

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular

CARLO FREDERICO MORO

**Comportamento do peptídeo entomotóxico Jaburetox-2Ec em solução e a sua  
interação com lipossomas miméticos de plaquetas humanas**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-  
graduação em Biologia Celular e Molecular da  
UFRGS como requisito parcial para obtenção do título  
de Mestre em Ciências.

Orientadora: Célia Regina Ribeiro Carlini  
Co-orientadora: Nádyá Pesce da Silveira

Porto Alegre, 2010

## **Membros da Banca Examinadora**

Dr. ANTONIO FREDERICO MICHEL PINTO

Centro de Biotecnologia – UFRGS

Dra. CLARA ISMERIA DAMIANI BICA

Instituto de Química - UFRGS

Dr. JEAN LOUIS SCHWARTZ

Université de Montreal, Canadá

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Proteínas Tóxicas, Departamento de Biofísica do Centro de Biotecnologia da UFRGS e no Laboratório de Instrumentação e Dinâmica Molecular do Instituto de Química da UFRGS. Algumas análises foram realizadas no Laboratório Nacional de Luz Síncroton e na Faculdade de Farmácia da UFRGS.

O suporte financeiro foi provido pela Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela Financiadora de Estudos e Projetos – FINEP, e pelo Laboratório Nacional de Luz Síncroton – LNLS.

## Agradecimentos

Ao meu pai, por estimular e apoiar meu interesse pela ciência, e por ser um modelo de pesquisador, professor e pai.

Às minhas orientadoras, Célia e Nádyá, pela acolhida e por todas as oportunidades e ensinamentos.

À Yasmine, pela enorme ajuda dada e todos esses anos como colega de pesquisa, bem como à todos os colegas dos laboratórios Laprotox e LINDIM, por todas as ajudas e explicações.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, por ter me acolhido como aluno por todo esse tempo.

E por fim, a todos os cientistas, passados e contemporâneos, famosos e anônimos, pela longa e árdua criação de toda a base do conhecimento científico que permite a um trabalho como esse ser realizado.

*"If I have seen a little further it is by standing on the shoulders of Giants."*

– Isaac Newton

## RESUMO

No presente trabalho, o peptídeo inseticida recombinante Jaburetox-2Ec, derivado da urease de *Canavalia ensiformis* (*Jack bean*) foi estudado, principalmente através de técnicas de espectroscopia de espalhamento de luz e raios-X. Foi analisada a tendência do peptídeo a se agregar em diferentes condições físico-químicas quando em solução aquosa, e a sua interação com membranas de lipossomas miméticos de plaquetas humanas.

A partir dos dados de raio hidrodinâmico, raio de giro, e massa molar ponderal média obtidos do peptídeo em solução, foi possível observar uma tendência para maior agregação numa faixa em torno de pH 5,5, bem como ausência de agregação em pH inferior a 4,0 e superior a 7,0. Não se verificou nenhum efeito visível no nível de agregação com a adição de agente redutor ou íons, sendo que a exposição ao oxigênio do ar levou a um aumento da mesma.

Os estudos de interação do Jaburetox-2Ec com lipossomas revelaram uma significativa mudança estrutural na membrana, que se mostrou mais intensa com uma maior concentração do peptídeo. Foram, através de *software*, feitos ajustes teóricos das curvas de espalhamento de raios-X à baixos ângulos dos lipossomas, a fim de quantificar as mudanças nos parâmetros físicos das membranas causados pela ação do peptídeo. A formação de poros na membrana pelo peptídeo foi proposta como explicação para os resultados encontrados.

Palavras-chave: *Canavalia ensiformis*, *Jack bean*, urease, Jaburetox-2Ec, espectroscopia de espalhamento de luz, SAXS, SASFit.

## ABSTRACT

In the present work, the insecticide recombinant peptide Jaburetox-2Ec, derived from *Canavalia ensiformis* (Jack bean) urease, was studied, primarily by light and X-ray scattering techniques. Its tendency to aggregate in aqueous solution under different physical-chemical conditions, and its interaction with human platelet mimetic liposome membranes were analyzed.

From the data relative to hydrodynamic radii, radii of gyration and mean molecular weight obtained from the peptide in aqueous solution, it was possible to observe a tendency for greater aggregation around pH 5.5, as well as an absence of aggregation at values of pH below 4.0 and above 7.0. No visible effect on the level of aggregation was verified with the addition of reducing agent or ions, whereas the exposure to oxygen in the air resulted in an increase in this level.

The studies of Jaburetox-2Ec interaction with liposomes revealed a significant structural change in the membrane, which was shown to be more intense in higher peptide concentrations. Software-assisted theoretical fits were made for the experimental small-angle X-ray scattering curves aiming to quantify the changes in the physical parameters of the membranes caused by peptide action. The formation of pores in the membrane was proposed as an explanation to the results found.

Keywords: *Canavalia ensiformis*, *Jack bean*, urease, Jaburetox-2Ec, light scattering spectroscopy, SAXS, SASFit.

# ÍNDICE

<b>1. Introdução</b>	<b>9</b>
1.1. Ureases	9
1.2. <i>Jack bean Urease</i> (JBU)	9
1.3. Canatoxina (CNTX)	10
1.4. Jaburetox-2Ec	11
<b>2. Objetivos</b>	<b>16</b>
<b>3. Materiais e Métodos</b>	<b>17</b>
3.1. Extração e preparação de Jaburetox-2Ec	17
3.2. Estudo das variações das condições do meio	18
3.3. Preparação dos lipossomas miméticos de plaquetas humanas	19
3.4. Espectroscopia de espalhamento de luz	21
3.4.1. Espalhamento de luz dinâmico (DLS)	21
3.4.2. Espalhamento de luz estático (SLS)	22
3.5. Espectroscopia de raios-X a baixos ângulos (SAXS)	24
3.6. Potencial Zeta	26
3.7. Análises	27
3.7.1. Espalhamento de luz	27
3.7.2. SAXS	28
3.7.3. Potencial Zeta	28
<b>4. Resultados e Discussão:</b>	<b>28</b>
4.1. Jaburetox-2Ec em solução aquosa	28
4.1.1. Raio hidrodinâmico	28
4.1.2. Massa molar e raio de giro	33
4.1.3. Dimensão fractal	33
4.2. Interação com lipossomas	35
4.2.1. Raio hidrodinâmico dos lipossomas	35
4.2.2. SAXS	38
4.2.3. Potencial Zeta	48

<b>5. Conclusões</b>	<b>49</b>
<b>6. Referências bibliográficas</b>	<b>51</b>
<b>A1. Anexo I</b>	<b>54</b>

# 1. Introdução

## 1.1. Ureases

As ureases (EC 3.5.1.5; amidohidrolases de uréia) são enzimas dependentes de níquel que catalisam a hidrólise da uréia para formar amônia e dióxido de carbono (WANG & TARR, 1955). Estas enzimas agem também sobre a hidroxauréia e a diidroxauréia (FISCHBEIN, 1969) e algumas uréias substituídas e ésteres de ácido carbâmico, como a tiouréia e *p*-nitrofenilcarbamato (BENNET & WREN, 1977). As ureases são amplamente distribuídas, sendo encontradas em bactérias, fungos e plantas. Independente da fonte e de suas estruturas quaternárias, todas as ureases descritas até o momento apresentam alto grau de homologia, estruturas tridimensionais e mecanismos catalíticos semelhantes, sugerindo divergência a partir um único ancestral comum (MOBLEY et al, 1995; FOLLMER, 2008).

Ureases bacterianas são formadas por duas ou três cadeias polipeptídicas distintas, UreA, UreB e UreC na maioria das bactérias e UreA e UreB no gênero *Helicobacter*. Em bactérias, além de disponibilizar nitrogênio, a hidrólise da uréia pode proteger o microrganismo da morte em ambientes ácidos através da formação de amônia, o que ocorre em diversos processos patológicos humanos, como gastrites, pielonefrites e formação de pedras no trato urinário (MOBLEY *et al.*, 1995).

Ureases de plantas são proteínas homo-oligoméricas, formadas por trímeros ou hexâmeros de uma única subunidade, e sua principal função parece estar relacionada à reciclagem de nitrogênio a partir da uréia (SIRKO & BRODZIK, 2000; FOLLMER, 2008). A urease catalisa a conversão de uréia à amônia, que é assimilada na via da síntese de glutamina (LAM *et al.*, 1996), e é responsável pela reciclagem da uréia aplicada como fertilizante (WITTE

*et al.*, 2002). A uréia, no entanto, não é um metabólito majoritário em plantas, sugerindo que a urease pode possuir outras funções em plantas (CARLINI & POLACCO, 2008).

### **1.2. Jack bean Urease (JBU)**

A *Canavalia ensiformis* (Jack bean) é uma leguminosa de excepcional resistência a insetos, e é fonte de várias proteínas de interesse bioquímico e biotecnológico, tais como a lectina concavalina A (SUMNER & HOWELL, 1933), inibidores de tripsina (UBATUBA, 1955), urease, e a Canatoxina (CNTX) (CARLINI & GUIMARÃES, 1981).

A urease de *Canavalia ensiformis* (JBU) foi a primeira enzima a ser cristalizada (SUMNER, 1926), contribuindo para a demonstração da natureza proteínica das enzimas. A JBU nativa existe na forma de trímeros e hexâmeros de cadeias idênticas de 91 kDa, cada uma contendo dois íons níquel (SIRKO & BRODZIK, 2000; FOLLMER, 2008).

### **1.3. Canatoxina (CNTX)**

A CNTX é uma proteína tóxica isolada da *Canavalia ensiformis* (CARLINI & GUIMARÃES, 1981) e caracterizada como uma isoforma da JBU (FOLLMER *et al.*, 2001), possuindo aproximadamente 85% de homologia com esta, e cerca de 30-40% de sua atividade ureolítica. Sua forma estrutural é um dímero de cadeias polipeptídicas de 95 kDa ligadas não-covalentemente, e contendo um átomo de Zn e um de Ni em cada subunidade (FOLLMER *et al.*, 2001; 2002). A CNTX apresenta também atividades biológicas independentes de sua atividade ureolítica (FOLLMER *et al.*, 2001). A CNTX mostrou ação inseticida quando administrada oralmente a insetos com digestão baseada em enzimas ácidas do tipo catepsinas, mas não em

insetos com digestão baseada em enzimas básicas do tipo tripsinas (CARLINI et al., 1997). A CNTX provoca também convulsões e morte quando aplicada intraperitonealmente em camundongos e ratos ( $DL_{50} = 0,5-2,0$  mg/kg, CARLINI *et al.*, 1984), mas sem produzir efeitos letais por via oral.

Foi demonstrado que a entomotoxicidade da CNTX é devida a um peptídeo interno de 10 kDa (pepcanatox), liberado através da hidrólise da proteína por catepsinas de insetos suscetíveis, podendo ser produzido *in vitro* por esse processo (FERREIRA-DASILVA et al. 2000). A CNTX não apresenta atividade inseticida em insetos de digestão ácida baseada em tripsinas. Ureases bacterianas, que possuem apenas parte da seqüência do pepcanatox, não apresentam efeito inseticida (FOLLMER et al, 2004, *Eur. J. Biochem.*).

