



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



INSTITUTO DE QUÍMICA

Campus Araraquara

Síntese em Fase Sólida e Estudos Con-
formacionais de Análogos Contendo
TOAC de um Peptídeo da Rã *Hypsiboas*
albopunctatus

EDUARDO FESTOZO VICENTE

Araraquara
2009

EDUARDO FESTOZO VICENTE

Síntese em Fase Sólida e Estudos Conformacionais
de Análogos Contendo TOAC de um Peptídeo da Rã
Hypsiboas albopunctatus

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli
Co-Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Marchetto

Araraquara

2009

EDUARDO FESTOZO VICENTE

Síntese em Fase Sólida e Estudos Conformacionais
de Análogos Contendo TOAC de um Peptídeo da Rã
Hypsiboas albopunctatus

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Biotecnologia.

Araraquara, 24 de julho de 2009.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli (Orientador)
Instituto de Química - UNESP, Araraquara.

Prof. Dr. Clovis Ryuichi Nakaie
Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP, São Paulo.

Prof. Dr. Antonio José da Costa Filho
Instituto de Física de São Carlos - Universidade de São Paulo - USP, São Carlos.

*Aos meus pais, Heloisa e Ado, que em todos
os momentos da minha vida me apoiaram in-
condicionalmente para que eu pudesse atingir
meus objetivos. Sou eternamente grato pelo
que fizeram e fazem por mim.
Muito obrigado. Amo vocês demais.*

AGRADECIMENTOS

A **DEUS**, que sempre me deu forças para continuar lutando e nunca me abandonou em momento algum de minha caminhada. Obrigado Senhor por ter me dado a oportunidade de encarar a vida com tanto otimismo e alegria.

A toda minha família: ao meu irmão **Henrique**, meus avôs **João** e **Alberto**, minhas avós **Heleninha** e **Maria**; aos meus tios e tias, em especial meu padrinho tio “**Casoberto**” e tio “**Cao**”, pelas discussões “científicas” nas horas de lazer; aos meus primos e primas, em especial a **Marina**, minha companheira de pós-graduação. Ao meu afilhado **Leandro**, que mesmo longe na distância, está bem perto aqui, do meu coração. Amo muito todos vocês.

Ao meu Professor, Orientador e Amigo, Dr. **Eduardo Maffud Cilli**, a quem eu considero como exemplo de sabedoria, honestidade, ética e profissionalismo, além de servir para mim como o conceito de educador e orientador. Muito obrigado por tudo o que você fez e por ter depositado a sua confiança em mim por estes sete anos de convivência, trabalho e muito aprendizado que, mesmo de perto ou de muito longe, levarei guardado comigo pelo resto da vida o orgulho de ter trabalhado ao seu lado.

Ao professor Dr. **Reinaldo Marchetto**, que certamente contribuiu em muito para o meu conhecimento e valores para que eu pudesse concluir meu trabalho. Obrigado por ter “cuidado” de nós quando estávamos sem o Prof. Eduardo por aqui!

Ao Dr. **Alberto Alécio (Albertinho)** pelos experimentos no espectrômetro de massas. Obrigado pelas risadas, pelos momentos de descontração e pelas análises realizadas.

Aos meus amigos de coração e de laboratório **Crusca**, **Juquinha**, **Wanessa**, **Graziely** e **Saulo**, que têm me acompanhado por vários anos da minha vida. Obrigado por todo apoio pessoal e profissional que me deram (e que apoio!), porque só vocês sabem o que passamos. Obrigado por me levantarem quando caí, pelos conselhos tão valiosos e por todo o carinho que vocês têm me dado. Vocês fizeram e fazem a minha vida melhor.

A todos os meus amigos que participaram, acompanharam e contribuíram de alguma forma na minha vida acadêmica: **Ronaldo Ghandi**, **Messias**, **Luizão**, **Anderson**, **Davi Pardal**, **Rodrigo**, **Amanda**, **Flávia**, **Mônica**, **Araketu**, **Adrielle**, **Simone** e **Ana Lígia** (USP - RP), **Saska**, **Camila**, **Estebán**, **Vanessa**, **Michele** e **Omar**.

Aos meus amigos/irmãos do peito, companheiros da República Caverna, os cavernosos, que me acompanharam durante todos esses anos e que continuam até hoje, e também à nossa “mãezona” de Araraquara, a **Sílvia**. Em especial, aos meus “irmãos mais velhos” **Leandro Zulu** e **Rodolfo Guaíamum**, que sempre me ajudaram, incentivaram e estiveram ao meu lado quando eu mais precisei. Muito obrigado a todos.

À minha querida turma de amigos de Bebedouro, o *Baxaria*, com os quais mantenho laços de verdadeira amizade até hoje, desde o tempo de colegial. Seria impossível citar o nome de cada um, pois são muitos os integrantes desta família. Mas, tenham a certeza que todos estão dentro do meu coração. Obrigado pelo carinho, pela amizade e por tantos bons momentos vividos com vocês.

Aos amigos da Associação dos Pós-Graduandos do Instituto de Química (APG-IQ), pois despertaram em mim uma visão mais realista, política e também otimista de nossa pós-graduação. Obrigado por terem contribuído para minha formação pessoal e profissional.

A toda família **Reiff Janini**, em especial à **Ana Paula**, que me ajudaram a construir um pedaço de meu caminho. Sou muito grato pelo apoio, por toda a ajuda concedida, pelo incentivo e por todo o amor e carinho que foi dado a mim por vocês. Vocês foram essenciais para esta vitória de minha vida.

Ao pessoal da Seção de Pós-Graduação, **Célia, Sandra e Wênia**, por toda a atenção despendida, pelos serviços prestados, pela paciência comigo e pelos momentos de descontração; ao pessoal da Biblioteca, em especial a **Cristina** e a **Valéria**, que me ajudaram na confecção das referências e pela total atenção dada a mim.

Aos nossos professores colaboradores, sem os quais não seria possível a conclusão deste trabalho: **Prof. Dr. Antonio José da Costa Filho (Jabah)**, **Prof^a. Dr^a. Maria José Mendes Giannini (Zezé)** e **Prof^a. Dr^a. Mariana de Souza Castro**.

Às agências de fomento CAPES, FAPESP, CNPq e FUNDUNESP pelo auxílio e suporte financeiro, sem os quais este trabalho não seria realizado.

A todas pessoas da UNESP - Araraquara que contribuíram, diretamente ou indiretamente, para o meu trabalho. Sempre irei lembrar do que fizeram por mim. Muito obrigado, meus amigos e companheiros.

*"Na busca por mim, descobri a verdade. Na busca pela verdade, descobri o amor.
Na busca pelo amor, descobri Deus. E em Deus, tenho encontrado tudo."*

*"As pessoas esquecerão o que você disse.
As pessoas esquecerão o que você fez.
Mas elas nunca esquecerão
Como você as fez sentir."*

"Se tivesse acreditado na minha brincadeira de dizer verdades, teria ouvido as verdades que insisto em dizer brincando. Falei muitas vezes como um palhaço, mas nunca desacreditei da sinceridade da platéia que sorria."

Charles Chaplin

*"Antes de falar, escute. Antes de escrever, pense. Antes de gastar, ganhe.
Antes de julgar, espere. Antes de rezar, perdoe. Antes de desistir, tente."*

*"O mais importante em qualquer jogo não é vencer, mas participar.
Da mesma forma, o mais importante na vida não é o triunfo, mas o empenho.
O essencial não é ter vencido, mas ter lutado bem."*

*"Quando cometer um erro, não olhe para trás por muito tempo.
Analise as coisas e então olhe para diante.
Erros são lições de sabedoria. O passado não pode ser mudado.
O futuro ainda está em seu poder."*

*"Enquanto navega pela vida
Não evite tempestades e águas bravias.
Apenas deixe-as passar.
Apenas navegue."*

*Sempre se lembre:
mares calmos não fazem bons marinheiros."*

RESUMO

Nas últimas décadas, um grande número de peptídeos antimicrobianos tem sido isolado de várias espécies de seres vivos, fazendo parte da sua imunidade inata. Estes peptídeos possuem algumas características em comum: 1) apresentam carga positiva (grande ocorrência de aminoácidos básicos); 2) possuem um porcentual considerável de aminoácidos hidrofóbicos e 3) apresentam grande tendência de adotarem estruturas secundárias anfipáticas. Devido à sua propriedade de permeabilizar e destruir membranas bacterianas, levando-as à morte, estes peptídeos são um foco de interesse no desenvolvimento de novos antibióticos. Um modo de estudo destas moléculas é por meio da adição de marcadores na sequência peptídica, permitindo relacionar as propriedades conformacionais com a atividade biológica envolvida. Desta forma, este trabalho teve como objetivo sintetizar e avaliar 3 análogos de um novo peptídeo antimicrobiano extraído da pele da rã *Hypsiboas albopunctatus* de sequência GWLDVAKKIG-KAAFNVAKNF(I/L), denominado de hilina C (*hyC*), a fim de obter informações a respeito do seu mecanismo de ação e estruturação frente a miméticos de membrana. Os análogos possuem o composto paramagnético ácido 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-N-oxil-4-amino-4-carboxílico (TOAC) substituindo os aminoácidos alanina na posição 13 e triptofano na posição 2, ou adicionado na extremidade N-terminal do peptídeo. Os peptídeos foram sintetizados por Síntese Peptídica em Fase Sólida (SPFS) utilizando a estratégia química Fmoc. As propriedades conformacionais dos peptídeos e as suas dinâmicas foram investigadas por dicroísmo circular (CD) e ressonância paramagnética eletrônica (RPE) em água, trifluoretanol (agente indutor de estrutura secundária), micelas zwitteriônicas (lisofosfatidilcolina - LPC) e em dois tipos de lipossomas de composições lipídicas diferentes: PE:PA:PC e SM:PA:PC. As atividades biológicas foram analisadas pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM) em bactérias (duas Gram-positivas e duas Gram-negativas) e pela concentração fungicida mínima (CFM) em duas espécies de fungos. O aminoácido triptofano foi usado como sonda para analisar por fluorescência a profundidade da inserção em miméticos de membrana. Os resultados mostraram que a SPFS foi viável na obtenção dos peptídeos, obtendo-se materiais com alto índice de pureza. As atividades biológicas demonstraram que, apesar das modificações, todos os peptídeos se mostraram ativos contra os microrganismos testados. No entanto, o análogo TOAC²-*hyC* apresentou em estudos de permeabilização menor atividade. Os estudos de CD evidenciaram que em solução aquosa os peptídeos não estão estruturados, assumindo em TFE e nos miméticos de membranas uma conformação contendo alto teor de α -hélice. Os estudos de fluorescência com miméticos de membranas mostraram que houve uma maior inserção do análogo TOAC¹³-*hyC* nos miméticos em relação aos demais. Os ensaios em RPE demonstraram que o peptídeo TOAC¹³-*hyC* é o que mais interage com os miméticos de membranas estudados, apresentando entre os análogos a maior imobilidade do sistema, seguido pelo TOAC²-*hyC*, sendo que o peptídeo TOAC⁰-*hyC* aparentemente não apresenta interação, se situando no exterior destes sistemas. Estes dados permitiram descrever a topologia do peptídeo na membrana, onde a região N-terminal não está imersa, a posição 2 está na interface, e a 13 está totalmente inserida. Somado a isto, o uso de lipossomas de diferentes composições possibilitou visualizar diferenças conformacionais do peptídeo, nos modelos estudados.

Palavras-chave: *Hypsiboas albopunctatus*; SPFS; fluorescência, peptídeos antimicrobianos, TOAC, RPE, CD.

ABSTRACT

In recent decades, a large number of antimicrobial peptides have been isolated from several species of microorganisms as part of their innate immunity. These peptides have some particular features: 1) positive charges (high occurrence of basic amino acids), 2) a considerable percentage of hydrophobic amino acids and 3) greater tendency to adopt amphipathic secondary structures. Due to the property of permeabilizing and destroying bacterial membranes, causing cell death, these peptides are interesting regarding the development of new antibiotics. To study these molecules, markers were added in the peptide sequence, allowing conformational properties to relate with the biological activity involved. Thus, this work aimed to synthesize and evaluate 3 analogues of a new antimicrobial peptide extracted from the skin secretion of the frog *Hypsiboas albopunctatus*, whose sequence is GWLDVAKKIGKAAFNVAKNFI/L, called Hilina C (hyC) in order to obtain information of the mechanism of action and structure of this peptide, using membrane mimetics. The analogues have the compound paramagnetic amino acid 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl-4-amino-4-carboxylic acid (TOAC) replacing the alanine at position 13 and tryptofan in position 2, or added to the end of the N-terminal peptide. The peptides were synthesized by Solid Phase Peptide Synthesis (SPPS) using the Fmoc chemistry strategy. The conformational properties of peptides and their dynamics were investigated by electronic paramagnetic resonance (EPR) and circular dichroism (CD) in water, trifluoroethanol (TFE) (secondary structure inducer agent), zwitterionic micelles (lysophosphatidylcholine - LPC) and two types of liposomes in different lipid compositions: PE:PA:PC and SM:PA:PC. The biological activities were examined by determining the minimal inhibitory concentration (MIC) in bacteria (two Gram-positive and two Gram-negative) and the minimal fungicidal concentration (MFC) in two species of fungi. The amino acid tryptophan was used as a fluorescence probe to analyze the insertion depth in the cell membrane mimetics. The results showed that the SPPS was feasible to obtain the peptides, resulting in high purity materials. The biological activities demonstrated that, despite modifications, all peptides were active against the microorganisms tested. However, permeabilization studies showed that TOAC²-hyC has lower activity than the others. The CD studies pointed that, in aqueous solution, the peptides are not structured, but in TFE and membrane mimetics, they exhibited a conformation containing a high amount of α -helix. Fluorescence studies with mimetic membranes showed a greater incorporation of the analogue TOAC¹³-hyC in this system regarding the others. The EPR assays presented that the peptide TOAC¹³-hyC interact the most with the membranes studied, showing the largest immobility of the system, followed by TOAC²-hyC. Apparently, TOAC⁰-hyC has no interaction, locating outside these systems. These findings allowed the description of the peptide topology in the membrane, where the N-terminal region is not immersed; the position 2 is in the interface, and 13 is fully inserted. Also, the use of liposomes of different compositions permitted the viewing of peptide conformational differences in the models studied.

Keywords: *Hypsiboas albopunctatus*; SPPS; fluorescence, antimicrobial peptides, TOAC, EPR, CD.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1. Aminoácidos

Ala (A)	Alanina
Arg (R)	Arginina
Asn (N)	Asparagina
Asp (D)	Ácido aspártico
Cys (C)	Cisteína
Gln (Q)	Glutamina
Glu (E)	Ácido Glutâmico
Gly (G)	Glicina
His (H)	Histidina
Ile (I)	Isoleucina
Leu (L)	Leucina
Lys (K)	Lisina
Met (M)	Metionina
Phe (F)	Fenilalanina
Pro (P)	Prolina
Ser (S)	Serina
Thr (T)	Treonina
Trp (W)	Triptofano
Tyr (Y)	Tirosina
Val (V)	Valina

2. Outras terminologias

a_N	desdobramento hiperfino
Boc	<i>t</i> -butoxicarbonila
CD	Dicroísmo Circular
CF	carboxifluoresceína
CFM	Concentração fungicida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Performance
CMC	Concentração micelar crítica
DCM	diclorometano
DIC	diisopropilcarbodiimida
DIEA	<i>N</i> -diisopropiletilamina
DMF	dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
DO	Densidade Óptica
DPPA	1,2-dipalmitoil- <i>sn</i> -glicerol-3-fosfato
DPPC	1,2-dipalmitoil- <i>sn</i> -glicerol-3-fosfocolina
DPPE	1,2-dipalmitoil- <i>sn</i> -glicerol-3-fosfoetanolamina
ϵ	coeficiente de extinção molar
Fmoc	9-fluorenilmetiloxycarboxila
HBTU	<i>o</i> -(benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônico
HC ₅₀	Concentração do peptídeo que causou 50% de hemólise
HF	fluoreto de hidrogênio
HOBt	<i>N</i> -hidroxibenzotriazol
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
K _{sv}	Constante de Stern-Volmer
LB	meio Luria-Bertane
LPC	1-palmitoil-2-hidroxi- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina
LUV	<i>Large unilamellar vesicles</i> , vesículas unilamelares grandes
MLV	<i>Multilamellar vesicles</i> , Vesículas multilamelares
NMP	<i>N</i> -metilpirrolidona
PAMs	Peptídeos antimicrobianos

SDS	Dodecil sulfato de sódio
SM	Esfingomielina
SUV	<i>Small Unilamellar Vesicles</i> , vesículas unilamelares pequenas
TFA	ácido trifluoracético
TFE	2,2,2-trifluoroetanol
TIS	triisopropilsilano
TOAC	ácido 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-N-oxil-4-amino-4-carboxílico
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UV-Vis	Luz ultravioleta e visível
WT	<i>Wild Type</i> , peptídeo selvagem

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: A rã <i>Hypsiboas albopunctatus</i> . http://www.biodiversidade.cnpem.br/FotosEspecies/Herpetofauna/Anuros/Perereca_cabrinha._Hypsiboas_albopunctatus.jpg	21
Figura 2: Modelos de ação dos peptídeos antimicrobianos. (A) “barrel-stave”, (B) “carpete” e (C) poro “toroidal”.	24
Figura 3: Representação esquemática da estrutura de uma micela formada em solução aquosa. À sua volta, podemos observar moléculas de água solvatando a micela. http://www.educa.madrid.org/web/cc.nsdelaabiduria.madrid/Ejercicios/2b/Biologia/Lipidos/micelas.jpg	25
Figura 4: Representação esquemática da estrutura de um lipossoma formado em solução aquosa. http://www.fapepi.pi.gov.br/novafapepi/sapiencia5/imagens/fotopesquisa2-1.jpg	26
Figura 5: Representação esquemática dos diferentes tipos de lipossomas, mostrando o diâmetro e o número de camadas: MLV - vesículas lipídicas multilamelares, LUV - vesículas unilamelares grandes e SUV - vesículas unilamelares pequenas.	26
Figura 6: Esquema geral representando as etapas da SPFS.	28
Figura 7: (A) Ácido 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-N-óxido-4-amino-4-carboxílico (TOAC); (B) TOAC ligado a uma cadeia peptídica pelo seu grupo amino e pelo grupo ácido.	29
Figura 8: À esquerda, gráfico de energia (E) versus campo magnético estático (B_0), mostrando o desdobramento das linhas espectrais características do radical nitróxido. À direita, ilustração dos parâmetros usados nas medidas de RPE aplicados aos espectros obtidos experimentalmente.	32
Figura 9: Diagrama de Jablonski, mostrando os processos físicos que podem ocorrer após uma molécula absorver um fóton com energia na faixa do ultravioleta ou visível. As setas retas representam os processos envolvendo fótons e as setas onduladas são as transições não-radioativas.	35
Figura 10: Representação esquemática da ligação peptídica, evidenciando os ângulos Φ e Ψ . Em cinza, estão representados os átomos de carbono; em azul, os átomos de nitrogênio; em vermelho, os átomos de oxigênio; em branco, os átomos de hidrogênio. As esferas de cor roxa representam os grupos radicais das cadeias laterais dos aminoácidos.	36
Figura 11 : Espectros de CD característicos das estruturas secundárias (A) α -hélice, (B) folha β pregueada e (C) estrutura ao acaso ou randômica.	37
Figura 12: “Helical Wheel” do peptídeo “Wild Type”	39
Figura 13: Resina Rink Amide AM utilizada nas sínteses dos peptídeos.	41
Figura 14: Protocolo de síntese utilizando a estratégia Fmoc.	42
Figura 15: Estruturas dos lipídios empregados nos estudos com lipossomas. À esquerda, as estruturas em projeção de Fischer e à direita as representações em espaço cheio. (A) dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC); (B) ácido dipalmitoilfosfatídico (DPPA); (C) dipalmitoilfosfoetanolamina (DPPE) e (D) esfingomielina (SM).	51
Figura 16: Estrutura do detergente zwitteriônico 1-palmitoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina (LPC): (A) representação da estrutura do LPC em projeção de Fischer; (B) representação da estrutura do LPC em espaço cheio.	53
Figura 17: Estruturas dos compostos usados para analisar a estruturação do peptídeo pela técnica de CD, representados em projeção de Fischer e em espaço cheio: (A) dodecil sulfato de sódio (SDS); (B) trifluoretanol (TFE); (C) detergente zwitteriônico 1-palmitoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina ou lisofosfatidilcolina (LPC).	55
Figura 18: Acompanhamento por CLAE do acoplamento da alanina no TOAC ¹³ -hyC. O cromatograma 1 representa o peptídeo após 3 etapas de acoplamento e o cromatograma 2 o peptídeo após 6 etapas. O pico contendo a alanina é indicado pela seta (identificado por espectrometria de massas).	58
Figura 19: Perfil cromatográfico do peptídeo WT-hyC bruto.	58
Figura 20: Cromatogramas antes e após a reversão do peptídeo TOAC ¹³ -hyC. Notou-se após a reversão a formação de um pico com maior tempo de retenção, em destaque, correspondente ao material desejado.	59
Figura 21: Cromatogramas antes e após a reversão do peptídeo TOAC ² -hyC. Notou-se após a reversão a formação de um pico com maior tempo de retenção, em destaque, correspondente ao material desejado.	60

Figura 22: Cromatogramas antes e após a reversão do peptídeo TOAC ⁰ -hyC. Notou-se após a reversão a formação de um pico com maior tempo de retenção, em destaque, correspondente ao material desejado.	61
Figura 23: Perfil cromatográfico do peptídeo selvagem WT-hyC puro, com o respectivo tempo de retenção na coluna de fase reversa C18.	63
Figura 24: Perfil cromatográfico do peptídeo TOAC ⁰ -hyC puro, com o respectivo tempo de retenção na coluna de fase reversa C18.	64
Figura 25: Perfil cromatográfico do peptídeo TOAC ² -hyC puro, com o respectivo tempo de retenção na coluna de fase reversa C18.	64
Figura 26: Perfil cromatográfico do peptídeo TOAC ¹³ -hyC puro, com o respectivo tempo de retenção na coluna de fase reversa C18.	65
Figura 27: Espectro de massas do peptídeo WT-hyC sintetizado. O pico de maior intensidade representa o peptídeo ionizado com carga igual a $z = 3$, confirmando a obtenção do peptídeo desejado.	66
Figura 28: Espectro de massas do peptídeo TOAC ⁰ -hyC sintetizado. O pico de maior intensidade representa o peptídeo ionizado com carga igual a $z = 3$, confirmando a obtenção do peptídeo desejado.	67
Figura 29: Espectro de massas do peptídeo TOAC ² -hyC sintetizado. O pico de maior intensidade representa o peptídeo ionizado com carga igual a $z = 2$, confirmando a obtenção do peptídeo desejado.	67
Figura 30: Espectro de massas do peptídeo TOAC ¹³ -hyC sintetizado. O pico de maior intensidade representa o peptídeo ionizado com carga igual a $z = 2$, confirmando a obtenção do peptídeo desejado.	68
Figura 31: Variação da fluorescência devido à liberação da carboxifluoresceína nos estudos de permeabilização com vesículas de PE:PA:PC.	74
Figura 32: Variação da fluorescência devido à liberação da carboxifluoresceína nos estudos de permeabilização com vesículas de SM:PA:PC.	74
Figura 33: Espectros de fluorescência do peptídeo WT-hyC em diferentes concentrações de LPC. .	76
Figura 34: Espectros de fluorescência do peptídeo TOAC ⁰ -hyC em diferentes concentrações de LPC.	76
Figura 35: Espectros de fluorescência do peptídeo TOAC ¹³ -hyC em diferentes concentrações de LPC.	77
Figura 36: Variação do comprimento de onda máximo obtido para os peptídeos em função da concentração de LPC.	77
Figura 37: Variação da intensidade de fluorescência máxima dos peptídeos em função da concentração de LPC.	78
Figura 38: Espectros de fluorescência do peptídeo WT-hyC em diferentes concentrações de PE:PA:PC.	79
Figura 39: Espectros de fluorescência do peptídeo TOAC ⁰ -hyC em diferentes concentrações de PE:PA:PC.	80
Figura 40: Espectros de fluorescência do peptídeo TOAC ¹³ -hyC em diferentes concentrações de PE:PA:PC.	80
Figura 41: Variação da intensidade de fluorescência dos peptídeos em função da concentração da mistura de lipídeos PE:PA:PC.	81
Figura 42: Variação do comprimento de onda de máxima emissão dos peptídeos em função da concentração da mistura de lipídeos PE:PA:PC.	81
Figura 43: Espectros de fluorescência do peptídeo WT-hyC em diferentes concentrações de SM:PA:PC.	82
Figura 44: Espectros de fluorescência do peptídeo TOAC ⁰ -hyC em diferentes concentrações de SM:PA:PC.	82
Figura 45: Espectros de fluorescência do peptídeo TOAC ¹³ -hyC em diferentes concentrações de SM:PA:PC.	83
Figura 46: Variação da intensidade de fluorescência dos peptídeos em função da concentração da mistura de lipídeos SM:PA:PC.	83
Figura 47: Variação do comprimento de onda de máxima emissão dos peptídeos em função da concentração da mistura de lipídeos SM:PA:PC.	84
Figura 48: Espectros de fluorescência do peptídeo WT-hyC em solução, em diferentes concentrações de acrilamida.	85
Figura 49: Espectros de fluorescência do peptídeo TOAC ⁰ -hyC em solução, em diferentes concentrações de acrilamida.	86

Figura 50: Espectros de fluorescência do peptídeo TOAC ¹³ -hyC em solução, em diferentes concentrações de acrilamida.	86
Figura 51: Variação da razão de emissão de fluorescência inicial sobre a fluorescência máxima (F_0/F) obtida para os peptídeos em solução com diferentes concentrações de acrilamida.	87
Figura 52: Variação da razão de emissão de fluorescência inicial sobre a fluorescência máxima (F_0/F) obtida para o sistema peptídeo/LPC em diferentes concentrações de acrilamida.	88
Figura 53: Variação da razão de emissão de fluorescência inicial sobre a fluorescência máxima (F_0/F) obtida dos peptídeos estudados em função da concentração de acrilamida, em vesículas de composição PE:PA:PC.....	89
Figura 54: Variação da razão de emissão de fluorescência inicial sobre a fluorescência máxima (F_0/F) obtida dos peptídeos estudados em função da concentração de acrilamida, em vesículas de composição SM:PA:PC.	90
Figura 55: Espectros de CD dos peptídeos com 80 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em solução aquosa.	91
Figura 56: Espectros de CD dos peptídeos com 80 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em 60 % de TFE.	91
Figura 57: Espectros de CD dos peptídeos com 80 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em 10 mmol L^{-1} de LPC.....	92
Figura 58: Espectros de CD dos peptídeos com 80 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em 10 mmol L^{-1} de SDS.	92
Figura 59: Espectro de CD dos peptídeos com 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em vesículas contendo PE:PA:PC.	94
Figura 60: Espectro de CD dos peptídeos com 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em vesículas contendo SM:PA:PC.....	94
Figura 61: Espectro de RPE dos análogos contendo TOAC (80 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em solução aquosa.	97
Figura 62: Espectro de RPE dos análogos contendo TOAC (80 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em 10 mmol L^{-1} de LPC.	97
Figura 63: Espectro de RPE dos análogos contendo TOAC (20 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em 0,8 mmol L^{-1} de vesículas contendo PE:PA:PC.	99
Figura 64: Espectro de RPE dos análogos contendo TOAC (20 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em 0,8 mmol L^{-1} de vesículas contendo SM:PA:PC.	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Massas das peptidil-resinas e dos peptídeos brutos e revertidos.....	62
Tabela 2: Massas do peptídeo “Wild Type” e dos análogos contendo TOAC utilizadas e obtidas no processo de purificação, bem como os valores do rendimento obtido.	65
Tabela 3: Proporção relativa dos aminoácidos obtidos através da Análise de Aminoácidos.	69
Tabela 4: Conteúdos Peptídicos dos peptídeos “Wild Type” e dos análogos contendo TOAC por UV e Análise de Aminoácidos.	69
Tabela 5: Valores da CIM (em $\mu\text{mol L}^{-1}$) para os peptídeos.	70
Tabela 6: Valores da CIM (em $\mu\text{mol L}^{-1}$) dos peptídeos.	71
Tabela 7: Valores de HC_{50} (em $\mu\text{mol L}^{-1}$) determinados pela atividade hemolítica dos peptídeos....	71
Tabela 8: Valores de K_{sv} e $\lambda_{\text{máx}}$ para os peptídeos em miméticos de membranas e em solução aquosa.	89
Tabela 9: Valores dos parâmetros obtidos dos espectros de RPE dos peptídeos marcados com TOAC nos diferentes meios estudados.	96

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Homologia entre os peptídeos WT- <i>hyC</i> e as ceratotoxinas. Em destaque amarelo estão representados os aminoácidos que foram conservados nas estruturas primárias; em destaque azul, estão representados os aminoácidos que foram substituídos em homologia semiconservativa e em fonte vermelha os aminoácidos substituídos evolutivamente, entre a família das ceratotoxinas.	22
Quadro 2: Seqüências original e modificadas do peptídeo antimicrobiano extraído da pele da rã <i>Hypsiboas albopunctatus</i> com a sonda paramagnética TOAC (O) em destaque.....	40
Quadro 3: Predição da estrutura para o peptídeo “Wild Type”.	96

SUMÁRIO

RESUMO.....	IX
ABSTRACT	X
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XI
LISTA DE FIGURAS.....	XIV
LISTA DE TABELAS	XVII
LISTA DE QUADROS	XVIII
1. INTRODUÇÃO	20
1.1. Peptídeos antimicrobianos (PAMs).....	20
1.2. Modelos de membranas.....	25
1.3. Síntese Peptídica em Fase Sólida (SPFS)	27
1.4. Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)	28
1.4.1. <i>Sensibilidade ao movimento molecular</i>	30
1.5. Fluorescência.....	33
1.6. Dicroísmo circular (CD - Circular Dichroism).....	36
2. OBJETIVOS	39
3. MATÉRIAS E MÉTODOS	41
3.1. Síntese Peptídica em Fase Sólida (SPFS)	41
3.2. Reversão do aminoácido paramagnético TOAC.....	44
3.3. Purificação e caracterização dos Peptídeos por CLAE	44
3.4. Análise de Aminoácidos.....	45
3.5. Espectrometria de Massas.....	46
3.6. Atividade Biológica	46
3.6.1. <i>Atividade antibacteriana</i>	47
3.6.2. <i>Atividade antifúngica</i>	47
3.6.3. <i>Atividade hemolítica</i>	49
3.7. Fluorescência.....	49
3.7.1. <i>Estudos de permeabilização</i>	50
3.7.2. <i>Estudos de interação peptídeo/micelas</i>	53
3.7.3. <i>Estudos de interação peptídeo/lipossomas</i>	53
3.7.4. <i>Estudos de supressão de fluorescência</i>	54
3.8. Dicroísmo Circular	55
3.9. Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)	56
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	57
4.1. Síntese Peptídica em Fase Sólida (SPFS)	57
4.2. Reversão do aminoácido paramagnético TOAC.....	62
4.3. Purificação e caracterização dos peptídeos	62
4.4. Atividade Biológica	70
4.4.1. <i>Atividade antibacteriana</i>	70
4.4.2. <i>Atividade antifúngica</i>	70
4.4.3. <i>Atividade hemolítica</i>	71
4.5. Fluorescência.....	72
4.5.1. <i>Estudos de permeabilização</i>	72
4.5.2. <i>Estudos de interação peptídeo/micelas</i>	75
4.5.3. <i>Estudos de interação peptídeo/lipossomas</i>	79
4.5.4. <i>Estudos de supressão de fluorescência</i>	85
4.5.4.1. <i>Estudos de supressão de fluorescência em micelas</i>	87
4.5.4.2. <i>Estudos de supressão de fluorescência em vesículas</i>	88
4.6. Dicroísmo Circular	90
4.7. Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)	95
5. CONCLUSÕES	100
6. PERSPECTIVAS.....	102
REFERÊNCIAS	103

1. INTRODUÇÃO

1.1. Peptídeos antimicrobianos (PAMs)

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) são componentes dos sistemas de defesa de muitas formas de vida. Eles fazem parte do primordial e inespecífico sistema imune inato, o qual é a principal defesa para a maioria dos organismos vivos. O seu papel prioritário é destruir ou invadir organismos patogênicos. Entretanto, cada vez mais se verifica que podem também exercer função de moduladores no sistema de defesa em organismos superiores (JENSSEN et al., 2006).

Apesar de pertencerem a uma linhagem evolucionária antiga, a ocorrência de resistência bacteriana aos PAMs é extremamente rara, pois em contraste com a maioria de antibióticos de uso clínico, grande parte desses peptídeos tem como alvo as membranas microbianas (sistema macromolecular) em detrimento de alvos mais específicos, como as enzimas. Este modo de ação foi corroborado por estudos onde seqüências sintetizadas em sua totalidade com D-aminoácidos mostraram a mesma atividade biológica que as toxinas naturais e compostas geralmente por L-enantiômeros (MERRIFIELD et al., 1995). Assim, a aquisição de resistência por parte do hospedeiro requer uma reestruturação total da composição e/ou organização das membranas. Por esta razão, e devido ao aumento de patógenos resistentes às drogas atuais, estas moléculas são de grande interesse no desenvolvimento de novos fármacos antibióticos. Entre as vantagens do desenvolvimento e utilização de fármacos peptídicos, podemos citar a sua rápida ação; a ausência de seleção de genes de resistência em patógenos e a opção de combinações com outros antibióticos clássicos, criando uma potente sinergia, que pode ser eficaz no combate aos microrganismos patogênicos (YEAMAN et al., 2003).

Apesar da diversidade, a análise de mais de 800 peptídeos listados em bases de dados (disponível no site: <http://www.uniprot.org>) permitiu a determinação de algumas características comuns à maioria dos peptídeos antimicrobianos, tais como: 1) uma rede de cargas positivas (maior ou igual a +2, possuindo a maioria dos peptídeos cargas entre +4 e +6), devido à ocorrência dos aminoácidos básicos arginina, lisina e em alguns casos a histidina; 2) um alto teor de aminoácidos hidrofóbi-

cos - entre 50 e 70 %; 3) uma propensão de adotar estruturas secundárias anfipáticas na presença de membranas; e 4) número de resíduos de aminoácidos entre 12 e 50 (TOKE, 2005).

Os PAMs podem ser obtidos de várias espécies, sendo que, dentre os isolados de vertebrados, existe uma classe obtida do gênero *Hypsiboas* (APPONYI et al., 2004; MANGONI et al., 2003). As moléculas pertencentes a esta classe, chamadas de hilas, são ativas em doses micromolares contra uma variedade de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos (CASTRO et al., 2005; CRUSCA et al., 2008). O grupo de pesquisa em Toxicologia da Universidade de Brasília - UNB, coordenado pela Prof^a. Dr^a. Mariana S. Castro, tem trabalhado no isolamento destes peptídeos da secreção cutânea de uma rã do cerrado brasileiro, a *Hypsiboas albopunctatus*, que possui aproximadamente 55 mm e pertence à biota natural desta vegetação (figura 1). Entre os peptídeos isolados, um foi o escolhido para os estudos deste trabalho. Este peptídeo contém uma cadeia peptídica de 21 aminoácidos, com a seguinte sequência primária: Gly-Trp-Leu-Asp-Val-Ala-Lys-Lys-Ile-Gly-Lys-Ala-Ala-Phe-Asn-Val-Ala-Lys-Asn-Phe-(Ile/Leu)-CONH₂ ("Wild Type" ou *hyC*).



Figura 1: A rã *Hypsiboas albopunctatus*.

http://www.biodiversidade.cnpm.embrapa.br/FotosEspecies/Herpetofauna/Anuros/Pererecacabrinha._Hypsiboas_albopunctatus.jpg

Podemos notar neste peptídeo a presença da extremidade C-terminal na forma amidada. Esta transformação é um mecanismo pós-traducional e ocorre com muita frequência nos peptídeos antimicrobianos de anuros. Esta alteração contribui com o aumento da carga positiva líquida total destes peptídeos, o que resulta em um efeito direto na atividade biológica, aumentando o efeito citolítico desta molé-

cula (CASTRO et al., 2009). Esta amidação diminui a repulsão eletrostática com os grupos fosfatos dos fosfolipídios da membrana celular, facilitando a interação do peptídeo com a mesma (CAO et al., 2005).

Esta sequência, inédita na literatura, não possui grande similaridade com os PAMs descritos de anuros até o momento. No entanto, possui homologia com as ceratotoxinas, isoladas da glândula do aparelho reprodutor feminino da mosca *Ceratitis capitata*. As ceratotoxinas mostraram-se ativas contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, permeabilizando as membranas externas e internas da *E. coli* por meio da formação de poros utilizando o mecanismo do tipo “barrel-stave” (descrito a seguir) (BESSIN et al., 2004). O peptídeo WT-hyC, embora de menor tamanho, mostrou alta identidade com a ceratotoxina A, apresentando uma porcentagem de 52 % de aminoácidos conservados, ou seja, idênticos à sequência primária, e 14 % de semiconservados, onde a substituição dos aminoácidos não acarreta grande efeito na hidrofobicidade do peptídeo (quadro 1).

