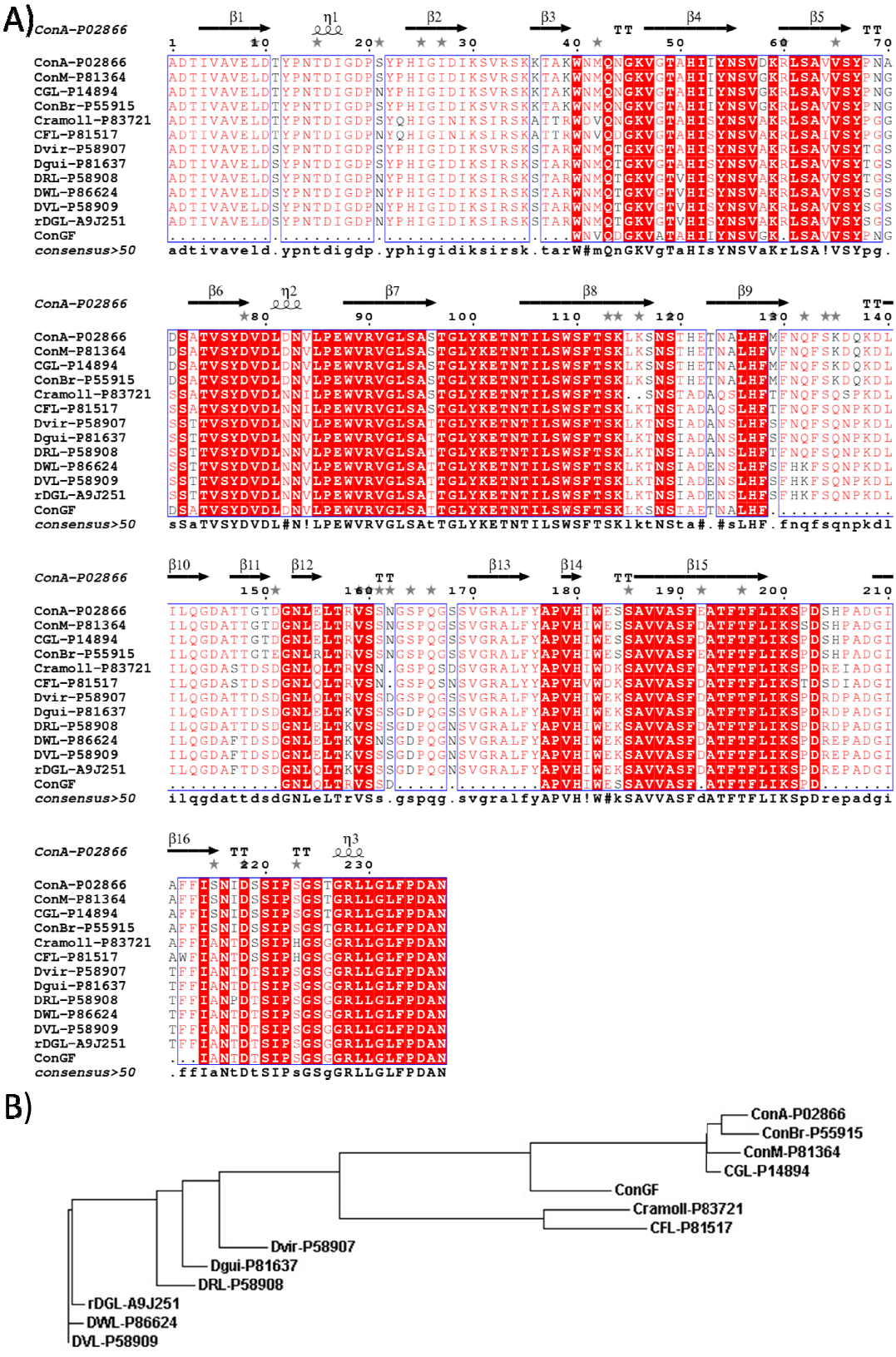

Figura 28 - A) Alinhamento da sequência parcial de ConGF com as lectinas de Canavalia, Cratylias e Diocleas. Os resíduos marcados em um quadro correspondem a regiões conservadas em todas as

sequências e os resíduos destacados em vermelho correspondem aos resíduos identicos em todas as sequências B) Cladrograma baseada no alinhamento dessas sequências.