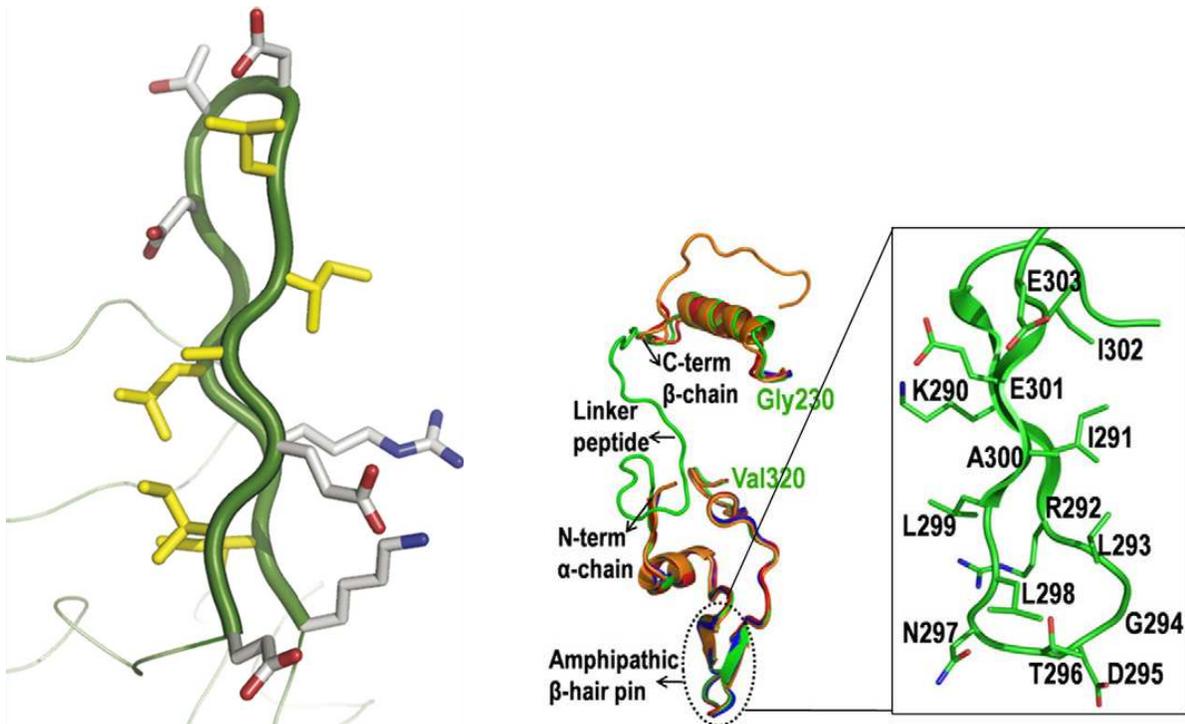
#### **1.4. Peptídeo Jaburetox-2Ec**

Devido ao baixo rendimento dos métodos de produção do pepcanatox, foi desenvolvido um peptídeo recombinante a partir do gene de urease JBURE-II (PIRES-ALVES et al., 2003), expresso em *Escherichia coli*, denominado **Jaburetox-2Ec** (MULINARI et al., 2004). Este peptídeo induziu taxa de mortalidade de 100% nos insetos testados, mesmo nos de digestão baseada em tripsinas, e se mostrou inócuo se ingerido ou injetado em ratos e camundongos, mesmo em altas doses (MULINARI et al, 2007). Através de modelagem *ab initio*, foram propostas possíveis estruturas conformacionais para esse peptídeo. Em 9 dos 10 melhores modelos produzidos, observou-se a formação de uma proeminente estrutura de laço  $\beta$  (Figura 1; MULINARI et al, 2007; BARROS et al., 2009). Esta estrutura também é comum a uma série de peptídeos formadores de poros em membranas (BROGDEN, 2005), bem como alguns tipos de neurotoxinas de artrópodes (MENEZ, 1998). A existência desse grampo  $\beta$  na estrutura da JBU

foi recentemente confirmada com a resolução da estrutura cristalográfica dessa proteína (BALASUBRAMANIAN & PONNURAJ, 2010).

Trabalhos anteriores demonstraram que o peptídeo Jaburetox-2Ec é capaz de induzir extravasamento em vesículas lipossômicas unilamelares, e que esse efeito é dependente do estado de agregação do peptídeo. O mesmo trabalho também realizou simulações computacionais que sugerem que o Jaburetox-2Ec tem a tendência a se ancorar em interfaces polar/apolar (BARROS et al., 2009)

A seqüência de aminoácidos do Jaburetox-2Ec é apresentada na Figura 2.



**Figura 1:** a) Esquerda: Um dos 10 melhores modelos *ab initio* do Jaburetox-2Ec. Há um predomínio de resíduos hidrofóbicos (amarelo) na face esquerda, enquanto resíduos hidrofílicos (branco) predominam na outra face. Regiões azuis contém nitrogênio (Lisina e Arginina) e as vermelhas contém oxigênio (Treonina, Ác. Aspártico e Ác. Glutâmico). (MULINARI et al, 2007) b) Direita: Estrutura da região da JBU contendo o peptídeo pepcanatox, obtida experimentalmente (em verde) superimposto com as regiões correspondentes de urease de *H. pylori* (HPU, laranja), *K. aerogenes* (KAU, azul) e *B. pasteurii* (BPU, vermelho). A caixa à direita mostra em detalhes a região do grampo  $\beta$ . (BALASUBRAMANIAN & PONNURAJ, 2010)

```

ATGGGTCCAGTTAATGAAGCCAATTGTAAAGCAGCTATGGAGATTGTGTGCAGAAGGGAA 60
 M G P V N E A N C K A A M E I V C R R E 20
TTTGGACATAAGGAAGAAGAAGATGCAAGTGAGGGTGTTACCACAGGAGACCOCTGATTGT 120
 F G H K E E E D A S E G V T T G D P D C 40
CCTTTCACCAAAGCCATTCCCTCGTGAAGAATATGCTAACAAAGTATGGTCCGACTATTGGT 180
 P F T K A I P R E E Y A N K Y G P T I G 60
GACAAAATCOGTCTGGTGACACTGATTTGATTGCTGAAATTGAAAAGGATTTGCCCTT 240
 D K I R L G D T D L I A E I E K D F A L 80
TATGGTGATGAAAGTGTTTTTGGAGGTGGAAAAGTTATAAAGGGCGAGCTCAATTGCGAAG 300
 Y G D E S V F G G G K V I k g e l n s k 100
CTTGAAGGTAAGCCTATCCCTAACCCCTCTCCTCGGTCTCGATTCTACGCGTACCGGTCAT 360
 l e g k p i p n p l l g l d s t r t g h 120
CATCACCATCACCATTGA 378
 h h h h h * 125

```

**Figura 2:** Seqüência nucleotídica e seqüência de aminoácidos deduzida para o cDNA do Jaburetox-2Ec. A seqüência deduzida de aminoácidos é mostrada abaixo de seus respectivos códons. Os números de nucleotídeos e aminoácidos estão indicados no lado direito. O quadrado indica o códon de início de tradução. As regiões dos *primers* (para ampliação e clonagem do cDNA) estão sublinhadas. A seqüência do Jaburetox está escrita em letras maiúsculas, enquanto as seqüências do epitopo V-5 e cauda de poli-histidina estão em minúsculas (MULINARI et al., 2007)

Dado o alto índice de mortalidade nos insetos suscetíveis, bem como a ausência de toxicidade aguda em modelos mamíferos, há um grande interesse na investigação deste peptídeo para uso como bioinseticida, visto que seu espectro de ação inclui também um grupo de insetos não suscetíveis aos efeitos das toxinas *Bt* (que agem apenas sobre insetos de digestão alcalina baseada em enzimas do tipo tripsina), como percevejos e alguns grupos de besouros, e provavelmente afídeos.

## 2. Objetivos

O primeiro objetivo do presente estudo foi o de analisar o comportamento de agregação do peptídeo Jaburetox-2Ec frente à variáveis químicas, tais como o pH, a presença de íons ( $\text{Na}^+$ ) e agentes redutores (2-beta-mercaptoetanol), através da determinação dos raios hidrodinâmicos aparentes do peptídeo em solução, por espectroscopia de espalhamento de luz dinâmico. Também objetivamos, através de espectroscopia de espalhamento de luz estático, a determinação das massas molares das partículas em solução para determinar seu estado de agregação, bem como seus raios de giro, a fim de determinar a provável arquitetura das unidades peptídicas e seus aglomerados.

Em seqüência, buscamos estudar o efeito do peptídeo sobre membranas lipossômicas a fim de verificar se esse provocava mudanças estruturais, tais como a formação de poros em membranas celulares. Para isso foram preparados lipossomas miméticos de plaquetas humanas a partir de cinco fosfolipídios e mais colesterol. A composição dos lipossomas, baseado em plaquetas humanas, foi escolhida devido a este ser um modelo bem estudado de membrana celular (CASAL et al., 2003), enquanto que a composição lipídica das membranas celulares de insetos não é bem conhecida.

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1. Extração e preparação da amostra

O peptídeo recombinante Jaburetox-2Ec, é expresso por células de *Escherichia coli* modificadas, contendo a seqüência de 91 aminoácidos com atividade entomotóxica, mais um epítipo de reconhecimento V-5 e uma cauda de seis histidinas, para facilitar a purificação por cromatografia em metal imobilizado (MULINARI et al., 2007). A massa molar do peptídeo foi calculada em 13668,26 g.mol<sup>-1</sup>, com um ponto isoelétrico de 5,30 (<http://ca.expasy.org/>).

Para a extração do peptídeo do meio celular, as células congeladas foram suspensas em tampão de equilíbrio (Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, pH 7,5; 300 mM NaCl; 20 mM imidazol) e submetidas a lise ultra-sônica para o rompimento das paredes celulares. O extrato obtido foi centrifugado a 12000 rpm por 20 min, em centrífuga refrigerada Eppendorff, sendo o sobrenadante obtido centrifugado novamente nas mesmas condições.

O sobrenadante da segunda centrifugação foi submetido à cromatografia de afinidade em resina de ácido iminodiacético-Sepharose (GE HealthCare) carregada com íons Ni<sup>2+</sup> (IDA-Ni). A coluna foi lavada com o tampão de equilíbrio para remoção da fração não retida, em volume suficiente até não se verificar mais presença de proteínas (teste com o Reagente de Bradford à base do corante Coomassie Blue) no eluato. O peptídeo Jaburetox-2Ec fica retido na coluna devido à sua cauda de histidina, sendo eluído com tampão Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, pH 7,5; 300 mM NaCl acrescido de 250 mM imidazol. As frações eluídas contém o peptídeo. Estas foram reunidas e submetidas à diálise em tampão de Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, pH 7,5; β-ME 5mM e EDTA 1mM para retirada do imidazol.

A concentração protéica da solução é medida após reação com o reativo de Bradford por absorvância a 595 nm, contra padrões de albumina sérica bovina (BSA), usando o tampão de diálise como branco (BRADFORD, 1976).

Para testar a pureza da amostra após o processo, uma alíquota de uma das extrações foi aplicada em gel de SDS-PAGE.

### **3.2. Estudo das variações das condições do meio**

Para as análises a diferentes pHs foram utilizados tampões de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$  e ácido cítrico  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  na faixa de pH 4 a 8 e de  $\text{NaOH}$   $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  e  $\text{H}_3\text{BO}_3$ . $\text{KCl}$   $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  para a faixa de pH 9 a 10.

As alíquotas para análise foram preparadas por diluição da amostra em água deionizada e adição do tampão até completar 4 mL. A concentração final da amostra nas análises foi prevista para ficar em torno de  $0,05 \text{ mg/mL}$ .

O pH das alíquotas foi medido em medidor de pH de eletrodo de vidro (previamente calibrado) e, quando necessário, ajustado por adição do ácido ou base do tampão.

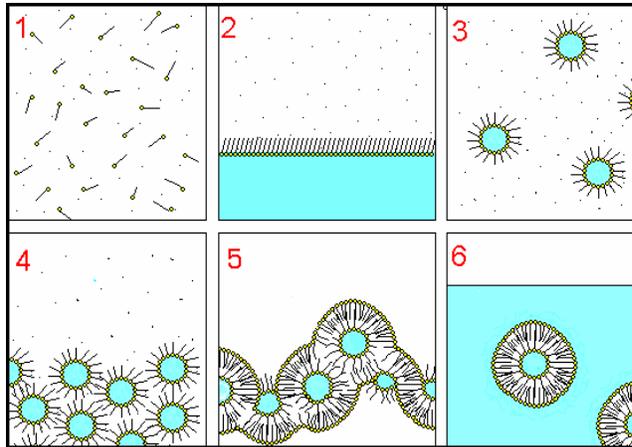
Para as amostras submetidas à exposição a oxigênio, foi borbulhado ar dentro da solução por 120 minutos, através de uma micropipeta de vidro e filtro de algodão, conectados a uma linha de ar. Os frascos das amostras foram mantidos fechados durante o borbulhamento, exceto pelos orifícios de entrada e saída de ar.

As amostras foram filtradas imediatamente antes da análise em filtro de  $0,45 \mu\text{m}$  para cubetas previamente lavadas com acetona para retirada do pó.

### 3.3. Preparação dos lipossomas

Os lipossomas miméticos de plaquetas humanas foram preparados a partir de 60 mg de lipídeos e colesterol, constituindo numa mistura (em % de peso) de 34,1% L- $\alpha$ -fosfatidilcolina, 24,3% L- $\alpha$ -fosfatidiletanolamina, 6,1% L- $\alpha$ -fosfatidilserina, 2% L- $\alpha$ -fosfatidilinositol, 7,7% esfingomiéline e 25,8% colesterol. Todos os reagentes foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich. A preparação dos lipossomas se deu pelo método de evaporação em fase reversa (MERTINS, 2005), como representado na Figura 3.