PEPTÍDEO	SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS																								
WT-hyC	G W L D V A K K I G K A A F N V A K N F I/L																								
Ceratotoxina A	S	I	G	S	A	L	K	K	A	L	P	V	A	K	K	I	G	K	A	A	F	N	V	A	K
Ceratotoxina D	S	I	G	T	A	V	K	K	A	V	P	I	A	K	K	V	A	I	P	I	A	K	A	V	L
Ceratotoxina C	S	L	G	G	V	I	-	-	-	S	G	A	K	K	V	A	K	V	A	I	P	I	G	K	A

Quadro 1: Homologia entre os peptídeos WT-hyC e as ceratotoxinas. Em destaque amarelo estão representados os aminoácidos que foram conservados nas estruturas primárias; em destaque azul, estão representados os aminoácidos que foram substituídos em homologia semiconservativa e em fonte vermelha os aminoácidos substituídos evolutivamente, entre a família das ceratotoxinas.

Apesar de todas as informações adquiridas até o momento relacionadas aos PAMs, os mecanismos precisos da interação peptídeo-membrana ainda não estão totalmente estabelecidos. A proposição mais aceita é que, depois da interação inicial, ocorra a formação de poros, causando o rompimento da membrana citoplasmática, levando à morte celular.

Neste sentido, os estudos da etapa inicial e da especificidade frente aos diferentes tipos de lipídios, principalmente na diferenciação entre as membranas bacterianas e de eritrócitos, são importantes no direcionamento para a interação com patógenos e no aumento de seu índice terapêutico (CHEN et al., 2005).

Assim, algumas destas diferenças entre as membranas bacterianas e de eritrócitos devem ser enfatizadas:

1) Composição lipídica: enquanto os eritrócitos em sua maioria possuem na face externa fosfolipídios dipolares (zwitteriônicos), as células bacterianas apresentam uma maior quantidade de fosfolipídios negativos nas duas camadas lipídicas;

2) Ausência de colesterol nas membranas celulares bacterianas, o que as tornam mais flexíveis, auxiliando na possível formação dos poros;

3) Diferença de potencial transmembranal ($\Delta\Psi$). Esta diferença no $\Delta\Psi$ entre certos microrganismos e células hospedeiras pode fornecer aos peptídeos antimicrobianos catiônicos um alvo seletivo pelos microrganismos. As células de mamíferos exibem um $\Delta\Psi$ por volta de -90 a -110 mV, enquanto que células bacterianas, na sua fase logarítmica de crescimento, comumente possuem valores de $\Delta\Psi$ entre -130 a -150 mV. Tais diferenças na eletroquímica da membrana favorecem uma maior interação dos peptídeos catiônicos antimicrobianos com as bactérias (YEAMAN et al., 2003; ZASLOFF, 2002).

Em relação aos mecanismos de ação, três são os modelos mais aceitos para exemplificar a formação de poros, os quais possuem em comum a interação das cadeias peptídicas na superfície da membrana, diferindo nas demais etapas:

1) No primeiro modelo denominado “barrel-stave” (BREUKINK e DE KRUIJFF, 1999), várias cadeias peptídicas se associam e se inserem na membrana formando uma estrutura em forma de barril, que age como um canal. Este perturba o potencial transmembranal e desequilibra o gradiente de íons, levando a um vazamento dos componentes celulares e subsequente morte celular. Neste modelo, os peptídeos anfipáticos se alinham com sua face hidrofóbica em contato com as cadeias acila dos fosfolipídios e a hidrofílica em direção à parte interna do poro, similar a aduelas formando um barril. Um exemplo clássico de um peptídeo que possui este mecanismo de ação é a alameticina, que foi extraída do fungo *Trichoderma veridae* (YANG et al., 2001).

2) No segundo modelo chamado “carpete” (SHAI, 2002), os peptídeos se acumulam na superfície da bicamada lipídica como um “carpete” e, após atingir a concentração limiar de monômeros, a membrana citoplasmática é permeada e desintegrada em um mecanismo semelhante à ação de um detergente. As cecropinas são um exemplo de peptídeos que apresentam este mecanismo de ação (SITARAM e NAGARAJ, 1999).

3) Por último, o modelo “toroidal” (YANG et al., 2001; SATO et al., 2006), em que a interação entre o peptídeo e a membrana induz uma “dobra” na bicamada lipídica, formando um poro constituído por fosfolipídios e peptídeos. As ilustrações dos mecanismos de ação dos peptídeos estão exemplificadas na figura 2.

Ressalta-se que, apesar de alguns peptídeos antimicrobianos poderem interagir com alvos intracelulares, a interação destes com a membrana citoplasmática também é importante objeto de estudo, visto que esses peptídeos ainda devem atravessá-la para alcançar o seu sítio de ação.

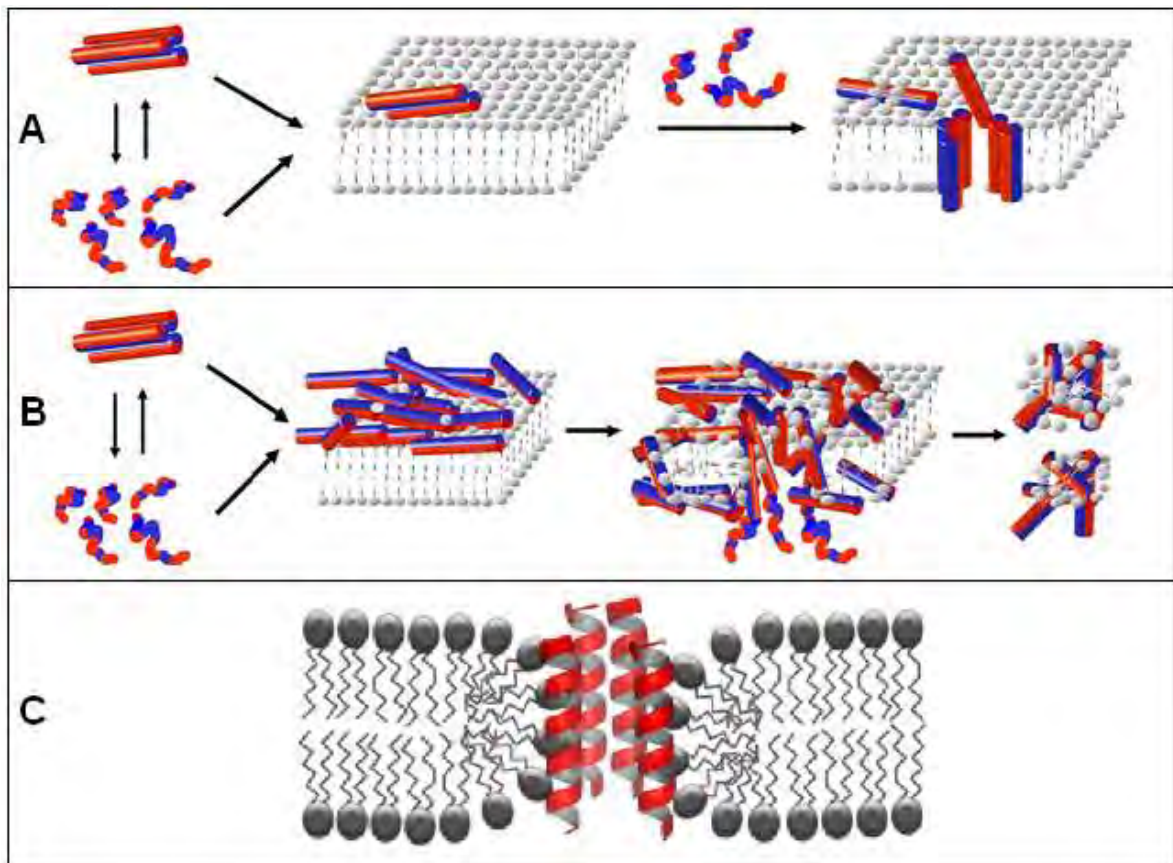


Figura 2: Modelos de ação dos peptídeos antimicrobianos. (A) “barrel-stave”, (B) “carpete” e (C) poro “toroidal”.

1.2. Modelos de membranas

Os modelos de membrana mais simples utilizados nos estudos de interação dos peptídeos são as micelas. As micelas são estruturas esféricas microscópicas, que apresentam a “cabeça” polar dos seus constituintes na sua superfície e em contato com a água, enquanto que as cadeias acíclicas hidrofóbicas se escondem em seu interior (figura 3). Detergentes e alguns ácidos graxos tendem a formar tal estrutura quando agregados em solução aquosa, mas somente acima de uma concentração mínima denominada de CMC (concentração micelar crítica).

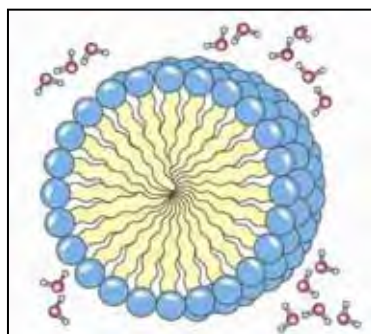


Figura 3: Representação esquemática da estrutura de uma micela formada em solução aquosa. À sua volta, podemos observar moléculas de água solvatando a micela.
<http://www.educa.madrid.org/web/cc.nsdelasabiduria.madrid/Ejercicios/2b/Biologia/Lipidos/micelas.jpg>

Sistemas mais completos e utilizados atualmente como modelos de membranas são as vesículas ou lipossomas que, por possuírem em seu interior um compartimento aquoso, mimetizam melhor esta estrutura. Neste caso, as cadeias de hidrocarbonetos se organizam no interior de uma bicamada fugindo do contato com a água, enquanto as cabeças polares permanecem em contato com este solvente. As principais forças responsáveis por estas interações são as hidrofóbicas, entre as caudas polares dos ácidos graxos que constituem os lipídeos, e as interações hidrofílicas da cabeça polar com a água, o que promove uma organização termodinamicamente favorável e orienta a agregação destas moléculas para formar os lipossomas (figura 4).

Os lipossomas podem ser classificados de acordo com a sua composição química, tamanho e o número de camadas (figura 5). Algumas definições utilizadas são: “small unilamellar vesicles” - SUV, “large unilamellar vesicles” - LUV e “multi-

lamellar liposome vesicles” (MLV), entre outras. Os lipossomas multilamelares grandes (MLV) são formados por vários compartimentos aquosos e lipofílicos intercalados, seu diâmetro pode variar de 100 a 5000 nm e o número de camadas entre 7 e 10. Os lipossomas unilamelares grandes (LUVs) possuem um único compartimento interno aquoso e um lipofílico (a bicamada lipídica), apresentam diâmetro superior a 100 nm, e se caracterizam por possuírem uma tensão superficial semelhante ao das membranas celulares. Os lipossomas unilamelares pequenos (SUVs) são estruturas de diâmetro menores, entre 15 e 50 nm.

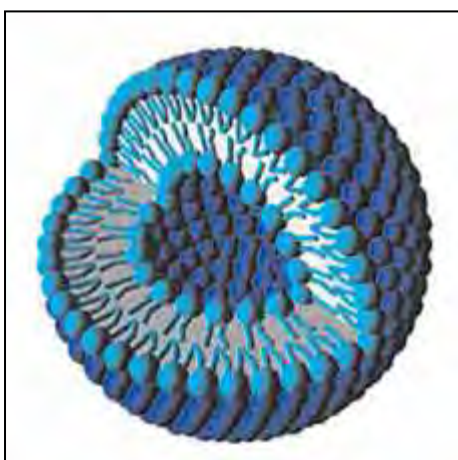


Figura 4: Representação esquemática da estrutura de um lipossoma formado em solução aquosa. <http://www.fapepi.pi.gov.br/novafapepi/sapiencia5/imagens/fotopesquisa2-1.jpg>

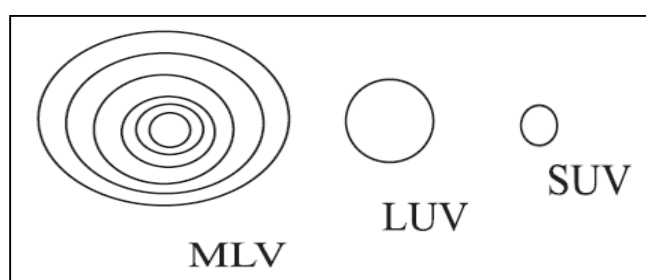


Figura 5: Representação esquemática dos diferentes tipos de lipossomas, mostrando o diâmetro e o número de camadas: MLV - vesículas lipídicas multilamelares, LUV - vesículas unilamelares grandes e SUV - vesículas unilamelares pequenas.

Devido à composição das vesículas poderem ser modificadas de acordo com o tipo de lipídio adicionado à solução, estes modelos de membrana são largamente utilizados para verificar a influência de cada um destes componentes na interação com os peptídeos.

1.3. Síntese Peptídica em Fase Sólida (SPFS)

A metodologia de Síntese de Peptídeos de Fase Sólida (SPFS) (MERRIFIELD, 1963) é a mais empregada atualmente para a obtenção de peptídeos visando a pesquisa científica. Este método apresenta como principal vantagem a obtenção de uma grande quantidade de seqüências peptídicas diferentes em um curto espaço de tempo. Esta técnica baseia-se no crescimento da cadeia peptídica por meio da adição de resíduos de aminoácidos um a um à sua região N-terminal. Desta forma, a síntese ocorre da direção C-terminal para a N-terminal, permanecendo durante todo o processo covalentemente ligada a um suporte polimérico ou resina (fase sólida).

Atualmente, são empregadas duas estratégias para a SPFS: a química Boc, usando o composto *t*-butiloxicarbonila para a proteção dos grupos N-terminais dos aminoácidos, e a química Fmoc, que utiliza o composto 9-fluorenilmetiloxicarboxila (Fmoc). Atualmente a química mais utilizada é a Fmoc, onde o grupo α -amino do aminoácido é protegido temporariamente por este protetor base-lábil, e suas cadeias laterais reativas por grupos estáveis à base empregada e lábeis ao ácido trifluoracético (TFA). Entre os protetores das cadeias laterais mais utilizados estão os grupos *t*-butiloxicarbonila, tritila e *t*-butila. Nesta estratégia, o grupo Fmoc é removido pela base piperidina. O ciclo geral de síntese, envolvendo as etapas de desproteção, lavagem e acoplamento estão no esquema geral representado na figura 6.

Alternativamente, a química Boc emprega o grupamento ácido-lábil *t*-butiloxicarbonila como protetor do grupo N-terminal, e derivados benzílicos (Bzl) para a proteção da maioria das cadeias laterais de resíduos de aminoácidos trifuncionais.

A etapa de acoplamento, independente do protocolo a ser utilizada, é realizada pela ativação dos grupos carboxila do aminoácido a ser inserido com reagen-

tes, tais como, diisopropilcarbodiimida (DIC)/N-hidroxibenzotriazol (HOBt) e o-(benzotriazol-1-il)-1, 1, 3, 3-tetrametilurônio hexafluorofosfato (HBTU)/ N-etildiisopropilamina (DIEA).



Figura 6: Esquema geral representando as etapas da SPFS.

1.4. Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)

O nosso grupo tem utilizado para os estudos de peptídeos e da Síntese Peptídica em Fase Sólida (SPFS) diversas técnicas espectrométricas, tais como fluorescência, Ressonância Magnética Nuclear (RMN), Dicroísmo Circular (CD), RPE, entre outras.

No uso da SPFS, destacamos a avaliação da mobilidade da cadeia peptídica no interior do grão de resina através da RPE (LIKHTENSHEIN, 1976), na qual publicamos diversos trabalhos (CILLI et al., 1997; CILLI et al., 1999; NAKAIE et al., 2001; RIBEIRO et al., 2001), sendo o mais recente sobre a importância das diferentes cadeias laterais na agregação das cadeias peptídicas (CILLI et al., 2007). Além da utilização no estudo da SPFS, a RPE tem sido uma ferramenta útil na análise do comportamento estrutural de diversos peptídeos (NAKAIE et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2002; PISTOLESI et al., 2007;; SCHREIER et al., 2004; VIEIRA et al., 2003).

Desta forma, o uso da RPE propicia a obtenção de dados que permitem obter informações sobre o mecanismo de ação dos peptídeos e do meio que os circunda.

Este método, também chamado de marcador de spin, consiste no emprego de uma molécula paramagnética onde se procura obter informações de caráter es-

trutural a respeito do sistema na qual ela se encontra ligado. Esses dados podem estar relacionados à liberdade de movimento, colisões intermoleculares, ordenamento molecular, geometria local, presença de O_2 e outras espécies paramagnéticas (BERLINER et al., 1989; SMITH et al., 1976).

A RPE é um ramo da espectroscopia que, na região das microondas, estuda a absorção de radiação eletromagnética por materiais contendo átomos ou moléculas com um elétron não emparelhado, em presença de campos magnéticos externos. Neste caso, o momento angular de spin eletrônico total dos átomos ou moléculas é $S > 0$ e, assim, o material se comporta como paramagnético. Este fenômeno não acontece em materiais onde todos os elétrons estão emparelhados, devido ao Princípio de Exclusão de Pauli. Substâncias ativas do ponto de vista da RPE são, por exemplo, radicais orgânicos livres, íons de metais de transição, metais, cristais com defeitos, etc.

Para a utilização da RPE no estudo de peptídeos, o procedimento mais utilizado é a substituição e/ou adição na sequência primária do aminoácido sintético e paramagnético TOAC (ácido 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-N-óxido-4-amino-4-carboxílico - figura 7).

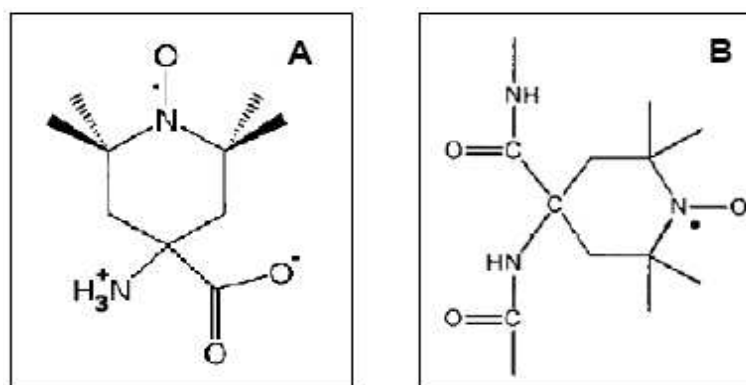


Figura 7: (A) Ácido 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-N-óxido-4-amino-4-carboxílico (TOAC); (B) TOAC ligado a uma cadeia peptídica pelo seu grupo amino e pelo grupo ácido.

O TOAC é caracterizado por ser uma estrutura heterocíclica contendo um radical livre (grupo nitróxido), sendo estabilizado pela presença de dois carbonos adjacentes tetrasubstituídos. Uma propriedade interessante do TOAC, além de ser um marcador de spin de proteínas e peptídeos, é a sua restrição de mobilidade devido à tetrasubstituição dos C_α e a dificuldade de rotação nas ligações das cadeias laterais, as quais estão em volta do radical nitróxido, num modelo cíclico.

A introdução do uso do TOAC no estudo de peptídeos foi realizada na década de 80 por Nakaie e colaboradores (NAKAIE et al., 1981; NAKAIE et al., 1983), onde por meio da SPFS utilizando a química Boc, foi possível incorporar inicialmente o aminoácido paramagnético na posição N-terminal. Com a síntese do composto Fmoc-TOAC (MARCHETTO et al., 1993), no entanto, foi possível adicionar este composto em outros pontos da cadeia peptídica (MARTIN et al., 2001).

Estudos demonstraram que a inserção do TOAC em uma sequência peptídica facilita a indução de hélices e dobras, devido à sua semelhança com o aminoácido α -amino-isobutírico (BARBOSA et al., 1999; SCHREIER et al., 2004; McNULTY et al., 2002). Além disso, o TOAC, por conter um radical livre em sua molécula, é capaz de induzir uma supressão (“quenching”) da fluorescência de peptídeos que possuem esta propriedade. Isto ocorre devido a um mecanismo de interação dipolo-dipolo, onde a transferência de energia eletrônica ocorre entre o aminoácido triptofano na forma excitada para o TOAC. Neste processo, a interconversão entre os subestados conformacionais do fluoróforo é lenta - na escala temporal do processo de transferência - o que permite evidenciar a diminuição da emissão da fluorescência do fluoróforo (PISPISA et al., 2000).

Uma limitação no uso deste aminoácido paramagnético em relação às investigações físico-químicas é que as ressonâncias dos prótons próximos a este composto em um espectro $^1\text{H-NMR}$ são significativamente alargadas devido ao efeito paramagnético produzido pelo radical livre nítróxido. Assim, compostos contendo TOAC não podem ser rotineiramente caracterizados pela técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) (TONIOLO et al., 1998).

Na literatura podemos encontrar vários estudos empregando a sonda paramagnética TOAC incorporada na sequência de aminoácidos de peptídeos antimicrobianos (LOPES et al., 2008; SALNIKOV et al., 2006; MARSH et al., 2007; TRAASETH et al., 2007; NEWSTADT et al., 2009), sendo que em todos puderam-se evidenciar as dinâmicas estruturais e a mobilidade do elétron desemparelhado do radical nítróxido dentro de sistemas que mimetizariam uma membrana biológica.

1.4.1. Sensibilidade ao movimento molecular

De conformidade com os valores da velocidade rotacional da molécula, obtêm-se diferentes alargamentos das três linhas de absorção nos espectros de RPE. Por exemplo, para maiores graus de imobilização, observam-se alargamentos mais acentuados devidos à sobreposição de contribuições individuais de diferentes orientações da molécula repórter com diferentes valores de A e g_e . Os parâmetros espectrais g_e e A são grandezas tensoriais e apresentam, portanto, propriedades anisotrópicas, determinando assim uma dependência dos espectros de RPE ao ângulo entre o campo magnético aplicado e a amostra. Deste modo, em um monocristal por exemplo, se o campo magnético estiver alinhado paralelamente ao orbital que contém o elétron desemparelhado (eixo z), o valor de A será máximo ($A_{zz} = 32$ G) e o valor de g_e mínimo ($g_{zz} \approx 2,002$). Quando o campo magnético estiver paralelo aos eixos x e y , os valores de A se tornam menores (A_{xx} e $A_{yy} = 6$ G) e os de g_e maiores ($g_{xx} \approx 2,009$ e $g_{yy} \approx 2,007$).

A grande utilidade dessa técnica, no estudo da conformação de peptídeos, provém basicamente dessa sensibilidade dos espectros de RPE à mobilidade rotacional, pois o sistema em estudo pode apresentar alterações físico-químicas dependentes do solvente empregado, e que se reflete na variação da velocidade de rotação da molécula repórter presente nesse sistema.

Em termos quantitativos, a velocidade de difusão rotacional da molécula pode ser analisada pelo cálculo do tempo de correlação rotacional (τ) cuja unidade é segundos/radianos, mas geralmente é dado apenas em segundos. A teoria para cálculo de τ de radicais nitróxidos, a partir das larguras e alturas dos três picos de absorção, foi desenvolvida por Kivelson (KIVELSON, 1960) e Freed e Fraenkel (FREED et al., 1963) e gera dois valores de τ (τ_B e τ_C), a partir de duas expressões diferentes descritas por Cannon e colaboradores (CANNON et al., 1975):

$$\tau_C = 6,55 \times 10^{-10} W_0 [(h_0/h_{+1})^{1/2} + (h_0/h_{-1})^{1/2} - 2] \text{ s}$$

$$\tau_B = 5,90 \times 10^{-10} W_0 [(h_0/h_{-1})^{1/2} - (h_0/h_{+1})^{1/2}] \text{ s}$$

onde W_0 é a largura da linha central em Gauss (G), e h_{+1} , h_0 e h_{-1} são respectivamente as amplitudes das primeiras derivadas das linhas de absorção do campo baixo, médio e alto. Essas expressões se aplicam de maneira rigorosa apenas para o

caso de movimento perfeitamente isotrópico e no intervalo de $5 \times 10^{-11} < \tau < 1 \times 10^{-9}$ s. Para misturas em que os movimentos moleculares são mais anisotrópicos, procura-se estimar o grau de movimentação molecular com base nas larguras espectrais dos picos de campo médio e alto (W_0 e W_{-1} , respectivamente). A figura 8 ilustra as linhas espectrais características do radical nitróxido e os parâmetros usados em nossos experimentos de RPE.

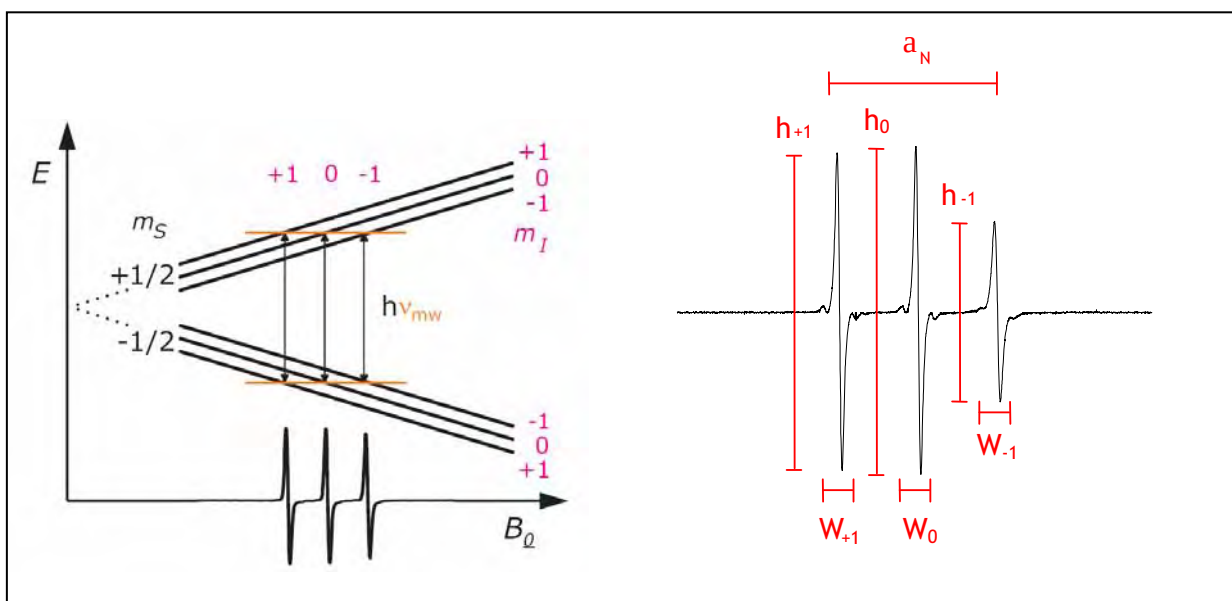
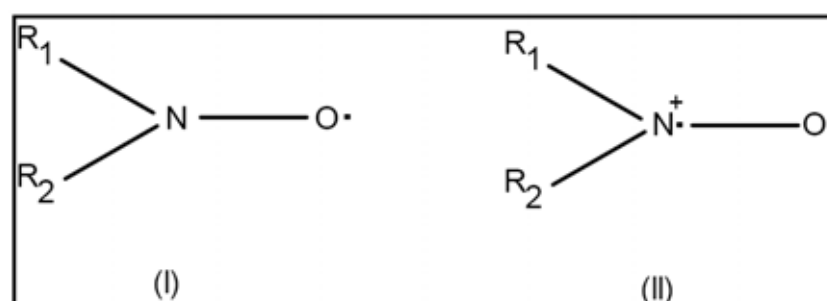


Figura 8: À esquerda, gráfico de energia (E) versus campo magnético estático (B_0), mostrando o desdobramento das linhas espectrais características do radical nitróxido. À direita, ilustração dos parâmetros usados nas medidas de RPE aplicados aos espectros obtidos experimentalmente.

Outra aplicação desta técnica está relacionada à sensibilidade do espectro do radical nitróxido à polaridade do meio, fato que se deve basicamente à existência das duas formas canônicas deste composto:



Na estrutura I, o elétron desemparelhado está preferencialmente localizado no átomo de oxigênio e na estrutura II se encontra no de nitrogênio. Quando o radical se encontra em meio bastante polar, como a água, a tendência é de predominar a estrutura II, o inverso ocorrendo em um meio mais apolar. A avaliação da lo-

calização do elétron desemparelhado e conseqüentemente da polaridade do meio, é feita através dos valores do desdobramento hiperfino isotrópico (a_N) e do fator g isotrópico. Quanto mais o elétron desemparelhado interagir com núcleo de nitrogênio (estrutura II), maior será o valor de a_N e menor o de g (BRIERE et al., 1965). Em geral, a_N varia aproximadamente de 14,5 G em solventes apolares como benzeno ou dioxano, e para valores ao redor de 16,0 G em água.

Desta forma, determinando-se os parâmetros citados acima nos espectros obtidos por meio da RPE pode-se obter informações importantes sobre a interação peptídeo/membrana.

1.5. Fluorescência

Uma das técnicas mais empregadas atualmente em análises conformacionais e interação de peptídeos e proteínas com miméticos de membranas é a fluorescência. Esta técnica é baseada, resumidamente, na emissão de energia na forma de luz após a sua absorção (LAKOWICZ, 1983). A absorção de energia por certos grupos, denominados cromóforos, os faz passar para um estado excitado (singleto excitado S_1), ocorrendo logo em seguida uma emissão de parte desta energia em comprimentos de onda específicos, voltando para seu estado fundamental (singleto fundamental S_0), descritos pelo diagrama de Jablonski - figura 9.

Quando um fóton com energia suficiente para excitar um elétron do estado fundamental (S_0) para um nível energético superior (S_n , $n = 1$ ou 2) é absorvido, ocorre uma transição entre esses estados. Cada um desses níveis eletrônicos possui vários níveis vibracionais para os quais as transições podem ocorrer. O fóton de menor energia absorvido pela molécula tem energia igual à diferença entre S_0 e o primeiro estado excitado (S_1). Fótons mais energéticos podem ser absorvidos, resultando em transições para níveis energéticos superiores a S_1 . Como as transições ocorrem, quase que em sua maioria, a partir do mais baixo nível vibracional S_0 (o qual é o estado onde mais freqüentemente se encontram os elétrons), o espectro de absorção reflete, basicamente, os níveis vibracionais do estado excitado e seu acoplamento com o estado fundamental.

Os estados excitados mais energéticos têm um tempo de vida muito curto e os elétrons excitados a esses níveis rapidamente relaxam para o nível vibracional

mais baixo do S_1 , que tem um tempo de vida mais longo. Esse processo de decaimento não radiativo entre níveis de mesma multiplicidade (S-S, T-T) é conhecido como conversão interna (CI). Transições a partir de S_1 podem ocorrer para um dos níveis vibracionais do estado fundamental, via decaimento radiativo, ou seja, com emissão de luz. Esse fenômeno é conhecido como a fluorescência propriamente dita.

Analogamente à absorção, a linha do espectro de fluorescência está estreitamente relacionada com os níveis vibracionais dos estados de menor energia.

Outra possibilidade, após a relaxação de um nível excitado mais energético para o primeiro nível vibracional de S_1 - por conversão interna -, é a ocorrência do cruzamento intersistemas (CIS), que dá origem a elétrons excitados no estado triplete. O cruzamento intersistemas é o termo utilizado para designar transições entre estados de diferentes multiplicidades (S - T). Em geral, o primeiro nível do triplete está situado em uma energia mais baixa que o primeiro nível do singlete. Isso se deve ao não emparelhamento dos elétrons que formam um estado triplete. Como eles se repelem mutuamente, é de se esperar que os mesmos tenham uma menor energia de ligação.

Como a multiplicidade do estado triplete ($M = 3$) é diferente da do estado fundamental ($M = 1$), uma transição direta é dita proibida. O decaimento do elétron de um nível triplete a um estado menos energético pode ocorrer de duas maneiras: I) novo cruzamento intersistemas para um nível vibracional do estado fundamental de maior energia e posterior relaxação não-radiativa. II) Decaimento radiativo de T_1 para S_0 , processo este conhecido como fosforescência. Como a fosforescência envolve uma transição “proibida”, o tempo do elétron excitado triplete é bastante longo, muito superior ao de fluorescência (SIMAS, 2005).

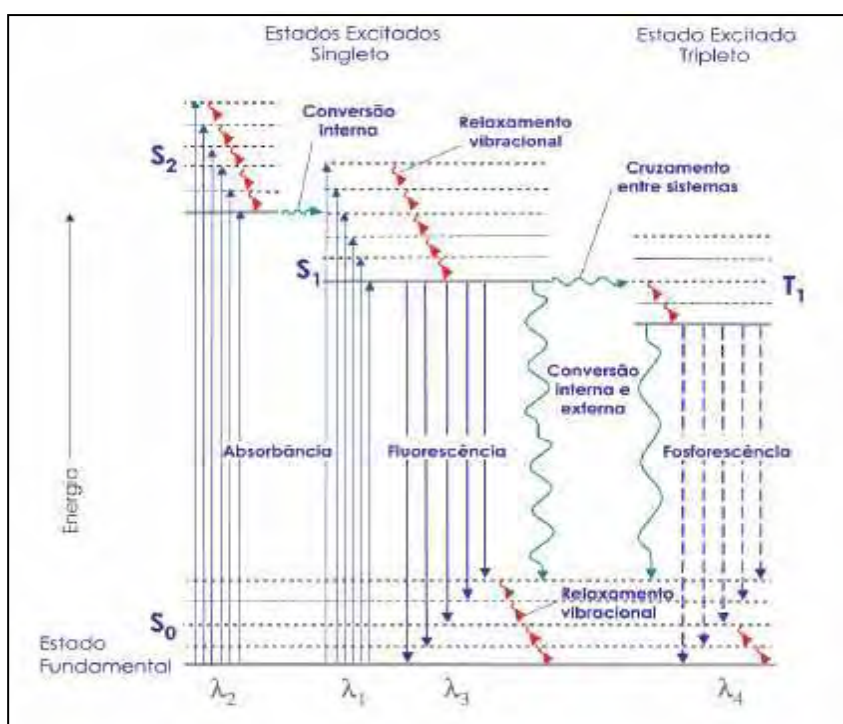


Figura 9: Diagrama de Jablonski, mostrando os processos físicos que podem ocorrer após uma molécula absorver um fóton com energia na faixa do ultravioleta ou visível. As setas retas representam os processos envolvendo fótons e as setas onduladas são as transições não-radioativas.

Os dados obtidos por esta técnica permitem, desta forma, estudar o ambiente em torno do peptídeo e a interação destes com moléculas do solvente e/ou membranas, além de outras moléculas peptídicas. Este estudo é possível devido à sensibilidade dos fluoróforos ao ambiente que os circunda, que alteram a energia do estado excitado e, conseqüentemente, a frequência de emissão. Os parâmetros que podem ser utilizados nestes estudos são o comprimento de onda de máxima de emissão ($\lambda_{\text{máx}}$), rendimento quântico (Φ_F), tempo de vida do fluoróforo (τ_F) e propriedades de polarização.

A fluorescência em proteínas e peptídeos (KREIMER et al., 2000) é devida à presença de resíduos aromáticos do triptofano e tirosina; a fenilalanina também possui esta característica, mas em um rendimento quântico muito baixo, fazendo com que sua emissão raramente seja observada. O espectro de emissão de fluorescência, tanto do triptofano quanto da tirosina, se faz pela excitação em um comprimento de onda do máximo de absorção, em torno de 280 nm. No entanto, o triptofano pode ser excitado seletivamente entre 295 e 305 nm.

1.6. Dicroísmo circular (CD - *Circular Dichroism*)

As ligações peptídicas absorvem radiação na região UV, mais precisamente em comprimentos de onda entre 180 e 230 nm. Existe uma característica especial da ligação peptídica, que é o fato de que os átomos que a compõem poderem interagir com os átomos de outras ligações peptídicas, contribuindo para forçar a proteína a assumir uma estrutura peculiar, não aleatória. Essa forma de estruturação da cadeia protéica origina as chamadas "estruturas secundárias" da proteína, que podem ser na forma de arranjos helicoidais ou estirados.

A rotação ao redor da ligação $O = C - NH$ da amida peptídica é restrita devido ao caráter duplo da ligação resultante da coplanaridade que formam os átomos CONH. Existem apenas duas ligações onde a rotação é permitida: $C_{\alpha}-NH$, cujo ângulo de rotação é denominado "phi" (Φ) e $C_{\alpha}-CO$, cujo ângulo é denominado "psi" (Ψ) - figura 10. Estes ângulos específicos são os responsáveis pelas estruturas secundárias: α -hélices; folhas β -paralelas e antiparalelas; β -turns; e randômicas ou ao acaso.