5. CONCLUSÕES

As lectinas ConA-like, como ConGF, sofrem um processamento pós traducional complexo que é a permutação circular, resultando em cadeias não religadas covalentemente, porém que possuem a capacidade de interagir entre si e formar a estrutura funcionalmente ativa. Esse trabalho mostra que essa cadeia alfa ligada não covalentemente cristaliza juntamente com a cadeia alfa madura, sendo possível dizer que não há diferenças estruturais entre as duas.

Além disso, a sequência parcial da lectina cristalizada mostra que ConGF é composta por uma interessante mistura entre as ConA-Like, possuindo características de sequência dos três gêneros que compõem a sub-tribo Diocleinae. Essa característica pode interferir diretamente em suas atividades biológicas. A sequência completa dessa lectina e a resolução da sua estrutura tridimensional será de grande interesse no estudo desse grupo de proteínas.

REFERÊNCIAS

1. ARAGON-ORTIZ, F., NANNE-ECHANDI, C.I., FINK, E. (1994). Properties and N-terminal amino acid sequences of three erythrina lectins from Costa Rica (leguminosae). Revista de Biologia Tropical, 42, 467-471.

2. ARNOLD K., BORDOLI L., KOPP J., and SCHWEDE T. (2006). The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. Bioinformatics, 22,195-201.

3. ASSREUY, A. M. S.; SHIBUYA, M. D.; MARTINS, G. J.; de SOUZA, M. L. P;. CAVADA, B. S.; MOREIRA, R. A.; OLIVEIRA, J. T. A.; RIBEIRO, R. A.; FLORES, C. A.. (1997) Anti-inflammatory effect of glucose /mannose binding lectins isolated from Brazilian beans. Mediators of Inflammation, 6, 201-210

4. BARONDES, S.H. (1988). Biofunctional properties of lectins: lectins redefined. Trends Biochem. Sci., **13**: 480-482.

5. BECKEY, H.D. (1963) Z. Anal. Chem., 197, 80.

6. BENESCH, J. L.; and ROBINSON; C. V. (2006). Mass spectrometry of macromolecular assemblies: preservation and dissociation. Curr. Opin. Struct. Biol., 16, 245–251.

7. BENESCH, J. L.; AQUILINA, J. A.; RUOTOLO, B. T.; SOBOTT F.; and ROBINSON, C. V. (2006). Tandem Mass Spectrometry Reveals the Quaternary Organization of Macromolecular Assemblies. Chem. Biol., 13, 597–605.

8. BHATTACHARYYA, L.; KUMAR DAS ,P.; SEN, A. (1981) Purification and properties of D-galactose-binding lectins from some erythrina species: Comparison of properties of lectins from *E. indica, E. arborescens, E. suberosa,* and *E. lithosperma*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 211(1), 459-470

9. BLEAKNEY, W. (1929) Phys. Rev., 34, 157.

10. BONNEIL, E.; YOUNG, N.M.; LIS, H.; SHARON, N.; and THIBAULT, P. (2004) Probing genetic variation and glycoform distribution in lectins of the Erythrina genus by mass spectrometry. Archives of Biochemistry and Biophysics 426 241–249

11. BOUCKAERT, J., DEWALLEF, Y., POORTMANS, F., WYNS, L. & LORIS, R. (2000). The structural features of concanavalin A governing non-proline peptide isomerization. Journal of Biological Chemistry, 275: 19778–87.

12. BUDZIKIEWICZ H, GRIGSBY RD (2006). "Mass spectrometry and isotopes: a century of research and discussion". Mass spectrometry reviews 25 (1): 146–57

13. CALVETE, J. J., THOLE, H. H., RAIDA, M.,URBANKE, C., ROMERO A., GRANGEIRO, T. B., RAMOS, M. V., ALMEIDA DA ROCHA, I. M, GUIMARÃES, F.N., CAVADA, B. S. (1999) Molecular characterization and crystallization of Diocleinae lectins. Biochimica et Biophysica Acta, 1430, 367-375.