Primeiramente, quantidades específicas dos constituintes dos lipossomas foram pesadas em balança analítica modelo Cahn C-35 Ultra-Microbalance, cuja sensibilidade está na faixa de 0,1 a 0,0001 mg. Em seguida as moléculas foram dissolvidas em clorofórmio (etapa 1). Após a dissolução das mesmas, uma porção de 100  $\mu$ L de água ultra-pura (Mili-Q) foi adicionada (etapa 2), ocorrendo a formação de duas fases: uma aquosa e outra contendo o solvente orgânico. A mistura foi então submetida à sonicação por dois minutos (etapa 3) em ultra-som modelo Thornton-Inpec, para a formação das micelas reversas. Na etapa 4, o clorofórmio foi evaporado em um evaporador rotatório modelo Fisatom 801, com bomba de vácuo modelo Tecnal-0581 (pressão reduzida de 620 mm/Hg). Após a sua total eliminação, houve a formação de um organogel que se depositou junto à parede do balão (etapa 5). Na etapa final (etapa 6), foi adicionada água ultra-pura ao balão contendo o organogel, sob agitação, para a formação dos lipossomas, originando uma suspensão aquosa dos mesmos (suspensão mãe). O resultado final é a obtenção de vesículas lipossômicas multilamelares contendo água, com distribuição homogênea dos seus componentes entre as vesículas.



**Figura 3: Preparação dos lipossomas.**

1. 30mg (34,1% PC; 25,8% CHOL; 24,3% PE; 7,7% SM; 6,1% PS; 2% PI) + clorofórmio (5mL).
2. Adição de 100 $\mu$ L de água ultra-pura (18,3  $\mu$ S).
3. Sonicação. Formação de micelas reversas.
4. Evaporação do solvente.
5. Formação do ORGANOGEL.
6. Adição de água ultra-pura (5 mL) e obtenção da SUSPENSÃO DE LIPOSSOMAS.

### 3.4. Espectroscopia de espalhamento de luz

#### 3.4.1. Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

O espalhamento de luz é um método em que um feixe de luz monocromática atinge a amostra, e a luz espalhada é detectada por uma fotomultiplicadora. Em uma análise de espalhamento de luz dinâmico (DLS), o raio hidrodinâmico (Rh) das partículas em solução pode ser caracterizado, considerando-se as flutuações de intensidade e as distribuições de frequência ( $\Gamma$ ) originadas da difusão translacional das partículas em solução. A função obtida a partir destas flutuações de luz espalhada no tempo é dada por uma integral de Laplace do tipo:

$$G(t) = \int_0^{\infty} G(\Gamma).e^{-\Gamma t}.d\Gamma \text{ (Eq. 1)}$$

A resolução espacial da técnica é definida pelo vetor de espalhamento  $q$ , dado pela Eq.(2):

$$|\vec{q}| = \left( \frac{4n}{\lambda_0} \right) \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \text{ (Eq. 2)}$$

onde  $\lambda_0$  denota o comprimento de onda da luz incidente,  $n$  o índice de refração da solução, e  $\theta$  o ângulo de espalhamento.

Relacionando-se  $\Gamma$  com o vetor  $q$ , determina-se o coeficiente de difusão translacional ( $D_T$ ):

$$D_T = \frac{\Gamma}{q^2} \text{ (Eq. 3)}$$

Extrapolando-se para ângulo ( $\theta$ ) e concentração ( $c$ ) zero, obtém-se o valor do coeficiente de difusão a diluição infinita ( $D_0$ ) através da equação:

$$D_c = D_0(1 + k_D c) \text{ (Eq. 4)}$$

Este, quando relacionado com a temperatura ( $T$ ) e a viscosidade ( $\eta_0$ ) do solvente, permite o cálculo do  $R_h$  das espécies em solução pela relação de Stokes-Einstein:

$$R_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta_0 D_0} \text{ (Eq. 5)}$$

A presença de impurezas como contaminantes, poeira, fibras e partículas prejudica as medidas de espalhamento de luz, por isso as amostras em solução devem ser cuidadosamente filtradas e/ou centrifugadas antes da realização das medidas.

### **3.4.2. Espalhamento de luz estático (SLS)**

O espalhamento de luz estático (SLS) é um método absoluto para a determinação da massa molar média ( $\overline{M}_w$ ) de macromoléculas, embora a obtenção de dados e a sua interpretação tornem-se mais difíceis quando as espécies em estudo apresentam comportamento associativo que pode resultar em agregados macromoleculares, como é o caso da urease. Este problema pode ser evitado se forem escolhidas faixas de concentração e solventes adequados, e mesmo a

$\bar{M}_w$  dos agregados pode ser determinada, juntamente com a  $\bar{M}_w$  da urease, se ambas as espécies estão presentes na amostra.

A presença de impurezas como contaminantes, poeira, fibras e partículas também prejudica as medidas de SLS, por isso as amostras em solução devem ser cuidadosamente filtradas e/ou centrifugadas antes da realização das medidas (MERTINS, 2004).

No espalhamento de luz estático, considera-se apenas a quantidade média de luz espalhada (I) em uma determinada direção, sem levar em conta a modificação ou distribuição de frequências. No SLS mede-se o excesso de intensidade da luz espalhada por uma solução comparada à intensidade da luz espalhada pelo solvente puro (BROWN, 1996). Um dos métodos mais empregados para a análise da luz espalhada por macromoléculas é a relação de Zimm (ZIMM, 1948), que permite obter o valor de  $\bar{M}_w$  através da extrapolação de uma reta formada pelos pontos de um gráfico  $Kc/R_\theta \times \sin^2 \theta/2$ , tal que para:

$$(\sin^2 \theta/2) = 0, \text{ (Eq. 6)}$$

$$(1/\bar{M}_w) = (Kc/R_\theta). \text{ (Eq. 7)}$$

onde  $\theta$  é o ângulo formado entre o feixe de luz incidente na amostra e o detector e  $c$  a concentração da amostra, sendo o valor da razão de Rayleigh  $R_\theta$  definido por:

$$R_\theta = R_{\theta\text{solução}} - R_{\theta\text{solvente(água)}} \text{ (Eq. 8)}$$

$$R_{\theta\text{solução}} = R_{\text{tolueno}} \cdot \sin \theta \cdot I/I_{\text{tolueno}} \text{ (Eq. 9)}$$

Sendo  $R_{\text{tolueno}}$  a razão de Rayleigh do tolueno ( $14 \times 10^{-6} \text{ cm}^{-1}$ ) (BROOKHAVEN INSTRUMENTS, 1989),  $I$  a intensidade medida para o ângulo  $\theta$  e  $I_{\text{tolueno}}$  a intensidade do tolueno a um ângulo de  $90^\circ$ . O valor de  $K$ , por sua vez, é definido por:

$$K = \frac{4\pi^2 n^2}{N_A \lambda_0^4} \left( \frac{dn}{dc} \right)^2 \quad (\text{Eq. 10})$$

onde  $n$  = índice de refração,  $N_A$  = número de Avogadro,  $\lambda_0$  = comprimento de onda da luz incidente (em cm) e  $(dn/dc)$  o incremento do índice de refração com a concentração da solução.

O raio de giro  $R_g$  pode ser obtido através da equação 11, abaixo:

$$\bar{R}_g^2 = \frac{3\lambda_0^2 \overline{M}_w (\text{incl.})}{16\pi^2} \quad (\text{Eq. 11})$$

onde  $\lambda_0$  = comprimento de onda da luz incidente (em nm) e  $(\text{incl.})$  = coeficiente angular da reta representada pelos pontos de  $Kc/R_\theta \times \sin^2 \theta/2$ .

### 3.5. Espectroscopia de raios-X a baixos ângulos

Em um experimento de SAXS, o quantidade de fótons espalhada por uma certa amostra é contada como uma função do ângulo de espalhamento  $\theta$ . A quantidade de fótons coletados é dependente das características da amostra, do fluxo de elétrons do feixe incidente e da distância entre a amostra e o detector. O espalhamento em baixos ângulos é completamente elástico, o que significa que as magnitudes dos vetores de onda incidente e espalhado são os mesmos ( $K_i = K_s =$

$2\pi/\lambda$ ). O módulo de espalhamento ( $q$ ) é dependente do ângulo de espalhamento ( $\theta$ ), e é definido matematicamente por:

$$q = K_s - K_i = \frac{4\pi}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \text{ (Eq. 12)}$$

A magnitude do vetor de espalhamento indica a faixa de tamanho que pode ser analisada pela técnica. Em experimentos de SAXS, a faixa de  $q$  avaliável tipicamente varia de 0,006 à 6  $\text{nm}^{-1}$ , o que corresponde às dimensões reais de  $\sim 1\mu\text{m}$  a 1 nm.

A intensidade dos raios-X espalhados por uma amostra é obtida a partir do vetor de espalhamento de  $q$ :

$$I_s(q) = \frac{N_s(q)}{t_s} = I_0 A_s \Delta\Omega \varepsilon T t \left( \frac{d\Sigma}{d\Omega} \right)(q) + BG \text{ (Eq. 13)}$$

onde  $I_s(q)$  é a intensidade da radiação espalhada durante o experimento e corresponde ao número de fótons espalhados ( $N_s$ ), para um ângulo  $\theta$ , que chegam à uma pequena área do detector na unidade de tempo  $t_s$ . O parâmetro  $A_s$  é a área iluminada pelo feixe,  $\Delta\Omega$  é o ângulo sólido definido pelo tamanho de pixel do detector,  $\varepsilon$  é a eficiência do detector,  $T$  e  $t$  são, respectivamente, a transmitância e a espessura da amostra, e BG é o ruído de fundo. A transmitância da amostra é definida como a razão de  $I_T$  e  $I_0$  medida nos experimentos. Finalmente,  $d\Sigma/d\Omega(q)$  é o espalhamento diferencial da seção transversal (*differential scattering cross section*) por unidade de volume. Este parâmetro tem unidade de  $\text{cm}^{-1}$  e é a quantidade obtida da calibração absoluta da intensidade de radiação medida.

Para um determinado sistema de partículas espalhantes, a intensidade de raios-X espalhada  $I(q)$  é resultado da multiplicação dos fatores forma –  $P(q)$  e estrutura –  $S(q)$ , de

acordo com a equação:

$$I(q) = nP(q)S(q) \text{ (Eq. 14)}$$

onde  $n$  é a densidade numérica de partículas.  $P(q)$  refere-se à forma e tamanho das partículas e está relacionado com o espalhamento de uma partícula simples isolada, e  $S(q)$  é denominado fator estrutura e é proveniente de interações de longo alcance entre diferentes partículas.

Assim, para sistemas diluídos de partículas esféricas uniformes, a interação entre as partículas pode ser desprezada -  $S(q) \sim 1$  - e a intensidade de espalhamento de raios-X resulta da soma dos espalhamentos de partículas individuais que não interagem ( $I(q) = nP(q)$ ).

### **3.6. Potencial Zeta**

A presença de uma carga superficial em partículas suspensas num líquido afeta a distribuição de íons que estão numa região muito próxima da partícula, ou seja, na interface entre a superfície da partícula e o meio de suspensão o que leva ao acúmulo de íons de carga oposta à carga da superfície na região que cerca a partícula. Dessa forma, uma bicamada elétrica é criada ao redor de cada partícula. Potencial Zeta é, portanto, a diferença de potencial entre o meio de dispersão e a dupla camada elétrica na superfície da partícula. A magnitude deste potencial permite uma avaliação da estabilidade das partículas em suspensão (MALVERN INSTRUMENTS, 2004).

### **3.7. Análises**

#### **3.7.1. Espalhamento de luz**

Neste trabalho, as amostras foram analisadas em um espectrômetro de espalhamento de luz Brookhaven Instruments (goniômetro BI-200, correlator digital AT BI-9000), com laser de He-Ne ( $\lambda_0 = 632,8$  nm) como fonte de radiação. Para as análises em DLS, o volume de espalhamento foi minimizado com uma abertura de 4 mm e um filtro de interferência antes da detecção do sinal na fotomultiplicadora, com ângulo de leitura de  $90^\circ$ . As funções de correlação temporal foram medidas em modo multi- $\tau$ , usando-se 224 canais. A cubeta foi imersa em decahidronaftaleno (decalina, Aldrich), com viscosidade de 0,9779 cP, a  $21^\circ\text{C}$ . As funções de correlação temporal foram analisadas utilizando-se o método dos cumulantes (*software* Brookhaven Instruments). Todos os valores foram obtidos em triplicata, e o diâmetro das partículas foi obtido através da média aritmética dos valores dos diâmetros efetivos obtidos. A faixa de erro foi obtida através da raiz quadrada da soma dos quadrados dos erros absolutos individuais.