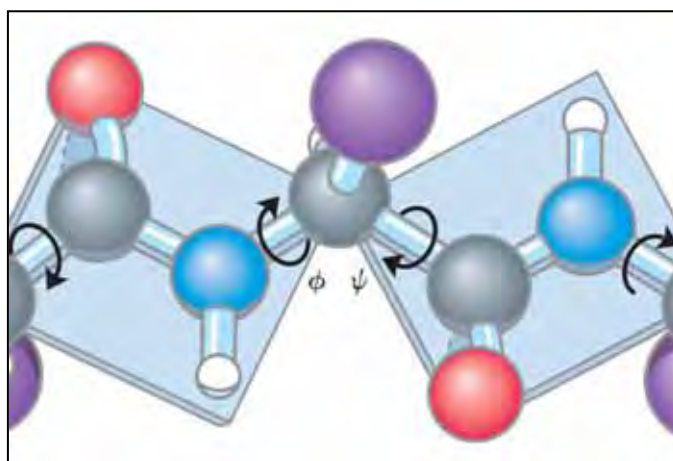


Figura 10: Representação esquemática da ligação peptídica, evidenciando os ângulos Φ e Ψ . Em cinza, estão representados os átomos de carbono; em azul, os átomos de nitrogênio; em vermelho, os átomos de oxigênio; em branco, os átomos de hidrogênio. As esferas de cor roxa representam os grupos radicais das cadeias laterais dos aminoácidos.

Essas estruturas secundárias geram arranjos atômicos que interagem de modo particular com a radiação polarizada, fazendo, por exemplo, com que uma luz com polarização circular no sentido horário seja absorvida diferentemente do que

uma luz com polarização no sentido anti-horário. A espectroscopia de dicroísmo circular mede justamente essa diferença de absorção de radiação com polarização circular, permitindo verificar se estão ocorrendo arranjos tridimensionais dentro de uma molécula de proteína ou peptídeo.

Quando a proteína está enovelada, o arranjo tridimensional dos cromóforos afeta a estrutura eletrônica e, em consequência, o espectro da proteína ou peptídeo. Para as proteínas com conformação ao acaso, as interações de longa distância são mínimas e seu espectro é composto das duas bandas $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$. A estrutura β apresenta uma banda $n \rightarrow \pi^*$ centrada em 215 nm e uma banda $\pi \rightarrow \pi^*$ em 196 nm, as quais são originadas pelos elétrons desemparelhados do oxigênio da carbonila. O espectro de uma α -hélice possui as mesmas bandas, porém ele é um pouco mais complexo devido à transição $\pi \rightarrow \pi^*$ ser desdobrada em $\pi \rightarrow \pi^*$ ($\perp$) encontrada em 191 nm e $\pi \rightarrow \pi^*$ ($\parallel$) que é localizada em 208 nm. A transição $n \rightarrow \pi^*$ é deslocada para menor energia, em 222 nm. Desta maneira, a forma do espectro de CD das proteínas depende do seu conteúdo de estrutura secundária. A figura 11 apresenta os espectros característicos de CD das estruturas secundárias acima mencionadas.

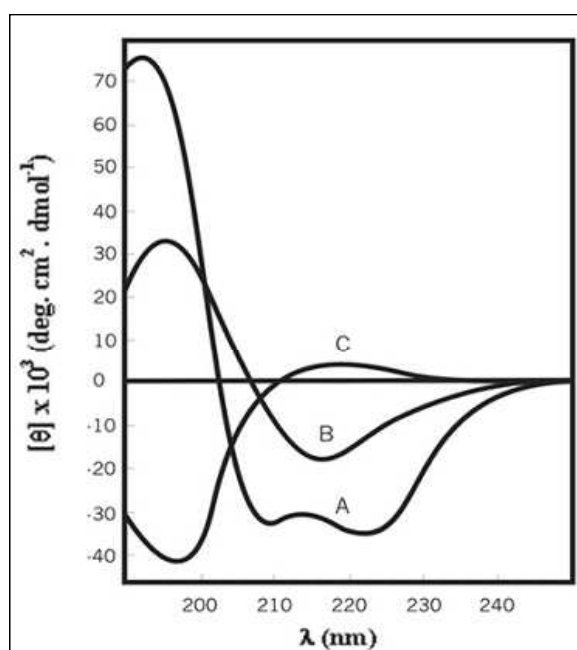


Figura 11 : Espectros de CD característicos das estruturas secundárias (A) α -hélice, (B) folha β pregueada e (C) estrutura ao acaso ou randômica.

Experimentos de dicroísmo circular em proteínas ou em peptídeos, permitem a obtenção de informações referentes a natureza e quantidade de estruturas secundárias. Desta forma, podemos relacionar a conformação da proteína/peptídeo com as mudanças nas características do meio circundante, por exemplo, temperatura, pH, ou a presença de outras moléculas no solvente (ITO, 2004).

Desta maneira, a técnica espectroscópica utilizando CD, permite obter informações sobre a estruturação do peptídeo frente a diferentes tipos de solventes hidrofílicos e lipofílicos, como solução aquosa tamponante em pH fisiológico, bem como em miméticos de membranas biológicas, tais como micelas e vesículas.

2. OBJETIVOS

A intenção deste trabalho foi adicionar ou substituir alguns aminoácidos na sequência do peptídeo “Wild Type” pelo composto paramagnético TOAC, a fim de estudar o seu modo de ação. A inserção estratégica do TOAC em diferentes pontos da cadeia peptídica permitiu, através das técnicas de RPE, de fluorescência e CD, examinar a estrutura e localização desta molécula quando ligada em miméticos de membrana.

Como o peptídeo “Wild Type” possui uma conformação basicamente em α -hélice (CESPEDES, 2009) e o TOAC possui uma estrutura semelhante ao ácido α -amino-isobutírico, esperamos que os análogo contendo este composto não percam a atividade antimicrobiana mas, pelo contrário, devido ao aumento do teor de α -hélice, espera-se que esta seja aumentada (BUI et al., 2000).

Através do diagrama de predição de estrutura, chamado de “helical wheel”, podemos observar a formação de uma α -hélice anfipática, devido à presença de aminoácidos polares e carregados em um lado, e aminoácidos apolares do outro (figura 12).

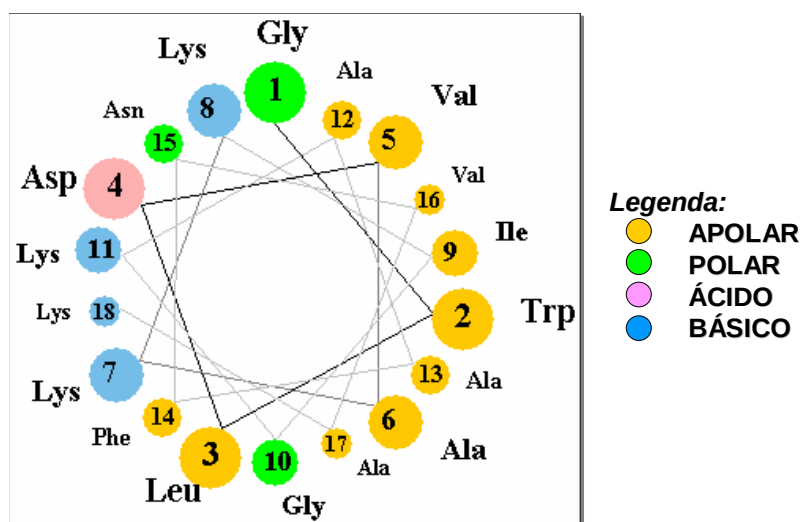


Figura 12: “Helical Wheel” do peptídeo “Wild Type” .

Desta forma, e com o intuito de compreender o mecanismo de ação deste peptídeo, substituiremos as posições 2 e 13 da sequência peptídica pelo marcador TOAC (representado pela letra O) (quadro 2). A posição 13 está em um ponto

central da face apolar do peptídeo em α -hélice, enquanto a posição 2 está na extremidade N-terminal. O domínio N-terminal, dados do nosso grupo não publicados, tem mostrado ter grande importância na atividade dos PAMs. Para complementar este estudo, outro análogo contendo TOAC na posição 0 da cadeia peptídica foi obtido (quadro 2).

Quadro 2: Sequências original e modificadas do peptídeo antimicrobiano extraído da pele da rã *Hypsiboas albopunctatus* com a sonda paramagnética TOAC (O) em destaque.

NOME DO PEPTÍDEO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
WT- <i>hyC</i>	-	G	W	L	D	V	A	K	K	I	G	K	A	A	F	N	V	A	K	N	F	I
TOAC ⁰ - <i>hyC</i>	O	G	W	L	D	V	A	K	K	I	G	K	A	A	F	N	V	A	K	N	F	I
TOAC ² - <i>hyC</i>	-	G	O	L	D	V	A	K	K	I	G	K	A	A	F	N	V	A	K	N	F	I
TOAC ¹³ - <i>hyC</i>	-	G	W	L	D	V	A	K	K	I	G	K	A	O	F	N	V	A	K	N	F	I

Além de ser um marcador de spin, o TOAC também possui a característica de supressor de fluorescência. Desta forma, estudos de fluorescência deste peptídeo em diferentes meios poderia fornecer informações adicionais sobre a conformação deste peptídeo, devido a presença de um resíduo de triptofano na posição 2 da cadeia.

Objetivando os estudos acima, as etapas que foram realizadas neste projeto estão descritas abaixo:

1) Síntese e purificação do peptídeo selvagem e análogos adicionando o grupo TOAC na posição 0 e substituindo os resíduos de aminoácidos nas posições 2 e 13 da sequência peptídica pela sonda paramagnética TOAC;

2) Determinação das atividades biológicas (atividade antifúngica, antibacteriana e hemolítica) e a capacidade de permeabilização dos peptídeos obtidos.

3) Estudo das mudanças conformacionais dos peptídeos sintetizados, na presença de trifluoroetanol (TFE) e miméticos de membrana, através das técnicas de RPE, dicroísmo circular e fluorescência.

4) Análise da interação destes peptídeos na presença de miméticos de membrana, como micelas e lipossomas de diferentes composições.

3. MATÉRIAS E MÉTODOS

3.1. Síntese Peptídica em Fase Sólida (SPFS)

Nas sínteses realizadas neste trabalho utilizou-se o protocolo Fmoc para a obtenção dos peptídeos. Este protocolo foi o escolhido por ser mais rápido e não empregar etapas ácidas durante a síntese, evitando assim a degradação do composto paramagnético TOAC (MARCHETTO et al., 1993).

Como descrito anteriormente, esta técnica consiste no crescimento da cadeia peptídica por meio do acoplamento de um aminoácido a cada ciclo completado, sendo que o primeiro aminoácido (extremidade C-terminal) está ligado covalentemente a uma resina com uma matriz de poliestireno (suporte polimérico inerte e insolúvel nas condições utilizadas). Para as sínteses, foi usada a resina Rink Amide AM - Synpep®, com 0,68 mmol/g de grau de substituição, protegida com o grupo protetor Fmoc (figura 13).

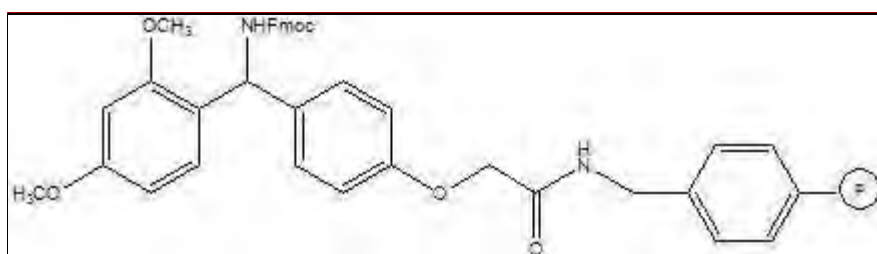


Figura 13: Resina Rink Amide AM utilizada nas sínteses dos peptídeos.

O aminoácido asparagina foi utilizado contendo o grupo tritila (trt) como protetor da cadeia lateral. Para o aminoácido ácido aspártico, foi usado o grupo *t*-butila (tBu) e para os aminoácidos lisina e triptofano empregou-se o grupo *t*-butiloxicarbonila (Boc) como protetor. Os demais aminoácidos foram utilizados sem protetor. Os aminoácidos provenientes da marca Synpep® foram a glicina, triptofano, ácido aspártico, lisina, isoleucina e asparagina; valina e fenilalanina foram oriundos da Nova Biochem®; da marca Bachem®, utilizamos a leucina; e a alanina foi adquirida da Advanced ChemTech®.

As sínteses foram feitas em seringas descartáveis, contendo em uma das extremidades um filtro constituído de material polimérico poroso. Este filtro permite que subprodutos, excesso de reagentes e solventes sejam eliminados por simples filtração.

As etapas realizadas em cada ciclo de síntese estão mostradas na figura 14.

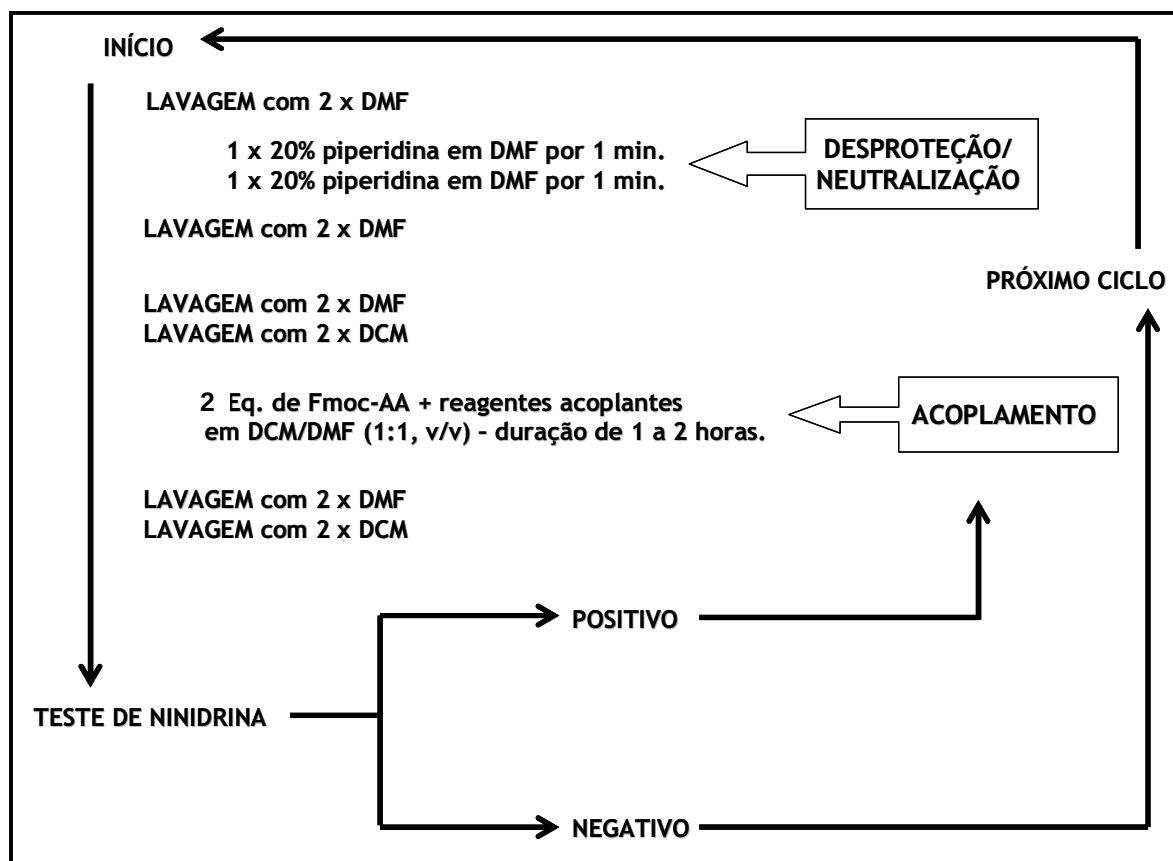


Figura 14: Protocolo de síntese utilizando a estratégia Fmoc.

Para a realização do acoplamento, os grupos carboxila dos aminoácidos foram ativados com *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (DIC) - Fluka®/*N*-hidroxibenzotriazol (HOBt) - Advanced ChemTech®, ou hexafluorofosfato de *o*-(benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio (HBTU) - Nova Biochem®/*N*-etildiisopropilamina (DIEA) - Fluka®, quando houve necessidade de reacoplamento. O excesso de reagentes utilizado, em relação ao teor de amino grupos livres, foi de 2 vezes e o tempo reacional de 2 horas.

A incorporação do aminoácido paramagnético TOAC - devido ao seu alto custo - foi realizada com 1,2 vezes de excesso, usando como agentes acoplantes o hexafluorofosfato de 2-(1-*H*-7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio (HATU) -

AnaSpec Inc.®), que é um agente ativador mais eficiente que os outros citados anteriormente (CARPINO et al., 1994). O HATU necessita de um meio básico para a promoção de uma acilação eficiente, portanto é acompanhado no processo reacional da base DIEA, com a finalidade de ajustar o pH reacional para aproximadamente 9. O solvente utilizado foi uma mistura contendo *N*-metilpirrolidona (NMP) - Merck® e diclorometano (DCM) - Synth®, que mostrou, por avaliação visual, o melhor inchamento da resina. Ambos os agentes acoplantes estavam presentes com 5 vezes de excesso.

A remoção do grupo Fmoc, base-lábil, foi realizada por meio de uma solução de piperidina 20 % (Merck®) em dimetilformamida (DMF) (Synth®) durante 1 e 20 minutos, respectivamente. Para a eliminação do excesso de reagentes, solventes e subprodutos foram realizados a cada passo, ciclos de 2 lavagens com DMF e DCM.

Todas as etapas de acoplamento e desproteção foram acompanhadas pelo teste de Kaiser (KAISER et al., 1970). Este teste consiste em coletar pequenas alíquotas de resina e adicionar uma solução de ninidrina, que em altas temperaturas (110°C), durante cerca de 3 a 5 minutos, apresenta uma mudança ou não da cor. Se houver acoplamento total do aminoácido na cadeia peptídica, a solução manter-se-á amarela, enquanto que na etapa de desproteção notaremos uma cor azul escura, indicando o complexo formado entre a ninidrina e os grupamentos α -amino livres.

A clivagem do peptídeo foi realizada pela adição de uma solução contendo água deionizada, triisopropilsilano (TIS) (Acros Organics®) e ácido trifluoracético - TFA (Merck®) (proporção de 5, 5, 90 respectivamente; v,v,v) num frasco de cintilação, durante 2 horas sob agitação branda. O volume utilizado foi na proporção de 10 mL de solução para cada 1 g de resina. Após este período, o peptídeo, juntamente com a resina, foi precipitado com éter etílico gelado, a fim de separá-los dos subprodutos resultantes da clivagem. Este processo foi repetido 3 vezes e o sobrenadante descartado. Depois desta etapa, a extração do peptídeo foi realizada com a adição de água deionizada e posterior centrifugação, processo também repetido 3 vezes. O sobrenadante resultante, contendo o peptídeo bruto, foi liofilizado, obtendo-se um material branco e floculoso, representando o produto final da síntese.

3.2. Reversão do aminoácido paramagnético TOAC

No processo de clivagem ácida, o TOAC perde seu elétron desemparelhado, devido à protonação do grupo nitróxido. Esta reação não é interessante, pois anula a propriedade paramagnética deste composto, fato este que nos impede de observar seu comportamento na RPE (TONIOLO et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2002). Para recuperar a propriedade paramagnética, foi feita uma reação chamada de reversão, onde o peptídeo contendo a sonda foi colocado em um meio alcalino para a desprotonação do grupo nitróxido. Neste processo, diluiu-se o peptídeo bruto em água deionizada e adicionou-se hidróxido de amônio até o pH atingir aproximadamente 10,0. A reação durou 4 horas e foi monitorada, a cada 60 minutos, por Cromatografia Líquida de Alta Performance - CLAE (ou *High Performance Liquid Chromatography* - HPLC), utilizando-se gradiente de 5 a 95% de solvente B em 30 minutos (solvente A = água deionizada em 0,045% de TFA e solvente B = acetonitrila em 0,036% de TFA).

3.3. Purificação e caracterização dos Peptídeos por CLAE

Por meio da CLAE em fase reversa foram realizadas a purificação e caracterização dos peptídeos. A utilização dos mesmos somente ocorreu se o grau de pureza alcançado foi maior que 95 %.

As purificações foram realizadas em modo semipreparativo utilizando um CLAE System Gold BECKMAN, com coluna de fase reversa C4 da marca VYDAC de dimensão 1,0 x 25 cm. O grau de pureza das frações foi determinado em um CLAE Prostar 400/Dynamax System VARIAN, com uma coluna analítica (0,46 x 25 cm) de fase reversa C18 Ultrasphere BECKMAN.

Os solventes para a purificação dos peptídeos marcados com TOAC foram 0,02 mol L⁻¹ de acetato de amônio em pH 5 (solvente A2) e 90 % acetonitrila em solvente A2 (solvente B2). Estes solventes foram utilizados para evitar a protonação do TOAC, pois em pHs mais ácidos, como nos solventes normalmente utilizados no laboratório, notou-se a protonação do grupo nitróxido.

O teor de pureza das frações obtidas foram determinadas por CLAE analítica utilizando os solventes A (0,045 % de TFA em água deionizada) e B (0,036 % de TFA em acetonitrila), e o programa empregado foi um gradiente de 5 a 95 % de solvente B em 30 minutos.

A completa caracterização dos peptídeos sintetizados foi comprovada por análise de aminoácidos e espectrometria de massas, descritas a seguir.

3.4. Análise de Aminoácidos

A análise de aminoácidos (AAA) foi feita para comprovar a obtenção correta dos peptídeos. Nesta análise, os peptídeos foram submetidos a hidrólise ácida e a solução de aminoácidos obtida foi avaliada utilizando uma coluna de troca iônica, com posterior revelação pelo método de derivatização pós-coluna por *orto*-ftaldeído (OPA). Estas análises foram realizadas utilizando um analisador Shimadzu LC-10A/C-47A existente em nosso laboratório

A hidrólise ácida foi feita com 1 mL de ácido clorídrico 6 mol L⁻¹ e 80 µL de uma solução de 5 % de fenol em água por 72 h a 110°C, após borbulhamento de nitrogênio por 1 min. Após este período, as amostras foram secas utilizando-se de um condensador e uma bomba de vácuo. O material seco foi dissolvido em solução tampão de citrato de sódio 0,2 mol L⁻¹ em pH 2,2. O volume empregado foi calculado de acordo com a massa de peptídeo hidrolisada (1 mg:1 mL). Esta solução foi filtrada em uma unidade filtrante GV Millex - Millipore e posteriormente injetada no analisador de aminoácidos previamente calibrado com um padrão que permite relacionar as áreas dos picos obtidos e os seus respectivos tempos de retenção com a concentração e o tipo de aminoácido, respectivamente.

3.5. Espectrometria de Massas

Os espectros de massas foram obtidos em um espectrômetro de massas Fison Plataform ESI, com injeção direta com uma bomba Shimadzu LC-10AD, em modo de detecção positiva, controlados por uma Workstation Compaq modelo AP200, localizado no Instituto de Química de Araraquara - UNESP, no Departamento de Química Orgânica.

A espectrometria de massas é uma ferramenta muito útil na caracterização dos peptídeos, pois permite determinar a razão massa molecular/carga (MM/z) das amostras analisadas. A técnica basicamente baseia-se em uma câmara injetora que ioniza a amostra por um método chamado *eletrospray*, um quadrupolo simples e um detector, todos dentro de um sistema a vácuo.

O espectro de massas mostra a razão MM/z , e assim permite calcular as massas moleculares obtidas experimentalmente através da fórmula :

$$MM_{\text{pept}} = \frac{(MM_z + z \cdot MM_{H^+})}{z}$$

onde MM_{pept} é a massa molecular do peptídeo analisado, MM_z é a massa molecular quando o peptídeo está com carga z ($z = 1, 2, 3 \dots$), z é a quantidade de cargas que contém o peptídeo e MM_{H^+} é a massa molecular do hidrogênio protonado, de valor 1,008 g/mol.

3.6. Atividade Biológica

A ação antimicrobiana dos peptídeos sintetizados foi testada contra diversos tipos e espécies de microrganismos. Os testes de susceptibilidade antimicrobiana foram realizados por métodos de diluição em meio líquido, que possibilita a obtenção de resultados quantitativos, como a concentração inibitória mínima (CIM) (SHIN et al., 2005; BENINCASA et al., 2006). O CIM é definido como a menor concentração em que não há crescimento detectável do microrganismo. Já a concentração fungicida mínima (CFM) é a menor concentração usada da amostra contra cepas de fungos em que há morte celular do microrganismo. O CIM é geralmente utilizado para

avaliar graus relativos de susceptibilidade de uma bactéria a agentes antimicrobianos e para comparar atividades relativas de fármacos comerciais contra várias espécies bacterianas.

3.6.1. Atividade antibacteriana

As cepas de bactérias utilizadas para realizar o teste da atividade antimicrobiana foram as seguintes: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Bacillus subtilis* (ATCC 19695), obtidas através do “Banco de Culturas Tropicais, Fundação André Tosello” (Campinas, SP). Estas foram cultivadas em uma temperatura de 37°C até a densidade ótica atingir 1,0 (DO = 1,0 a λ = 590 nm). Na fase logarítmica as bactérias foram diluídas no meio (1:50 para as Gram-negativas e 1:100 para as Gram-positivas).

Os ensaios de inibição do crescimento bacteriano consistiram na incubação das bactérias em fase exponencial de crescimento com uma diluição seriada (0,5 a 256 $\mu\text{mol L}^{-1}$) dos PAMs em microplacas esterilizadas com 96 poços (Nunc F96 microtiter plate, Denmark) em um volume final de 100 μL composto de 50 μL da cultura bacteriana contendo aproximadamente 1×10^5 (UFC) e 50 μL de peptídeo dissolvido em água. Como controle representativo da ausência de proliferação bacteriana, incubou-se o formaldeído 0,4 % (v/v) com a suspensão bacteriana. A inibição do crescimento foi determinada pela medida de densidade ótica a 595 nm com uma leitora de microplacas BioRad Modelo 3550 - UV (Hercules, CA, USA) após incubação por 18 h a 37°C. Os ensaios foram realizados em triplicata, em colaboração com o grupo de pesquisa do laboratório da Prof^a. Dr^a. Mariana S. Castro, da Universidade de Brasília (UNB).

3.6.2. Atividade antifúngica

O conhecimento sobre a ação dos peptídeos sobre os fungos tem aumentado recentemente. O seu modo de ação foi primeiramente descrito envolvendo tanto a lise celular do fungo quanto a interferência na síntese da sua parede celular. Entretanto, como o número de peptídeos antifúngicos conhecidos tem crescido rapida-

mente, novos modos de ação têm sido elucidados, como ligação ao ergosterol/colesterol na membrana, permeabilização, lise da membrana citoplasmática, entre outros mecanismos (JENSSEN et al., 2006).

Os microrganismos utilizados para o teste da atividade antifúngica foram: *Candida albicans* (ATCC 90028) e *Cryptococcus neoformans* (ATCC 90012). Os microrganismos usados para os testes foram obtidos do Laboratório de Micologia do Departamento de Análises Clínicas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP. Os fungos foram cultivados e mantidos em ágar Sabouraud dextrose por 24 e 48 h, em temperatura de 35°C.

Os testes da atividade antifúngica foram realizados usando o método da microdiluição em caldo como descrito na M27-A2, documento do “*Clinical and Laboratory Standards Institute*” (CLSI), com algumas modificações. Neste protocolo foi utilizado o meio RPMI 1640 com L-glutamina em pH 7,0, com 0,165 mol L⁻¹ de ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico (MOPS), enriquecido com 2 % de glicose.

As amostras foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO) e o volume adicionado à placa com meio de RPMI foi calculado para que a concentração do primeiro composto natural fosse 250 µg/mL. A suspensão das células foi preparada em solução fisiológica 0,85 % com uma turbidez equivalente a escala McFarland 0,5 e diluído 1:100 em RPMI para a concentração final 1×10^5 a 5×10^5 unidades formadoras de colônia (UFC)/mL. Esta suspensão foi inoculada na placa de microdiluição, já preparada previamente. As placas foram incubadas sob agitação a 37°C por 24 h para as espécies do gênero *Candida* e 48 h para *Cryptococcus neoformans*. O controle utilizado foi fluconazol e anfotericina (Sigma®).

A concentração fungicida mínima (CFM) foi determinada retirando-se alíquotas de cada poço das placas do ensaio anterior e colocando-as em novos poços com meio de cultura estéril, sem adição de peptídeos, durante 24 h de incubação, obtendo-se o valor da CFM para cada peptídeo. Essa etapa do projeto foi desenvolvida em colaboração com o grupo de pesquisa da Prof^a. Dr^a. Maria José Soares Mendes Giannini, no Laboratório de Micologia Clínica, Departamento de Análises Clínicas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP.

3.6.3. Atividade hemolítica

O protocolo foi modificado de *Onuma et al.*, 1999. Células vermelhas de sangue humano do tipo O⁺ foram separadas do plasma por sedimentação e lavadas 3 vezes em tampão 0,01 mol L⁻¹ Tris HCl pH 7,4 contendo 0,15 mol L⁻¹ de NaCl. Uma suspensão celular a 1 % (v/v) e uma solução a 128 μmol L⁻¹ do peptídeo foi preparada no mesmo tampão. Em tubos plásticos de 1,5 mL, diluições seriadas da solução dos peptídeos foram usadas para determinar a HC₅₀ (concentração do peptídeo que causou 50 % de hemólise) e o volume final em cada tubo foi 200 μL (100 μL da solução diluída do peptídeo e 100 μL da suspensão celular).

Depois de incubação a temperatura ambiente por 60 minutos, os tubos foram centrifugados a 3000 rpm por 2 min e alíquotas de 100 μL do sobrenadante foram pipetadas em microplacas de 96 poços. A absorbância a 405 nm foi determinada usando o leitor de microplacas da BioRad modelo 3550 UV. A referência de 100 % de lise foi realizada empregando uma solução contendo 100 μL da suspensão celular misturada com 100 μL de 1 % (v/v) do detergente Triton X-100. O branco foi obtido por meio de uma solução contendo 100 μL da suspensão celular com 100 μL de tampão Tris. Os ensaios foram realizados em triplicata. O valor da HC₅₀ foi determinado por regressão logarítmica. Estes ensaios hemolíticos foram realizados em colaboração com o grupo de pesquisa da Prof^a. Dr^a. Mariana S. Castro, da Universidade de Brasília (UNB).

3.7. Fluorescência

A aquisição dos dados de fluorescência foi realizada em um espectrofotômetro de fluorescência Cary Eclipse Varian e o comprimento de onda de excitação utilizado foi de 280 nm. O espectro de emissão de fluorescência foi adquirido em uma faixa de 300 a 500 nm, obtendo-se a intensidade de fluorescência e o comprimento de onda de emissão máxima para cada peptídeo e condição estudada.

Para os estudos de fluorescência, preparou-se uma solução estoque de peptídeo, na qual a concentração foi determinada utilizando-se um espectrofotômetro UV 1601 PC Shimadzu de duplo feixe, situado em nosso laboratório. A concentração das soluções usadas nos experimentos foi determinada pela sua absorbância no

comprimento de onda em 280 nm, usando o coeficiente de extinção molar do triptofano $\varepsilon = 5.550 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (FASMAN, 1976) numa sala com temperatura ajustada a 25°C. Os espectros de fluorescência foram obtidos utilizando-se uma concentração de $10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de peptídeos (exceto nos estudos de permeabilização, em que utilizamos $2 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$), com volume final (cubeta) de 600 μL . A temperatura do sistema foi mantida a 25°C por meio de um controlador de temperatura Cary Temperature Controller da marca Varian, a base de circulação de água para refrigeração do sistema.

3.7.1. Estudos de permeabilização

Após a obtenção dos peptídeos, estes foram avaliados quanto a sua capacidade de permeabilizar vesículas. Para tal estudo, confeccionamos vesículas contendo em seu interior um fluoróforo e, havendo permeabilização, ou seja, rompimento ou dano na camada lipídica, este composto é liberado do seu interior, ocorrendo uma maior emissão de fluorescência. O aumento da intensidade de fluorescência indica o grau de permeabilização da membrana pelo peptídeo (NESGAARD et al., 2009).

Assim, devido à composição dos eritrócitos humanos serem ricos em esfingomielina (SM) - principalmente a face externa da bicamada - e as bactérias Gram-negativas serem ricas em fosfoetanolamina (PE), priorizamos estudar a influência de cada um destes lipídios na interação com os peptídeos. Para isto, foram preparados dois tipos de vesículas, uma contendo dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), ácido dipalmitoilfosfatídico (DPPA) e esfingomielina do cérebro (SM) e outra DPPC, DPPA e dipalmitoilfosfatidiletanolamina (DPPE) com razão m/m/m de 80:5:15, respectivamente, com concentração de 15 mmol L^{-1} . As estruturas dos lipídios empregados neste trabalho estão representadas na figura 15. Todos os lipídios foram adquiridos da empresa Avanti Polar Lipids.

Os lipídios, já devidamente pesados, foram ressuspensos em clorofórmio e em metanol (4:1) e evaporados em N_2 até formarem um fino filme aderido na parede do tubo de ensaio. Este filme foi mantido sob vácuo durante 12 h para eliminação dos solventes. Logo após este procedimento, o filme foi hidratado com 1 mL de

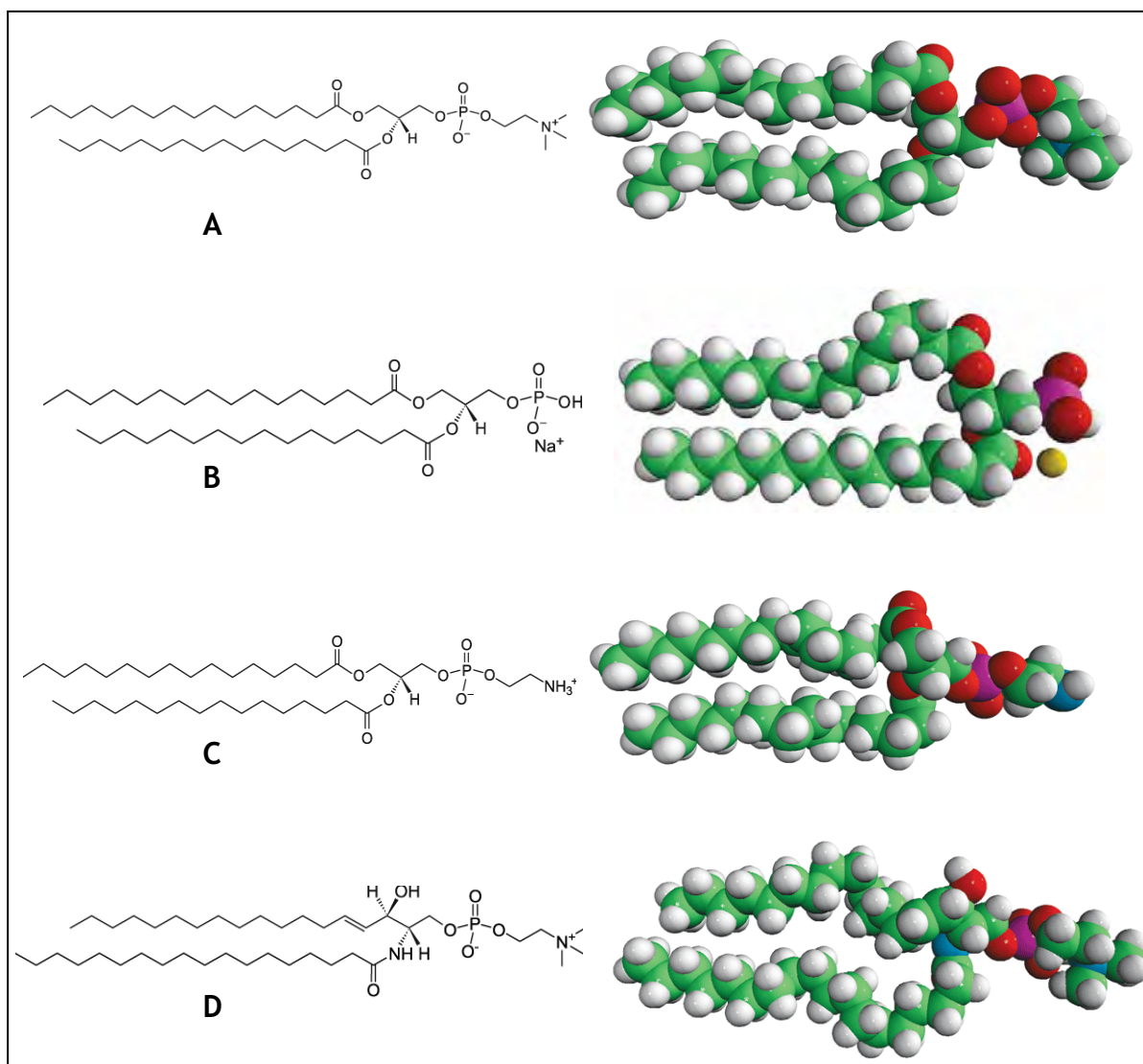


Figura 15: Estruturas dos lipídios empregados nos estudos com lipossomas. À esquerda, as estruturas em projeção de Fischer e à direita as representações em espaço cheio. (A) dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC); (B) ácido dipalmitoilfosfatídico (DPPA); (C) dipalmitoilfosfoetanolamina (DPPE) e (D) esfingomielina (SM).

uma solução 80 mmol L^{-1} de carboxifluoresceína em tampão Tris-HCl $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, NaCl $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7,4. A carboxifluoresceína possui a capacidade de emitir luz em 520 nm após ser excitado no comprimento de onda de 494 nm (FLEMING et al., 2008; SHAHIDULLAH et al., 2008). A solução obtida foi, durante uma hora, sucessivamente colocada em banho-maria a 60°C , agitada num equipamento Vortex e ultrassonicada, para que as camadas fossem quebradas e o tamanho das vesículas diminuídas (agitação seguida de repouso).