14. CALVETE, J.J., SANTOS, C.F., MANN, K., GRANGEIRO, T.B., NIMTZ, M., URBANKE, C. & CAVADA, B.S. (1998). Amino acid sequence, glycan structure, and proteolytic processing of the lectin of *Vatairea macrocarpa* seeds. FEBS Lett., 425: 286-292.

15. CANTU, MARCELO DELMAR; CARRILHO, EMANUEL; WULFF, NELSON ARNO AND PALMA, MARIO SÉRGIO. Seqüenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. Quím. Nova [online]. 2008, vol.31, n.3, pp. 669-675. ISSN 0100-4042.

16. CARRINGTON, D.M., AUFFRET, A. & HANKE, D.E. (1985). Polypeptide ligation occurs during post-translational modification of concanavalin A. Nature, 313, 64-67.

17. CATALINA,M. I.; VAN DEN HEUVEL, R. H.; van DUIJN, E.; and HECK, A. J.(., 2005). Decharging of Globular Proteins and Protein Complexes in Electrospray. Chem. Eur. J, 11, 960–968.

18. CAVADA, B.S., BARBOSA, T., ARRUDA, S., GRANGEIRO, T.B. & BARRAL NETTO, M. (2001). Revisiting proteus: do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins. Curr. Protein Pept. Sci., 2: 123-135.

19. CAVADA, B.S., MARINHO, E.S., SOUZA, E.P., BENEVIDES, R.G., DELATORRE, P., SOUZA, L.A., NASCIMENTO, K.S., SAMPAIO, A.H., MORENO, F.B., RUSTIGUEL, J.K., CANDURI, F., DE AZEVEDO JR., W.F. & DEBRAY, H. (2006). Purification, partial characterization and preliminary X-ray diffraction analysis of a mannose-specific lectin from *Cymbosema roseum* seeds. Acta Crystallographica Section F, 62: 235-7.

20. CHAMBERY, A., DI MARO, A., PARENTE, A. (2008). Primary structure and glycan moiety characterization of PD-Ss, type 1 ribosome-inactivating proteins from Phytolacca dioica L. seeds, by precursor ion discovery on a Q-TOF mass spectrometer. Phytochemistry 69 1973–1982.

21. CHAMBERY, A.; MARO, A. D.; PARENTE, A. (2008). Primary structure and glycan moiety characterization of PD-Ss, type 1 ribosome-inactivating proteins from Phytolacca dioica L. seeds, by precursor ion discovery on a Q-TOF mass spectrometer. Phytochemistry 69 1973–1982.

22. CHEN, X.J., CARROLL, J.A. and BEAVIS, R.C. (1998) Near-UV-induced matrix-assisted laser desorption/ionization as a function of wavelength. J. Am. Soc. Mass Spectrom., 9 (9), 885–91.

23. DELATORRE, P., ROCHA, B. A. M., GADELHA, C. A. A., SANTI-GADELHA, T., CAJAZEIRAS, J. B., SOUZA, E. P., NASCIMENTO, K. S., FREIRE, V. N., ALEXANDRE H. SAMPAIO, S. H., AZEVEDO, W. F. & CAVADA, B.S. (2006) Crystal structure of a lectin from *Canavalia maritima* (ConM) in complex with trehalose and maltose reveals relevant mutation in ConA-like lectins.,154, 280-6.

24. DELATORRE, P., ROCHA, B. A. M., SOUZA, E. P., OLIVEIRA, T.M., BEZERRA, G.A., MORENO, F.B., FREITAS, B.T., SANTI-GADELHA, T., SAMPAIO, A. H., AZEVEDO JR., W. F. & CAVADA, B. S. (2007). Structure of a lectin from Canavalia gladiata seeds: new structural insights for old molecules BMC Struct. Biol., 7: 52.