Para as análises em SLS, foi utilizada uma abertura de 1 mm e filtro de 633 nm, com varredura dos ângulos  $45^\circ$ ,  $55^\circ$ ,  $65^\circ$ ,  $75^\circ$ ,  $85^\circ$ ,  $90^\circ$ ,  $95^\circ$ ,  $105^\circ$ ,  $115^\circ$ ,  $125^\circ$ ,  $135^\circ$  e  $145^\circ$ . As amostras foram inicialmente medidas para concentração de  $0,05$  mg.mL<sup>-1</sup>, e posteriormente os valores de intensidade obtidos foram normalizados pelo valor de intensidade a  $90^\circ$  de uma análise a concentração de  $0,01667$  mg.mL<sup>-1</sup>. As intensidades foram então normalizadas para serem representadas como razão de Rayleigh ( $R_\theta$ ), segundo as Equações 8-9, e os gráficos  $Kc/R_\theta \times \sin^2 \theta/2$  obtidos para valores de  $c = 0,01667$  mg.mL<sup>-1</sup>,  $n = 1,33$  para água,  $N_A = 6,022 \times 10^{23}$ ,  $\lambda_0 = 6,328 \times 10^{-4}$  cm e  $(dn/dt) = 0,1791$  cm<sup>3</sup>.g<sup>-1</sup> (valor referente à albumina sérica bovina, usado como referência)

### **3.7.2. SAXS**

As análises de espalhamento de raios-X à baixos ângulos (SASX) foram realizadas na linha de luz de alto fluxo SAXS2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (Campinas, SP). As amostras líquidas foram inseridas em um porta-amostras de aço inoxidável fechado por duas janelas de mica com 25 mm de espessura e termostatizadas a  $20(\pm 0,1)$  °C. O tempo de exposição requerido para cada análise foi de cerca de 10 min. O comprimento de onda do feixe incidente foi de 1,488 Å, e um detector linear (Princeton Instruments) foi posicionado a 1028 cm da amostra. As intensidades foram corrigidas levando em conta a resposta do detector e os sinais de ruído escuro, bem como a transmitância da amostra e o espalhamento de fundo.

### **3.7.3. Potencial Zeta**

O equipamento utilizado para a realização da análise de PZ foi o Zetasizer Malvern Instruments ZEN3500. A metodologia de análise consiste na velocimetria (*Laser Doppler Velocimetria* – LDV), que neste caso utiliza um laser de comprimento de onda igual a 632,8 nm (He-Ne, 4,0 mV). Este equipamento dispõe de um detector que envia informações da luz espalhada num ângulo de 17° a um computador. No computador, um *software* produz um espectro de frequência e, após análise deste, calcula o PZ resultante.

## **4. Resultados e Discussão**

### **4.1. Jaburetox-2Ec em solução aquosa**

#### **4.1.1. Raio hidrodinâmico**

Os resultados obtidos com a amostra de Jaburetox-2Ec em solução através de espectroscopia de espalhamento de luz dinâmico (DLS) estão sistematizados na Figura 4, na

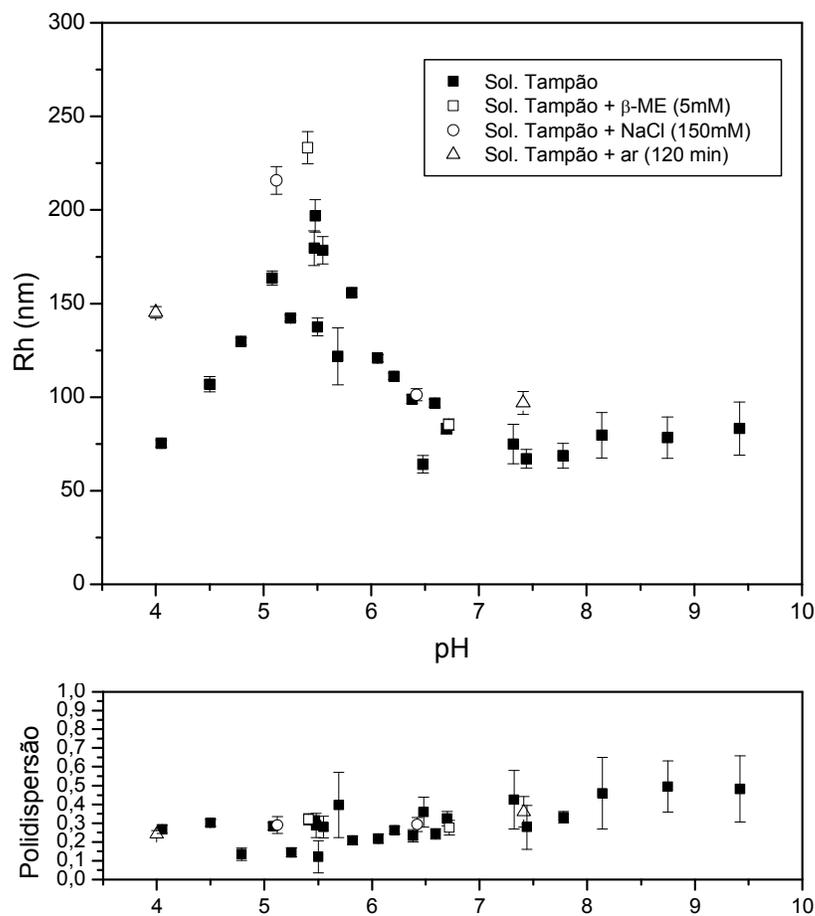
forma de raios hidrodinâmicos (Rh) aparentes (para  $c = 0,05$  mg/mL ou  $3,8$   $\mu$ M, considerando a massa do monômero), juntamente com os valores de polidispersão associados a cada valor de raio obtido. Os raios são considerados aparentes, pois os resultados não foram extrapolados para concentração tendendo a zero (diluição infinita). Os valores de Rh foram calculados como a metade dos valores obtidos para o diâmetro das partículas em solução. Para cada valor de diâmetro hidrodinâmico obtido, um valor correspondente de polidispersão da amostra foi estimado. Esse valor indica a distribuição de valores de diâmetro hidrodinâmico na amostra, valores baixos indicam partículas de tamanho mais homogêneo, e valores maiores uma maior variação de tamanho entre as partículas em suspensão.

A Figura 4 apresenta os raios aparentes obtidos para Jaburetox-2Ec em função de pH e em presença de  $\text{Na}^+$ , 2-beta-mercaptoetanol ( $\beta$ -ME), e ainda após oxidação por exposição das amostras a borbulhamento de ar ( $\sim 22\%$   $\text{O}_2$ ) por 2h. Observa-se que, partindo-se de pH 4,0, onde o peptídeo apresenta um raio hidrodinâmico aparente de aproximadamente 75 nm, o Rh da estrutura tende a aumentar até um máximo de aproximadamente 200 nm, em torno de pH 5,5. Em faixas de pH mais alcalinos, a estrutura apresenta tamanhos gradualmente menores, até voltar a atingir o tamanho médio de 75 nm de raio a partir de pH 7,0, que permanece estável até pH 9,5.

Estes resultados indicam que o peptídeo sofre agregação em função do pH, um fenômeno que atinge seu máximo em torno de pH 5,5. Esse valor de pH é próximo do ponto isoelétrico teórico (pH 5,3). Uma explicação para esse fato seria que em valores afastados do PI, onde a carga elétrica líquida do peptídeo é positiva ou negativa, a agregação seria dificultada por repulsão entre as moléculas. As análises subseqüentes para testar diferentes fatores foram realizadas apenas para dois valores de pH cada, de modo geral, um valor próximo de pH 5 e outro superior a 7.

Para verificar quais os aspectos moleculares envolvidos na agregação, utilizou-se o agente redutor 2-beta-mercaptoetanol. Agentes redutores podem estabilizar a estrutura do peptídeo por redução dos átomos de enxofre dos grupamentos tiólicos de resíduos de cisteína, prevenindo a formação de pontes dissulfeto entre unidades peptídicas (ANFISEN & HABER, 1961). O peptídeo jaburetox-2Ec contém 3 resíduos de cisteína em sua sequência. Conforme pode observar-se na Figura 4, a adição de  $\beta$ -ME não foi capaz de prevenir a agregação em pH próximo de 5,5, enquanto em pH 6,7 observa-se a mesma estrutura já observada na ausência de

$\beta$ -ME. Este resultado é similar ao encontrado para a análise de JBU sob as mesmas condições, no qual a adição do agente redutor  $\beta$ -ME não modificou o estado oligomérico da proteína (FOLLMER et al, 2004a). Isso indica que, tanto para a JBU quanto para o Jaburetox-2Ec, a formação de agregados não é dependente da formação de pontes dissulfeto.



**Figura 4:** Resultados obtidos por análises de espalhamento de luz dinâmico em amostras de Jaburetox-2Ec em solução aquosa 0,05 mg/mL (3,8  $\mu$ M) com pH ajustado por tampão  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,2 M/ácido cítrico 0,1 M para a faixa de pH de 4 a 8 e  $\text{H}_3\text{BO}_3 \cdot \text{KCl}$  0,1 M para a faixa de pH 9 a 10. Painel superior: valores de raio hidrodinâmico aparente em relação ao pH para várias condições de amostra tais como força iônica de  $\text{Na}^+$  150 mM, adição de  $\beta$ -ME à 5mM e borbulhamento de  $\text{O}_2$  22%. Painel inferior: respectivos valores de polidispersão para cada medida de DLS.

Da mesma forma, a adição de um eletrólito ( $\text{Na}^+$ ) e o conseqüente aumento da força iônica do meio para condições fisiológicas não afetou os estados de agregação. Sendo essa ( $150 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ) a concentração iônica aproximada de  $\text{Na}^+$  em condições fisiológicas, conclui-se que o estado agregado do peptídeo pode existir em condições naturais.

Por outro lado, a exposição do Jaburetox-2Ec a um meio oxidante (oxigênio do ar durante 2h) provocou o aparecimento de agregados em pH 7,4, onde originalmente havia sido observado apenas unidades “monoméricas” de Jaburetox-2Ec. Este fato sugere que a oxidação dos grupos tióis das três cisteínas presentes na seqüência do peptídeo leva a formação de pontes dissulfeto, que não se formariam em condições normais, entre diferentes unidades peptídicas, provocando agregação mesmo em faixas de pH que não propiciam esse comportamento.

Adicionalmente, verificou-se que, para períodos maiores de estocagem da amostra sob refrigeração, há uma tendência ao aumento na polidispersão e na faixa de erro das medidas de diâmetro (resultados não apresentados).

O processo de oligomerização do peptídeo em função do pH pode ser importante para o mecanismo de ação do peptídeo, pois o efeito máximo ocorre justamente na faixa de pH existente no trato digestório dos insetos suscetíveis aos efeitos das ureases, que são as moléculas precursoras que liberam esse peptídeo quando hidrolisadas (CARLINI et al., 1997; FERREIRA-DASILVA et al, 2000).

A formação de estruturas oligoméricas tem sido observada para diversos tipos de toxinas formadoras de poros em membrana, de estrutura similar à prevista para o Jaburetox-2Ec (MULINARI et al, 2007), tais como as toxinas do tipo Cry do *Bacillus thuringiensis* (BRAVO A. et al., 2007), a toxina Alpha do *Clostridium septicum* (MELTON-WITT et al., 2006) e a streptolisina O do *Streptococcus pyogenes* (GHANI et al., 1999), nos quais a capacidade das toxinas em formar poros em membranas celulares, e sua conseqüente toxicidade, se demonstrou dependente da sua capacidade de se oligomerizar previamente. Nesses casos, também, o pH foi um dos fatores determinantes na formação de oligômeros. (GONZALEZ et al., 2008)

#### 4.1.2. Massa molar e raio de giro

O espalhamento de luz estático foi usado para a determinação do raio de giro e massa molecular ponderal média ( $\overline{M}_w$ ) das partículas de Jaburetox-2Ec em solução. Os resultados obtidos foram analisados usando formalismo de Zimm ou Berry, de acordo com a dependência angular verificada durante os experimentos. Tipicamente foram usadas cinco amostras de Jaburetox-2Ec para cada experimento, com a concentração peptídica variando de 0,005 mg/mL a 0,05 mg/mL (0,38-3,8  $\mu$ M), diluídas em água ultra-pura (MilliQ) e com pH ajustado a 5,6 ou 8,1 com tampão de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2 M/ácido cítrico 0,1 M.

**Tabela 1:** Valores de  $\overline{M}_w$ , Rg e Rh para Jaburetox-2Ec em solução, de acordo com pH.

pH	Rh	Rg $\pm$ sd	$\overline{M}_w$
5,6	200	128 $\pm$ 15	1,66x10 <sup>5</sup>
8,1	80	54 $\pm$ 5,5	1,39x10 <sup>4</sup>

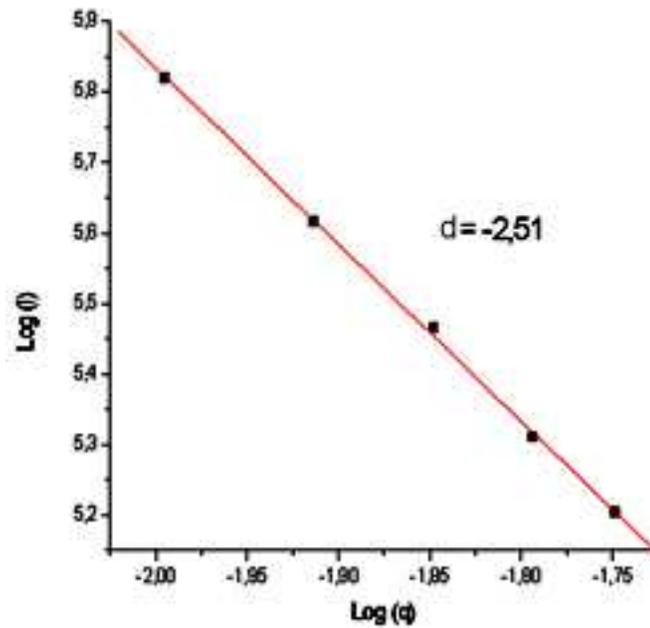
Os resultados de massa molar ponderal média obtidos indicam que, em pH 5,6, o peptídeo esteja na forma de um dodecâmero da forma monomérica (Mr 13.900) presente em pH 8,1.