Para se obter as vesículas unilamelares grandes (LUVs), as vesículas multilamelares foram submetidas a um extrusor (Avanti Polar Lipids), contendo filtro de

polycarbonato com poros de 100 nm (Avanti Polar Lipids) de diâmetro. Foram realizados 40 ciclos no extrusor para que os lipossomas ficassem com o mesmo tamanho. Durante essa etapa, o extrusor foi mantido aquecido a uma temperatura de aproximadamente 60°C. Pudemos notar após esta etapa que a solução de lipídios contendo carboxifluoresceína ficou um pouco mais translúcida, indicando a homogeneização dos lipossomas extruídos.

Após esta etapa, os lipossomas contendo carboxifluoresceína foram submetidos a uma coluna Sephadex G-50 (Amersham Biosciences®) para remoção dos fluoróforos que não foram incorporados a eles, usando-se tampão Tris-HCl 0,01 mol L⁻¹, NaCl 0,15 mol L⁻¹ e em pH 7,4.

Devido à instabilidade dos lipossomas, a suspensão de LUV foi usada até 24 h após a sua preparação. Os lipossomas foram armazenados em temperatura de 4°C.

Os ensaios de permeabilização foram realizados em uma concentração de 2 µmol L⁻¹ de peptídeo e 20 µL de lipossomas contendo o fluoróforo. Inicialmente, na cubeta adicionou-se tampão e os lipídios e analisou-se a sua fluorescência. Esperou-se 1 minuto para estabilização da mesma; caso a fluorescência diminuísse ou aumentasse, esta solução era descartada e repetia-se o procedimento. Esta é uma etapa limitante, pois os lipossomas devem estar emitindo um sinal de fluorescência constante pelo menos neste espaço de tempo, para que não haja interferências nas medidas, como o extravasamento do fluoróforo devido aos lipossomas instáveis.

Ao final do tempo de estabilização de um minuto, adicionou-se peptídeo na solução e coletaram-se os valores de intensidade de fluorescência no comprimento de onda de emissão de 520 nm durante 8 minutos. Após este período foi colocado uma solução de detergente Triton 1 % para se obter o valor de 100 % de lise dos lipossomas, permitindo a normalização dos dados obtidos e uma comparação mais efetiva entre os experimentos realizados (NESGAARD et al., 2008). Todos os experimentos foram realizados em triplicata e a margem de erro determinada.

3.7.2. Estudos de interação peptídeo/micelas

Estes ensaios foram feitos através da titulação do peptídeo com o detergente zwitteriônico lisofosfatidilcolina (LPC - figura 16) adquirido da Avanti Polar Lipids. Os parâmetros usados para analisar o comportamento estrutural dos peptídeos foram o comprimento de onda máxima de emissão ($\lambda_{\text{máx}}$) e a intensidade de fluorescência (I). Nestes estudos, uma solução estoque do detergente foi preparada em alta concentração (LPC 100 mmol L⁻¹), e armazenada sob refrigeração. As concentrações utilizadas durante a titulação variaram de 0 a 10 mmol L⁻¹ e, para cada experimento, utilizou-se o tampão Tris-HCl 0,01 mol L⁻¹, NaCl 0,15 mol L⁻¹ e em pH 7,4, com o intuito de simular o pH fisiológico.

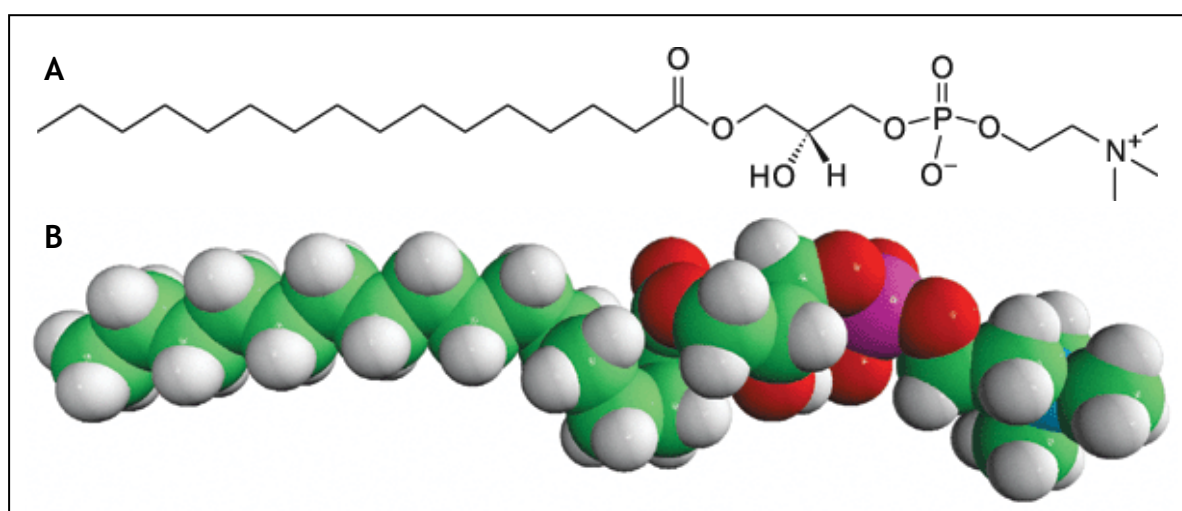


Figura 16: Estrutura do detergente zwitteriônico 1-palmitoil-2-hidroxi-*sn*-glicero-3-fosfocolina (LPC): (A) representação da estrutura do LPC em projeção de Fischer; (B) representação da estrutura do LPC em espaço cheio.

3.7.3. Estudos de interação peptídeo/lipossomas

Os lipossomas utilizados nestes estudos foram preparados utilizando as mesmas condições experimentais descritas nos estudos de permeabilização. A diferença é que, na ressuspensão do filme, não foi utilizada a carboxifluoresceína, somente o tampão Tris-HCl 0,01 mol L⁻¹, NaCl 0,15 mol L⁻¹ e em pH 7,4. Além disto, a razão entre a concentração de peptídeo e lipídio neste estudo foi muito menor que as utilizadas na permeabilização, pois neste estudo não era interessante a obten-

ção da lise das vesículas, mas sim somente a interação do peptídeo com o lipídio (CHEN et al., 1998).

Nestes ensaios, a quantidade de peptídeos foi mantida constante e as concentrações dos lipídios variaram de 0,1 mmol L⁻¹ até 0,8 mmol L⁻¹. O uso de concentrações superiores a 0,8 mmol L⁻¹ não foi viável, pois em ensaios anteriores realizados por nosso grupo foi observado a turbidez da solução estudada, o que poderia interferir nas leituras de fluorescência.

Para efeito de comparação, utilizou-se como principal parâmetro o comprimento de onda máximo, pois mudanças conformacionais sofridas pelo peptídeo podem causar uma maior ou menor aproximação das cadeias laterais de alguns aminoácidos ou do grupo TOAC com o grupo indol do triptofano, alterando a intensidade de fluorescência (CHEN et al., 1998).

3.7.4. Estudos de supressão de fluorescência

Para complementar os estudos de interação dos peptídeos com lipossomas e micelas, foram feitos experimentos de supressão de fluorescência em solução e na presença de ambos os miméticos de membrana.

A acrilamida é um supressor da fluorescência do triptofano. Este composto tem a capacidade de suprimir a fluorescência do triptofano em nosso caso através de choques colisionais provocados com o anel indol do triptofano. A acrilamida pode indicar a profundidade da inserção do fluoróforo em um sistema de membrana, pois, por ser uma molécula polar, não consegue inserir neste sistema. Assim, uma maior supressão da fluorescência indica uma maior exposição do triptofano ao meio polar (externo), representando uma menor inserção dentro do mimético de membrana. Essa supressão é medida numericamente por meio da constante de Stern-Volmer (K_{sv}) (ALSTON et al., 2008) para cada peptídeo nas diferentes condições estudadas (EFTINK et al., 1976). Esta constante é um parâmetro obtido a partir da tangente da curva de supressão, que relaciona a intensidade de fluorescência (F_0/F) com a concentração do supressor.

Estes estudos foram realizados com as amostras provenientes do final dos estudos de interação peptídeo/miméticos de membrana (item 3.7.2. e 3.7.3.), com adições sucessivas de acrilamida (10 em 10 mmol L⁻¹), até a concentração final de 50 mmol L⁻¹.

3.8. Dicroísmo Circular

As análises de CD foram feitas em um espectropolarímetro Jasco J-715, localizado no Instituto de Física de São Carlos - Universidade de São Paulo, Grupo de Biofísica Molecular "Sérgio Mascarenhas". O tempo de integração foi de 3 s por ponto, em celas de 1,0 mm de caminho óptico, com 16 varreduras por espectro e a concentração de $80 \mu\text{mol L}^{-1}$. Para todos os experimentos a leitura foi feita a cada 0,5 nm.

Em nossos ensaios, utilizamos inicialmente 4 meios diferentes para averiguar o comportamento estrutural dos peptídeos: **1)** solução aquosa (pH 7,38); **2)** 60 % de trifluoretanol (TFE); **3)** 10 mmol L^{-1} de 1-palmitoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina ou lisofosfatidilcolina (LPC); e **4)** 10 mmol L^{-1} de dodecil sulfato de sódio (SDS) (figura 17).

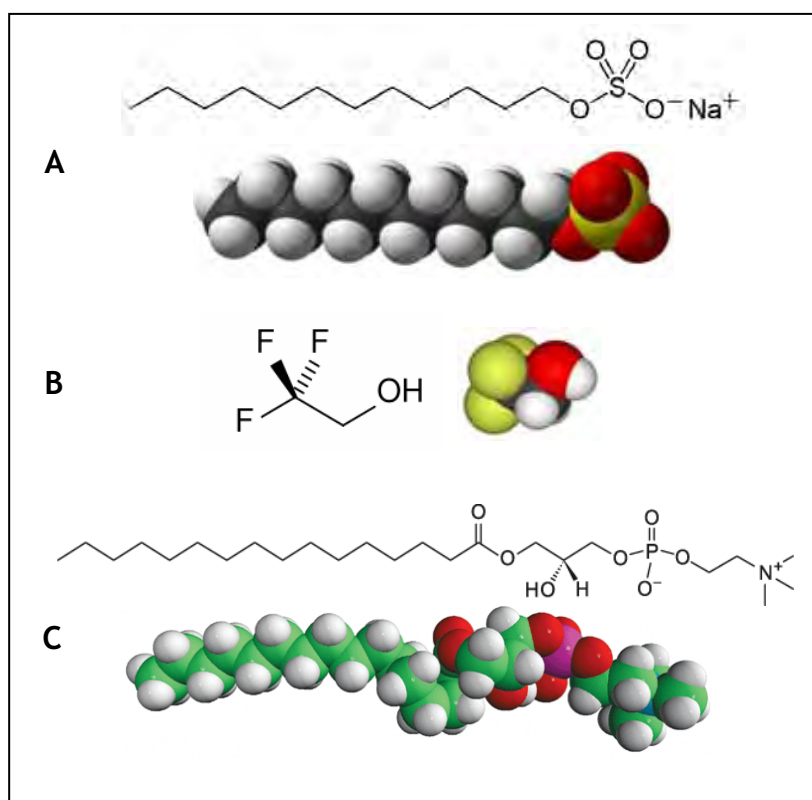


Figura 17: Estruturas dos compostos usados para analisar a estruturação do peptídeo pela técnica de CD, representados em projeção de Fischer e em espaço cheio: **(A)** dodecil sulfato de sódio (SDS); **(B)** trifluoretanol (TFE); **(C)** detergente zwitteriônico 1-palmitoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina ou lisofosfatidilcolina (LPC).

Além destas condições, também testamos os peptídeos nas duas vesículas descritas anteriormente, DPPE/DPPA/DPPC e SM/DPPA/DPPC proporção 15:5:80, respectivamente, na concentração de 0,8 mmol L⁻¹.

O cálculo da elipcidade molar $[\theta]$, utilizado para converter os dados coletados inicialmente em milidegree, foi feito utilizando a seguinte fórmula (CASALLA-NOVO et al., 2006):

$$[\theta] = \frac{\text{valor (em milidegree)}}{10 \times \ell \times [\text{peptídeo}] \times \text{n}^\circ \text{ de aa}}$$

onde no numerador é inserido o valor obtido em milidegree pelo equipamento, ℓ é o caminho óptico utilizado na cubeta (0,1 cm), $[\text{peptídeo}]$ é a concentração de peptídeo usada no experimento em mol L⁻¹ e n° de aa é a quantidade de resíduos presentes no peptídeo que, em nosso caso, é de número 21.

3.9. Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)

Para confirmar a manutenção da capacidade paramagnética dos peptídeos e obter informações sobre a mobilidade da região contendo o grupo TOAC, foram realizados experimentos com os peptídeos análogos ao “Wild Type” por meio da RPE. Assim, as amostras foram analisadas em células de quartzo num espectrômetro Varian E109 a 9,5 GHz, com potência de microondas a 5 mW (para evitar efeitos de saturação), a 25°C, com campo magnético modulado em amplitudes menores que um quinto das larguras das linhas espectrais. O equipamento está localizado no Instituto de Física de São Carlos - Universidade de São Paulo, Grupo de Biofísica Molecular “Sérgio Mascarenhas”, sob a supervisão do Prof. Dr. Antonio José da Costa Filho.

As análises foram feitas nas seguintes condições: 1) em solução aquosa, em concentrações peptídicas de 20 e 80 μmol L⁻¹; 2) em micelas de LPC a 10 mmol L⁻¹ numa concentração de 80 μmol L⁻¹ de peptídeo e 3) em lipossomas de composições SM:PA:PC e PE:PA:PC em concentrações de 0,8 mmol L⁻¹, empregando uma concentração peptídica de 20 μmol L⁻¹.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Síntese Peptídica em Fase Sólida (SPFS)

A síntese foi realizada inicialmente até a obtenção da seqüência Fmoc-FNVAKNFI utilizando a resina Rink Amida MBHA de grau de substituição (0,68 mmol/g), partindo de uma escala inicial de 1,0 mmol (1,67 g de resina). Neste ponto, passou-se piperidina para retirada do grupo Fmoc e empregou-se 0,2 mmol para a síntese do peptídeo contendo TOAC¹³-hyC e 0,4 mmol para a síntese da seqüência LDVAKKIGKAAFNVAKNFI, sendo o restante (0,4 mmol) guardado em refrigeração para posteriores sínteses. A peptidil-resina contendo a seqüência LDVAKKIGKAAFNVAKNFI foi dividida, após desproteção, em 3 frações contendo 0,2 mmol, 0,1 mmol e 0,1 mmol, para as sínteses dos peptídeos TOAC²-hyC e TOAC⁰-hyC e WT-hyC (seleção), respectivamente.

O acoplamento do aminoácido posterior ao TOAC na seqüência primária requereu uma atenção especial em relação aos demais aminoácidos. Devido à sua estrutura, o TOAC dificulta a entrada do próximo resíduo da seqüência, já que ele apresenta um alto impedimento estérico devido às suas tetrasubstituições, e seu grupamento amino quando ligado à cadeia peptídica (NAKAIE et al., 1983; TONIOLO et al., 1995) possui um pK_a baixo (aproximadamente 5,5). No estado livre, este grupo apresenta um pK_a em torno de 8. Portanto, parte da dificuldade na reação de acoplamento está relacionada com a baixa nucleofilicidade do grupamento amino do TOAC, o que nos levou a usar reagentes mais potentes para que o acoplamento fosse eficiente (ZHANG et al., 2007).

Desta forma, os próximos aminoácidos da síntese, em nosso caso alanina para o TOAC¹³-hyC e glicina para o TOAC²-hyC, foram acoplados com 6 reações repetitivas, utilizando 5 vezes de excesso de Fmoc-aminoácido e da mistura acilante HATU/DIEA em altas temperaturas (50 a 60°C), sob constante agitação, por aproximadamente 4 h. O acompanhamento da reação foi realizado por CLAE, onde observamos a formação de um pico com maior tempo de retenção, em virtude da entrada do Fmoc-aminoácido, como exemplificado para o peptídeo TOAC¹³-hyC (figura 18).

Ao final, tivemos um rendimento de acoplamento desta etapa de aproximadamente 60% para ambos análogos.

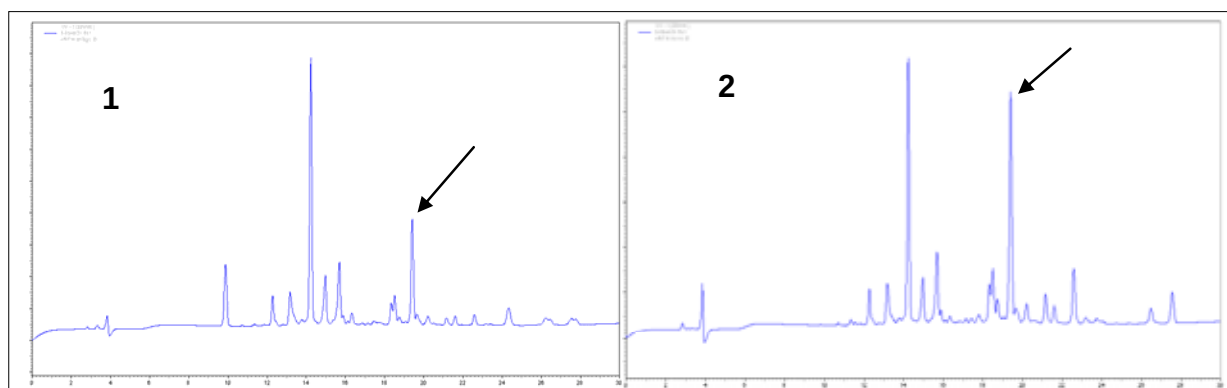


Figura 18: Acompanhamento por CLAE do acoplamento da alanina no TOAC¹³-hyC. O cromatograma 1 representa o peptídeo após 3 etapas de acoplamento e o cromatograma 2 o peptídeo após 6 etapas. O pico contendo a alanina é indicado pela seta (identificado por espectrometria de massas).

Após a incorporação da alanina e da glicina na sequência peptídica, e acetilação dos grupos aminos restantes (que não foram acoplados), a síntese foi continuada. Após o acoplamento do último Fmoc-aminoácido, desprotegeu-se com piperidina e realizou-se a etapa de clivagem, obtendo-se os peptídeos na forma bruta (figuras 19 a 22).

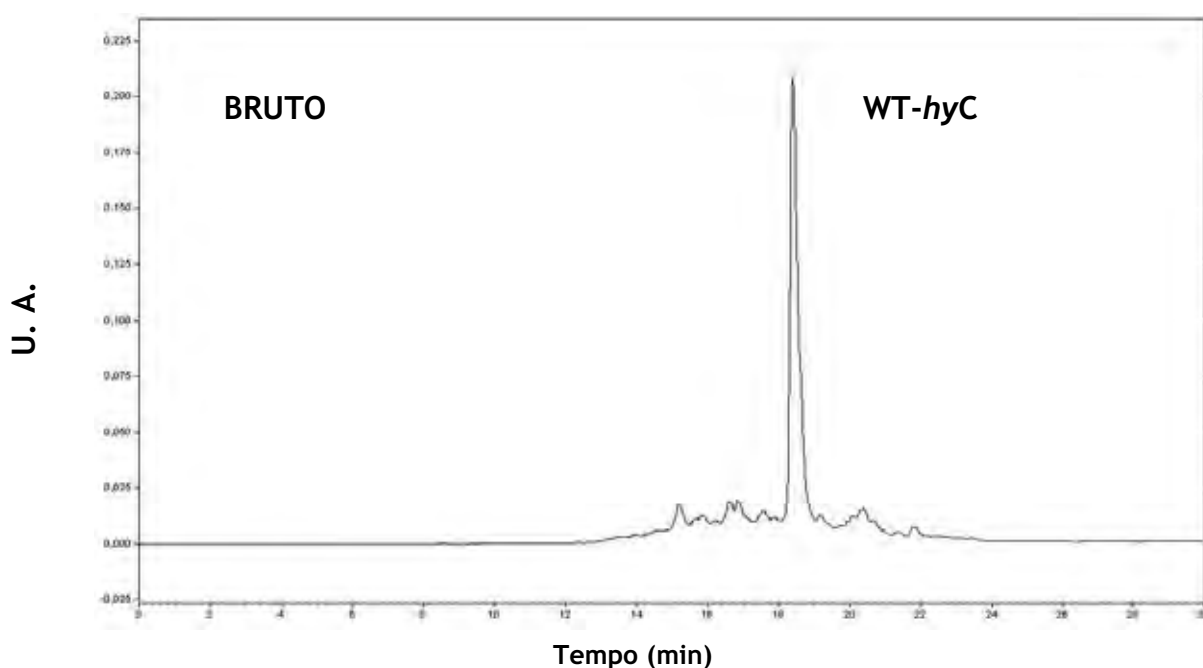


Figura 19: Perfil cromatográfico do peptídeo WT-hyC bruto.

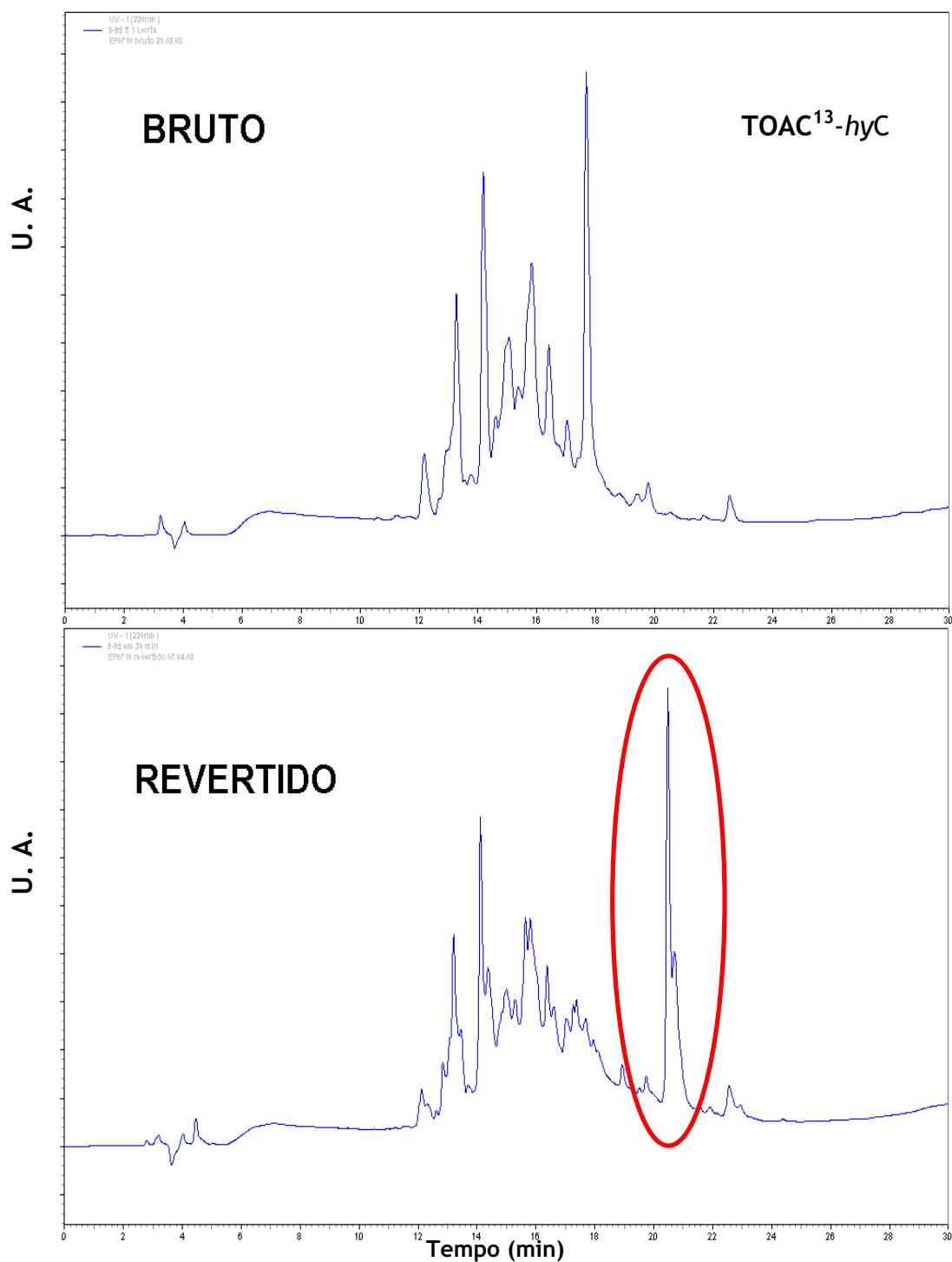


Figura 20: Cromatogramas antes e após a reversão do peptídeo TOAC¹³-hyC. Notou-se após a reversão a formação de um pico com maior tempo de retenção, em destaque, correspondente ao material desejado.

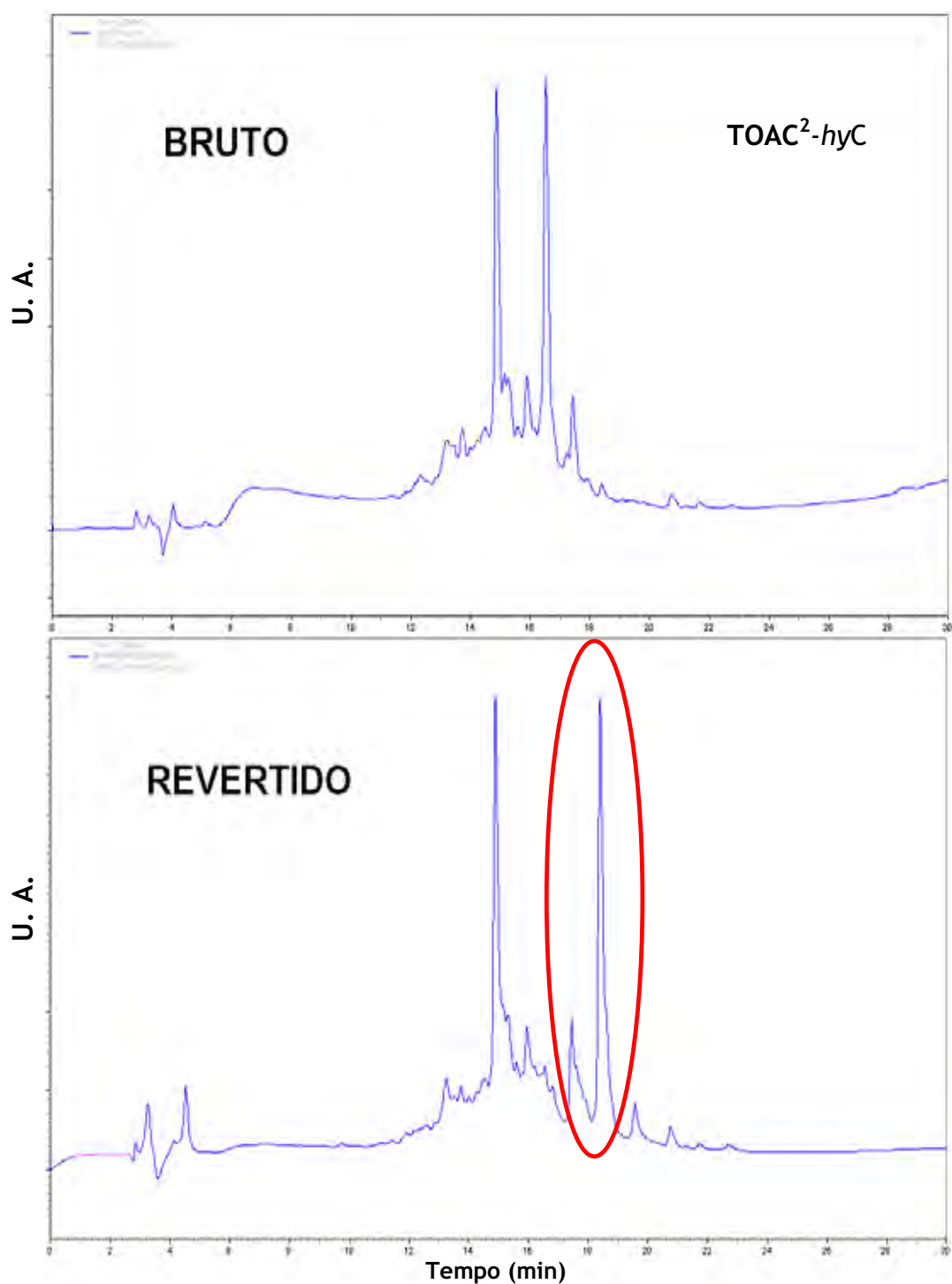


Figura 21: Cromatogramas antes e após a reversão do peptídeo TOAC²-hyC. Notou-se após a reversão a formação de um pico com maior tempo de retenção, em destaque, correspondente ao material desejado.

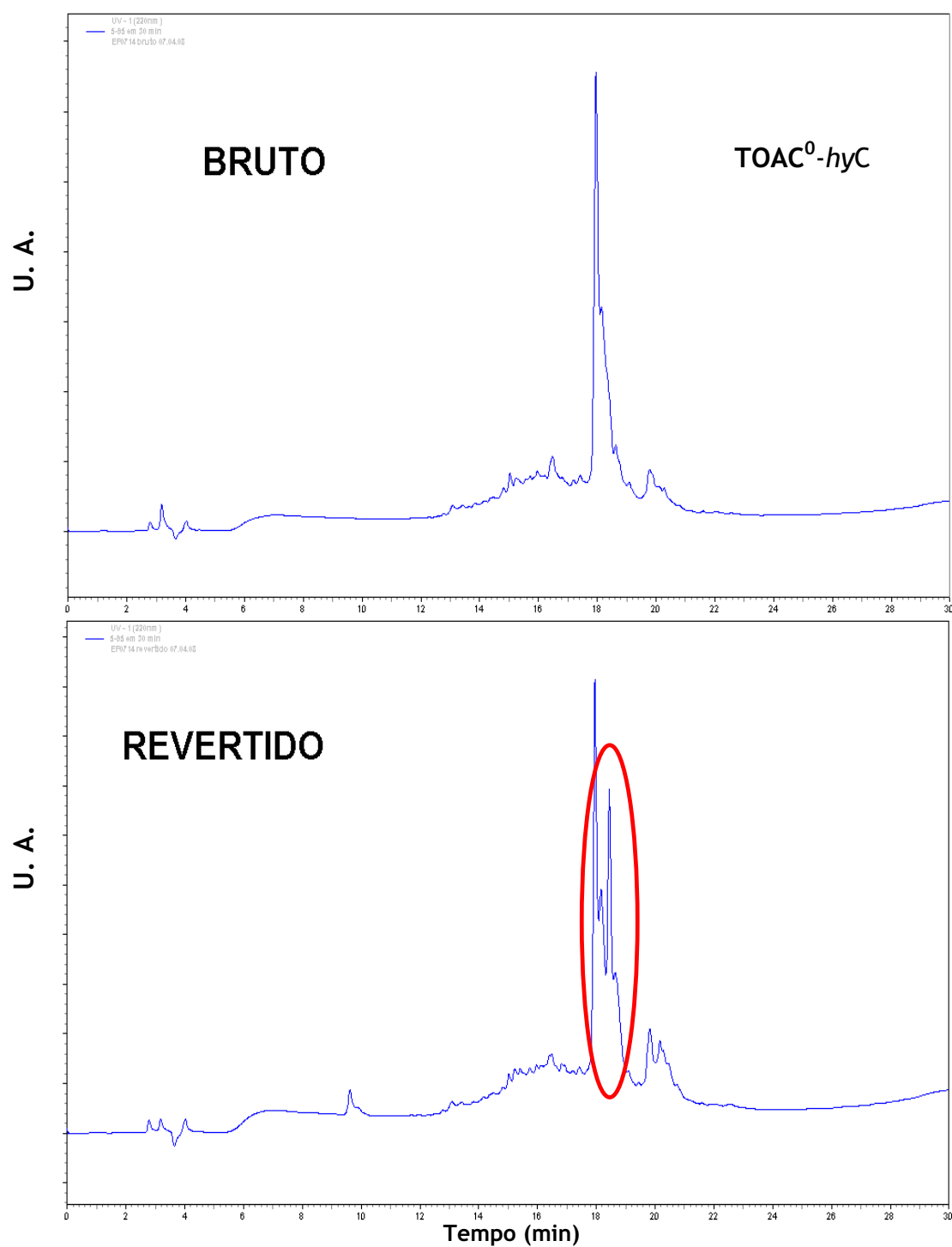


Figura 22: Cromatogramas antes e após a reversão do peptídeo TOAC⁰-hyC. Notou-se após a reversão a formação de um pico com maior tempo de retenção, em destaque, correspondente ao material desejado.

4.2. Reversão do aminoácido paramagnético TOAC

A reversão do TOAC foi monitorada por CLAE, onde pudemos evidenciar a formação de um pico com tempo de retenção maior que os picos majoritários do espectro bruto, o que representa nosso material de interesse, já que a perda de um próton aumenta a hidrofobicidade da molécula.

Na figura 20, podemos observar nitidamente, no cromatograma do material revertido, o aparecimento de um pico com maior tempo de retenção para o peptídeo TOAC¹³-hyC, o que evidencia a ocorrência da desprotonação do grupamento NO (nitroxido). Este procedimento foi realizado para os demais peptídeos contendo o TOAC em sua cadeia peptídica (figuras 21 e 22).

Na tabela 1 estão apresentadas as massas de peptidil-resinas clivadas, e dos peptídeos brutos e revertidos.

O aumento da massa após a etapa de reversão pode ser explicado pela presença do sal acetato de amônio formado nesta etapa.

Tabela 1: Massas das peptidil-resinas e dos peptídeos brutos e revertidos.

PEPTÍDEO	MASSA DE PEPTIDIL-RESINA CLIVADA (mg)	MASSA DE PEPTÍDEO BRUTO (mg)	MASSA PEPTÍDEO REVERTIDO (mg)
WT-hyC	300	133	-
TOAC ⁰ -hyC	424	182	181
TOAC ² -hyC	450	220	231
TOAC ¹³ -hyC	694	239	252

4.3. Purificação e caracterização dos peptídeos

Após a reversão dos peptídeos, passamos à etapa de purificação e caracterização dos mesmos.

A purificação foi realizada em um sistema de CLAE semipreparativo, utilizando o gradiente de 40 a 70 % de solvente B2 (sistema contendo acetato) em 120 minutos. A determinação do gradiente a ser utilizado foi feita por meio dos valores

dos tempos de retenção obtidos nos cromatogramas dos peptídeos revertidos (aproximadamente 20 min que corresponde a 60% de acetonitrila).

Alguns peptídeos necessitaram de repurificação, pois no primeiro processo não conseguimos chegar a um grau de pureza superior a 95%. Sendo assim, para os peptídeos TOAC⁰-hyC e WT-hyC foram realizadas outras purificações usando programas mais longos, de 37 a 57% em 100 minutos e de 45% a 60% de solvente B2 em 180 minutos, respectivamente.

Os tubos coletados na purificação foram analisados em um cromatógrafo analítico, com gradiente de solvente B de 5 a 95 % (sistema contendo TFA) em 30 minutos. Os tubos contendo o material puro foram juntados (processo denominado de corte) e liofilizados, obtendo-se as frações puras.

Os perfis cromatográficos das frações mais puras (todas com grau de pureza superior a 95%) com o seu respectivo tempo de retenção na coluna estão nas figuras 23, 24, 25 e 26.