25. DREISEWERD, K. (2003) The Desorption Process in MALDI. Chem. Rev., 103, 395.

26. E. van DUIJN, P. J. BAKKES, R. M. HEEREN, R. H. van den HEUVEL, H. van HEERIKHUIZEN, S. M. van der VIES and A. J. HECK. (2005) Monitoring macromolecular complexes involved in the chaperonin-assisted protein folding cycle by mass spectrometry Nat. Methods, 2, 371–376.

27. EDMAN, P. Acta Chem. Scand. 1950, 4, 283.

28. FERGUSON, R.E., MCKULLOH, K.E. and ROSENSTOCK H.M. (1965) J. Chem. Phys., 42, 100.

29. FERRIGE, A.G., SEDDON, M.J., GREEN, B.N., JARVIS, S.A., SKILLING, J. (1992). Disentangling electrospray spectra with maximum entropy. Rapid Commun. Mass Spectrom. **6**: 707–711.

30. GASTEIGER E., HOOGLAND C., GATTIKER A., DUVAUD S., WILKINS M.R., APPEL R.D., BAIROCH A. (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server; (In) John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press. 571-607

31. GERARDO, P. (1984) Isolation and characterization of a lectin from the seeds of *Erythrina Edulis*. Phytochemistry, 23 (6) 1229-1232

32. GOLDSTEIN, I. J., HUGHES, R.C., MONSIGNY, M., OSAWA, T., & SHARON, N. (1980). What should be called a lectin?. Nature, 285:66.

33. GOUET, P., COURCELLE, E., STUART, D.I. and METOZ, F. (1999). ESPript: multiple sequence alignments in PostScript. Bioinformatics. 15 305-8

34. HAMELRYCK, T.W., LORIS, R., BOUCKAERT, J., DAO-THI, M.H., STRECKER, G., IMBERTY, A., FERNANDEZ, E., WYNS, L. & ETZLER, M.E. (1999). Carbohydrate binding, quaternary structure and a novel hydrophobic binding site in two legume lectin oligomers from *Dolichos biflorus*. J Mol Biol., 286: 1161-1177.

35. HOFFMAN, E. H and STROOBANT, V. 2007. Mass Spectrometry. Principles and applications. Wiley. 502pp.

36. KARAS M, HILLENKAMP F (1988). "Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons". Anal. Chem. 60 (20): 2299–301.

37. KIENITZ, H. (1968) Massenspektrometrie, Verlag Chemie, Weinheim.

38. KNOCHENMUSS, R. and ZENOBI, R. (2003) MALDI Ionization: The Role of In-Plume Processes. Chem. Rev., 103, 44

39. KORTT, A. A. (1986). Characterization of a lectin from the seeds of Erythrina vespertilio. Phytochemistry, 25(10) 2371-2374

40. KRIHNA, R. and WOLD, F. (1997) Protein Structure – A Practical Approach, 2nd edn (ed.T.E. Creighton), Oxford University Press, New York, pp. 391–402.

41. KYUNG H. CHOI and RICHARD A. LAURSEN. (2000). Amino-acid sequence and glycan structures of cysteine proteases with proline specificity from ginger rhizome Zingiber officinale. Eur. J. Biochem. 267, 1516-1526

42. LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature, 227: 680-685.

43. LIS, H.; JOUBERT, F. J.; SHARON, N. (1985) Isolation and properties of N-acetyllactosamine-specific lectins from nine erythrina species. Phytochemistry, 24(12), Pages 2803-2809

44. LORIS, R., HAMELRYCK, T., BOUCKAERT, J., & WYNS, L. (1998). Legume lectin structure. Biochim. Biophys. Acta, 1383: 9-36.

45. LORIS, R., WALLE, I.V., GREVE, H.D., BEECKMANS, S., DEBOECK, F., WYNS, L., BOUCKAERT, J. (2004) Structural Basis of Oligomannose Recognize by the Pterocarpus angolensis Seed Lectin. 335(5):1227-1240.