#### 4.3. Dimensão Fractal dos agregados de Jaburetox-2Ec

A dimensão fractal de um sistema físico é um valor estatístico de como a estrutura tende a preencher o espaço a medida que cresce em tamanho (ou ao ser analisada em ampliações crescentes). A dimensão fractal dos agregados em solução (d) pode ser obtida a partir da análise da intensidade de luz espalhada (I) (SLS) em função do ângulo de observação (HARRISON, 1995), de acordo com a expressão:

$$I(q) \cong q^{-d} \text{ (Eq. 15)}$$

A Figura 5 ilustra o gráfico utilizado para determinação do parâmetro d, para a amostra em pH 5,15.



**Figura 5:** Dimensão fractal para a amostra de Jaburetox-2Ec em pH 5,15. O logaritmo da intensidade de luz espalhada é plotado contra os logaritmos de diferentes valores de  $q$ , obtidos pela variação dos ângulos de análise de acordo com a Eq. 2. O módulo da declividade da reta resultante é o valor da dimensão fractal  $d$ .

Os valores de dimensão fractal  $d$  obtidos para amostras em pH 7,78 e 5,15 foram de -1,36 e -2,51, respectivamente. De acordo com essa abordagem, quando  $Rg.q \approx 1.0$ , a fractalidade mássica dos agregados poder ser investigada (HARRISON, 1995). Valores de dimensão fractal ( $d$ ) com módulos próximos de 1 indicam a presença de estruturas moleculares em solução (estrutura peptídica dissolvida), o que efetivamente é encontrado para o pH 7,78, onde o peptídeo Jaburetox-2Ec encontra-se na forma não-agregada em solução. Já para a situação onde o peptídeo encontra-se agregado, observou-se valores iguais ou maiores que 2,5. Em sistemas biológicos encontra-se fractalidades entre 2,73 e 2,79, como por exemplo, ao se analisar os brônquios pulmonares, ou mais especificamente, a forma como as estruturas se reproduzem ao longo dos pulmões. Os valores de fractalidade  $d$  encontrados neste trabalho para o peptídeo agregado (pH 5,15, por exemplo), considerando-se que deve-se estimar um erro absoluto em torno de 10%, apontam para estruturas fractais de crescimento irregular, semelhantemente ao que observa-se em sistemas biológicos. Este fato torna relevante a necessidade de aprofundar-se o conhecimento sobre os mecanismos de agregação que ocorrem em sistemas desta natureza, pois os mesmos obedecem a interações possíveis (estatisticamente determinadas), e não apenas a interações prováveis entre diferentes moléculas. Deve-se salientar ainda que o parâmetro  $d$  corresponde nesse trabalho a uma fractalidade estatística, sujeita, portanto a uma variação própria dos sistemas biológicos.

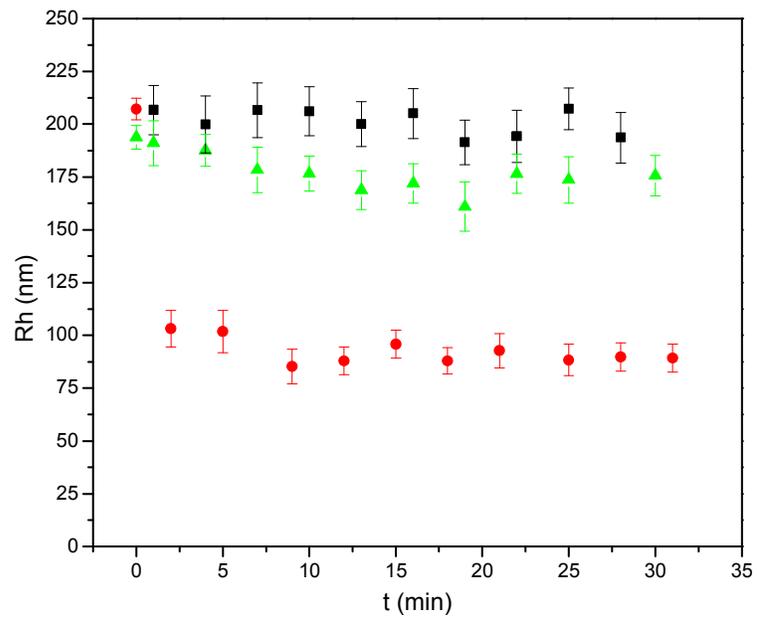
## **4.2. Interação com membranas lipídicas**

### **4.2.1. Raio hidrodinâmico dos lipossomas**

O espalhamento de luz dinâmico também foi usado para analisar os efeitos do Jaburetox-2Ec nos raios hidrodinâmicos de vesículas lipossômicas miméticas de plaquetas humanas. Os lipossomas foram suspensos em solução de NaCl 0,15 M, pH 7,0 e o seu tamanho foi monitorado ao longo do tempo, tendo sido adicionado 0,025 mg/mL (1,9  $\mu$ M) de Jaburetox-2Ec após a primeira medida. A Figura 6 compara os resultados de amostras de lipossomas puros em solução salina e lipossomas na presença do peptídeo. Lipossomas foram também exposto ao detergente Triton X-100 1% como para comparação.

Embora tenha ocorrido uma pequena diminuição de tamanho do lipossomas na presença de peptídeo, essa não parece ser significativa para demonstrar claramente que o Jaburetox-2Ec cause um efeito sobre o tamanho das vesículas. A análise do efeito do Triton X-100 foi realizado com propósitos comparativos, já que esperava-se um efeito inequívoco do detergente sobre as membranas lipossômicas. Foi observado que, na presença do detergente, as vesículas foram prontamente reduzidas à metade do seu tamanho original. No entanto, observou-se que as vesículas não foram completamente destruídas no tempo de análise do experimento, tendo se reorganizado na presença do Triton X-100 para formarem um nova população com tamanho menor (com ~50% do Rh original) – que pode estar composta de vesículas menores (ataque do Triton X-100 às bicamadas lipídicas mais externas do lipossoma), bem como de micelas lipídicas formadas no meio devido à liberação/desorganização dos lipídeos a partir do ataque do detergente às vesículas lipossômicas – que se mostraram estáveis nas condições do experimento.

Devido aos lipossomas terem sido inicialmente suspensos em água ultra-pura, após a sua diluição em solução salina, espera-se que a diferença de pressão osmótica entre o interior e exterior dos lipossomas resulte numa gradual passagem de NaCl para o interior dos mesmos. No entanto, devido à característica multilamelar dos lipossomas, acredita-se que esse efeito ocorra num espaço de tempo maior que o do experimento. É possível que a formação de poros nas lamelas exteriores pela ação do Jaburetox-2Ec afete o processo, no entanto, a diferença de raio hidrodinâmico observada não é suficientemente significativa para comprovar esse efeito.



**Figura 6.** Raios hidrodinâmicos (Rh) em função do tempo para as vesículas lipossômicas em solução salina NaCl 0,15 M (quadrados pretos), na presença de Jaburetox-2Ec 0,5 mg/mL (triângulos verdes) e de Triton X-100 1% (círculos vermelhos).

#### 4.2.2. SAXS

Os resultados de SAXS foram obtidos na forma de imagens 2D, as quais foram ajustadas levando em conta o ruído escuro e uma amostra “branca” contendo apenas solução de NaCl 0,15 M. Essas tiveram então a suas intensidades integradas ao longo de um intervalo de sua circunferência e foram convertidas em gráficos lineares através do programa Fit2D (HAMMERSLEY). As diferentes intensidades obtidas em relação ao ângulo de espalhamento, e consequentemente o formato do gráfico obtido, são representados pelo efeito dos fatores forma e estrutura, tais como descritos na Eq. 14.

Para realizar o ajuste teórico dos espectros experimentais foi utilizado um modelo teórico, disponível no software SASFit (ver. 0.89) (KOHLBRECHER, 2009). Nesse modelo, o fator forma  $P(q)$  foi baseado em um modelo de vesícula composta de bicamada lipídica (KOHLBRECHER, 2009) usando uma distribuição logarítmica normal (KOHLBRECHER, 2009), tal como dado abaixo;

$$I(q) = \left( \begin{aligned} &K(q, R_c, \eta_{sol} - \eta_t) + K(q, R_c + t_t, \eta_t - \eta_h) \\ &+ K(q, R_c + t_t + t_h, \eta_h - \eta_t) + K(q, R_c + 2t_t + t_h, \eta_t - \eta_{sol}) \end{aligned} \right)^2 \quad (\text{Eq. 16})$$

com

$$K(q, R, \Delta\eta) = \frac{4}{3} \pi R^3 \Delta\eta^3 \frac{\sin qR - qR \cos qR}{(qR)^3} \quad (\text{Eq. 17})$$

Os parâmetros utilizados no ajuste das curvas foram o raio do núcleo micelar  $R_c$ , a espessura da parte externa da bicamada (grupo cabeça)  $t_h$ , a espessura da parte interna da bicamada (grupo cauda)  $t_t$ , a densidade de espalhamento da parte externa da bicamada  $\eta_h$ , a densidade de espalhamento da parte interna da bicamada  $\eta_t$  e a densidade de espalhamento do solvente  $\eta_{sol}$ . (Figura 7)

O fator estrutura  $S(q)$  foi modelado utilizando-se uma estrutura multi-lamelar tal como dada pela teoria de Caillé modificada (MCT) (ZHANG et al., 1994) usando uma aproximação monodispersa.

$$S_{MC}(q, R, d, \eta_1, \gamma) = \sum_{N_K=N-2\sigma}^{N+2\sigma} x_K S_{K,MC} \quad (\text{Eq. 18})$$

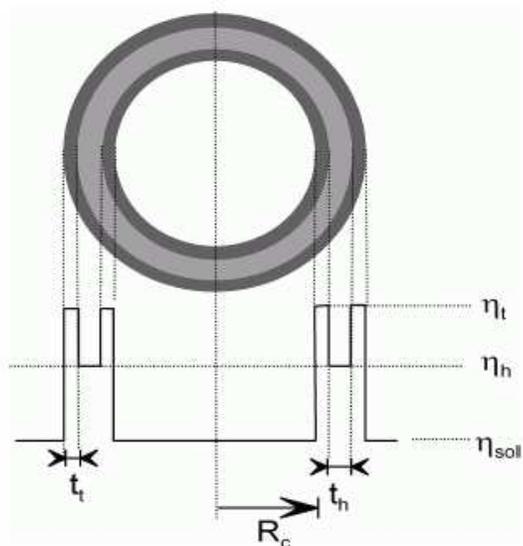
com

$$S_{K,MC} = N_K + 2 \sum_{m=1}^{N_K+1} (N_K - m) \cos(mqd) e^{-\left(\frac{d}{2\pi}\right)^2 q^2 \eta \gamma} (\pi m) e^{-\left(\frac{d}{2\pi}\right)^2 q^2 \eta_1} \quad (\text{Eq. 19})$$

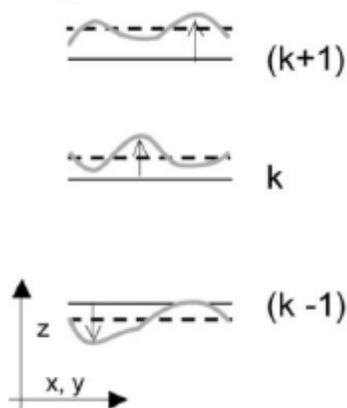
Os parâmetros considerados aqui foram o número total de bicamadas no domínio de espalhamento  $N$ , a distância de separação entre as bicamadas  $d$ , o parâmetro de Caillé  $\eta$ , que consiste numa medida para as flutuações da bicamada conforme representadas na Fig. 8, e a constante escalar de espalhamento difuso adicional  $Nu$ .

A Figura 9a mostra o sistema contendo apenas os lipossomas em solução salina. A linha vermelha corresponde ao ajuste obtido a partir dos modelos descritos acima. As duas linhas na figura 9b correspondem às contribuições separadas do fator forma  $P(q)$  e do fator estrutura  $S(q)$ . O pequeno “ombro” visível na curva experimental em 9a, na faixa de  $q \sim 5,5$  corresponde a irregularidades na membrana na faixa de 10 nm (FERNANDEZ et al., 2008). Os parâmetros obtidos desse ajuste estão listados na Tabela 3.