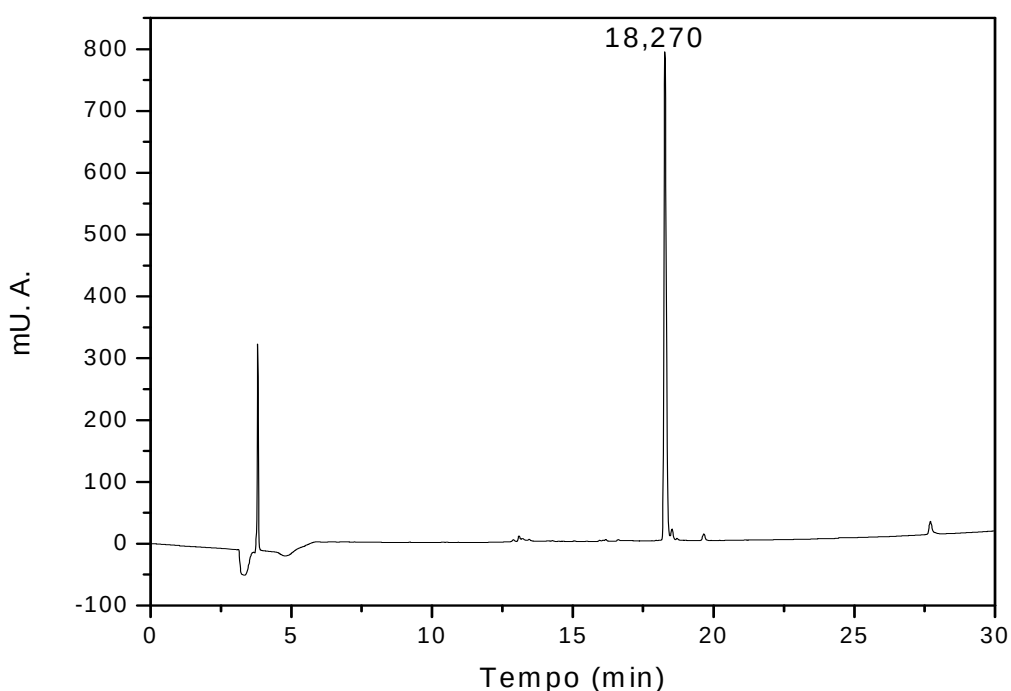


Figura 23: Perfil cromatográfico do peptídeo selvagem WT-hyC puro, com o respectivo tempo de retenção na coluna de fase reversa C18.

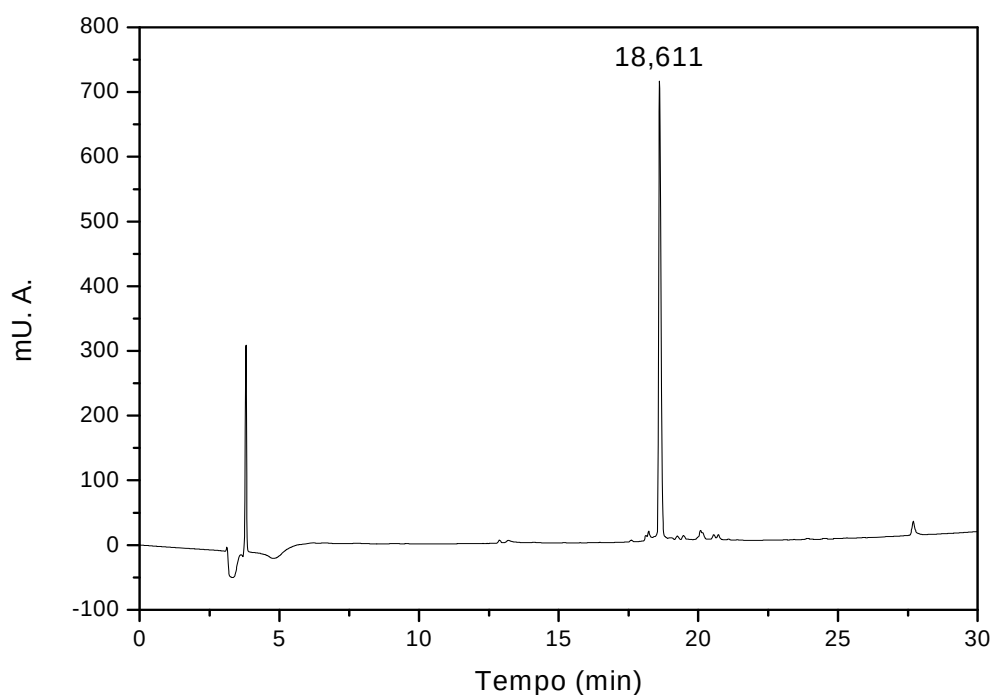


Figura 24: Perfil cromatográfico do peptídeo TOAC⁰-hyC puro, com o respectivo tempo de retenção na coluna de fase reversa C18.

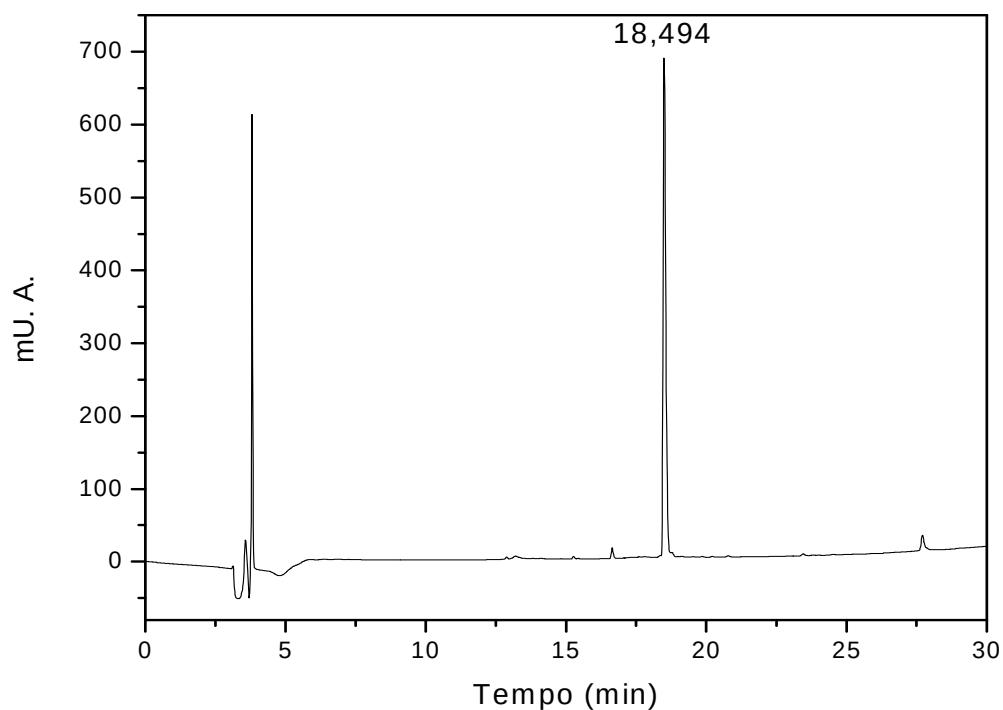


Figura 25: Perfil cromatográfico do peptídeo TOAC²-hyC puro, com o respectivo tempo de retenção na coluna de fase reversa C18.

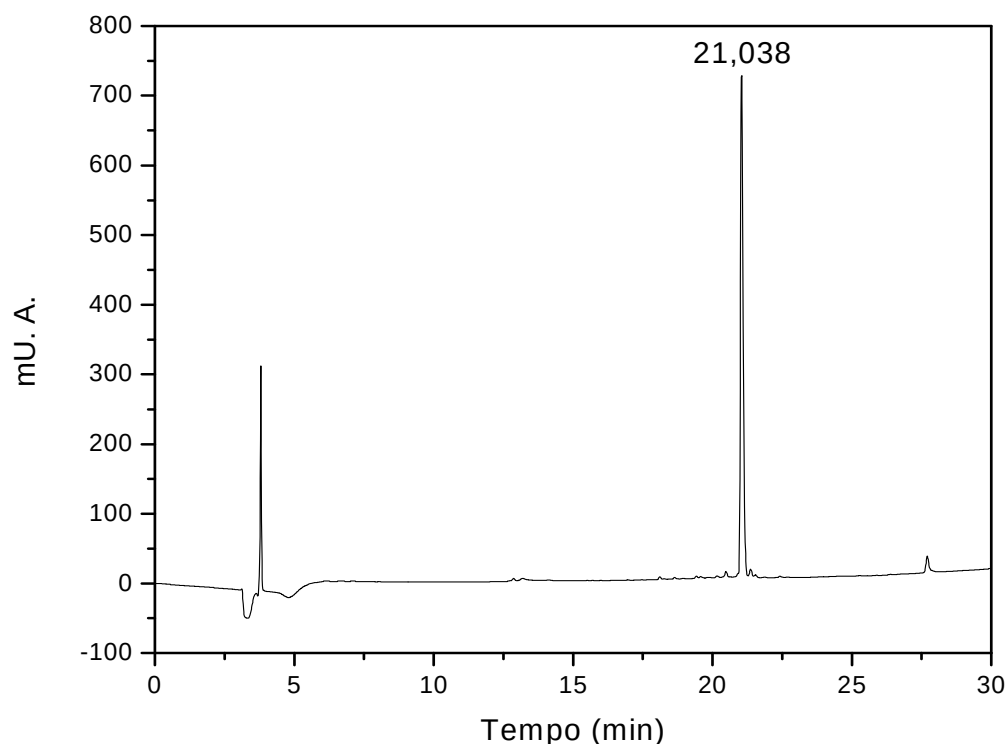


Figura 26: Perfil cromatográfico do peptídeo TOAC¹³-hyC puro, com o respectivo tempo de retenção na coluna de fase reversa C18.

A tabela 2 mostra a quantidade de peptídeo utilizada nas etapas de purificação, as massas de peptídeos puros (com teor maior que 95% de pureza) e os rendimentos finais das sínteses.

Tabela 2: Massas do peptídeo “Wild Type” e dos análogos contendo TOAC utilizadas e obtidas no processo de purificação, bem como os valores do rendimento obtido.

PEPTÍDEO	MASSA INJETADA NO CLAE (mg)	MASSA DE PEPTÍDEO PURO (mg)	RENDIMENTO FINAL (%)
WT-hyC	133	9,0	13
TOAC ⁰ -hyC	164	8,2	9
TOAC ² -hyC	80	17,5	21
TOAC ¹³ -hyC	53	10,5	13

A confirmação da obtenção dos peptídeos foi feita inicialmente pela espectrometria de massas, onde podemos observar a razão massa molecular/carga do peptídeo. Devido à calibração do aparelho para moléculas pequenas, os picos com 100% de saturação no espectro mostraram a razão massa/carga, principalmente para cargas 2, 3 e 4.

A análise dos espectros confirmou a obtenção dos peptídeos desejados:

WT-hyC = 2.289,75 g/mol ($MM/3 = 764$ e $MM/2 = 1.146$ g/mol) - figura 27;

TOAC⁰-hyC = 2.486 g/mol ($MM/4 = 623$ e $MM/3 = 830$ g/mol)- figura 28;

TOAC²-hyC = 2.299,8 g/mol ($MM/3 = 768$ e $MM/2 = 1.152$ g/mol)- figura 29 e

TOAC¹³-hyC = 2.414,9 g/mol ($MM/4 = 605$, $MM/3 = 807$ e $MM/2 = 1.209$ g/mol) - figura 30.

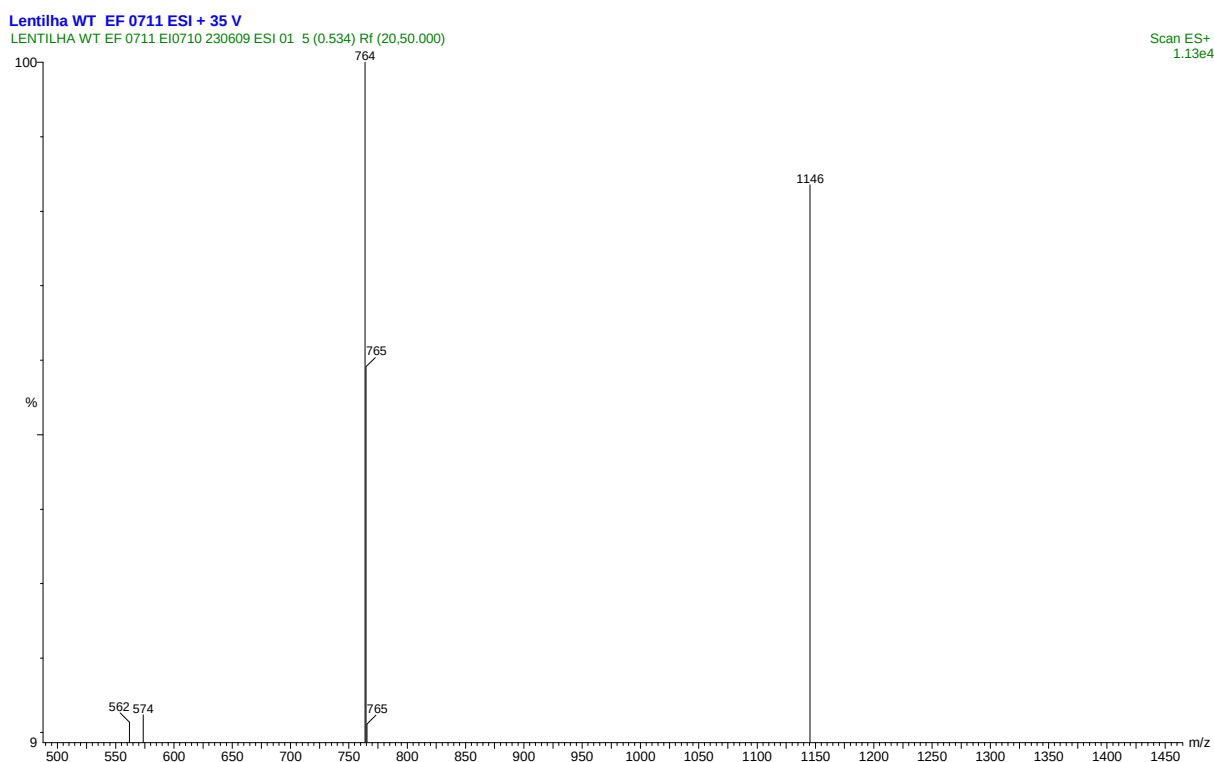


Figura 27: Espectro de massas do peptídeo WT-hyC sintetizado. O pico de maior intensidade representa o peptídeo ionizado com carga igual a $z = 3$, confirmando a obtenção do peptídeo desejado.

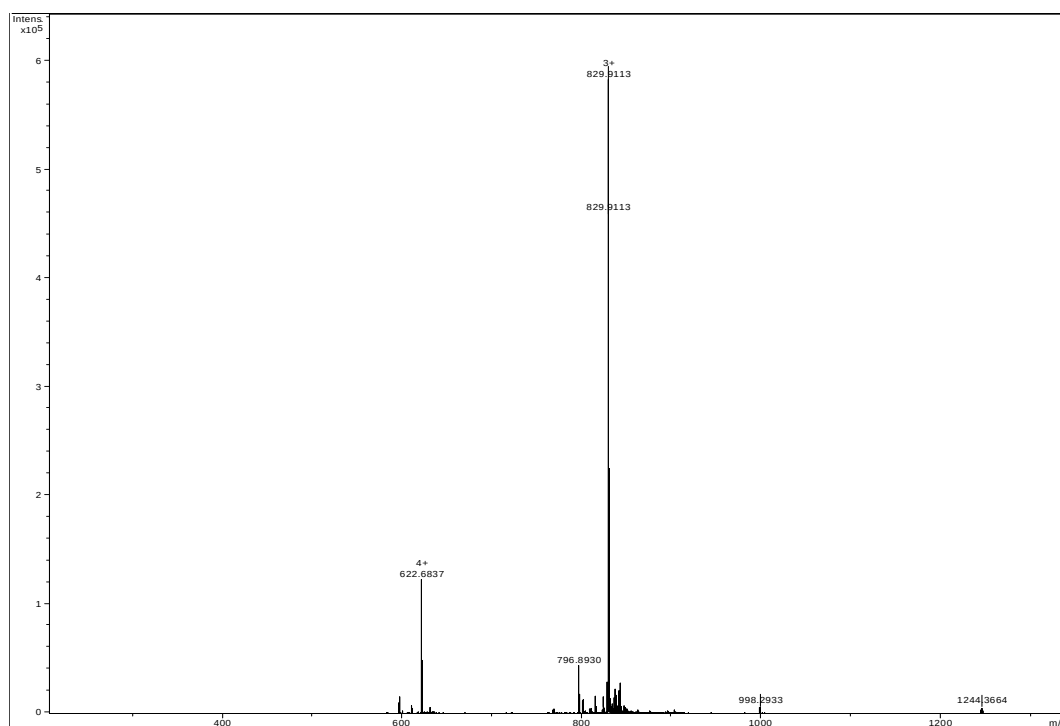


Figura 28: Espectro de massas do peptídeo TOAC⁰-hyC sintetizado. O pico de maior intensidade representa o peptídeo ionizado com carga igual a $z = 3$, confirmando a obtenção do peptídeo desejado.

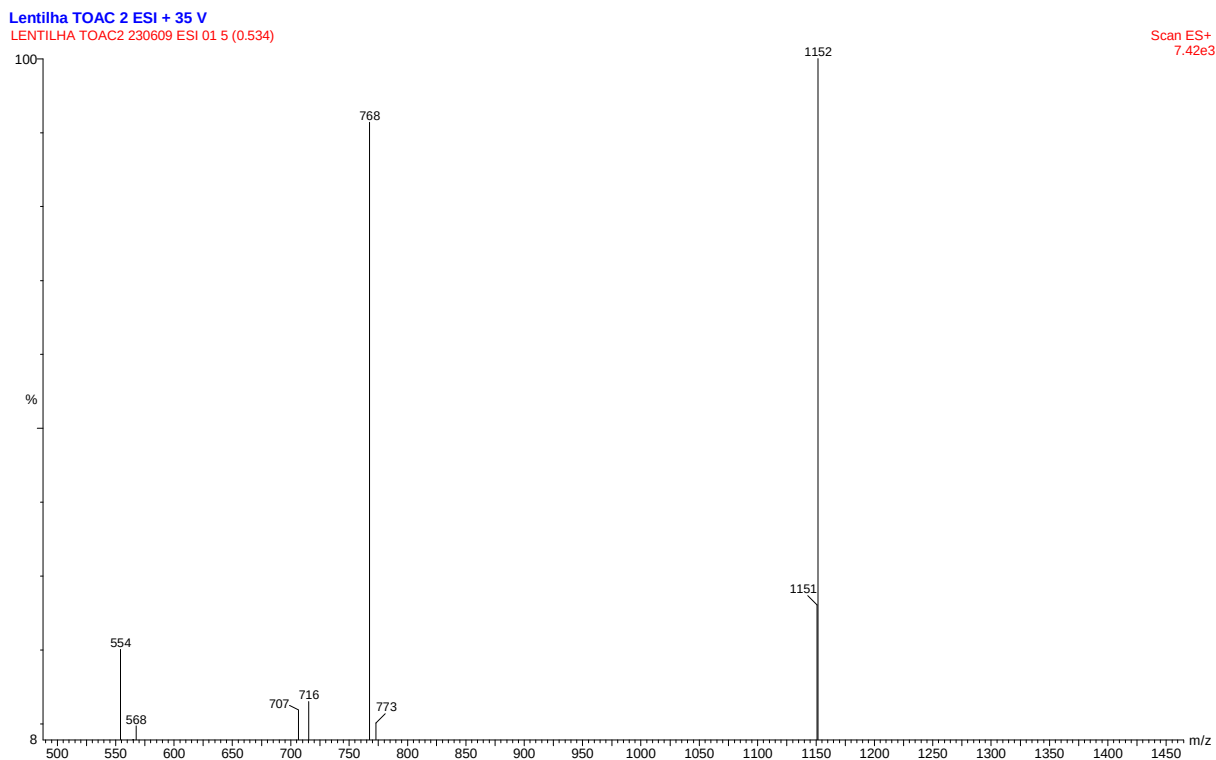


Figura 29: Espectro de massas do peptídeo TOAC²-hyC sintetizado. O pico de maior intensidade representa o peptídeo ionizado com carga igual a $z = 2$, confirmando a obtenção do peptídeo desejado.

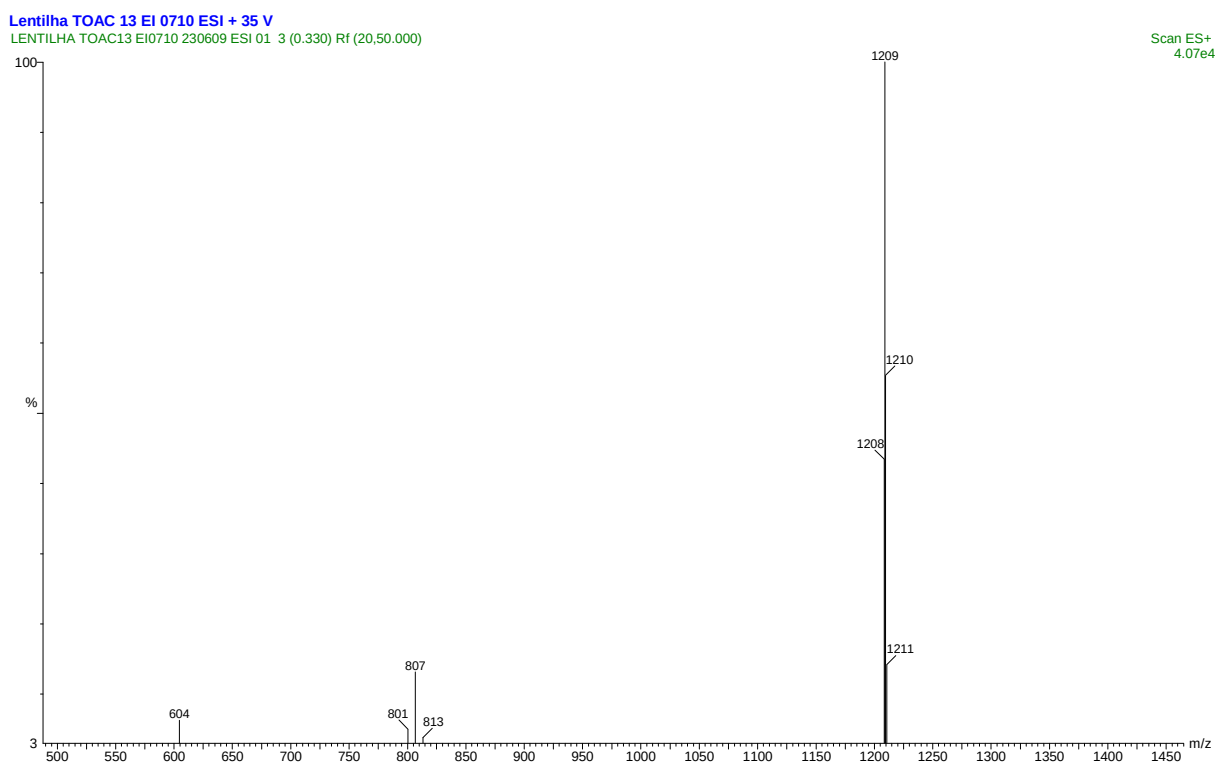


Figura 30: Espectro de massas do peptídeo TOAC¹³-hyC sintetizado. O pico de maior intensidade representa o peptídeo ionizado com carga igual a $z = 2$, confirmando a obtenção do peptídeo desejado.

Outra técnica utilizada para caracterizar e confirmar a obtenção dos peptídeos sintetizados foi a Análise de Aminoácidos. Todos os peptídeos tiveram seus aminogramas determinados (não apresentados) e mostraram composição e proporção dos aminoácidos esperados. A tabela 3 apresenta a proporção relativa dos aminoácidos presentes nos peptídeos, com exceções do aminoácido triptofano e do aminoácido paramagnético TOAC, que durante o processo de hidrólise são totalmente degradados devido às fortes condições reacionais.

Estas análises também foram úteis para encontrarmos o conteúdo peptídico real da amostra, ou seja, a porcentagem de peptídeo existente na amostra. Esta quantificação também foi realizada por UV, no qual foi possível determinar o conteúdo peptídico dos peptídeos que contenham o aminoácido triptofano devido à sua absorção em 280 nm (tabela 4). Este dado é importante para o cálculo da concentração real do peptídeo usada nos ensaios.

Ressalta-se que, o restante da amostra são sais oriundos das etapas de purificação, e não contaminantes.

Tabela 3: Proporção relativa dos aminoácidos obtidos através da Análise de Aminoácidos.

PROPORÇÃO RELATIVA DOS AMINOÁCIDOS								
AMINOÁCIDOS	PEPTÍDEOS							
	WT- <i>hyC</i>		TOAC ⁰ - <i>hyC</i>		TOAC ² - <i>hyC</i>		TOAC ¹³ - <i>hyC</i>	
	Teórico	Obtido	Teórico	Obtido	Teórico	Obtido	Teórico	Obtido
Ác. aspártico	3	3,2	3	3,2	3	3,2	3	3,2
Glicina	2	2,2	2	2,1	2	2,3	2	2,2
Alanina	4	4,3	4	4,3	4	4,8	3	3,2
Valina	2	1,9	2	1,9	2	1,9	2	2,0
Isoleucina	2	1,9	2	1,9	2	1,8	2	2,0
Leucina	1	0,9	1	0,8	1	0,8	1	0,8
Fenilalanina	2	1,9	2	1,9	2	1,7	2	1,9
Lisina	4	3,7	4	3,7	4	3,5	4	3,8

Tabela 4: Conteúdos Peptídicos dos peptídeos “Wild Type” e dos análogos contendo TOAC por UV e Análise de Aminoácidos.

PEPTÍDEO	Conteúdo Peptídico por UV	Conteúdo Peptídico por AAA
WT- <i>hyC</i>	63 %	67 %
TOAC ⁰ - <i>hyC</i>	94 %	90 %
TOAC ² - <i>hyC</i>	-	80 %
TOAC ¹³ - <i>hyC</i>	90 %	85 %

Neste bloco foi possível demonstrar que, apesar da grande dificuldade de acoplamento do aminoácido seguinte ao grupo TOAC e da necessidade da mudança nos sistema de solventes utilizados normalmente por nosso grupo, foi possível a obtenção dos peptídeos desejados com um grau de pureza adequado para os próximos estudos a serem desenvolvidos.

4.4. Atividade Biológica

4.4.1. Atividade antibacteriana

As atividades antibacterianas dos peptídeos foram testadas para verificar se a inserção do aminoácido TOAC na cadeia peptídica afeta de alguma forma a capacidade antimicrobiana destas seqüências em comparação com o “Wild Type”. Os resultados obtidos mostraram que os peptídeos mantiveram atividade contra as bactérias testadas. Apesar de uma pequena perda de atividade, a introdução do grupo TOAC não afetou fortemente a propriedade antimicrobiana destes peptídeos. O peptídeo mais afetado foi o TOAC⁰-hyC, que apresentou diminuição na atividade em todas as cepas testadas, sinalizando que a extremidade N-terminal é importante no mecanismo de ação destas moléculas (tabela 5).

Tabela 5: Valores da CIM (em $\mu\text{mol L}^{-1}$) para os peptídeos.

PEPTÍDEO	BACTÉRIAS TESTADAS (CIM - $\mu\text{mol L}^{-1}$)			
	<i>E. coli</i> (Gram -)	<i>P. aeruginosa</i> (Gram -)	<i>S. aureus</i> (Gram +)	<i>B. subtilis</i> (Gram +)
WT-hyC	8	8	2	1
TOAC ⁰ -hyC	16	64	8	2
TOAC ² -hyC	8	32	8	1
TOAC ¹³ -hyC	8	16	8	2

4.4.2. Atividade antifúngica

Os peptídeos também foram analisados em relação à atividade antifúngica contra *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*, e mostraram-se todos ativos. Chamamos atenção para o análogo TOAC¹³-hyC que apresentou valores de CIM menores que os outros peptídeos, inclusive quando comparado ao WT-hyC.

Tabela 6: Valores da CIM (em $\mu\text{mol L}^{-1}$) dos peptídeos.

PEPTÍDEO	FUNGOS TESTADOS (CIM - $\mu\text{mol L}^{-1}$)	
	<i>Candida albicans</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
WT-hyC	31,3	62,5
TOAC ⁰ -hyC	62,5	62,5
TOAC ² -hyC	31,3	62,5
TOAC ¹³ -hyC	7,8	31,3

4.4.3. Atividade hemolítica

Além dos testes antibacterianos e antifúngicos, fizemos ensaios com eritrócitos para avaliarmos o poder hemolítico dos peptídeos sintetizados. Este estudo é fundamental para analisarmos o índice terapêutico da molécula. Quanto maior o efeito terapêutico (neste caso antimicrobiano) e menor o efeito tóxico (hemolítico), maior é o seu índice terapêutico, o que indica que a molécula tem potencial para se tornar um fármaco. Na tabela 7 estão os valores da concentração peptídica para se obter 50 % de hemólise (HC_{50}) para as seqüências estudadas. Novamente, o análogo TOAC¹³-hyC apresentou o menor valor de HC_{50} , significando que, embora ele possua uma boa atividade antibacteriana e antifúngica, ele possui uma atividade hemolítica alta, o que pode nos levar a crer que este peptídeo estrutura-se de tal maneira que mesmo em pequenas doses, o seu alvo principal, a membrana, é completamente destruído.

Tabela 7: Valores de HC_{50} (em $\mu\text{mol L}^{-1}$) determinados pela atividade hemolítica dos peptídeos.

PEPTÍDEO	ATIVIDADE HE-MOLÍTICA (HC_{50} - $\mu\text{mol L}^{-1}$)
WT-hyC	7,1
TOAC ⁰ -hyC	2,6
TOAC ² -hyC	19,0
TOAC ¹³ -hyC	1,1

Destacamos nestes ensaios o TOAC⁰-hyC, que apresentou a segunda maior atividade hemolítica (menor HC₅₀).

4.5. Fluorescência

4.5.1. Estudos de permeabilização

Para a realização dos estudos de permeabilização, os peptídeos foram colocados em contato com vesículas contendo em seu interior o fluoróforo carboxifluoresceína que, ao ser exposto ao ambiente externo, provoca um aumento na intensidade de fluorescência que é proporcional ao grau de permeabilização dos lipossomas.

Utilizamos em nossos ensaios dois tipos de lipossomas diferentes: o primeiro contendo dipalmitoilfosfoetanolamina (DPPE) e o segundo esfingomielina (SM), sendo que em ambos os sistemas lipídicos, a proporção de ácido dipalmitoilfosfatídico (DPPA) e dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) foi mantida. Ressalta-se que foi modificado apenas um lipídio por vez nos sistemas estudados. Isto foi realizado para averiguar o efeito de cada um na permeabilização destes sistemas pelos peptídeos.

Os resultados obtidos (figuras 31 e 32) mostraram que o peptídeo contendo TOAC na posição 2 perdeu grande parte de sua capacidade de permeabilizar as vesículas, atingindo no máximo 20 % de lise, seguido pelo TOAC⁰-hyC que perdeu uma pequena parte de sua habilidade de permeabilização. O peptídeo TOAC¹³-hyC apresentou capacidade de permeabilização semelhante ao do peptídeo selvagem. Assim, estes dados mostram que a região N-terminal é importante no mecanismo de formação de poros.

O fato de encontrarmos mudanças na capacidade de permeabilização dos peptídeos TOAC⁰-hyC e TOAC²-hyC, não visualizadas claramente nas atividades antimicrobianas, pode ser explicado por uma maior sensibilidade deste método, ou ainda pela diferença entre as membranas plasmáticas e a composição de lipídios utilizados.

Comparando os dois tipos de vesículas, os lipossomas contendo SM mostraram maior velocidade e eficiência de lise do que as contendo PE, fato que pode ser

verificado pela maior permeabilização das vesículas contendo SM (máximo de 100%) em relação às contendo PE (máximo de 70%).

Para tentar explicar os resultados acima e obter maiores informações sobre o modo de ação destes peptídeos, experimentos visando avaliar a interação destes peptídeos com miméticos de membrana e as mudanças em suas estruturas secundárias, foram realizados.

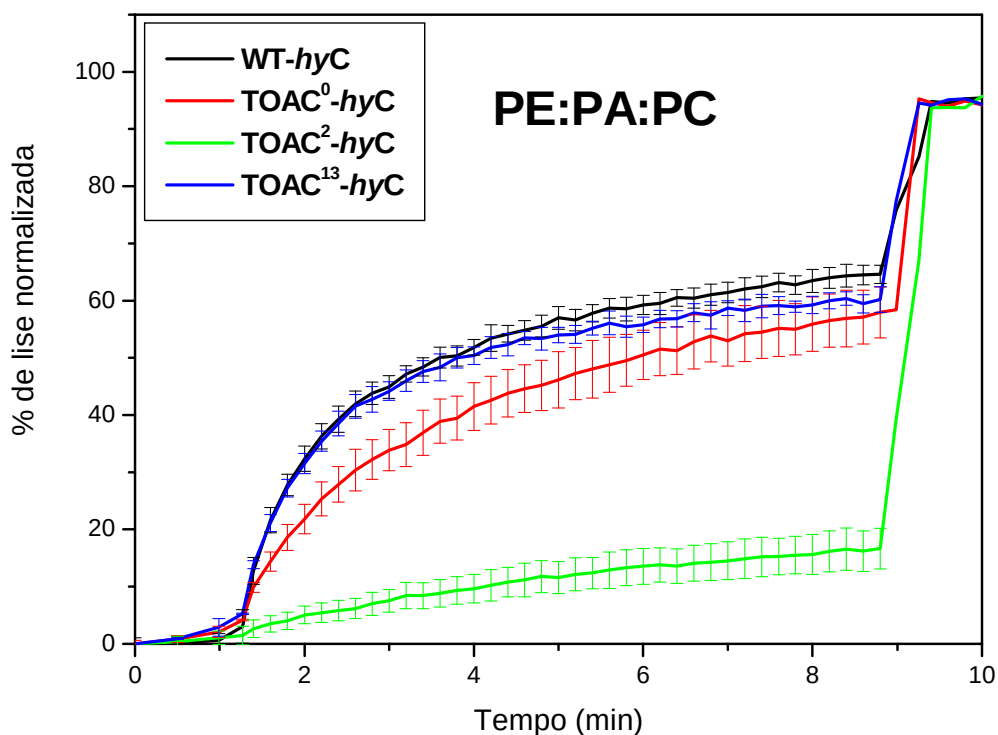


Figura 31: Variação da fluorescência devido à liberação da carboxifluoresceína nos estudos de permeabilização com vesículas de PE:PA:PC.

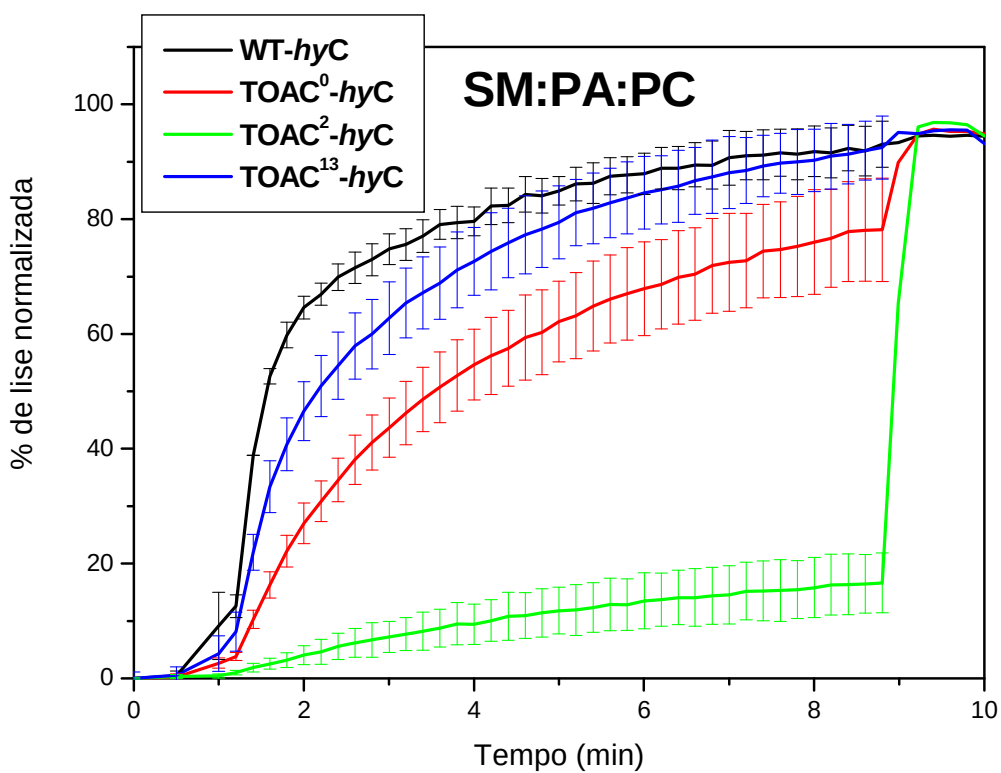


Figura 32: Variação da fluorescência devido à liberação da carboxifluoresceína nos estudos de permeabilização com vesículas de SM:PA:PC.