46. MANN, M.; SHAO-EN O., GRØNBORG, M.; STEEN, H.; JENSEN, O. N.; and PANDEY, A. (2002). Analysis of protein phosphorylation using mass spectrometry: deciphering the phosphoproteome. TRENDS in Biotechnology .20(6) 261-268

47. MELO, V.M.M.; VASCONCELOS, I. M.; GOMES, V. M.; CUNHA, M.; SOARES, A. A.; OLIVEIRA, J.T.A. (2005) A cotyledonary agglutinin from Luetzelburgia auriculata inhibits the fungal growth of Colletotrichum lindemuthianum, Fusarium solani and Aspergillus niger and impairs glucose-stimulated acidification of the incubation medium by Saccharomyces cerevisiae cells. Plant Science, 169 (3) 629-639

48. MIN, W., JONES, D. H. (1994) In vitro splicing of concanavalin A is catalyzed by asparaginyl endopeptidase; Nat. Struct. Biol 1: 502–504

49. MORAES, S.M., CAVADA, B.S., MOREIRA, R.A., ROQUE-BARREIRA, M.C., SANTOS-DE-OLIVEIRA, R., PINTO, V.P. & OLIVEIRA, J.T. (1996). Purification, physicochemical characterization and biological properties of a lectin from *Erythrina velutina* forma aurantiaca seeds. Braz. J. Med. Biol. Res., 29: 977-85.

50. MOREIRA, R.A., AINOUZ, I.L., OLIVEIRA, J.T.A., CAVADA, B.S. (1991) Plant Lectins, Chemical and Biological Aspects; Mem. Ins. Oswaldo Cruz. 86: 211-218.

51. MORRIS, H.R. (1980) Soft Ionization Biological Mass Spectrometry, Heyden, London.

52. MUNSON, M.S.B. and FIELD, F.H. (1966) J. Am. Chem. Soc., 88, 2621.

53. NAGANO, C.S., CALVETE, J.J., BARETTINO, D., PÉREZ, A., CAVADA, B.S. AND SANZ, L. (2008) Insights into the structural basis of the pH-dependence dimer-tetramer equilibrium through crystallographic analysis of recombinant Diocleinae lectins. Biochem. J. 409: 417-28.

54. NANNE-ECHANDI, C. I. & ARAGÓN-ORTIZ, F. (1991). Aislamiento, purificación y caracterización de una lectina de la semilla del poro, Erythrina costaricensis. Rev. Biol. Trop. 39 15-21

55. NIALL HD (1973). Automated Edman degradation: the protein sequenator.Methods Enzymol.27:942-1010.

56. OLIVEIRA, J.T.A., MELO, V.M.M., CAMARA, M.F.L., VASCONCELOS, I.M., BELTRAMINI, L.M., MACHADO, O.L.T., GOMES, V.M., PEREIRA, S.P., FERNANDES, C.F., NUNES, E.P., CAPISTRANO, G.G.G., MONTEIRO-MOREIRA, A.C.O. (2002) Purification and physicochemical characterization of a cotyledonary lectin from Luetzelburgia auriculada. Phytochemistry 61: 301-310.

57. ORTEGA, M.; SANCHEZ, C.; CHACON, E.; RENDON, J. L.; ESTRADA, R.; MASSO, F.; MONTAÑO, L. F.; ZENTENO, E. (1990) Purification and characterization of a lectin from Erythrina americana by affinity chromatography. Plant Science, 72(1), 133-140

58. PAUL, W. and STEINWEDEL, H.S. (1953) Z. Naturforsch., 8a, 448.

59. PEÑA, C.; VILLARRAGA,F.; PÉREZ,G.(1998). A lectin from the seeds of Erythrina rubrinervia. Phytochemistry, 27 (4), 1045-1048

60. PEUMANS, W.J., H.C., WINTER, V., BEMER, F., VAN LEUVEN, I.J., GOLDSTEIN, P., TRUFFA-BACHI, E.J.M., VAN DAMME (1997). Isolation of a novel plant lectin with and unusual specificity from Calystegia sepium. Glycoconj. J., **14**: 259-265.