Os resultados na Tabela 3 são consistentes com um sistema de vesículas relativamente monodispersas com estrutura multilamelar. A figura 9b mostra o modelo do ajuste decomposto em seus fatores forma e estrutura. Esse fator forma é característico de vesículas bicamada de grande raio e não-interativas em solução. O formato da curva não é afetado pelo tamanho da vesícula inteira, já que o raio total dessa está além da faixa de  $q$  coberta pela técnica de SAXS. A forma do pico largo principal da curva é influenciada pela espessura dos grupos “cabeça” polares e das “caudas” hidrofóbicas dos componentes lipídicos da bicamada, que possuem densidades eletrônicas diferentes. O pico do fator estrutura é causado por difração de Bragg entre múltiplas lamelas de bicamadas na vesícula. A distância de separação  $d$  entre essas camadas pode ser obtida a partir do valor de  $q$  em que esse aparece no espalhamento. Como visto na Tabela 2, a distância obtida para esse ajuste foi de aproximadamente 6,2 nm.



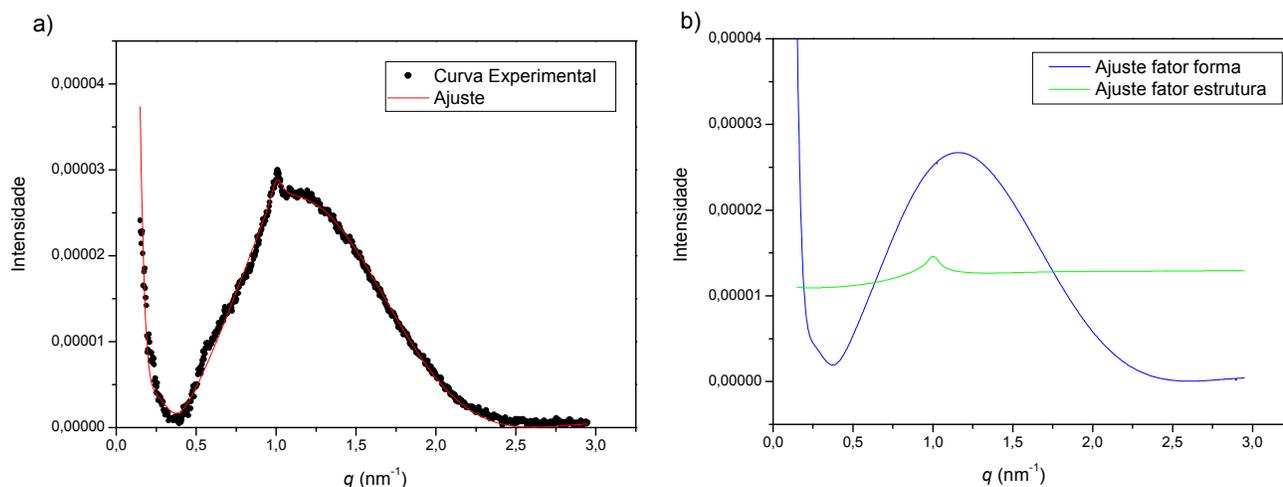
**Figura 7:** Modelo teórico de vesícula bicamada (KOHLBRECHER, 2009).



**Figura 8:** Flutuações na fase  $L\alpha$  da vesícula lipossômica causadas por ondulações de bicamada.

Os picos resultantes são descritos pela MCT (KOHLBRECHER, 2009).

Usando ambos os modelos, foi possível ajustar curvas teóricas aos dados experimentais e inferir, a partir dos parâmetros que geraram os melhores ajustes, as propriedades das amostras.



**Figura 9.** Dados de SAXs para as vesículas lipossômicas em solução de NaCl 0,15 M. Os valores de intensidade das imagens de espalhamento foram integrados e plotados em gráficos. As curvas experimentais assim obtidas foram tratadas no programa SASFit de modo a ajustar os modelos teóricos aos resultados experimentais. a) A curva sólida representa o modelo de ajuste descrito no texto. b) Decomposição do modelo de ajuste em seus fatores forma (azul) e estrutura (verde).

**Tabela 2.** Parâmetros físicos dos modelos utilizados no ajuste da curva de SAXS na figura 9, tais como descritos na seção 4.2.2.  $R_c$ ,  $t_h$ ,  $t_t$  e  $d$  são dados em nm.

Amostra	Fator Forma						Fator Estrutura		
	$R_c$	$t_h$	$t_t$	$\eta_h$	$\eta_t$	$\eta_{sol}$	N	d	$\eta$
Lipossomas	150*	1.406	2.292	5.6576	5.66073	5.6591	13.73	6.23	0.96

\*O valor de  $R_c$  foi mantido fixo

A Figura 10 mostra um sistema similar de lipossomas em solução salina, com a adição do peptídeo Jaburetox-2Ec (pH 7,5) a uma concentração de 0,1  $\mu$ M imediatamente antes da análise. Foram obtidas, em seqüência, 4 imagens do espalhamento resultante, cada uma com um tempo de exposição de 10 minutos. Foi realizada também uma análise da mesma amostra após 12 horas (720 min).

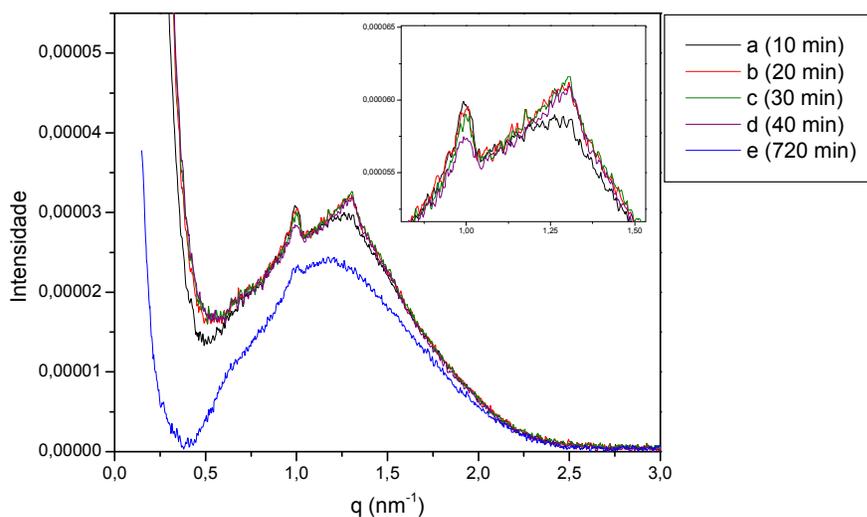
Os gráficos obtidos para as análises nos primeiros 40 minutos são similares ao gráfico apresentado na Figura 9. A principal diferença é o aparecimento de um pico de intensidade crescente em  $q \sim 1,3$ . Comparando os máximos dos picos  $q \sim 1,0$  e  $q \sim 1,3$  entre as medidas *a* e *d*, pode se verificar que o pico  $q \sim 1,0$  é inicialmente mais intenso que o pico  $q \sim 1,3$ , mas que ao longo do tempo há uma inversão na intensidade dos mesmos. No entanto a mesma amostra, medida após 12 horas, revela um pico  $q \sim 1,0$  consideravelmente menos intenso e o pico em  $q \sim 1,3$  torna-se irrelevante.

Foi analisada também uma amostra similar para a qual foi adicionado o peptídeo Jaburetox-2Ec a uma concentração de 0,5  $\mu$ M. Foram obtidas, para essa amostra, 3 imagens de espalhamento ao longo de 30 minutos, bem como uma análise da mesma amostra após 12 horas (720 min). Os resultados estão apresentados na Figura 11.

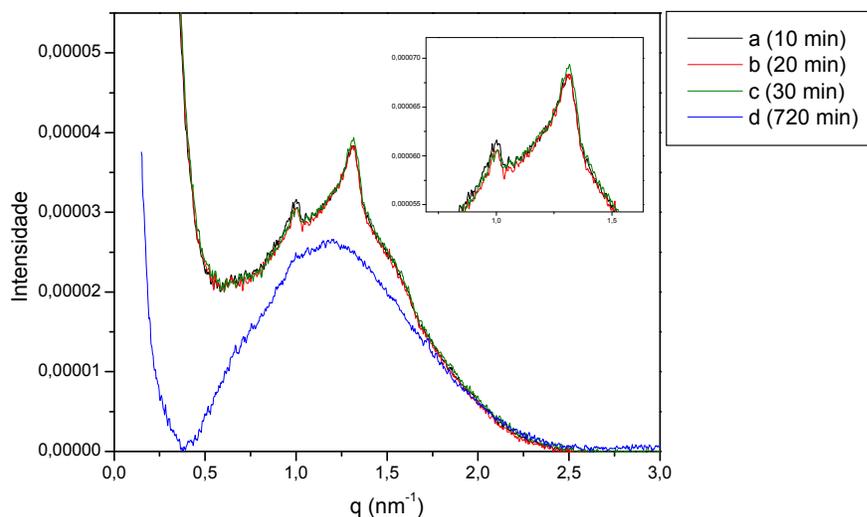
Em contraste com a amostra contendo 0,1  $\mu$ M de peptídeo, nessa amostra foi observado já na primeira medida um pico em  $q \sim 1,3$  muito mais intenso que o pico em  $q \sim 1,0$ . E diferentemente da amostra anterior, não se verificou nenhuma mudança de intensidade significativa ao longo das medidas. Na medida após 12 horas (720 min), nenhum dos dois picos permanece claramente visível, possivelmente devido ao efeito prolongado do peptídeo que causa a diminuição ou desaparecimentos das multilamelas.

Uma comparação entre os resultados das Figuras 10 e 11 sugere que o efeito do Jaburetox-2Ec sobre os lipossomas é dose-dependente, sendo mais rápido e pronunciado na concentração de 0,5  $\mu$ M, sendo que em uma concentração de 0,1  $\mu$ M ainda é possível observar o seu efeito ocorrendo durante o tempo de análise.

Os melhores ajustes obtidos para os sistemas de lipossomas na presença de Jaburetox-2Ec consideraram os dois picos principais como originários de dois fatores estrutura diferentes, sobre o mesmo fator forma.



**Figura 10:** Dados de SAXS para as vesículas lipossômicas em solução de NaCl 0,15 M após a adição de Jaburetox-2Ec à uma concentração de 0,1  $\mu\text{M}$ . As diversas linhas representam medidas finalizadas nos tempos indicados na legenda. No canto superior direito pode-se visualizar uma ampliação dos dois picos principais e a sua variação ao longo do tempo.

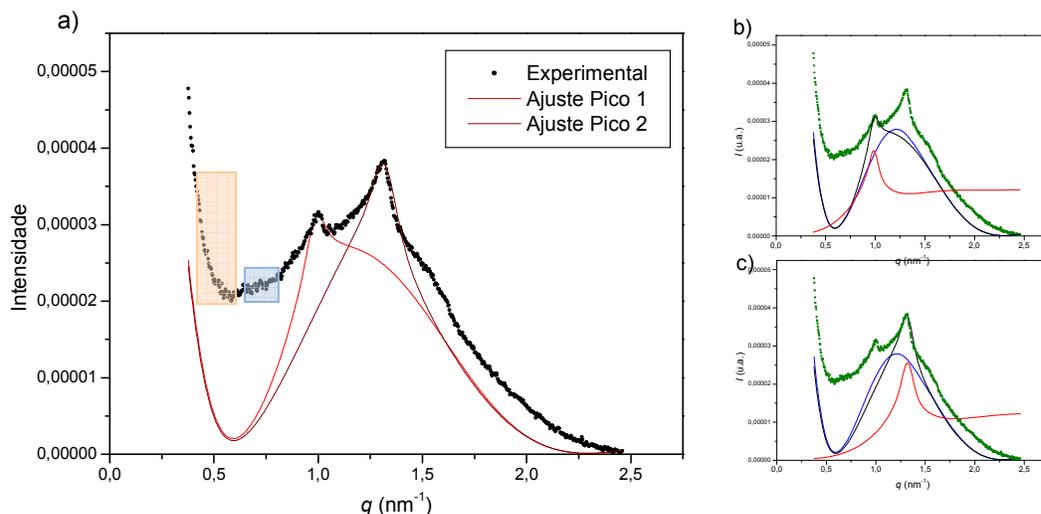


**Figura 11:** Dados de SAXS para as vesículas lipossômicas em solução de NaCl 0,15 M após a adição de Jaburetox-2Ec à uma concentração de 0,5  $\mu\text{M}$ . As diversas linhas representam medidas finalizadas nos tempos indicados na legenda. No canto superior direito pode-se visualizar uma ampliação dos dois picos principais e a sua variação ao longo do tempo.