4.5.2. Estudos de interação peptídeo/micelas

O aminoácido triptofano, por possuir uma fluorescência intrínseca devido à presença do anel indol em sua cadeia lateral, permite estudar as variações estruturais do peptídeo em que está situado frente a miméticos de membrana, a mudança da polaridade dos solventes, etc. O triptofano, desta forma, age como uma “sonda” natural, permitindo averiguar o comportamento estrutural dos peptídeos quando interage com a membrana citoplasmática das células.

Nestes estudos utilizamos dois parâmetros espectrais: o $\lambda_{\text{máx}}$ e a intensidade de fluorescência emitida. O primeiro parâmetro foi o escolhido por nós, pois permite correlações mais claras e precisas sobre o comportamento estrutural e seu grau de exposição/interação do peptídeo com os sistemas lipídicos usados. A intensidade de fluorescência pode nos fornecer dados não tão concisos, já que a supressão de fluorescência do triptofano pelo TOAC e pelas cadeias laterais de determinados aminoácidos pode afetar este parâmetro, dificultando a avaliação da sua contribuição na interação com os miméticos de membrana (LAKOWICZ, 1983).

Salientamos que o análogo sintetizado TOAC²-hyC não foi estudado por esta técnica, devido à substituição do aminoácido triptofano na posição 2 pelo aminoácido paramagnético TOAC em sua cadeia peptídica.

Para a avaliação do comportamento estrutural do peptídeo frente a micelas, outro modelo de membranas muito empregado, foi usado o detergente LPC, como já descrito em “Materiais e Métodos”. O LPC possui duas cargas em sua cabeça polar, uma negativa em seu grupo fosfato e outra positiva na amina quartenária. Este detergente pode ser considerado quimicamente próximo a fosfatidilcolina (fosfolípido presente na membrana celular de alguns organismos), pois apresenta uma cabeça hidrofílica com um fosfato ligado à cauda acila e um grupo colina.

Os resultados obtidos estão apresentados nas figuras 33, 34, 35, 36 e 37.

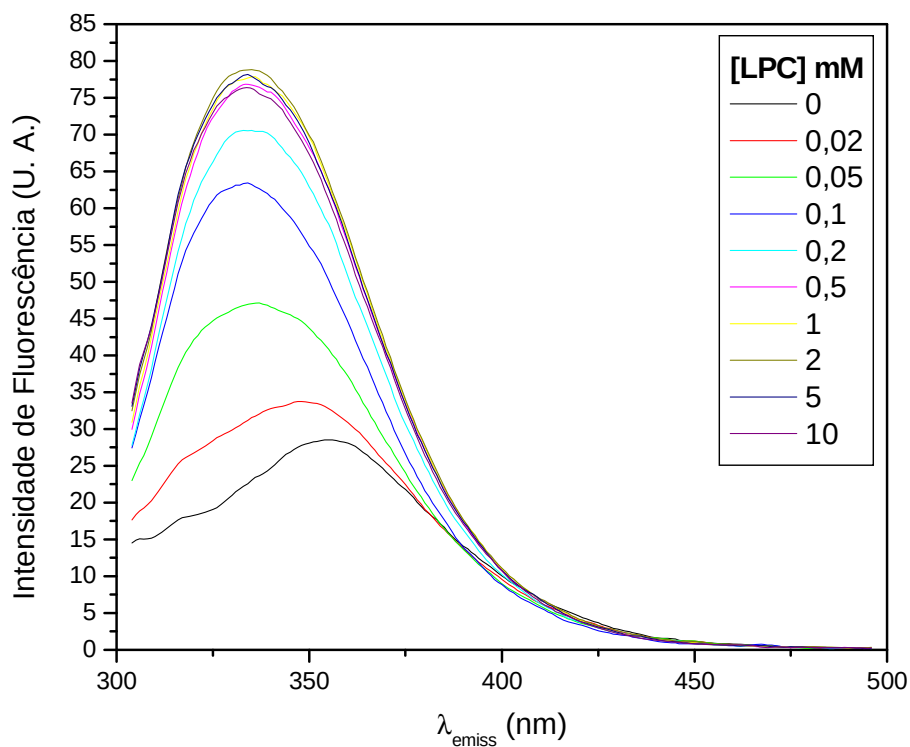


Figura 33: Espectros de fluorescência do peptídeo WT-hyC em diferentes concentrações de LPC.

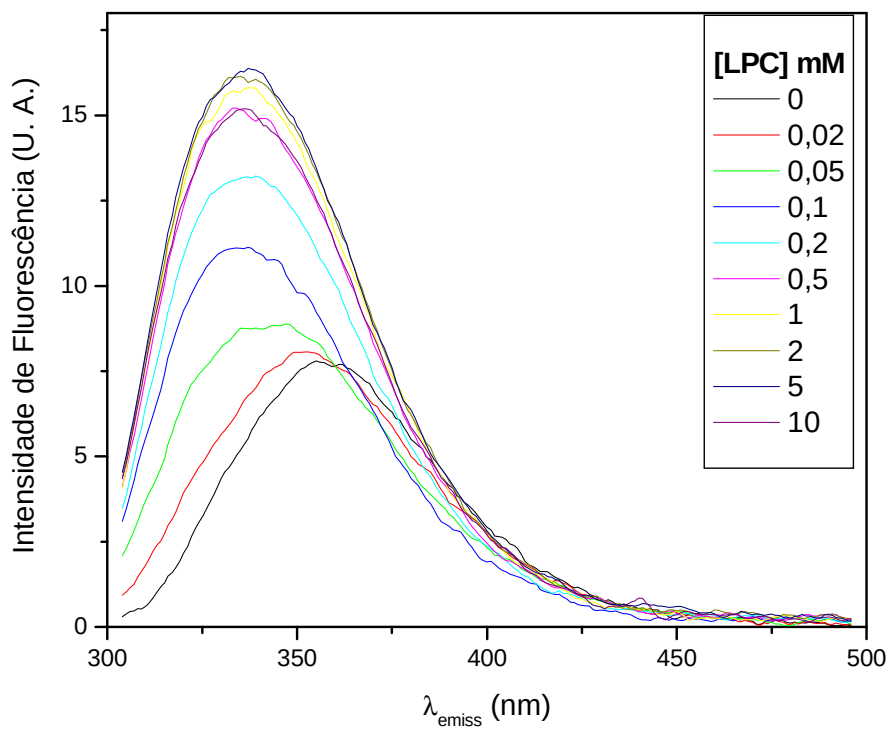


Figura 34: Espectros de fluorescência do peptídeo TOAC⁰-hyC em diferentes concentrações de LPC.

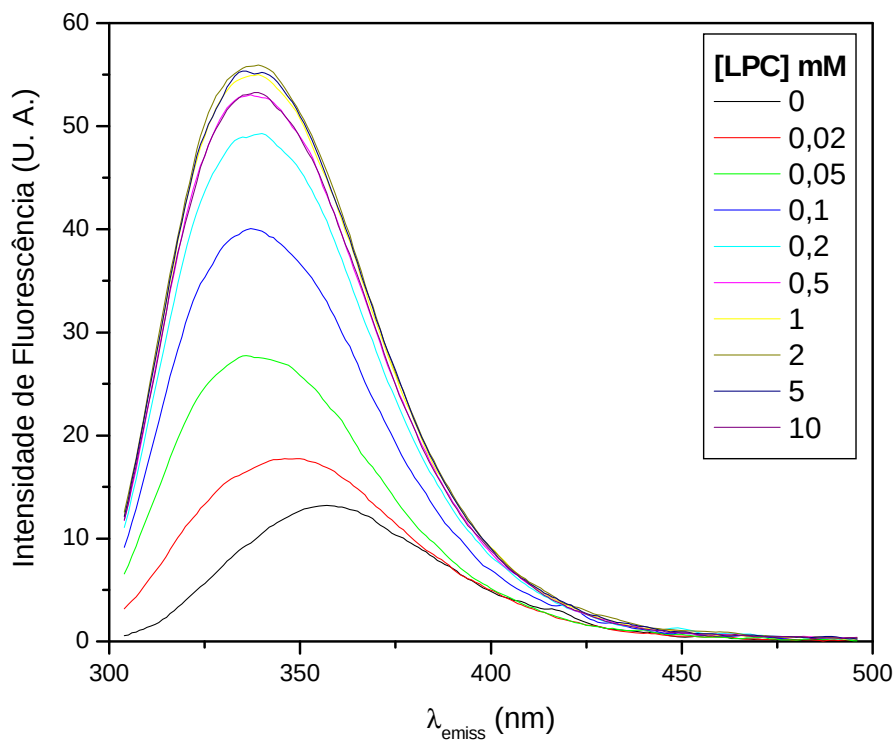


Figura 35: Espectros de fluorescência do peptídeo TOAC¹³-hyC em diferentes concentrações de LPC.

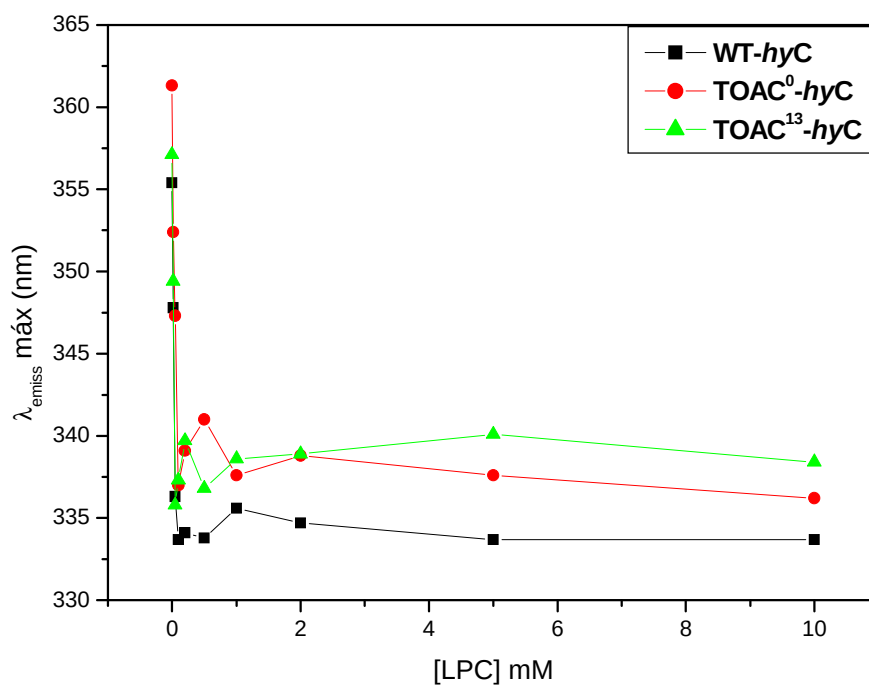


Figura 36: Variação do comprimento de onda máximo obtido para os peptídeos em função da concentração de LPC.

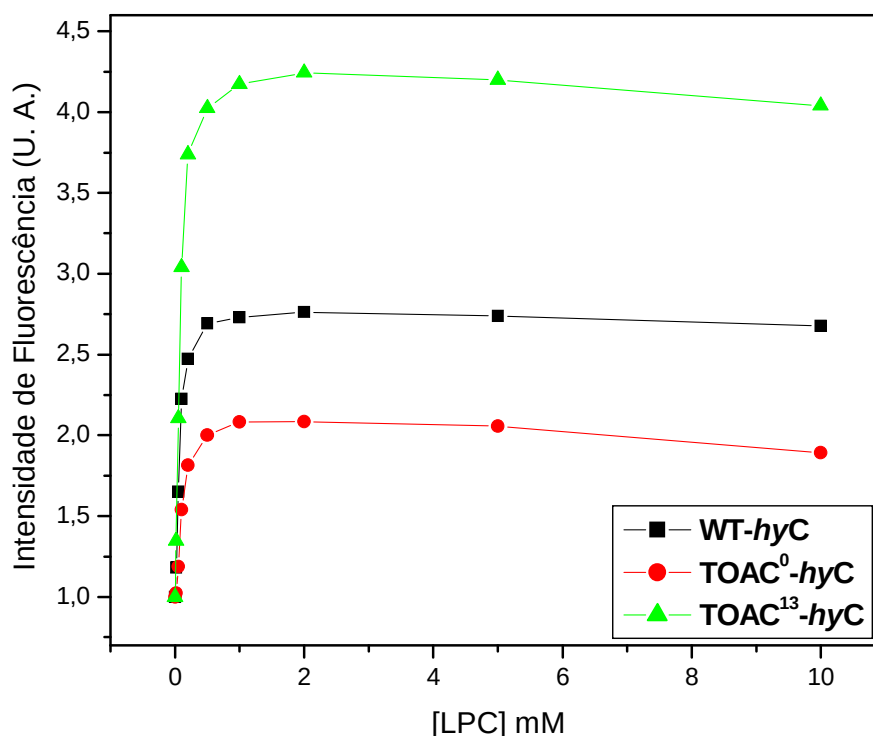


Figura 37: Variação da intensidade de fluorescência máxima dos peptídeos em função da concentração de LPC.

Analisando os espectros das figuras 33, 34 e 35 notou-se que, com o aumento da quantidade de detergente na solução, a intensidade de fluorescência dos peptídeos aumenta (figura 37). Isto pode ser devido a uma maior inserção do aminoácido triptofano dentro da micela, ocorrendo menos interações com o solvente e menor dissipação de energia. O fato do peptídeo TOAC⁰-hyC apresentar menor aumento da intensidade de fluorescência pode estar relacionado à supressão da fluorescência pelo grupo TOAC.

Além disso, podemos notar um “blue shift”, ou seja, uma diminuição do comprimento de onda máximo emitido, o que nos indica que está havendo uma migração de um ambiente mais polar (solução aquosa) para um apolar (mimético de membrana), por parte do fluoróforo. Isto ocorre devido à interação entre os dipolos existentes no fluoróforo e no solvente. Quanto mais polar é o solvente, maior o gasto de energia para que os dipolos se alinhem uns com os outros, o que influencia na energia final do sistema. Desta forma, como parte da energia foi gasta neste processo, menor será a energia final do sistema, portanto, maior será o comprimento de onda onde ocorrerá o pico de maior intensidade de fluorescência.

A variação do $\lambda_{\text{máx}}$ é observada claramente na figura 36, onde podemos visualizar a queda do comprimento de onda de máxima emissão de maneira igual para todos os peptídeos, sendo que a partir da concentração micelar crítica que, no caso do LPC é de aproximadamente de $1,1 \text{ mmol L}^{-1}$ (MORAIS et al., 2007), ficou praticamente constante.

4.5.3. Estudos de interação peptídeo/lipossomas

Os dados obtidos a partir da titulação dos peptídeos pelos dois tipos de vesículas estudadas estão mostrados nas figuras 38 a 47. Nos gráficos relacionando o $\lambda_{\text{máx}}$ com a concentração de lipídios (figuras 42 e 47), notou-se um “blue shift”, ou seja, um deslocamento do comprimento de onda para a região do azul, havendo assim uma queda do valor de $\lambda_{\text{máx}}$ de emissão, indicando, como nas micelas, uma migração para um ambiente apolar.

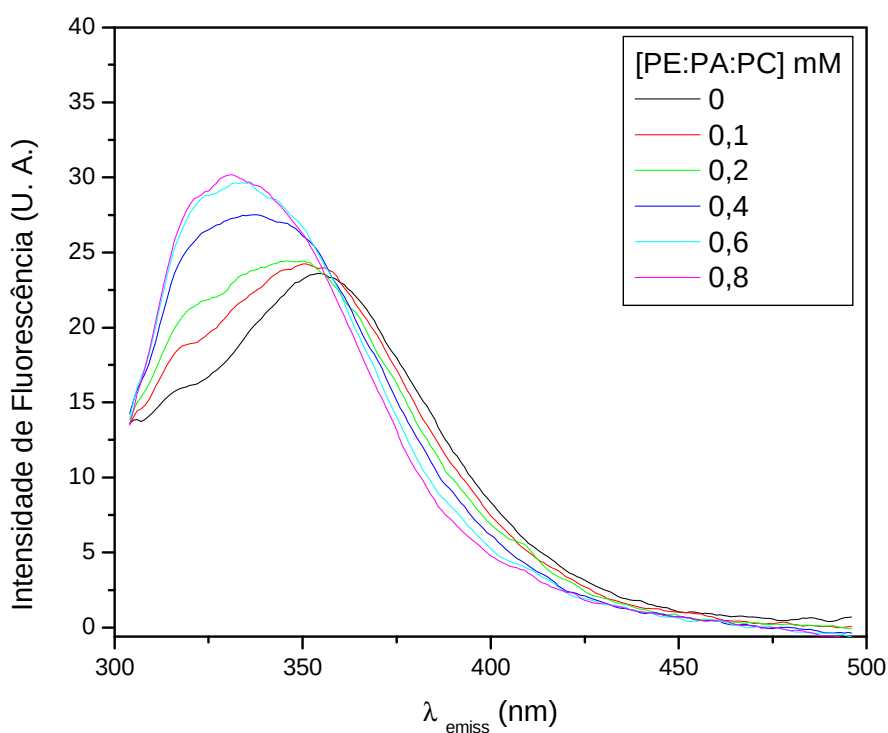


Figura 38: Espectros de fluorescência do peptídeo WT-hyC em diferentes concentrações de PE:PA:PC.

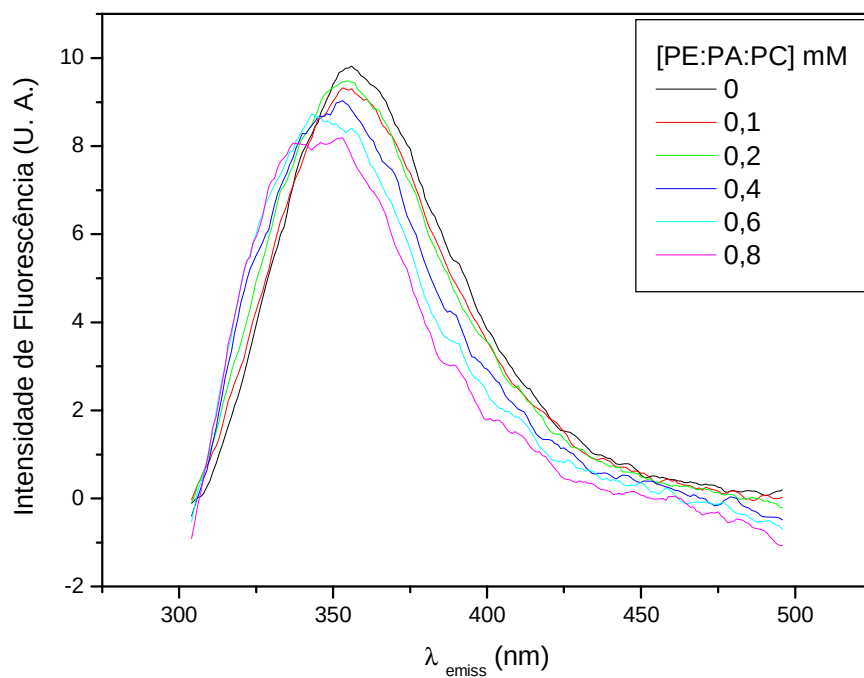


Figura 39: Espectros de fluorescência do peptídeo TOAC⁰-hyC em diferentes concentrações de PE:PA:PC.

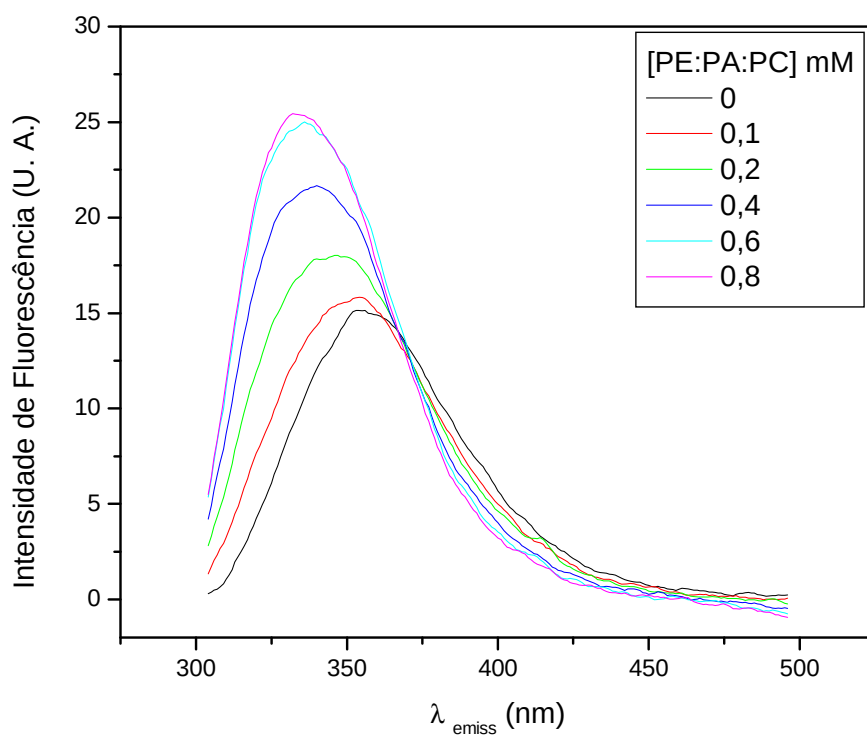


Figura 40: Espectros de fluorescência do peptídeo TOAC¹³-hyC em diferentes concentrações de PE:PA:PC.

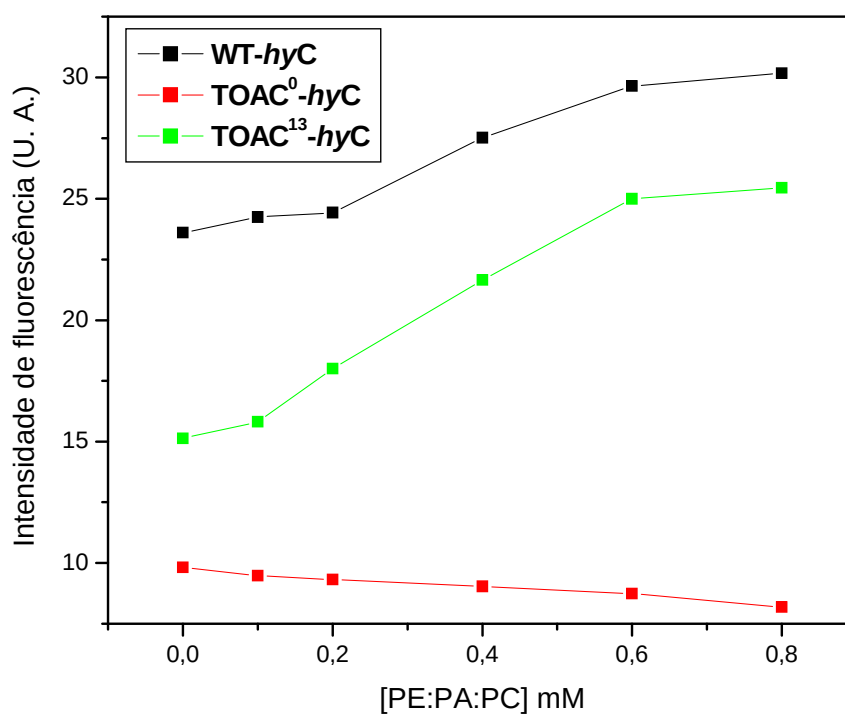


Figura 41: Variação da intensidade de fluorescência dos peptídeos em função da concentração da mistura de lipídeos PE:PA:PC.

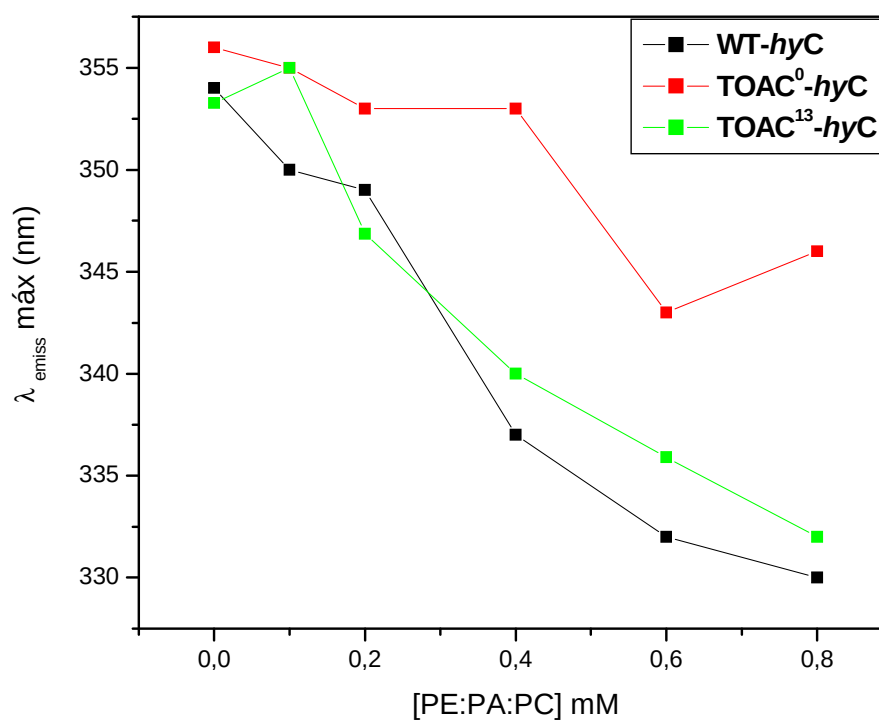


Figura 42: Variação do comprimento de onda de máxima emissão dos peptídeos em função da concentração da mistura de lipídeos PE:PA:PC.

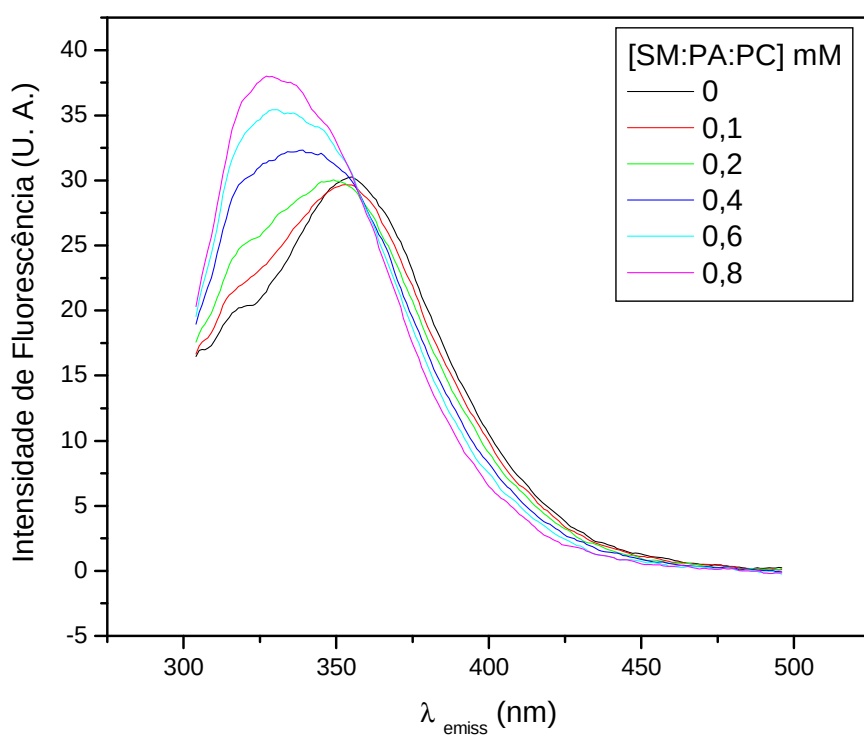


Figura 43: Espectros de fluorescência do peptídeo WT-hyC em diferentes concentrações de SM:PA:PC.

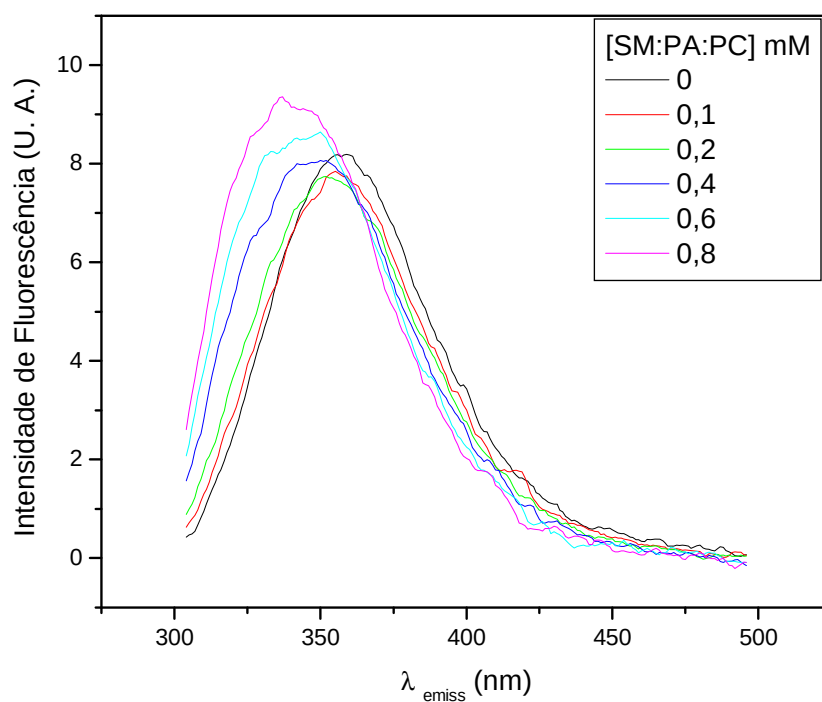


Figura 44: Espectros de fluorescência do peptídeo TOAC⁰-hyC em diferentes concentrações de SM:PA:PC.

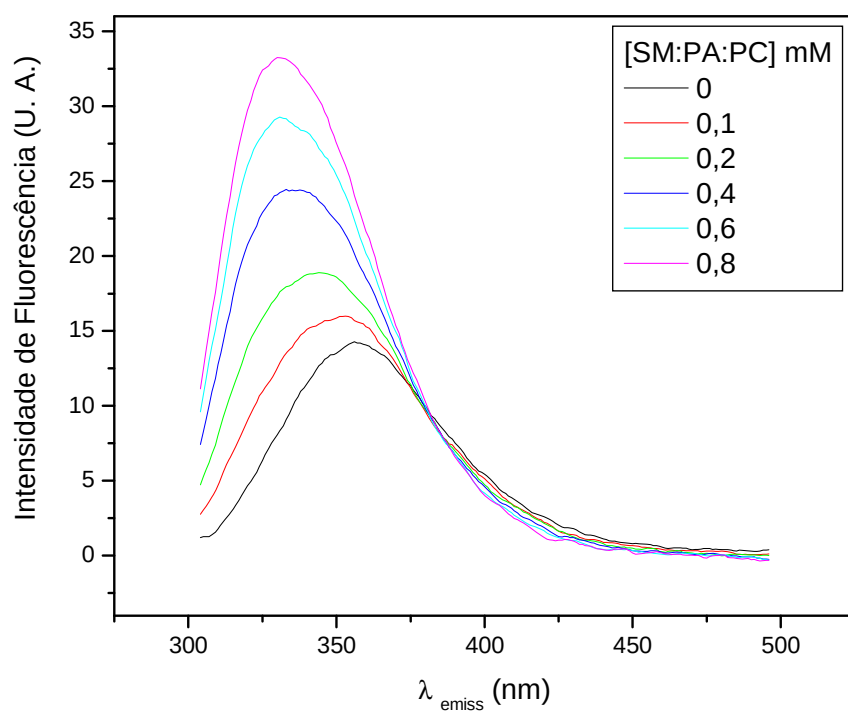


Figura 45: Espectros de fluorescência do peptídeo TOAC¹³-hyC em diferentes concentrações de SM:PA:PC.

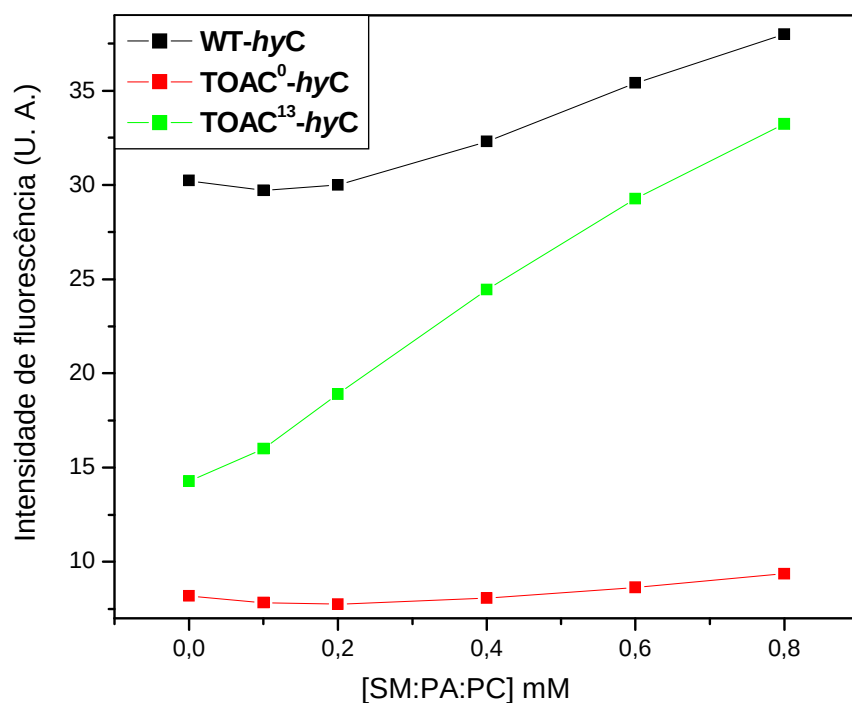


Figura 46: Variação da intensidade de fluorescência dos peptídeos em função da concentração da mistura de lipídeos SM:PA:PC.

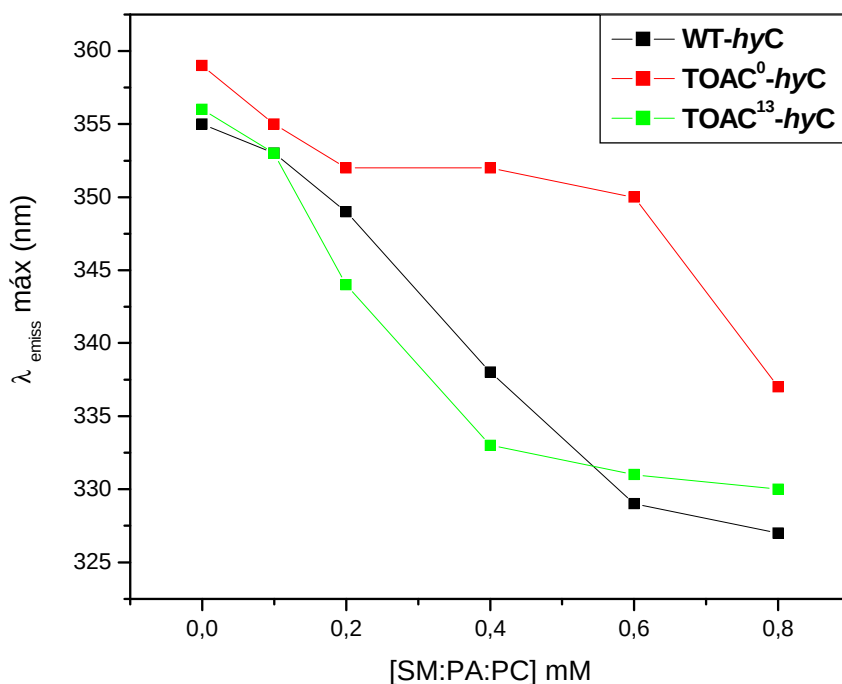


Figura 47: Variação do comprimento de onda de máxima emissão dos peptídeos em função da concentração da mistura de lipídeos SM:PA:PC.

Podemos notar que, os peptídeos que mais permeabilizaram as vesículas foram aqueles que mais interagiram com os miméticos de membrana (WT-hyC e TOAC¹³-hyC), indicando uma relação direta entre estes dois parâmetros. Desta forma, a interação inicial do peptídeo com a membrana é diretamente proporcional à capacidade de formação de poros destes peptídeos.

Ressalta-se também que os dados obtidos para a interação dos peptídeos com micelas e com lipossomas mostram resultados diferentes quando utilizamos os valores de $\lambda_{\text{máx}}$. Enquanto que em micelas a interação entre os três peptídeos é a mesma, nos lipossomas é possível verificar que a maior interação ocorre com o peptídeo selvagem, seguido pelo TOAC¹³-hyC. A menor interação é encontrada para o TOAC⁰-hyC.

Apesar de o lipossoma ser um modelo de membrana mais próximo das membranas celulares intactas, pode-se considerar a micela como sendo a membrana na estrutura em que o poro é formado. Desta forma, ambos os sistemas podem trazer informações valiosas sobre o modo de ação dos PAMs.