61. PEUMANS, W.J., VAN DAMME, E.J., BARRE, A. & ROUGÉ, P. (2001). Classification of plant lectins in families of structurally and evolutionary related proteins. Adv. Exp. Med. Biol., 491:27-54.

62. PUSZTAI, A. Plant lectins. Cambridge University Press, Cambridge, 1991.

63. RABIJNS, A.; VERBOVEN, C.; ROUGE, P.; BARRE, A.; VAN DAMME, E.J.M.; PEUMANS, W.J.; De RANTER C.J.. (2001) Structure ofa Legume Lectin From the Bark of Robinia pseudoacacia and Its Complex With N-

Acetylgalactosamine. PROTEINS: Structure, Function, and Genetics 44:470–478

64. RATANAPO, S., NGAMJUNYAPORN, W., CHULAVATNATOL, M. (2001) Interaction of a mulberry leaf lectin with a phytopathogenic bacterium, P.syringae pv mori. Plant Science, 160:739-744.

65. RUOTOLO, B. T.; GILES, K.; CAMPUZANO, I.; SANDERCOCK, A. M;. BATEMAN, R. H.; and ROBINSON, C. V. (2005) The influence and utility of varying field strength for the separation of tryptic peptides by ion mobility-mass spectrometry. Science, 310, 1658–1661.

66. RUOTOLO, B. T.; HYUNG, S. J.; ROBINSON, P. M.; GILES, K.; BATEMAN, R. H.; and ROBINSON, C. V. (2007) Ion Mobility–Mass Spectrometry Reveals Long-Lived, Unfolded Intermediates in the Dissociation of Protein Complexes Angew. Chem., Int. Ed., 46, 8001–8004.

67. SAMPIETRO, A.R., ISLÃ, M.I., QUIROGA, E.N., VATTUONE, M.A. (2001). An N-acetylglucosamine oligomer binding agglutinin (lectin) from ripe Cyphomandra betacea Sendt. Fruits. Plant Science, **160**: 659-667.

68. SHARMA, V. & SUROLIA, A. (1997). Analyses of carbohydrate recognition by legume lectins: size of the combining site loops and their primary specificity. Journal of Molecular Biology, 267: 433–445.

69. SHARON, N. & LIS, H. (1990). Legume lectins - a large family of homologous proteins. FASEB Journal, 4: 3198-3208.

70. SHARON, N., LIS, H. (2004) History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules; Glycobiology 14(11): 53R-62.

71. SRINIVAS, V. R., REDDY, G.B., AHMAD, N., SWAMINATHAN, C.P., MITRA. N. & SUROLIA, A. (2001) Legume lectin family, the “natural mutants of the quaternary state”, provide insights into the relationship between protein stability and oligomerization. Biochimica et Biophysica Acta, 1527: 102–111.

72. STEPHENS, W. (1946) Phys. Rev., 69, 691.

73. STILLMARK, H. Uber Ricin, ein giftiges Ferment aus den Samen von Ricinus comm. L.und einigen anderen Euphorbiaceen, Tese de Doutorado, Universidade de Dorpat, Estônia, 1888.

74. STOJANOVIC , D.; FERNANDEZ, M.; CASALE, I.; TRUJILLO, D.; CASTES, M.. (1994). Characterization and mitogenicity of a lectin from Erythrina velutina seeds. Phytochemistry, 37, (4), 1069-1074

75. STUMP, M.J., FLEMING, R.C., GONG, W.-H. et al. (2002). Matrix-assisted laser desorption mass spectrometry. Appl. Spectrosc. Rev., 37, 275.

76. SUN, J.; KITOVA, E. N.; and KLASSEN, J. S. (2007) Method for Stabilizing Protein−Ligand Complexes in Nanoelectrospray Ionization Mass Spectrometry. Anal. Chem., 79, 416–425.