Na Figura 12 estão representados os ajustes da curva de SAXS dos lipossomas na presença de Jaburetox-2Ec 0,5  $\mu$ M (medida  $a$  da Fig. 11). As Figuras 12b e 12c mostram cada um dos ajustes decompostos em seus fatores forma e estrutura.

A Tabela 3 lista os parâmetros obtidos da modelagem para ambos os picos do gráfico. A principal diferença entre os dois modelos foi a distância de separação entre as bicamadas  $d$ , para a qual foi encontrado um valor de 6,23 nm para o primeiro pico, valor similar ao obtido na modelagem dos lipossomas puros em solução (como visto na Tabela 2), e um valor consideravelmente menor de 4,72 nm para o segundo pico, causado pela interação do peptídeo com os lipossomos. A maior intensidade da curva experimental para o mínimo em  $q \sim 0,5$  – indicado pela caixa vermelha na Figura 12a – em comparação ao fit teórico e à curva da amostra contendo apenas lipossomas vista na Figura 9, é provavelmente devido à presença de aglomerados do peptídeo na solução. Um pequeno pico correspondendo à irregularidades da membrana também pode ser reconhecido em  $q \sim 0,55$ , indicado pela caixa azul na Figura 12.

Experimentos de SAXS com os lipossomos sob efeito da urease (JBU) e de Triton X-100 também foram realizados, bem como ajustes preliminares para gráficos reslutantes. Em ambos os casos os resultados se mostraram notadamente diferentes dos obtidos com a adição apenas do peptídeo Jaburetox-2Ec. Esses experimentos estão discutidos no Anexo I.



**Figura 12.** Dados de SAXS para as vesículas lipossômicas em solução de NaCl 0,15 M após a adição de Jaburetox-2Ec à uma concentração de 0,5  $\mu\text{M}$ . a) As curvas sólidas representam os dois diferentes ajustes que constituem as maiores contribuições à curva experimental. A região marcada pela caixa azul indica irregularidades na membrana da ordem de 10 nm. A região da caixa vermelha indica a presença de aglomerados de peptídeos livres na solução. b) e c) Decomposição dos modelos de ajuste em seus fatores forma (azul) e estrutura (vermelho). O fator forma é o mesmo para os dois ajustes e os fatores estrutura estão ajustados para representar cada um dos dois picos principais na curva experimental.

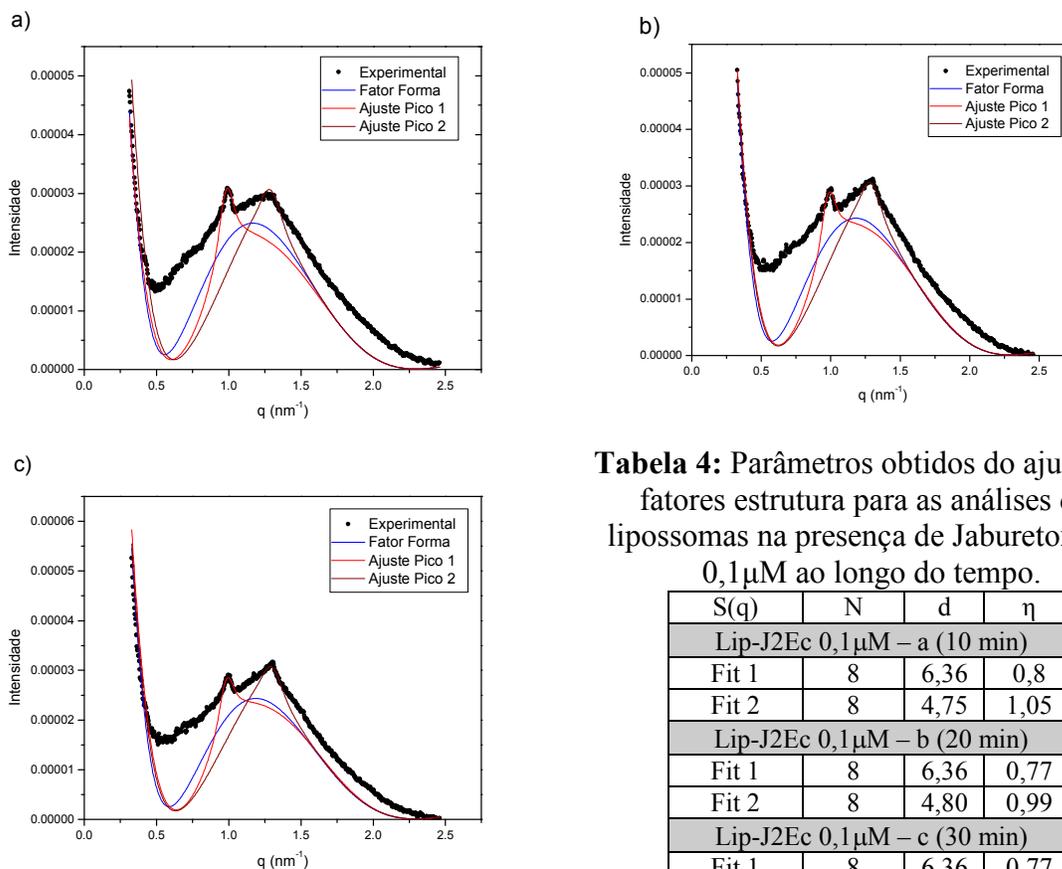
**Tabela 3.** Parâmetros da amostra de lipossomas na presença de Jaburetox-2Ec 0,5  $\mu\text{M}$  obtidos dos ajustes 1 e 2, levando em consideração o primeiro e segundo pico, respectivamente.  $R_c$ ,  $t_h$ ,  $t_t$  e  $d$  são dados em nm.

Lip-J2Ec	Fator Forma						Fator Estrutura		
	$R_c$	$t_h$	$t_t$	$\eta_h$	$\eta_t$	$\eta_{sol}$	N	d	$\eta$
Ajuste 1	150*	1.38	2.75	5.6577	5.66005	5.6594	9	6.32	0.96
Ajuste 2	150*	1.38	2.75	5.6577	5.66005	5.6594	9	4,72	0.85

\*O valor de  $R_c$  foi mantido fixo.

Uma possível explicação para o aparecimento do segundo pico é a criação de poros na membrana por ação do peptídeo causando a aproximação entre as lamelas nas regiões afetadas, bem como alterações na rigidez da membrana. No entanto, as regiões da membrana não afetadas continuariam a contribuir para o espalhamento de maneira similar à da amostra de lipossomas puros, de modo que o primeiro pico continua visível.

As Figuras 13a, 13b e 13c mostram os ajustes para os sistemas de lipossomas na presença de Jaburetox-2Ec 0,1  $\mu$ M e como esses se diferenciam ao longo do tempo de ação do peptídeo. A Tabela 4 mostra os diferentes valores dos parâmetros dos fatores estrutura para cada medida.



**Tabela 4:** Parâmetros obtidos do ajuste dos fatores estrutura para as análises dos lipossomas na presença de Jaburetox-2Ec 0,1 $\mu$ M ao longo do tempo.

S(q)	N	d	$\eta$
Lip-J2Ec 0,1 $\mu$ M – a (10 min)			
Fit 1	8	6,36	0,8
Fit 2	8	4,75	1,05
Lip-J2Ec 0,1 $\mu$ M – b (20 min)			
Fit 1	8	6,36	0,77
Fit 2	8	4,80	0,99
Lip-J2Ec 0,1 $\mu$ M – c (30 min)			
Fit 1	8	6,36	0,77
Fit 2	8	4,77	0,99

**Figura 13:** Dados de SAXS para as vesículas lipossômicas em solução de NaCl 0,15 M após a adição de Jaburetox-2Ec à uma concentração de 0,1  $\mu$ M juntamente com as curvas de ajuste obtidas para cada pico principal e a curva de fator forma do sistema. A evolução do sistema ao longo do tempo é demonstrada na seqüência dos gráficos. a) Análise durante os 10 primeiros minutos após a adição do peptídeo. b) Análise entre 10 e 20 minutos. c) Análise 20-30 minutos

### 4.2.3. Potencial Zeta

As amostras de lipossomas para análise do PZ foram diluídas (20  $\mu$ L da suspensão de lipossomas em 10 mL de uma solução aquosa 0,1 mM de NaCl), de forma a proporcionar um meio eletrolítico. As amostras foram filtradas através de uma membrana com porosidade de 0,45  $\mu$ m e a temperatura de análise foi de 25°C.

Foram realizadas medidas de PZ para as amostras de lipossomas puros e lipossomas na presença de Jaburetox-2Ec 0,5  $\mu$ M a pH 7,1 e 5,0. Os valores de PZ resultantes estão expressos na Tabela 6.

**Tabela 6.** Valores de Potencial Zeta para as vesículas lipossômicas em solução salina na presença de Jaburetox-2Ec em diferentes valores de pH.

<b>Amostra</b>	<b>PZ (mV)</b>
Lipossomas	-19,90
+ J-2Ec pH 7,1	-35,77
+ J-2Ec pH 5,0	-30,10

O valor negativo do potencial dos lipossomas em solução indica que as vesículas apresentam superfície externa com predominância de cargas negativas, na qual os íons  $\text{Na}^+$  que estão presentes na suspensão estão sendo atraídos pela carga superficial negativa dos lipossomas. Assim, o potencial elétrico superficial dessas vesículas é negativo. Este valor de PZ pode ser explicado pela presença da fosfatidilserina (PS), que é um fosfolípido aniônico e que estaria preferencialmente na camada externa da vesícula. O fosfatidilinositol (PI) também é aniônico, mas está em pequeníssima quantidade na composição lipossômica. A fosfatilcolina (PC) e a fosfatidiletanolamina (PE) são zwitteriônicas, e portanto neutros.

O aumento do potencial negativo dos lipossomas está provavelmente relacionado a aminoácidos carregados do peptídeo, que não estão distribuídos de maneira homogênea na sua seqüência, resultando em regiões hidrofóbicas que podem se inserir no lipossomo, deixando para fora as regiões carregadas (BARROS et al., 2009). Adicionalmente, o peptídeo possui um ponto isoelétrico teórico de 5,3, o que significa que este possui uma carga bruta positiva em pH 5,0 e negativa em pH 8,1. A mudança de razão positivo/negativo entre os aminoácidos expostos pode explicar a diferença de potencial para diferentes valores de pH.

## 5. Conclusões

O peptídeo entomotóxico recombinante Jaburetox-2Ec, derivado da urease de *Canavalia ensiformis*, foi analisado por técnicas de espalhamento de luz e raios-X a fim de determinar o seu comportamento em diferentes condições. Foi verificado que o peptídeo em solução aquosa neutra apresenta-se como uma partícula com 80 nm de raio hidrodinâmico e 54 nm de raio de giro. Sua massa molar foi estimada em  $1,39 \times 10^4 \text{ mol.g}^{-1}$ , próximo ao valor teórico. O peptídeo mostrou tendência a agregar quando exposto a um meio com pH em torno de 5,5, próximo ao seu ponto isoelétrico. O comportamento de oligomerização persiste em condições de força iônica fisiológica, e não é determinado pela formação de pontes dissulfeto. Em pH 5,5, o agregado do Jaburetox-2Ec apresentou-se como uma partícula com 200 nm de raio hidrodinâmico, 128 nm de raio de giro e sua massa molar foi estimada em  $1,66 \times 10^5 \text{ mol.g}^{-1}$ , correspondendo provavelmente a um dodecâmero da forma encontrada em meio neutro.

Considerando que a estrutura tridimensional proposta para o peptídeo, bem como a suas características de oligomerização, são similares às de alguns polipeptídeos formadores de poros, o seu efeito sobre membranas lipossômicas foi estudado. Membranas miméticas de plaquetas humanas foram produzidas para estudos de interação com o peptídeo.

Para comparar as propriedades das membranas lipossômicas na ausência e na presença do peptídeo Jaburetox-2Ec, essas foram analisadas por espectroscopia de espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS). As curvas experimentais foram aproximadas por modelos teóricos usando um software de *fit*, que proveu boas aproximações em relação às curvas experimentais. A partir dos parâmetros usados para as modelagens, foi possível inferir as características físicas das vesículas lipossômicas sozinhas e em presença do peptídeo. Foi verificado que a presença de Jaburetox-2Ec causa uma significativa mudança na membrana em bicamada dos lipossomas, e que esse efeito, caracterizado pela diminuição de intensidade do pico  $q \sim 1,0$  e aparecimento de um pico intenso em  $q \sim 1,3$  no gráfico de espalhamento, se mostra mais intenso e de ação mais rápida em concentrações maiores do peptídeo. Na modelagem teórica dos gráficos, a presença desses dois picos foi representada como o efeito de dois fatores estrutura (característica da camada bilipídica) sobre um mesmo fator forma (característica da vesícula). O aparecimento do pico  $q \sim 1,3$  e o aumento de sua intensidade com a maior concentração de Jaburetox-2Ec sugere que esse provenha da contribuição de espalhamento de regiões da membrana afetadas pelo

peptídeo, enquanto o pico  $q \sim 1,0$  provêm de regiões não-afetadas. De acordo com a modelagem, as principais diferenças entre os dois fatores estrutura são a diminuição da distância de espaçamento inter-lamelar  $d$  na presença do peptídeo e o parâmetro de Caillé  $\eta$ , indicativo de um aumento na rigidez da membrana.