4.5.4. Estudos de supressão de fluorescência

Para averiguarmos com mais precisão o grau de inserção destas moléculas nos diferentes sistemas lipídicos, estudos usando a supressão de fluorescência causada pelo composto acrilamida foram realizados.

Os gráficos obtidos da titulação do peptídeo em solução por acrilamida estão mostrados nas figuras 48, 49, 50 e 51. Os valores obtidos das tangentes das retas apresentadas na figura 51 mostram uma agregação dos peptídeos já em solução (valores de K_{sv} em torno de 10 L mol^{-1} - tabela 8). Dados do aminoácido N-acetil-triptofanamida (NATA) em solução de uréia mostraram valores de $19,9 \text{ L mol}^{-1}$, sendo esta uma referência para moléculas desagregadas em solução (ALSTON et al., 2008).

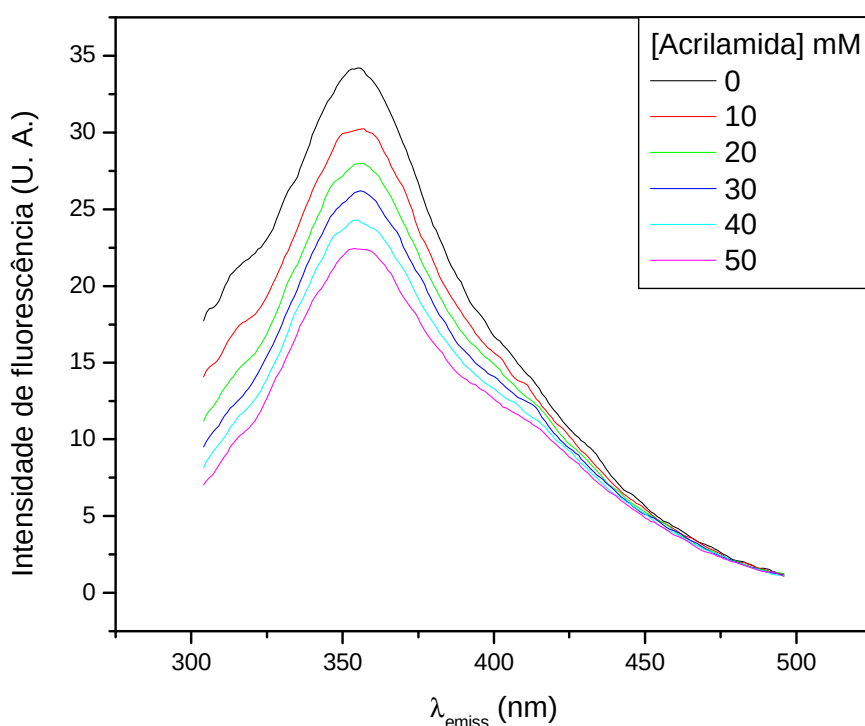


Figura 48: Espectros de fluorescência do peptídeo WT-hyC em solução, em diferentes concentrações de acrilamida.

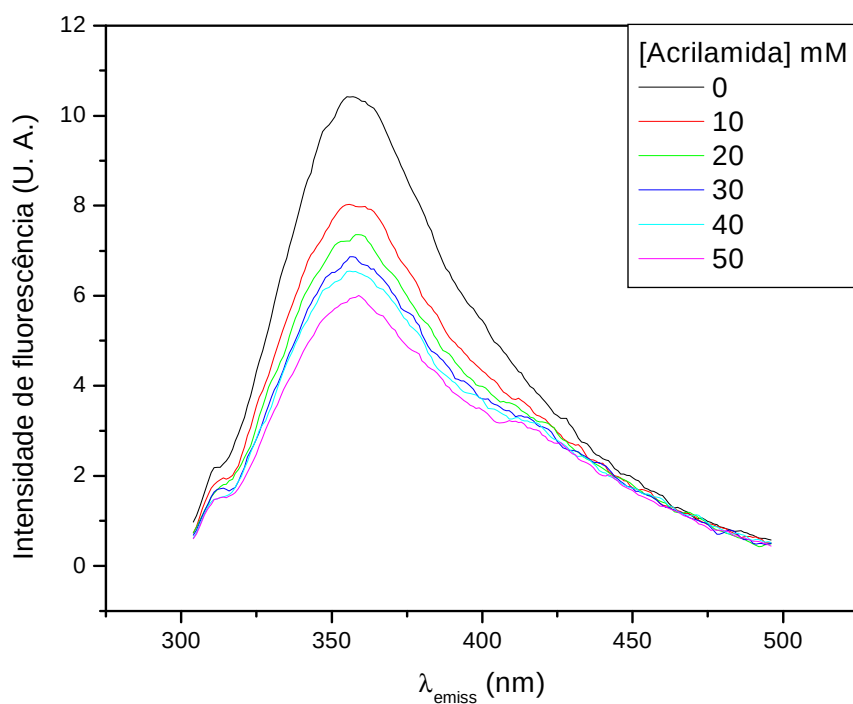


Figura 49: Espectros de fluorescência do peptídeo TOAC⁰-hyC em solução, em diferentes concentrações de acrilamida.

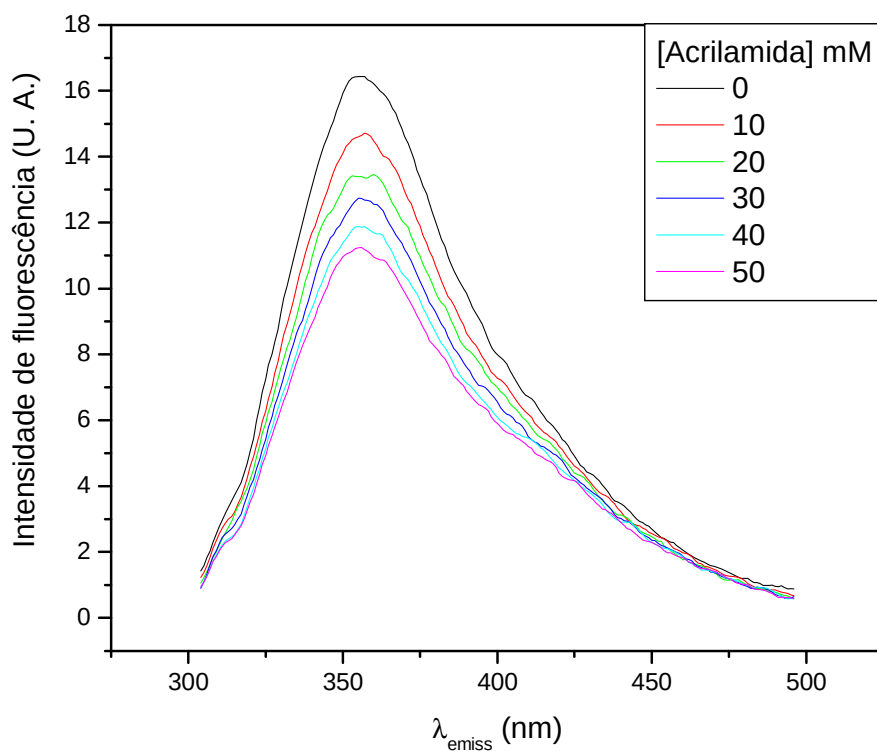


Figura 50: Espectros de fluorescência do peptídeo TOAC¹³-hyC em solução, em diferentes concentrações de acrilamida.

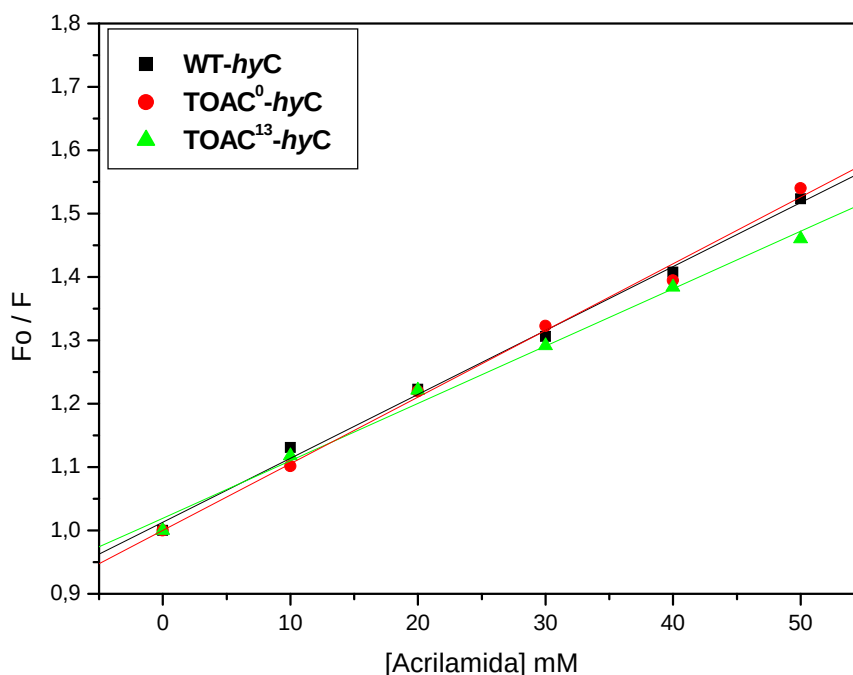


Figura 51: Variação da razão de emissão de fluorescência inicial sobre a fluorescência máxima (F_0/F) obtida para os peptídeos em solução com diferentes concentrações de acrilamida.

4.5.4.1. Estudos de supressão de fluorescência em micelas

O mesmo estudo de supressão anterior foi realizado utilizando o sistema peptídeo/LPC (figura 52 e tabela 8).

Na comparação dos dados obtidos neste experimento com os em solução, observa-se uma diminuição dos valores de K_{sv} (tabela 8). A adição do detergente LPC diminui o acesso da acrilamida ao triptofano, diminuindo a supressão e confirmando a interação dos peptídeos com as micelas. Uma menor supressão de fluorescência indica que o triptofano está menos exposto ao meio e, conseqüentemente, mais inserido neste modelo de membrana.

Comparando-se os peptídeos entre si, o que apresentou maior interação com as micelas, isto é, menor valor de K_{sv} foi o TOAC⁰-hyC. Este dado difere dos obtidos no estudo de interação do peptídeo com micelas, onde os três peptídeos mostraram, pelo $\lambda_{m\acute{a}x}$, o mesmo grau de interação. Esta discrepância pode estar relacionada com alguma interação específica entre o TOAC e o triptofano (posição 2).

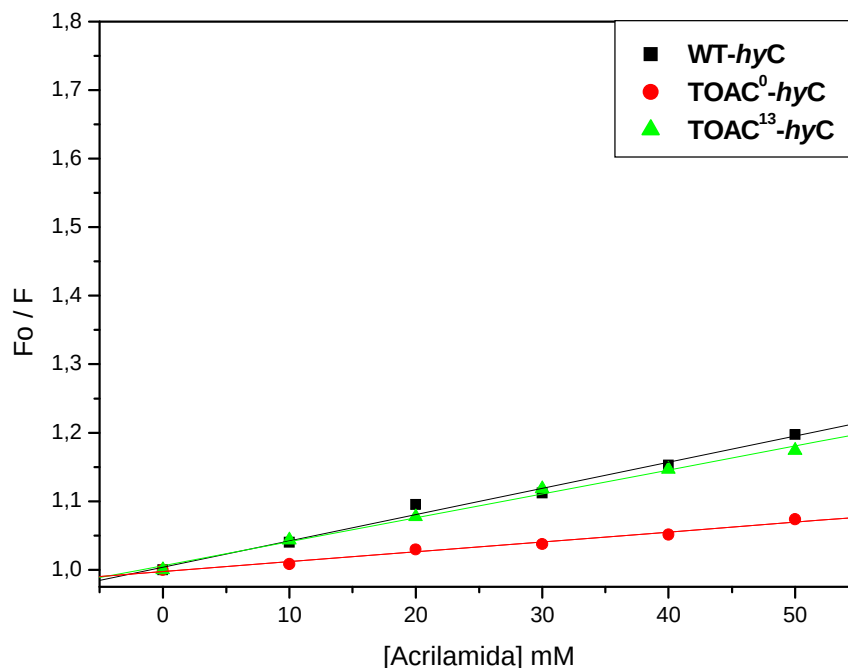


Figura 52: Variação da razão de emissão de fluorescência inicial sobre a fluorescência máxima (F_0/F) obtida para o sistema peptídeo/LPC em diferentes concentrações de acrilamida.

4.5.4.2. Estudos de supressão de fluorescência em vesículas

Os resultados dos estudos de supressão de fluorescência dos peptídeos em vesículas estão representados nas figuras 53 e 54. Os dados (figuras 53 e 54) obtidos mostraram que a diminuição da intensidade de fluorescência com o aumento do supressor quase não é visualizada, obtendo-se valores da tangente para o TOAC¹³-hyC em torno de 1. Este valor significa que não houve mudança na inclinação da reta, indicando uma baixa ou nenhuma exposição do triptofano ao meio aquoso (tabela 8). Comparativamente, o peptídeo que mostrou maior interação foi o TOAC¹³-hyC, seguido pelo WT-hyC e TOAC⁰-hyC. A curva levemente negativa obtida para a vesícula de SM com o peptídeo TOAC¹³-hyC foi considerada como de inclinação de valor 1.

Os dados obtidos para o TOAC¹³-hyC estão condizentes com os resultados oriundos dos dados de interação. Entretanto, para o TOAC⁰-hyC, foi obtida uma baixa supressão, apesar da interação com a vesícula não ser muito forte. Atribuímos este resultado à supressão da fluorescência do triptofano pelo grupo TOAC e não a interação com a vesícula. Esta suposição é corroborada pela diminuição da intensidade de fluorescência obtida nas figuras 37, 41 e 46. A presença do grupo

TOAC próximo ao resíduo de triptofano pode ser o fator responsável pela supressão da fluorescência.

Ressalta-se que, o fato do peptídeo contendo TOAC¹³-hyC apresentar menor exposição à acrilamida que o selvagem pode estar relacionado à rigidez deste grupo paramagnético, o que causa uma maior estruturação do peptídeo e assim uma maior interação com a membrana.

Tabela 8: Valores de K_{sv} e $\lambda_{m\acute{a}x}$ para os peptídeos em miméticos de membranas e em solução aquosa.

PEPTÍDEO	VESÍCULAS PE:PA:PC		VESÍCULAS SM:PA:PC		MICELAS DE LPC		SOLUÇÃO AQUOSA	
	$\lambda_{m\acute{a}x}$	K_{sv} L mol ⁻¹	$\lambda_{m\acute{a}x}$	K_{sv} L mol ⁻¹	$\lambda_{m\acute{a}x}$	K_{sv} L mol ⁻¹	$\lambda_{m\acute{a}x}$	K_{sv} L mol ⁻¹
WT-hyC	330	3,2	327	2,8	334	3,8	356	10,1
TOAC ⁰ -hyC	346	2,7	337	1,4	335	1,4	357	10,5
TOAC ¹³ -hyC	332	1,0	330	1,0	339	3,5	357	9,0

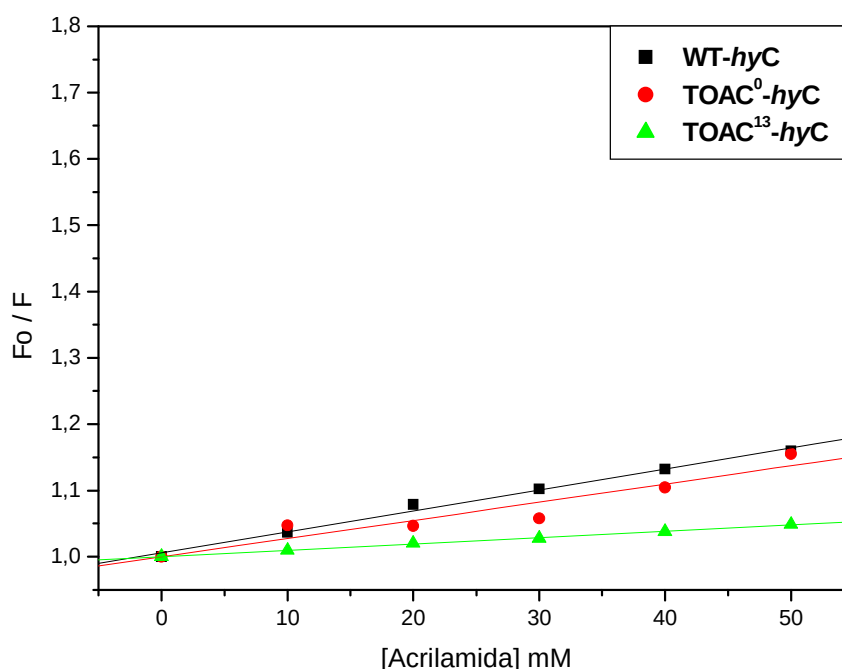


Figura 53: Variação da razão de emissão de fluorescência inicial sobre a fluorescência máxima (F_0/F) obtida dos peptídeos estudados em função da concentração de acrilamida, em vesículas de composição PE:PA:PC.

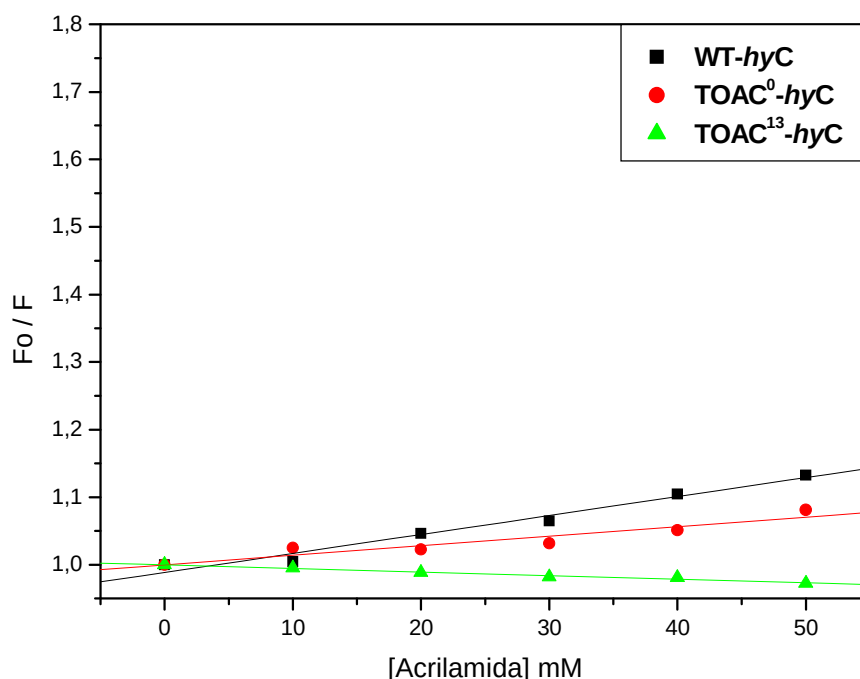


Figura 54: Variação da razão de emissão de fluorescência inicial sobre a fluorescência máxima (F_0/F) obtida dos peptídeos estudados em função da concentração de acrilamida, em vesículas de composição SM:PA:PC.

4.6. Dicroísmo Circular

Para verificar se mudanças conformacionais ocorriam quando os peptídeos migravam do meio aquoso para as vesículas, submetemos estes peptídeos à análise por dicroísmo circular (CD).

Em nossos ensaios, primeiramente, utilizamos 4 tipos de condições para averiguar o comportamento estrutural dos peptídeos: em solução aquosa (pH 7,38), em 60% de trifluoretanol (TFE), em 10 mM de lisofosfatidilcolina (LPC) e em 10 mM de dodecil sulfato de sódio (SDS).

As figuras 55, 56, 57 e 58 mostram os espectros de CD adquiridos nas condições acima.

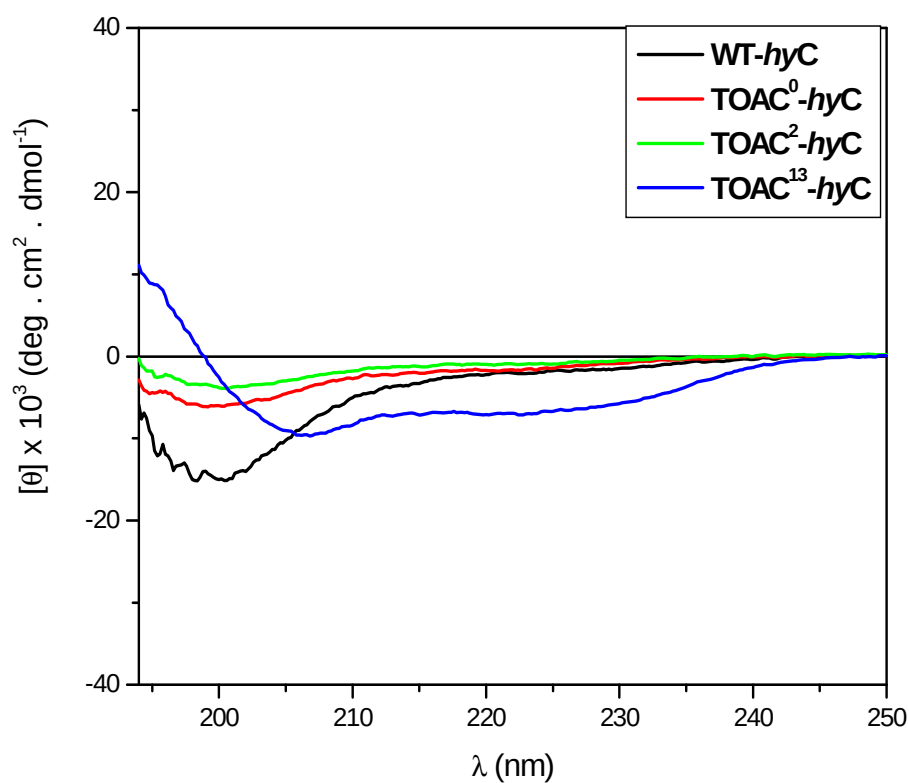


Figura 55: Espectros de CD dos peptídeos com $80 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução aquosa.

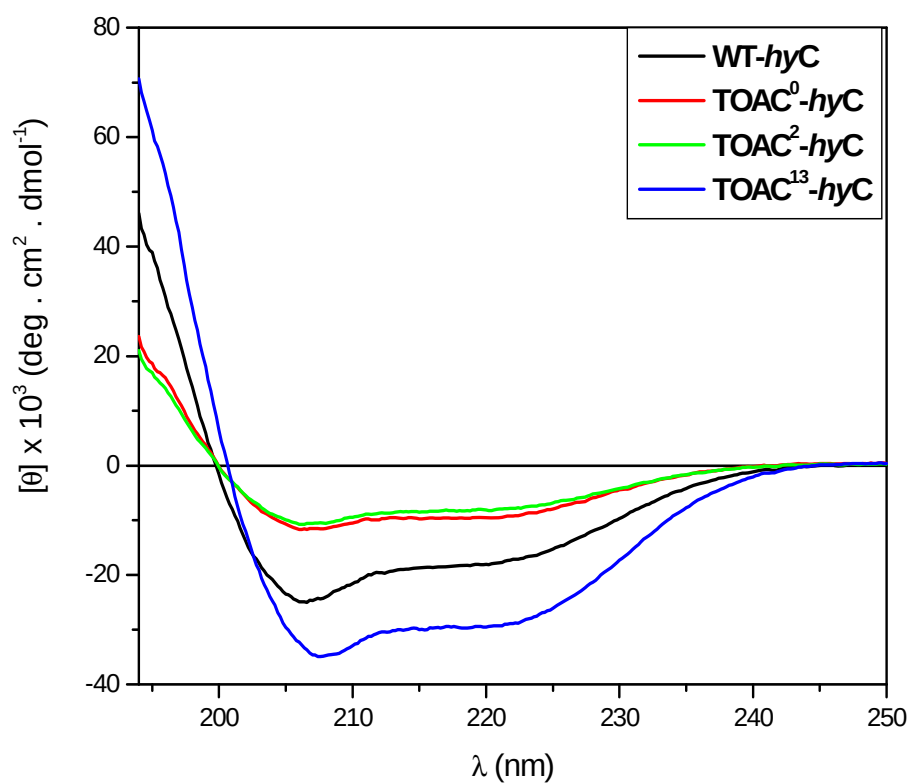


Figura 56: Espectros de CD dos peptídeos com $80 \mu\text{mol L}^{-1}$ em 60 % de TFE.

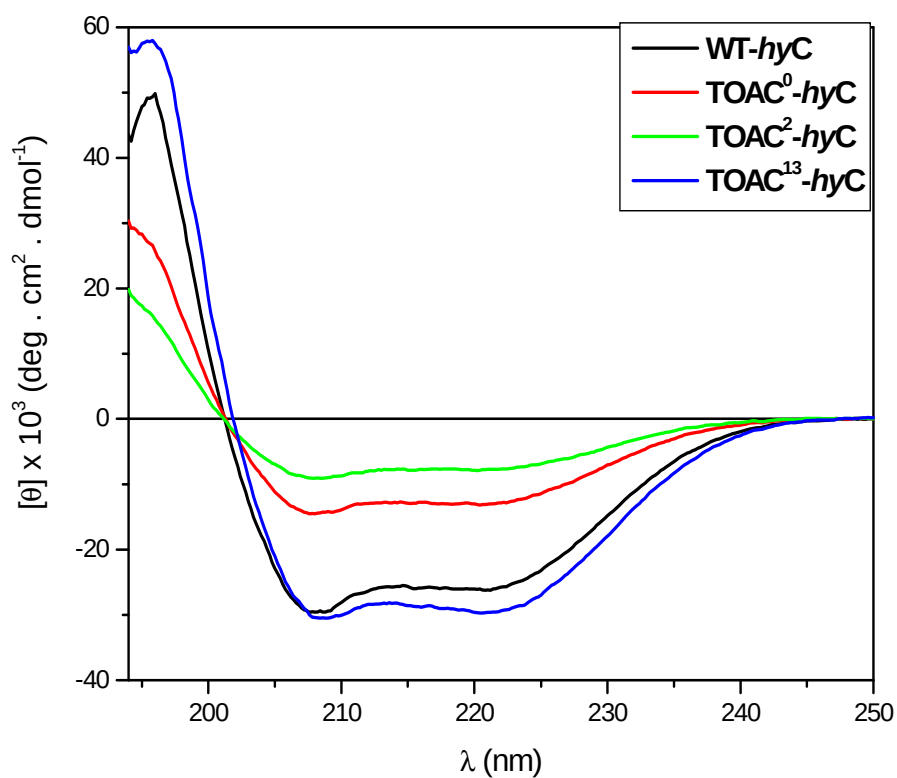


Figura 57: Espectros de CD dos peptídeos com $80 \mu\text{mol L}^{-1}$ em 10 mmol L^{-1} de LPC.

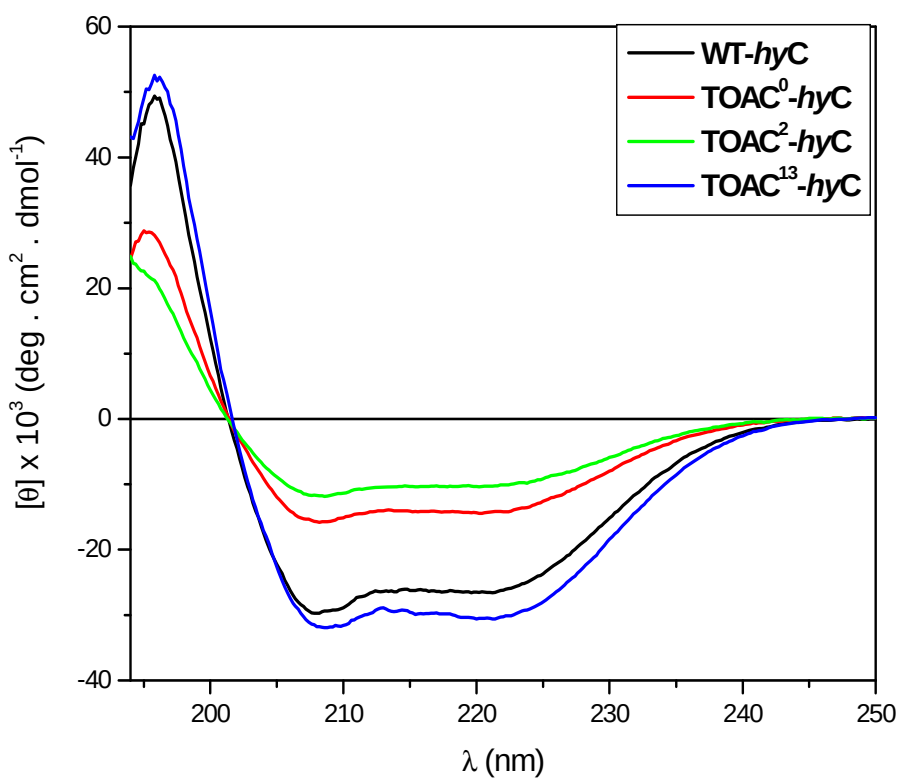


Figura 58: Espectros de CD dos peptídeos com $80 \mu\text{mol L}^{-1}$ em 10 mmol L^{-1} de SDS.

Em solução aquosa, obtemos um espectro típico de uma estrutura randômica para todos os peptídeos, com exceção do TOAC¹³-hyC, que em solução aquosa já mostrou uma tendência para formação de α -hélice. Esta maior estruturação do TOAC¹³-hyC pode estar relacionada à rigidez do TOAC, que por estar no meio da cadeia induz a formação de estruturas.

O TFE é basicamente um indutor de estrutura secundária, devido à sua capacidade de “seqüestrar” as moléculas de água que solvatam o peptídeo, induzindo a estruturação do mesmo (ROCCATANO et al., 2002). Dos espectros, podemos verificar que todos os peptídeos assumem estrutura em α -hélice, indicada pelas duas bandas negativas em 208 e 222 nm e uma positiva em 192 nm. O peptídeo TOAC¹³-hyC, seguido pelo WT-hyC, teve uma maior estruturação em relação aos outros análogos, fato evidenciado pela maior intensidade das três bandas características deste tipo de estrutura.

Em micelas de LPC e SDS, miméticos de membrana, também foi observado a estruturação do peptídeo em α -hélice, indicando que os peptídeos alteram sua estrutura quando interagem com membranas. Somado a isto, as diferenças de carga entre estes dois detergentes não causaram alterações significativas na interação com os peptídeos, mostrando que a carga na superfície da membrana não é o fator fundamental na ligação com estas seqüências.

Estes dados também mostraram uma correlação direta entre o teor de α -hélice e a capacidade de permeabilização: quanto maior a capacidade de se estruturar em α -hélice, maior a permeabilização do peptídeo frente a um mimético de membrana.

Para complementar estes estudos, determinou-se também a estrutura destes peptídeos nos dois lipossomas descritos anteriormente, um contendo PE e outro SM (figuras 59 e 60, respectivamente).

Diferentemente do encontrado nas micelas, os espectros de CD em PE:PA:PC foram muito semelhantes, indicando mesmo tipo e teor de estrutura para todos os quatro peptídeos. A diferença de estruturação encontrada pode estar relacionada à diferença do agregado formado pelos detergentes e pelos lipídeos. Enquanto o segundo representa a membrana intacta, e representa um modelo ideal para estudar a interação inicial do peptídeo com a membrana, a micela pode ser considerada um modelo que mimetiza a membrana após a formação do poro.

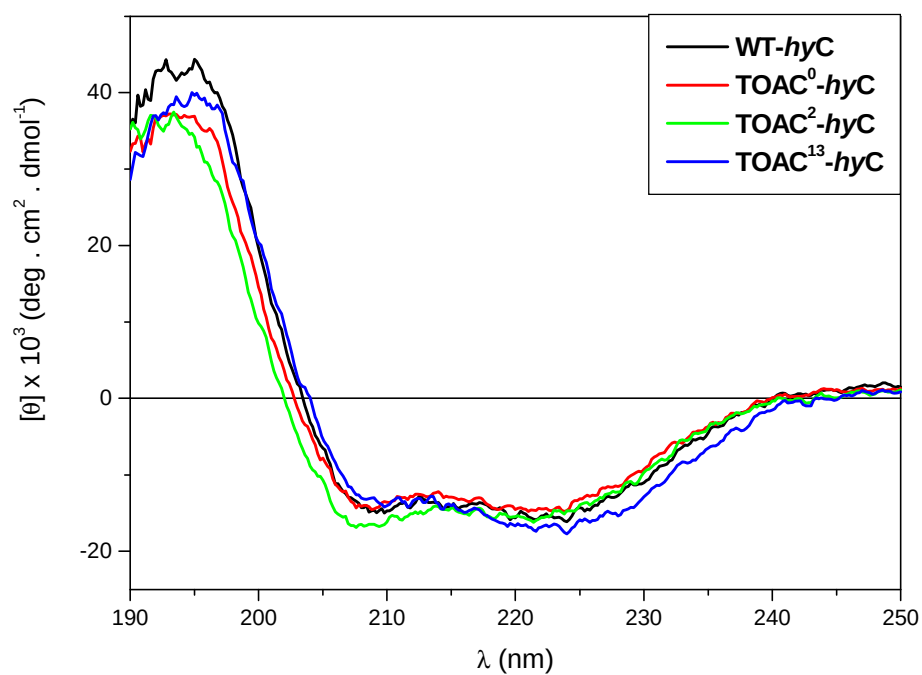


Figura 59: Espectro de CD dos peptídeos com $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ em vesículas contendo PE:PA:PC.

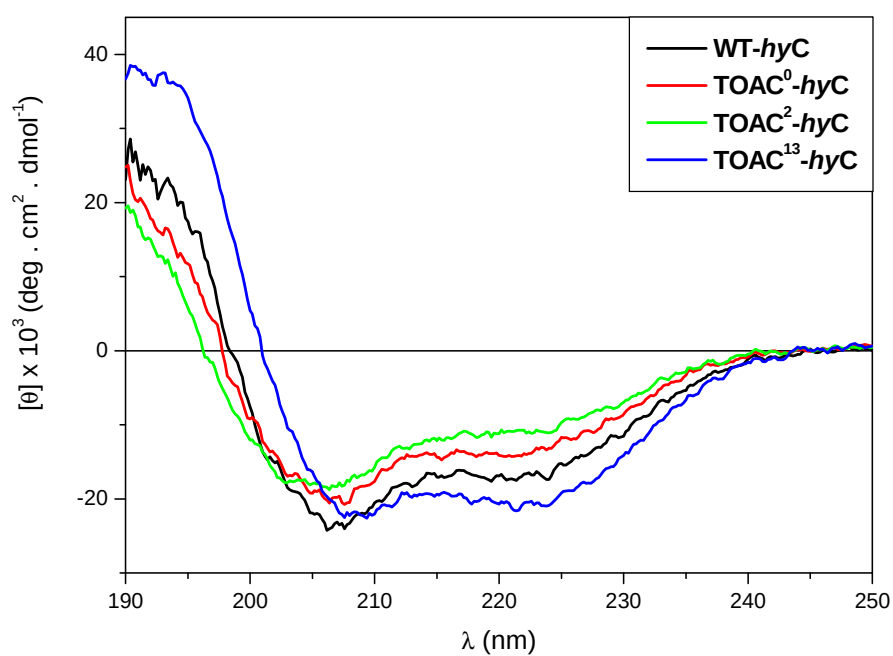


Figura 60: Espectro de CD dos peptídeos com $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ em vesículas contendo SM:PA:PC.

A análise em pormenores dos espectros de CD em lipossomas contendo PE indica a formação de estrutura do tipo “coiled-coil”, α -hélice enrolada em α -hélice. Este tipo de estrutura pode ser encontrado quando a razão $\theta_{222}/\theta_{208}$ for maior que 1 (DELUCA et al., 2003; HODGES, 1996; SU et al., 1994). Os peptídeos que apresentaram a menor e maior relação acima foram o TOAC²-hyC e o TOAC¹³-hyC, respectivamente. Se compararmos estes dados com os de permeabilização, podemos dizer que, quanto maior a formação de estruturas do tipo “coiled-coil”, para estes peptídeos, maior a capacidade de formação de poros.

Os espectros de CD obtidos para os lipossomas contendo SM mostraram resultados diferentes. Todos os peptídeos apresentaram estruturas do tipo α -hélice, mas aparentemente sem a formação de “coiled-coil”. Estes dados mostram interações diferentes dos peptídeos com os dois tipos de lipossomas estudados. Somado a isto, os peptídeos que mostraram maior estruturação foram o TOAC¹³-hyC e o WT-hyC, novamente os com maiores valores de permeabilização.

4.7. Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)

Os experimentos de RPE foram realizados nas mesmas condições das análises de CD, facilitando a comparação entre os dados encontrados nestas duas técnicas.

Os espectros dos peptídeos obtidos em solução mostraram um alto grau de mobilidade das cadeias peptídicas (figura 61), apresentando apenas um componente em sua estrutura. A análise comparativa entre os 3 peptídeos mostra que a maior imobilidade é encontrada para o peptídeo TOAC¹³-hyC, onde podemos visualizar linhas mais alargadas e maior valor da largura da linha do pico central, da razão de alturas e do tempo de correlação rotacional (τ_c) (tabela 9).