77. SUSEELAN, K.N., MITRA, R., PANDEY, R., SAINIS, K.B., AND KRISHNA, T.G. (2002). Purification and characterization of a lectin from wild sunflower (Helianthus tuberosus L.) tubers. Archives of Biochemistry and Biophysics, **407**: 241-247.

78. SYNOWSKY,S. A.; VAN DEN HEUVEL, R. H.; MOHAMMED, S.; PIJNAPPEL, P. W.; and HECK, A. J.; Mol. Cell. Proteomics, 2006, 5, 1581–1592.

79. TANAKA, T., WAKI, H., Ido, Y. et al. (1988) Protein and Polymer Analyses up to m/z 100 000 by laser Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom., 2, 151.

80. THOMSON, J.J. (1913) Rays of Positive Electricity and Their Application to Chemical Analysis, Longmans Green, London.

81. TURTON, K.; NATESH, R.; THIYAGARAJAN, N.; CHADDOCK J.A.; ACHARYA, K.R.(2004). Crystal structures of Erythrina cristagalli lectin with bound N-linked oligosaccharide and lactose. Glycobiology 14(10) 923–929.

82. UETRECHT, C.; VERSLUIS, C.; WATTS, N.R.; ROSS, H.W.; WUITE, G.J.L.; WINFIELD, P.T.; STEVEN, A.C.; HECK, A.J.R. (2008). High-resolution mass spectrometry of viral assemblies: Molecular composition and stability of dimorphic hepatitis B virus capsids. Chem., Int. Ed. , 47, 6247–6251.

83. ULIEL, S., FLIESS, A., UNGER, R. (2001). Natural occurring circular permutations in proteins. Protein engineering, 14(8) 533-542.

84. ULIEL, S.; FLIESS, A.; UNGER, R. (2001). Natural occurring circular permutations in proteins. Protein engineering, 14(8) 533-542

85. VAN DAMME, E. J. M., PEUMANS, W. J., BARRE, A., ROUGÉ, P. (1998) Plant Lectins: A Composite of Several Distinct Families of Structurally and Evolutionary Related Proteins with Diverse Biological Roles. Critical Reviews in Plant Sciences, 17(6), 575–692.

86. VAN DAMME, E.J.M., BARRE, A., ROUGÉ, P., VAN LEUVEN, F. & PEUMANS, W.J. (1996). The NeuAc α-2,6-gal/galNAc binding lectin from Elderberry (Sambucus nigra) bark: A type 2 Ribosome Inactivating Protein with an unusual specificity and structure? In Eur. J. Biochem., 235: 128-137.

87. VAN DAMME, E.J.M., PEUMANS, W.J., BARRE, A. & ROUGÉ, P. (1998) Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. Crit. Rev. Plant Sci., 17: 575-692.

88. van DUIJN, E., D. A. SIMMONS, R. H. van den HEUVEL, P. J. BAKKES, H. van HEERIKHUIZEN, R. M. HEEREN, C. V. ROBINSON, S. M. van der VIES and A. J. Heck, J. (2006) Improving the Performance of a Quadrupole Time-of-Flight Instrument for Macromolecular Mass Spectrometry. Am. Chem. Soc., 128, 4694–4702

89. VAN PARIJS, J., BROEKAERT, W.F., GOLDSTEIN, I.J., PEUMANS, W.J. (1991). Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (Hevea brasiliensis) latex. Plant., **183**: 258-262.

90. WALSH, C.T. (2006) Posttranslational Modifications of Proteins: Expanding Nature's Inventory, Roberts and Co. Publishers, Greenwood Village, CO.

91. WANTYGHEM, J., PLATZER, N., GINER, M., DERAPPE, C. and GOUS-Sault, Y. (1992) Carbohydr. Res. 236, 181^193

92. YAMAGUCHI, O., KIMURA, M., ARAKI, M., YAMASAKI, N., KIMURA, Y., NAKAJIMA, S. and TAKAGI, S. (1993) J. Biochem. 114, 560^566.

93. ZENOBI, R. and KNOCHENMUSS, R. (1998) Ion formation in MALDI mass spectrometry. Mass Spectrom. Rev., 17 (5), 337–66.