## 6. Referências bibliográficas

ANFISEN C.B., HABER, E. Studies on the Reduction and Re-formation of Protein Disulfide Bonds. *J. Biol. Chem.*, Vol. 236, 5:1361-1363, 1961

BALASUBRAMANIAN, A., PONNURAJ, K., Crystal structure of the first plant urease from jack bean: 83 years of journey from its first crystal to molecular structure. *J Mol Biol.* 400(3): 274-83, 2010.

BARROS, P.R., STASSEN, H., FREITAS, M.S., CARLINI, C.R., NASCIMENTO, M.A.C., FOLLMER, C., Membrane-disruptive properties of the bioinsecticide Jaburetox-2Ec: implications to the mechanism of the action of insecticidal peptides derived from ureases. *Biochimica et Biophysica Acta. Proteins and Proteomics.* 1794: 1848 - 1854, 2009.

BENNET, J., WREN, E. A., The interaction of p-nitrophenyl carbamate with urease. *Biochim. Biophys. Acta.* 482: 421-426, 1977.

BROOKHAVEN INSTRUMENTS, Instruction manual for BI-200SM Goniometer Ver 2.0, Sec. VIII-5, Brookhaven Instruments Corporation, New York, 1989.

BRADFORD, M.M., Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254, 1976.

BRAVO A. *et al.*, Bacillus thuringiensis Cry1Ab Mutants Affecting Oligomer Formation Are Non-toxic to *Manduca sexta* Larvae. *J. Biol. Chem.*, 282, 29: 21222-21229, 2007.

BROGDEN, K. A., Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 238–250, 2005.

BROWN, W. (ed.) Light Scattering, Principles and Development. Oxford: Clarendon Press, 1996.

BURCHARD, W., Solubility and solution structure of cellulose derivatives, *Cellulose*, 10: 213-225, 2003.

CARLINI, C.R., GUIMARÃES, J.A., Isolation and characterization of a toxic protein from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds, distinct from concanavalin A. *Toxicon*, 19: 667-676, 1981.

CARLINI, C. R., Polacco, J. C. Toxic properties of ureases. *Crop Science.* , v.48, p.1665 - 1672, 2008.

CARLINI, C.R., GOMES, C.B., GUIMARÃES, J.A. Central nervous effects of the convulsant-protein canatoxin. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 54: 161-166, 1984.

CASAL, E., GALAN, A.M., ESCOLAR, G., GALLARDO, M., ESTELRICH, J. Physical stability of liposomes bearing hemostatic activity. *Chemistry and Physics of Lipids*, 125: 139-146, 2003.

ExPASy Proteomics Server. Disponível em: <<http://ca.expasy.org/>> . Acesso em: 22 nov. 2007.

FERNANDEZ, R.M., RISKE, K.A. AMARAL, L.Q., ITRI, R., LAMY M.T., Influence of salt on the structure of DMPG studied by SAXS and optical microscopy, *Biochimica et Biophysica Acta* 1778: 907–916, 2008.

FERREIRA-DASILVA, C.T., GOMBAROVITS, M.E., MASUDA, H., OLIVEIRA, C.M., CARLINI, C.R., Proteolytic activation of canatoxin, a plant toxic protein, by insect cathepsin-like enzymes. *Arch. Insec.t Biochem. Physiol.* 44(4): 162–71, 2000.

FOLLMER, C., BARCELLOS, G.B.S., ZINGALI, R.B., MACHADO, O.L.T., ALVES, E.W., BARJA-FIDALGO, C.; GUIMARÃES, J.A., CARLINI, C.R. Canatoxin, a toxic protein of jackbeans (*Canavalia ensiformis*), is a variant form of urease (EC 3.5.1.5). Biological effects of urease independent of its ureolytic activity. *Biochem. J.* 360: 217-224, 2001.

FOLLMER, C., CARLINI, C.R., YONEAMA, M.L., DIAS, J.F., PIXE analysis of urease isoenzymes isolated from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds. *Nuclear Instrumentation and Methods in Physics Research Part B* 189: 482-486, 2002.

FOLLMER, C., PEREIRA, F.V., SILVEIRA, N.P., CARLINI, C.R. Jack bean urease (EC 3.5.1.5) aggregation monitored by dynamic and static light scattering. *Biophys. Chem.* 111: 79-87, 2004a.

FOLLMER, C., REAL-GUERRA R., WASSERMAN, G.E., OLIVEIRA-SEVERO D., CARLINI, C.R., Jackbean, soybean and *Bacillus pasteurii* ureases: biological effects unrelated to ureolytic activity. *Eur. J. Biochem.* 271: 1357–63, 2004b.

FOLLMER, C., Insights into the role and structure of plant ureases. *Phytochem.* 69: 18-28, 2008.

GHANI, E.M.A. *et al.*, Streptolysin O: Inhibition of the Conformational Change during Membrane Binding of the Monomer Prevents Oligomerization and Pore Formation. *Biochemistry*, 38: 15204-15211, 1999.

GONZALEZ, M.R., BISCHOFBERGER, M., PERNOT, L., VAN DER GOOR, F.G., FRÊCHE, B., Bacterial pore-forming toxins: The (w)hole story? *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 493–507, 2008.

HAMMERSLEY, A.P., FIT2D V9.129 Reference Manual V3.1, *ESRF Internal Report, ESRF98HA01T*, 1998. <http://www.esrf.eu/computing/scientific/FIT2D/>

HARRISON, A., *Fractals in Chemistry*, Oxford Ed., 1995.

KOHLBRECHER J., SASfit: A program for fitting simple structural models to small angle scattering., <http://kur.web.psi.ch/sans1/SANSSoft/sasfit.html>, 2009

LAM, H.M., COSCHIGANO, K.T., OLIVEIRA, I.C., MELO-OLIVEIRA, R., CORUZZI, G.M. The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 569-593, 1996.

MALVERN INSTRUMENTS, Zetasizer Nano Series User Manual. England: Malvern Instruments, 2004

MELTON-WITT, J.A., BENTSEN, L.M., TWETEN, R.K., Identification of Functional Domains of *Clostridium septicum* Alpha Toxin. *Biochemistry*, 45: 14347-14354, 2006.

MENEZ, A. Functional architectures of animal toxins: a clue to drug design? *Toxicon* 36:1557–1572, 1998.

MERTINS, O. Desenvolvimento e caracterização de nanovesículas lipossômicas compósitas de fosfatidilcolina da lecitina de soja e quitosana. Porto Alegre: UFRGS, 2004. Dissertação (Mestrado em Química), Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2004.

MERTINS, O., SEBEN, M., POHLMANN, A.R., SILVEIRA, N.P., Production of soybean phosphatidylcholine-chitosan nanovesicles by reverse phase evaporation: a step by step study, *Chemistry and Physics of Lipids*, 138(2005) 29-37.

MOBLEY, H.L., ISLAND, M.D., HAUSINGER, R.P., Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol. Rev.* 59: 451-480, 1955.

MULINARI, F., FREITAS-SILVA, M.A., GROSSI-DE-SÁ, M.F., MORAES, M.G. KURTENBACH, E. CARLINI, C.R., Toxina Praguicida, Construção Gênica e Método de Controle de Pragas. Depósito em 08/04/2004, no INPI-S, com o número 001120/RS., 2004

MULINARI, F. et al., Jaburetox-2Ec: An insecticidal peptide derived from an isoform of urease from the plant *Canavalia ensiformis*. *Peptides*, 28: 2042-2050, 2007.

NG, F.H., WONG, S.Y., NG, W.F., WONG, B.C., Prolonged storage of frozen unbuffered rapid urease test. *J. Clin. Gastroenterol.* 31: 142– 143, 2000.

PETERS, C.D., WALSH A.G., BEAUREGARD, M., Detection of an unfolding intermediate in alpha-urease with enhanced affinity for ANSA. *Biochem. Cell. Biol.* 75: 55– 61, 1997.

PIRES-ALVES, M., GROSSI-DE-SÁ, M.F., BARCELLOS, G.B.S., CARLINI, C.R., MORAES, M.G., Characterization and expression of a novel member (JBURE-II) of the urease gene family from jackbean [*Canavalia ensiformis* (L.) DC]. *Plant and Cell Physiology.*, v.44, p.139 - 145, 2003.

SIRKO, A., BRODZIK, R., Plant ureases: roles and regulation. *Acta Biochim. Pol.* 47(4): 1189-1195, 2000.

SUMNER, J.B. The isolation and crystallization of the enzyme urease. *J. Biol. Chem.* 69: 435-441, 1926.

SUMNER, J.B., HOWELL, S.F. Identification of the hemagglutinin of jackbean with Con A. *J. Bacteriol.* 32: 227-240, 1936.

UBATUBA, F.B. Occurrence of a trypsin inhibiting factor in the seeds of *Canavalia ensiformis*. *Rev. Bras. Biol.* 15: 1-8, 1955.

WANG, J.H., TARR, D.A. On the mechanism of the urease action. *J. Am. Chem. Soc.* 77: 6205-6206, 1955.

WITTE, C.P., TILLER, S.A.; TAYLOR, M.A., DAVIES, H.V. Leaf urea metabolism in potato: urease activity profile and patterns of recovery and distribution of 15 N after foliar urea application in wild type and urease-antisense transgenics. *Plant Physiol.* 128: 1129-1136, 2002.

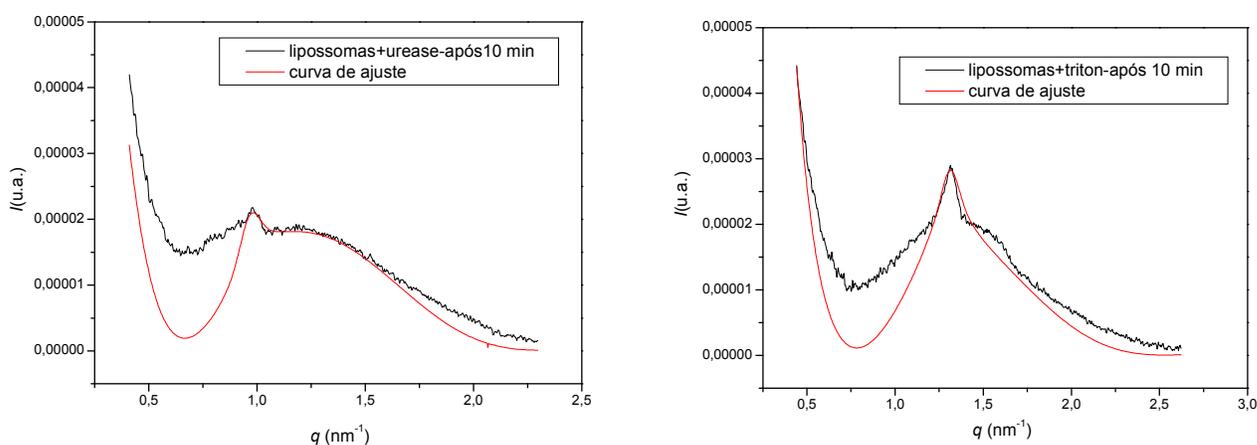
ZERNER, B., Recent advances in the chemistry of an old enzyme, *Bioorg. Chem.* 19: 116-131, 1991.

ZHANG, R., SUTER, R. M., NAGLE, J. F., Theory of the structure factor of lipid bilayers. *Phys. Rev. E.* 50:5047-5060, 1994.

ZIMM, B.H. *The Journal o Chemical Physics.* 16, 12, 1948.

## A1. Anexo I

Em comparação com os gráficos obtidos para a interação dos lipossomas com Jaburetox-2Ec representados nas figuras 10 e 11, a figura 14 apresenta os gráficos resultantes da interação dos lipossomas com a urease de *C. ensiformis* (JBU) em solução (0,5  $\mu\text{M}$ ) (a) e com o detergente Triton X-100 (1% v/v) (b), bem como os respectivos ajustes teóricos. Embora esses resultados não sejam analisados a fundo nesse trabalho, é possível verificar que o efeito do peptídeo Jaburetox-2Ec sobre os lipossomas foi significativamente distinto dos efeitos de tanto a JBU quanto do Triton X-100.



**Figura 14.** Dados de SAXS para as vesículas lipossômicas em solução de NaCl 0,15 M após a adição de JBU à uma concentração de 0,5  $\mu\text{M}$  (esquerda) e Triton X-100 a 1% v/v (direita). As curvas sólidas vermelhas representam os ajustes teóricos obtidos.