Tabela 9: Valores dos parâmetros obtidos dos espectros de RPE dos peptídeos marcados com TOAC nos diferentes meios estudados.

Condição	Peptídeo	h_0/h_{-1}	h_0/h_{+1}	W_0	τ_c (ns)
H₂O	TOAC ⁰ -hyC	1,03	1,82	1,1	0,26
	TOAC ² -hyC	1,14	2,58	1,2	0,53
	TOAC ¹³ -hyC	1,21	3,59	1,9	1,24
LPC	TOAC ⁰ -hyC	1,81	7,63	2,0	2,76
	TOAC ² -hyC	*	*	5,1	*
	TOAC ¹³ -hyC	*	*	6,8	*
PE:PA:PC	TOAC ⁰ -hyC	1,08	1,76	1,5	0,36
	TOAC ² -hyC	1,24	2,11	3,0	1,11
	TOAC ¹³ -hyC	*	*	10,3	*
SM:PA:PC	TOAC ⁰ -hyC	1,10	1,72	1,5	0,35
	TOAC ² -hyC	1,11	1,77	1,5	0,38
	TOAC ¹³ -hyC	1,40	3,46	2,0	1,37

*nd - não determinado.

Este resultado está coerente com o fato deste aminoácido estar no centro da sequência, onde, por predição de estrutura obtida no sítio *Predict Protein Server* (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html), o peptídeo selvagem encontra-se estruturado em α -hélice.

Quadro 3: Predição da estrutura para o peptídeo “Wild Type”.

POSIÇÃO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
“Wild Type”	G	W	L	D	V	A	K	K	I	G	K	A	A	F	N	V	A	K	N	F	I
Predição	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	c	c	e

(h) α -hélice, (e) estrutura estendida, (c) estrutura ao acaso.

Como o esperado, a maior mobilidade foi encontrada para o TOAC⁰-hyC, pois como a sonda está localizada na extremidade, ela apresenta um menor impedimento estérico, o que pode ser comprovado pelos parâmetros de mobilidade encontrados na tabela 9: quanto menores os valores de h_0/h_{-1} , h_0/h_{+1} e τ_c , mais móvel a sonda se encontra no ambiente estudado.

A interação dos peptídeos com as micelas ocasionou uma mudança drástica nos espectros de RPE (figura 62). Todas as seqüências mostraram alargamento das linhas espectrais, comprovando, como obtido por fluorescência e CD, a inserção do peptídeo na micela.

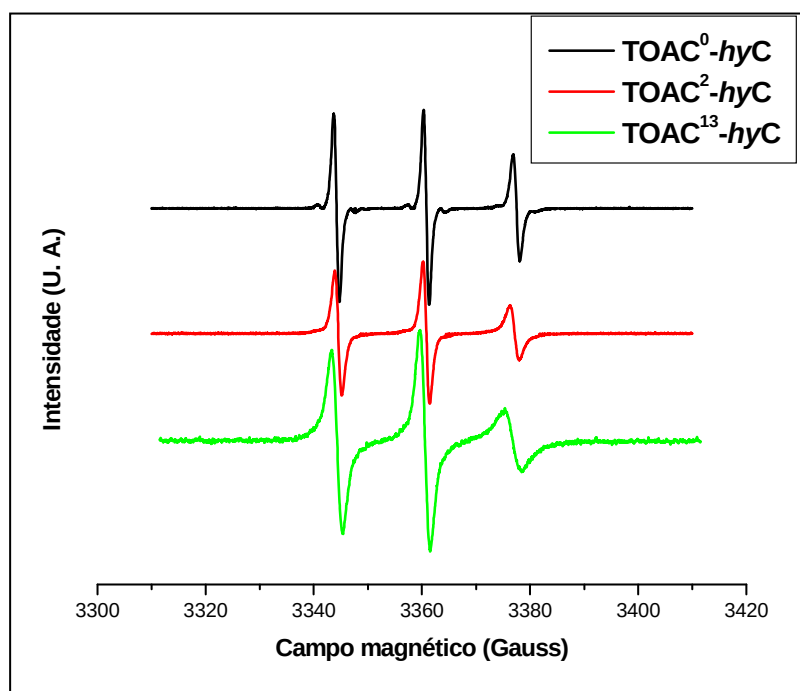


Figura 61: Espectro de RPE dos análogos contendo TOAC ($80 \mu\text{mol L}^{-1}$) em solução aquosa.

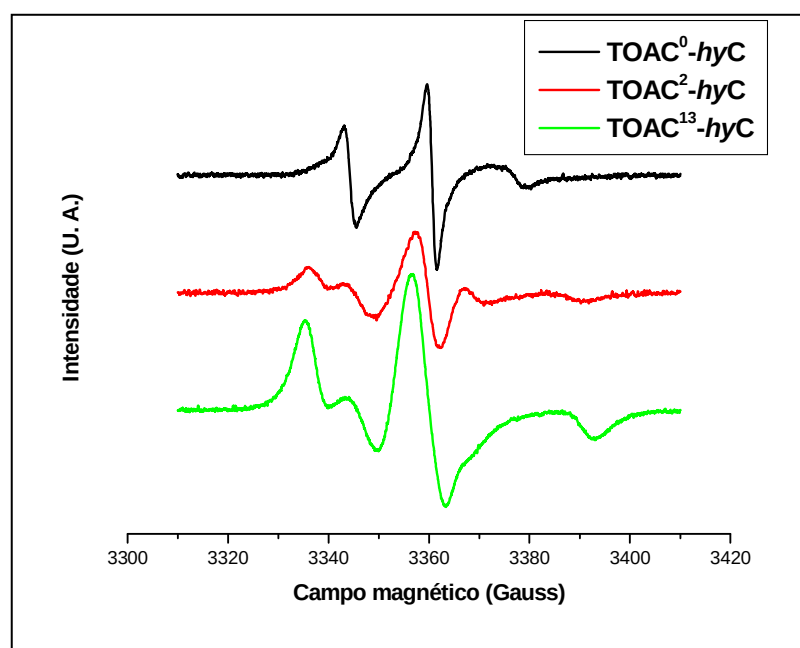


Figura 62: Espectro de RPE dos análogos contendo TOAC ($80 \mu\text{mol L}^{-1}$) em 10 mmol L^{-1} de LPC.

Por meio dos espectros obtidos, é possível observar que a região central da molécula, em torno do 13º resíduo, é a mais inserida na micela, pois o TOAC¹³-hyC apresenta espectros mais alargados, parecidos com espectros obtidos de amostras policristalinas. O espectro do peptídeo na posição 2 apresenta dois componentes. Desta forma, é possível especular que esta posição está localizada entre as cabeças polares do detergente e a solução aquosa.

O TOAC⁰-hyC também apresenta um alargamento das linhas espectrais, mas esta imobilização pode ser um reflexo da inserção do restante da cadeia na micela, sendo que a extremidade N-terminal do peptídeo está em contato com a fase aquosa e fora da estrutura micelar.

Os espectros de RPE em lipossomas (figuras 63 e 64) apresentaram resultados semelhantes aos encontrados na micela de LPC, isto é, a região mais inserida e imóvel é a próxima do 13º resíduo, seguido da posição 2, na interface da bicamada, sendo que a extremidade N-terminal está exposta ao solvente.

Comparando os dois lipossomas, o que apresentou maior interação com os peptídeos foi o contendo PE. Neste lipossoma é possível visualizar facilmente duas populações diferentes para o TOAC²-hyC, enquanto que, para o contendo SM, esta segunda população aparece em concentração muito pequena. Além disto, o análogo TOAC¹³-hyC em PE apresenta um espectro praticamente de amostras policristalinas, enquanto que em SM este peptídeo apresenta duas populações distintas, uma móvel e outra imóvel.

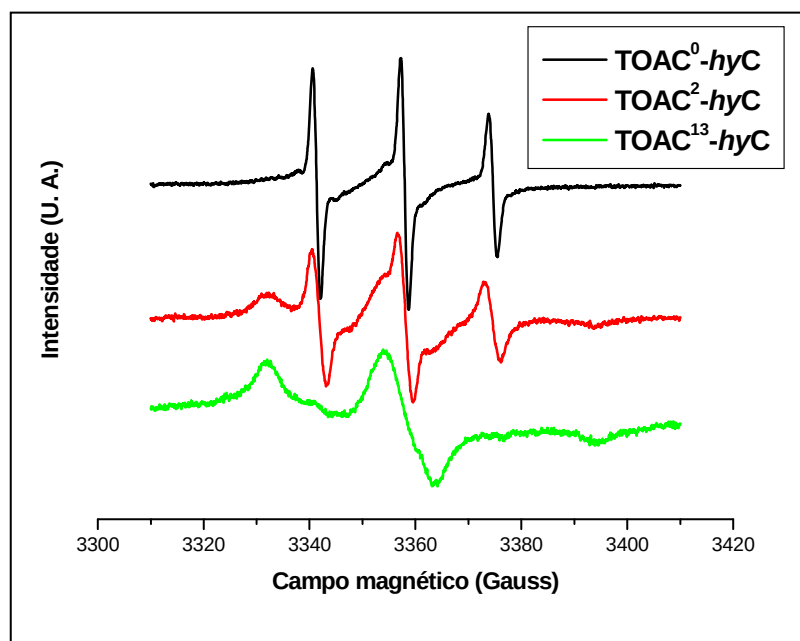


Figura 63: Espectro de RPE dos análogos contendo TOAC ($20 \mu\text{mol L}^{-1}$) em $0,8 \text{ mmol L}^{-1}$ de vesículas contendo PE:PA:PC.

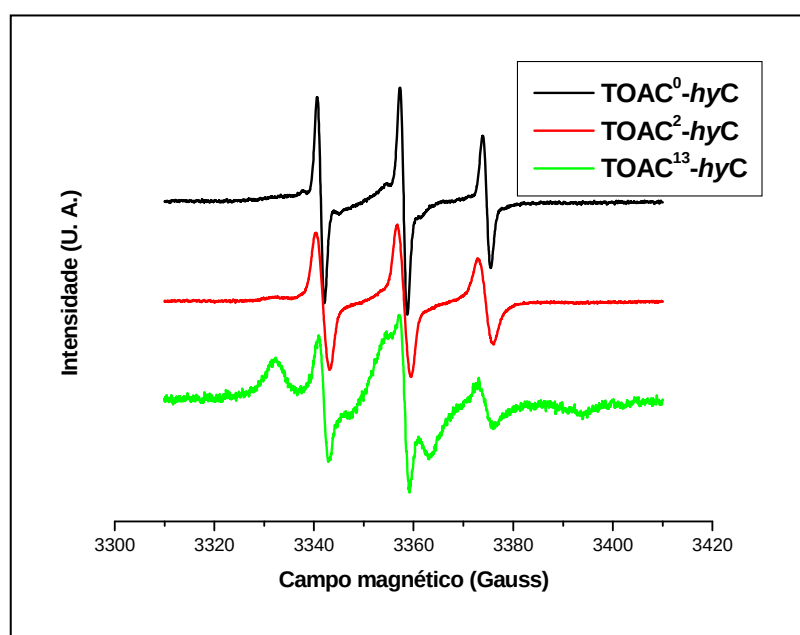


Figura 64: Espectro de RPE dos análogos contendo TOAC ($20 \mu\text{mol L}^{-1}$) em $0,8 \text{ mmol L}^{-1}$ de vesículas contendo SM:PA:PC.

5. CONCLUSÕES

1. A metodologia de Síntese Peptídica em Fase Sólida, utilizando-se a estratégia Fmoc, mostrou-se viável para a obtenção do peptídeo selvagem e dos contendo o aminoácido TOAC. O principal problema foi o acoplamento do aminoácido após o grupo TOAC que mostrou dificuldades, necessitando de condições reacionais mais agressivas e de agentes acoplantes mais reativos.
 2. A clivagem utilizando TFA causou a protonação do grupo NO existente no TOAC, necessitando da realização da etapa de reversão. A purificação utilizando TFA - normalmente utilizada em nosso laboratório e usada na literatura para peptídeos contendo TOAC (MARTIN et. Al., 2001) - também não foi eficiente, pois parte do grupo NO era protonada, sendo este ácido substituído pelo tampão acetato de amônio em pH 5. A CLAE utilizando este tampão resolveu este problema de protonação.
 3. Todos os análogos peptídeos testados mostraram atividades biológicas, indicando que a substituição ou adição de um resíduo pelo TOAC, não afetou significativamente a atividade destas moléculas, viabilizando o uso desta sonda paramagnética para os estudos deste peptídeo. O análogo TOAC¹³-hyC apresentou atividade antifúngica e hemolítica maior que o WT-hyC, sendo que a atividade antimicrobiana manteve-se a mesma. Já o peptídeo TOAC⁰-hyC foi o que mostrou as menores atividades antibacterianas, indicando a importância da porção N-terminal deste peptídeo em sua atividade.
 4. Os resultados de permeabilização demonstraram que todos os peptídeos possuem esta ação sobre as vesículas testadas, sendo que o peptídeo contendo o TOAC na posição 2 foi o que menos apresentou atividade, indicando que esta posição é importante para a atividade deste peptídeo. Na comparação entre os lipossomas, a maior atividade foi encontrada para as contendo SM, indicando maior afinidade dos peptídeos com este lipídio.
-

5. Os dados de interação dos peptídeos com os miméticos de membrana obtidos por meio da fluorescência, não mostraram diferenças de interação entre os peptídeos e as vesículas de diferentes composições. No entanto, quando comparamos os peptídeos entre si, o que mais mostrou inserção nos lipossomas estudados foi o TOAC¹³-HyC.
 6. Os experimentos de CD em solução aquosa, em TFE, SDS e LPC indicaram que os peptídeos sofrem alterações estruturais quando migram do meio aquoso para estes sistemas, passando de uma estrutura ao acaso para uma estrutura em α -hélice. Estes dados também mostram uma correlação direta entre o teor de α -hélice obtido nestes sistemas com a capacidade de permeabilização: quanto maior a capacidade de se estruturar em α -hélice em micelas, maior a permeabilização do peptídeo. Os espectros obtidos nos dois lipossomas mostraram diferenças significativas na interação com os peptídeos em função de sua composição. Nos de PE, a estrutura encontrada foi do tipo “coiled-coil”, enquanto que no contendo SM foi a α -hélice.
 7. Os dados de RPE indicaram que todos os peptídeos interagem com as micelas, sendo que a posição 13 apresenta a menor mobilidade, seguida da posição 2. Desta forma, neste modelo de membrana a topologia do peptídeo seria a extremidade N-terminal em contato com a solução aquosa, a posição 2 entre as cabeças polares do detergente e a solução aquosa e a 13 imersa na micela. Em lipossomas contendo PE, de um modo geral, a topologia obtida foi a mesma, no entanto, com modelos contendo o lipídeo SM, a presença de uma população mais móvel, parece indicar uma diferente estruturação e/ou teor de interação dos peptídeos.
 8. Entre as técnicas empregadas, a que apresentou a melhor possibilidade de visualização da topologia do peptídeo foi a RPE.
 9. Neste trabalho, foi possível verificar que cada técnica possibilita a obtenção de informações diferentes, porém complementares.
 10. As informações obtidas neste trabalho propiciaram a obtenção de dados que podem ajudar a descrever o mecanismo de ação do peptídeo hilina C.
-

6. PERSPECTIVAS

Para a obtenção de maiores informações sobre as dinâmicas e a estruturação do peptídeo selvagem e dos seus análogos, alguns experimentos podem ser realizados para ajudar na elucidação do seu modo de ação frente às membranas biológicas:

1. Experimentos como CD orientado ou Ressonância Magnética Nuclear, que podem elucidar as diferentes estruturas peptídicas nas duas composições de vesículas estudadas.
 2. Estudos com fosfolipídios contendo o marcador de spin TOAC em diferentes posições da cadeia hidrocarbonada, para comparação do comportamento do peptídeo selvagem (WT-*hyC*) em relação aos peptídeos contendo TOAC em sua estrutura.
 3. Estudos de interação peptídeo-membrana em diferentes pHs, para avaliar a importância da carga da sequência na interação com as membranas estudadas.
 4. Experimentos de RPE utilizando a supressão do TOAC contido nos peptídeos pelo O₂, o que proporcionará informações complementares sobre a posição da sequência nos miméticos de membrana.
 5. Obtenção da constante de afinidade do peptídeo com os sistemas lipídicos estudados, por meio da titulação do peptídeo com diferentes concentrações dos lipídeos estudados, pela técnica de RPE.
 6. Substituição do aminoácido paramagnético TOAC dos peptídeos por resíduos de cisteína e subsequente marcação com o spin label metanotiosulfonato (MTSL), a fim de estudar a influência da rigidez do grupo TOAC na sequência peptídica.
-

REFERÊNCIAS

ALSTON, R. W.; LASAGNA, M.; GRIMSLEY, G. R.; SCHOLTZ, J. M.; REINHART, G. D.; PACE, C. N. Peptide sequence and conformation strongly influence tryptophan fluorescence. **Biophysical Journal**, v. 94, n. 6, p. 2280-2287, 2008.

APPONYI, M. A.; PUKALA, T. L.; BRINKWORTH, C. S.; MASELLI, V. A.; BOWIE, J. H.; TYLER, M. J.; BOOKER, G. W.; WALLACE, J. C.; JOHN, A.; SEPAROVIC, F.; DOYLE, J.; LLEWELLYN, L. E. Host-defence peptides of Australian anurans: structure, mechanism of action and evolutionary significance. **Peptides**, v. 25, n. 6, p. 1035-1054, 2004.

BARBOSA, S. R.; CILLI, E. M.; LAMY-FREUND, M. T.; CASTRUCCI, A. M. L.; NAKAIE, C. R. First synthesis of a fully active spin-labeled peptide hormone. **Febs Letters**, v. 446, n. 1, p. 45-48, 1999.

BENINCASA, M.; SCOCCHI, M.; PACOR, S.; TOSSI, A.; NOBILI, D.; BASAGLIA, G.; BUSETTI, M.; GENNARO, R. Fungicidal activity of five cathelicidin peptides against clinically isolated yeasts. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, n. 5, p. 950-959, 2006.

BERLINER, L. J.; REUBEN, J. **Spin labeling: theory and applications**. New York: Plenum Press, 1989. 346 p.

BESSIN, Y.; SAINT, N.; MARRI, L.; MARCHINI, D.; MOLLE, G. Antibacterial activity and pore-forming properties of ceratotoxins: a mechanism of action based on the barrel stave model. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1667, p. 148-156, 2004.

BREUKINK, E.; DE KRUIJFF, B. The lantibiotic nisin, a special case or not? **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1462 n. 1-2, p. 223-234, 1999.

BRIERE, R.; LEMAIRE, H.; RASSAT, A. Nitroxides 15 - synthese et etude de radicaux libres stables piperidiniques et pyrrolidiniques. **Bulletin de la Societe Chimique de France**, n. 11, p. 3273-3281, 1965.

BUI, T. T. T.; FORMAGGIO, F.; CRISMA, M.; MONACO, V.; TONIOLO, C.; HUSSAIN, R.; SILIGARDI, G. TOAC: a useful C α -tetrasubstituted α -amino acid for peptide conformational analysis by CD spectroscopy in the visible region. Part I. **Perkin 2**, n. 5, p. 1043-1046, 2000.

- CANNON, B.; POLNASZEK, C. F.; BUTLER, K. W.; ERIKSSON, L. E. G.; SMITH, I. C. P. Fluidity and organization of mitochondrial-membrane lipids of brown adipose-tissue of cold-adapted rats and hamsters as determined by nitroxide spin probes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 167, n. 2, p. 505-518, 1975.
- CAO, W.; ZHOU, Y.; MA, Y.; LUO, Q.; WEI, D. N. Expression and purification of antimicrobial peptide adenoregulin with C-amidated terminus in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, v. 40, n. 2, p. 404-410, 2005.
- CARPINO, L. A.; EL-FAHAM, A.; ALBERICIO, F. Racemization studies during solid-phase peptide synthesis using azabenzotriazole-based coupling reagents. **Tetrahedron Letters**, v. 35, n. 15, p. 2279-82, 1994.
- CASALLANOVO, F.; OLIVEIRA, F. J. F. de; SOUZA, F. C. de; ROS, U.; MARTINEZ, Y.; PENTON, D.; TEJUCA, M.; MARTINEZ, D.; PAZOS, F.; PERTINHEZ, T. A.; SPISNI, A.; CILLI, E. M.; LANIO, M. E.; ALVAREZ, C.; SCHREIER, S. Model peptides mimic the structure and function of the N-terminus of the pore-forming toxin sticholysin II. **Biopolymers**, v. 84, n. 2, p. 169-180, 2006.
- CASTRO, M. S.; MATSUSHITA, R. H.; SEBBEN, A.; SOUSA, M. V.; FONTES, W. Hylins: bombinins H structurally related peptides from the skin secretion of the brazilian tree-frog *hyla biobeba*. **Protein and Peptide Letters**, v. 12, n. 1, p. 89-93, 2005.
- CASTRO, M. S.; FERREIRA, T. C. G.; CILLI, E. F.; CRUSCA, E. Jr.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; SEBBEN, A.; RICART, C. A. O.; SOUZA, M. V.; FONTES, W. Hylin a1, the first cytolytic peptide isolated from arboreal south american frog *Hypsiboas albopunctatus* ("spotted treefrog"). **Peptides**, v. 30, p. 291-296, 2009.
- CESPEDES, G. F. **Sínteses e estudos estrutura/função de um peptídeo extraído da rã *Hypsiboas albopunctatus* e Análogos**. 2009. 93 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.
- CHEN, Y.; BARKLEY, M. D. Toward understanding tryptophan fluorescence in proteins. **Biochemistry**, v.37, n. 28, p. 9976-9982, 1998.
- CHEN, Y.; MANT, C. T.; FARMER, S. W.; HANCOCK, R. E. W.; VASIL, M. L.; HODGES, R. S. Rational design of α -helical antimicrobial peptides with enhanced activities and specificity/therapeutic index. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 13, p. 12316-12329, 2005.
- CHEN, Y. H.; LUDESCHER, R. D.; MONTVILLE, T. J. Influence of lipid composition on pediocin PA-1 binding to phospholipid vesicles. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 9, p. 3530-3532, 1998.

CILLI, E. M.; MARCHETTO, R.; SCHREIER, S.; NAKAIE, C. R. Use of spin label EPR spectra to monitor peptide chain aggregation inside resin beads. **Tetrahedron Letters**, v. 38, n. 4, p. 517-520, 1997.

CILLI, E. M.; MARCHETTO, R.; SCHREIER, S.; NAKAIE, C. R. Correlation between the mobility of spin-labeled peptide chains and resin solvation: an approach to optimize the synthesis of aggregating sequences. **Journal of Organic Chemistry**, v. 64, n. 25, p. 9118-9123, 1999.

CILLI, E. M.; VICENTE, E. F.; CRUSCA, J.; NAKAIE, C. R. EPR investigation of the influence of side chain protecting groups on peptide-resin solvation of the Asx and Glx model containing peptides. **Tetrahedron Letters**, v. 48, n. 31, p. 5521-5524, 2007.

CRUSCA, E.; GONCALVES, A.; MARCHETTO, R.; FONTES, W.; CASTRO, M. S.; CILLI, E. M. Biological studies of the peptide Hy-a1 and analogs. **Journal of Peptide Science**, v. 14, n. 8, p. 104-105, 2008.

DELUCA, D.; WOHLKE, G.; MORODER, L. Synthesis and conformational characterization of peptides related to the neck domain of a fungal kinesin. **Journal of Peptide Science**, v. 9, n. 4, p. 203-211, 2003.

EFTINK, M. R.; GHIRON, C. A. Fluorescence quenching of indole and model micelle systems. **Journal of Physical Chemistry**, v. 80, n. 5, p. 486-493, 1976.

FASMAN, G. D. (Ed.) **Handbook of biochemistry and molecular biology: proteins**. New York: Plenum Press, 1976. v. 3.

FLEMING, E.; MAHARAJ, N. P.; CHEN, J. L.; NELSON, R. B.; ELMORE, D. E. Effect of lipid composition on buforin II structure and membrane entry. **Proteins-Structure Function and Bioinformatics**, v. 73, n. 2, p. 480-491, 2008.

FREED, J. H.; FRAENKEL, G. K. Theory of linewidths in electron spin resonance spectra. **Journal of Chemical Physics**, v. 39, n. 2, p. 326-334, 1963.

HODGES, R. S. Boehringer mannheim award lecture 1995. La conference boehringer mannheim 1995. De novo design of alpha-helical proteins: basic research to medical applications. **Biochemistry Cell Biology**, v. 74, n. 2, p. 133-154, 1996.

ITO, J. A. Técnicas espectroscópicas em biofísica. **Caderno de Física da UEFS**, v. 3, n. 1, p. 21-29, 2004.

JENSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R. E. W. Peptide antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 3, p. 491-511, 2006.

KAISER, E.; COLESCOTT, R. L.; BOSSINGER, C. D.; COOK, P. I. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. **Analytical Biochemistry**, v. 34, n. 2, p. 595-598, 1970.

KIVELSON, D. Theory of ESR linewidths of free radicals. **Journal of Chemical Physics**, v. 33, n. 4, p. 1094-1106, 1960.

KREIMER, D. I.; MALAK, H.; LAKOWICZ, J. R.; TRAKHANOV, S.; VILLAR, E.; SHNYROV, V. L. Thermodynamics and dynamics of histidine-binding protein, the water-soluble receptor of histidine permease. Implications for the transport of high and low affinity ligands. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 13, p. 4242-4252, 2000.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. New York: Plenum Press, 1983.

LIKHTENSHEIN, G. I. **Spin labeling methods in molecular biology**. New York: Wiley-Interscience, 1976.

LOPES, D. D.; POLETTI, E. F.; VIEIRA, R. F. F.; JUBILUT, G. N.; OLIVEIRA, L.; PAIVA, A. C. M.; SCHREIER, S.; NAKAIE, C. R. A proposed EPR approach to evaluating agonist binding site of a peptide receptor. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 14, n. 2, p. 121-126, 2008.

MANGONI, M. L.; PAPO, N.; MIGNOGNA, G.; ANDREU, D.; SHAI, Y.; BARRA, D.; SIMMACO, M. Ranacyclins, a new family of short cyclic antimicrobial peptides: biological function, mode of action, and parameters involved in target specificity. **Biochemistry**, v. 42, n. 47, p. 14023-14035, 2003.

MARCHETTO, R.; SCHREIER, S.; NAKAIE, C. R. A novel spin-labeled amino acid derivative for use in peptide synthesis - (9-fluorenylmethyloxycarbonyl)-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl-4-amino-4-carboxylic acid. **Journal of the American Chemical Society**, v. 115, n. 23, p. 11042-11043, 1993.

MARSH, D.; JOST, M.; PEGGION, C.; TONIOLO, C. TOAC spin labels in the backbone of alamethicin: EPR studies in lipid membranes. **Biophysical Journal**, v. 92, n. 2, p. 473-481, 2007.

MARTIN, L.; IVANCICH, A.; VITA, C.; FORMAGGIO, F.; TONIOLO, C. Solid-phase synthesis of peptides containing the spin-labeled 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl-4-amino-4-carboxylic acid (TOAC). **Journal of Peptide Research**, v. 58, p. 424-432, 2001.

-
- McNULTY, J. C.; THOMPSON, D. A.; CARRASCO, M. R.; MILLHAUSER, G. L. Dap-SL: a new site-directed nitroxide spin labeling approach for determining structure and motions in synthesized peptides and proteins. **Febs Letters**, v. 529, n. 2-3, p. 243-248, 2002.
- MERRIFIELD, R. B. Solid phase peptide synthesis. The synthesis of a tetrapeptide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, n. 14, p. 2149-54, 1963.
- MERRIFIELD, E. L.; MITCHELL, S. A.; UBACH, J.; BOMAN, H. G.; ANDREU, D.; MERRIFIELD, R. B. D-enantiomers of 15-residue cecropin A - melittin hybrids. **International Journal of Peptide and Protein Research**, v. 46, n. 3-4, p. 214-220, 1995.
- MORAIS, L. G. M.; FAZIO, A. M.; VIEIRA, R. F. F.; NAKAIE, R. C.; MIRANDA, M. T. M.; SCHREIER, S.; DAFFRE, S.; MIRANDA, A. Conformational and functional studies of gomesin analogues by CD, EPR and fluorescence spectroscopies. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1768, n. 1, p. 52-58, 2007.
- NAKAIE, C. R.; SCHREIER, S.; PAIVA, A. C. M. Synthesis and properties of spin-labeled angiotensin derivatives. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 742, n. 1, p. 63-71, 1983.
- NAKAIE, C. R.; GOISSIS, G.; SCHREIER, S.; PAIVA, A. C. M. Ph-dependence of electron paramagnetic resonance spectra of nitroxides containing ionizable groups. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 14, n. 2-3, p. 173-180, 1981.
- NAKAIE, C. R.; SILVA, E. G.; CILLI, E. M.; MARCHETTO, R.; SCHREIER, S.; PAIVA, T. B.; PAIVA, A. C. M. Synthesis and pharmacological properties of TOAC-labeled angiotensin and bradykinin analogs. **Peptides**, v. 23, n. 1, p. 65-70, 2002.
- NAKAIE, C. R.; BARBOSA, S. R.; VIEIRA, R. F. F.; FERNANDEZ, R. M.; CILLI, E. M.; CASTRUCCI, A. M. L.; VISCONTI, M. A.; ITO, A. S.; LAMY-FREUND, M. T. Comparative EPR and fluorescence conformational studies of fully active spin-labeled melanotropic peptides. **Febs Letters**, v. 497, n. 2-3, p. 103-107, 2001.
- NESGAARD, L.; VAD, B.; CHRISTIANSEN, G.; OTZEN, D. Kinetic partitioning between aggregation and vesicle permeabilization by modified Adan. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1794, p. 84-93, 2009.
- NEWSTADT, J. P.; MAYO, D. J.; INBARAJ, J. J.; SUBBARAMAN, N.; LORIGAN, G. A. Determining the helical tilt of membrane peptides using electron paramagnetic resonance spectroscopy. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 198, n. 1, p. 1-7, 2009.
-

- OLIVEIRA, E.; CILLI, E. M.; MIRANDA, A.; JUBILUT, G. N.; ALBERICIO, F.; ANDREU, D.; PAIVA, A. C. M.; SCHREIER, S.; TOMINAGA, M.; NAKAIE, C. R. Monitoring the chemical assembly of a transmembrane bradykinin receptor fragment: correlation between resin solvation, peptide chain mobility, and rate of coupling. **European Journal of Organic Chemistry**, n. 21, p. 3686-3694, 2002.
- ONUMA, Y.; SATAKE, M.; UKENA, T.; ROUX, J.; CHANTEAU, S.; RASOLOFONIRINA, N.; RATSIMALOTO, M.; NAOKI, H.; YASUMOTO, T. Identification of putative palytoxin as the cause of clupeotoxism. **Toxicon**, n. 37, p. 55-65, 1999.
- PISPISA, B.; STELLA, L.; VENANZI, M.; PALLESCHI, A.; MARCHIORI, F.; POLESE, A.; TONIOLO, C. A spectroscopic and molecular mechanics investigation on a series of AIB-based linear peptides and a peptide template, both containing tryptophan and a nitroxide derivative as probes. **Biopolymers**, v. 53, n. 2, p. 169-181, 2000.
- PISTOLESI, S.; POGNI, R.; FEIX, J. B. Membrane insertion and bilayer perturbation by antimicrobial peptide CM15. **Biophysical Journal**, v. 93, n. 5, p. 1651-1660, 2007.
- RIBEIRO, S. C. F.; SCHREIER, S.; NAKAIE, C. R.; CILLI, E. M. Effect of temperature on peptide chain aggregation: an EPR study of model peptidyl-resins. **Tetrahedron Letters**, v. 42, n. 19, p. 3243-3246, 2001.
- ROCCATANO, D.; COLOMBO, G.; FIORONI, M.; MARK, A. E. Mechanism by which 2,2,2-trifluoroethanol/water mixtures stabilize secondary-structure formation in peptides: a molecular study. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 99, n. 19, p. 12179-12184, 2002.
- SALNIKOV, E. S.; ERILOV, D. A.; MILOV, A. D.; TSVETKOV, Y.; PEGGION, C.; FORMAGGIO, F.; TONIOLO, C.; RAAP, J.; DZUBA, S. A. Location and aggregation of the spin-labeled peptide trichogin GA IV in a phospholipid membrane as revealed by pulsed EPR. **Biophysical Journal**, v. 91, n. 4, p. 1532-1540, 2006.
- SATO, H.; FELIX, J. B. Peptide-membrane interactions and mechanisms of membrane destruction by amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1758, n. 9, p. 1245-1256, 2006.
- SCHREIER, S.; BARBOSA, S. R.; CASALLANOVO, F.; VIEIRA, R. D. F.; CILLI, E. M.; PAIVA, A. C. M.; NAKAIE, C. R. Conformational basis for the biological activity of TOAC-labeled angiotensin II and bradykinin: electron paramagnetic resonance, circular dichroism, and fluorescence studies. **Biopolymers**, v. 74, n. 5, p. 389-402, 2004.

SHAHIDULLAH, K.; LONDON, E. Effect of lipid composition on the topography of membrane-associated hydrophobic helices: stabilization of transmembrane topography by anionic lipids. **Journal of Molecular Biology**, v. 379, n. 4, p. 704-718, 2008.

SHAI, Y. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. **Biopolymers**, v. 66, n. 4, p. 236-248, 2002.

SHIN, S. Y.; YANG, S. T.; PARK, E. J.; EOM, S. H.; SONG, W. K.; KIM, J. I.; LEE, S. H.; LEE, M. K.; LEE, D. G.; HAHM, K. S.; KIM, Y. Antibacterial, antitumor and hemolytic activities of α -helical antibiotic peptide, P18 and its analogs. **Journal of Peptide Research**, v. 58, n. 6, p. 504, 2005.

SIMAS, E. R. **Síntese, caracterização e estudo das propriedades fotofísicas de um copolímero derivado de quinolina**. 2005. 57 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Faculdade de Engenharia e Ciências dos Materiais, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

SITARAM, N.; NAGARAJ, R. Interaction of antimicrobial peptides with biological and model membranes: structural and charge requirements for activity. **Biochimica et Biophysica Acta, Biomembranes**, v. 1462, n. 1-2, p. 29-54, 1999.

SMITH, I. C. P.; SCHREIER-MUCILO, S.; MARSH, D. **Free radicals in biology**. New York: Academic Press, 1976. 149 p.

SU, J. Y.; HODGES, R. S.; KAY, C. M. Effect of chain length on the formation and stability of synthetic alpha-helical coiled coils. **Biochemistry**, v. 33, n. 51, p. 15501-15510, 1994.

TOKE, O. Antimicrobial peptides: new candidates in the fight against bacterial infections. **Biopolymers**, v. 80, n. 6, p. 717-735, 2005.

TONIOLO, C.; CRISMA, M.; FORMAGGIO, F. TOAC, a nitroxide spin-labeled, achiral C α -tetrasubstituted α -amino acid, is an excellent tool in material science and biochemistry. **Biopolymers**, v. 47, n. 2, p. 153-158, 1998.

TONIOLO, C.; BIANCO, A.; FORMAGGIO, F.; CRISMA, M.; BONORA, G. M.; BENEDETTI, E.; DELDUCA, V.; SAVIANO, M.; DIBLASIO, B.; PEDONE, C.; AUBRY, A. The polypeptide 3(10)-helix as a template for molecular recognition studies: structural characterization of a side-chain functionalized octapeptide. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 3, n. 9, p. 1211-1221, 1995.

TRAASETH, N. J.; VERARDI, R.; TORGERSEN, K. D.; KARIM, C. B.; THOMAS, D. D.; VEGLIA, G. Spectroscopic validation of the pentameric structure of phospholamban. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 37, p. 14676-14681, 2007.

VIEIRA, R. F. F.; CASALLANOVO, F.; CILLI, E. M.; PAIVA, A. C. M.; SCHREIER, S.; NAKAIE, C. R. Conformational studies of TOAC-labeled bradykinin analogues in model membranes. **Letters in Peptide Science**, v. 9, n. 2-3, p. 83-89, 2003.

YANG, L.; HARROUN, T. A.; WEISS, T. M.; DING, L.; HUANG, H. W. Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. **Biophysical Journal**, v. 81, n. 3, p. 1475-1485, 2001.

YEAMAN, M. R.; YOUNT, N. Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. **Pharmacological Reviews**, v. 55, n. 1, p. 27-55, 2003.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, v. 415, n. 6870, p. 389-395, 2002.

ZHANG, Z.; REMMER, H. A.; THOMAS, D. D.; KARIM, C. B. Backbone dynamics determined by electron paramagnetic resonance to optimize solid-phase peptide synthesis of TOAC-labeled phospholamban. **Biopolymers**, v. 88, n. 1, p. 29-35, 2007.
